DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.05.017

重度烧伤狗肝、肾线粒体呼吸功能及 ATP 含量的变化

茆象千 彭家和 康运生 董燕麟 (第三军医大学生物化学教研室) 630038

提 要 本文用呼吸速率、呼吸控制率(RCR)、磷氧比值(ADP/O)和 ATP 含量为指标,观察了 50% TBSA Ⅲ°烧伤狗肝、肾线粒体呼吸功能的变化。

结果发现,烧伤后肝、肾线粒体呼吸速率增强,而 RCR、ADP/O 和 ATP 含量有明显降低,肝分别降至正常对照组的 43.1%、70.6%和 40.1%;肾分别降至 73.4%、76.2%和 51.4%,差异非常显著($P<0.001$)。伤后立即输液组肝 RCR、ADP/O 和 ATP 分别是正常对照组的 96.5%、95.4%和 89.8%;肾分别是 88.7%、93.5%和 85.0%,均较接近正常对照组,差异不显著($P>0.05$)。结果提示,重度烧伤严重损害肝、肾线粒体正常生理功能,可致线粒体氧化磷酸化生成 ATP 能力降低。而伤后立即输液对肝、肾线粒体功能有明显保护作用。

关键词 严重烧伤;呼吸控制率;磷氧比值;线粒体功能

线粒体是真核细胞内重要的亚细胞结构,是细胞有氧氧化与能量代谢的主要场所,对维持细胞正常生理活动有重要意义[1]。许多病理情况都可造成线粒体结构与功能的损伤[2,3]。呼吸控制率(Respiratory Control Ratio, RCR)、氧化磷酸化效率(ADP/O)与 ATP 的含量可反映线粒体的功能状态。本文用狗重度烧伤模型,观察伤后未输液与立即输液狗的肝、肾线粒体呼吸功能变化及 ATP 含量的变化,为探讨烧伤的损伤机制及治疗方法提供资料。

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

SP-2 溶氧测定控制器(中科院上海植生所),HSC-20R 型高速冷冻离心机(图门离心机厂),DG 3030 发光光度计(南京华东电子管厂)。ATP (Sigma),ADP(中科院上海化学研究所),琥珀酸钠(北京红光化学工厂),荧光素、荧光素酶(二医大生化教研室提供),其它药品均为国产分析纯。

1.2 动物模型与分组

动物模型由烧伤研究所制作提供。选用四川健康杂种雄狗,体重 12~15kg。实验前 1 d 在背部、颈部和四肢外侧去毛,测出 50%体表面积并作出标记。饥饿 12 h。用戊巴比妥钠(25~30mg/kg)静脉麻醉,在标记区内涂 3%凝固汽油,烧 30 s 造成 50%体表面积 Ⅲ° 烧伤。

正常对照组:去毛、麻醉但不致伤,根据 Parkland 公式 3 个 24 h 分别按 3.81±0.81、2.66±0.53 和 2.37±0.46ml/kg 1%BSA 静脉补乳酸林格氏液。烧伤立即输液组:同理,伤后 3 个 24 h 分别按 4.19±0.38、2.36±0.14 和 2.42±0.14ml/kg 1%BSA 补乳酸林格氏液。两组均 72 h 活杀。烧伤未输液组:伤后用 0.25±0.13ml/kg 1%BSA 肝素盐水冲洗导管,平均存活时间 10±4 h 活杀。

1.3 线粒体的制备和呼吸功能测定

1.3.1 线粒体制备

肝线粒体制备按 Johnson 等方法[4]进行。

肾线粒体制备参考 Jung 等方法[5]进行,稍加修改。取肾脏皮质部分,称重制成 1∶8(W/V)匀浆液,其余操作同肝脏线粒体制备。

1.3.2 呼吸功能测定

线粒体呼吸功能测定按 Estabrook 方法[6]进行。

1.4 组织 ATP 含量测定

组织 ATP 含量测定参考 Kimmich 等方法[7]进

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

行。活杀动物后迅速取适量肝、肾组织，并置于液氮内。然后称取 0.2～0.3g 于预冷的研钵中，加入 20 倍体积冷的 0.4mol/L $HClO_4$ 制成匀浆，3 000rpm 离心 5min，取上清 3ml 不断搅拌用 5mol/L K_2CO_3 调至 pH7.6，再离心，取上清 50μl 于比色管，放入发光光度计的暗室内，然后迅速注入 0.1ml 荧光素酶混合液，记录发光初始峰值，即为样品光强度。按标准曲线进行计算，以每克组织微克分子数表示。

2 结果

2.1 烧伤对肝、肾线粒体呼吸速率(S)和呼吸控制率(RCR)的影响

由表 1、2 可以看出，烧伤未输液组肝与肾线粒体呼吸速率和正常对照组相比均有增加，特别是 S_4 增大尤为明显($P<0.01$)，从而 RCR 值下降。烧伤后立即输液组肝、肾线粒体呼吸功能与正常对照组相比较，S_3和 S_4的呼吸速率以及 RCR 值均无明显变化($P>0.05$)。

表 1 烧伤对肝线粒体 S_3、S_4 和 RCR 的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	nmol O_2/mg protein/min S_3	S_4	RCR
正常对照组	3	116.0±2.8	19.2±1.5	6.10±0.40
未输液组	4	120.2±7.9	46.1±4.7*	2.63±0.34*
立即输液组	3	117.5±13.4	20.6±4.6	5.89±1.90

*与正常对照组相比 $P<0.01$

表 2 烧伤对肾线粒体 S_3、S_4 和 RCR 的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	nmol O_2/mg protein/min S_3	S_4	RCR
正常对照组	3	236.1±10.8	47.7±3.5	4.97±0.20
未输液组	5	272.2±4.6	74.7±4.2*	3.65±0.20*
立即输液组	3	258.6±19.7	59.1±9.3	4.41±0.27

*与正常对照组相比 $P<0.01$

2.2 烧伤对肝、肾线粒体氧化磷酸化效率(ADP/O)和组织 ATP 含量的影响

从表 3、4 中可以看处，烧伤可以引起肝、肾线粒体 ADP/O 和组织 ATP 含量都明显降低($P<0.01$)。而烧伤立即输液组与正常对照组相比较，差异不显著($P>0.05$)。

表 3 烧伤对肝线粒体 ADP/O 和组织 ATP 的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ADP/O	ATP (μmol/g 肝)
正常对照组	3	1.74±0.05	1.86±0.24
未输液组	4	1.23±0.06*	0.74±0.14*
立即输液组	3	1.66±0.02	1.67±0.27

*与正常对照组相比 $P<0.01$

表 4 烧伤对肾线粒体 ADP/O 和组织 ATP 的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ADP/O	ATP (μmol/g 肾)
正常对照组	3	1.68±0.04	1.19±0.01
未输液组	5	1.28±0.07*	0.61±0.02*
立即输液组	3	1.57±0.06	1.01±0.02

*与正常对照组相比 $P<0.01$

3 讨论

研究线粒体呼吸功能状态，RCR 是良好的指标，它可以反映线粒体电子传递功能与膜结构的完整[8]，本实验正常对照组测出肝线粒体 RCR 值为 6.10±0.40，肾线粒体为 4.97±0.42，与文献报道相似[5,9]，因而本文线粒体的分离提取方法是能满足实验要求的。

我们观察到烧伤狗肝、肾线粒体的 RCR 值、ADP/O 比值与 ATP 含量全面下降(见图 1、2)。肝脏分别是正常对照组的43.1%、70.6%和 40.1%。这与陈宗荣等[10]报告的烧伤后大鼠肝脏线粒体呼吸功能变化的结果相一致。烧伤后肾脏线粒体呼吸功能变化，我们则尚未查到有关文献。从本文结果看，肾脏分别是正常对照组的 73.4%、76.2%和 51.4%，和肝脏结果相似，说明严重烧伤后肝、肾线粒体均受到损害。烧伤出现的这种线粒体损伤可能与低血流量[11]、低氧供给和内毒素[12]造成线粒体损伤有关。由于线粒体损伤，破坏了线粒体的电子传递系统，降低了线粒体对 ADP 的亲和力，使 ADP 失去了对氧化和磷酸化的控制，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

从而使氧化和磷酸化偶联遭到破坏，造成 ADP/O 比值和 ATP 含量降低。

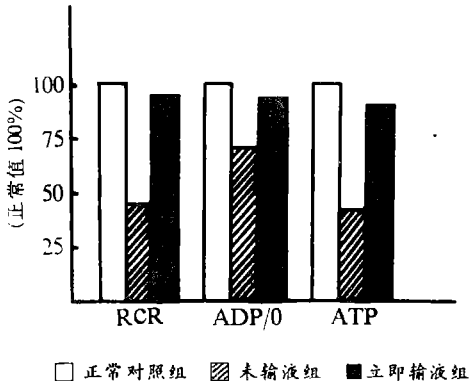


图 1 烧伤肝 RCR、ADP/O 和 ATP 变化比较

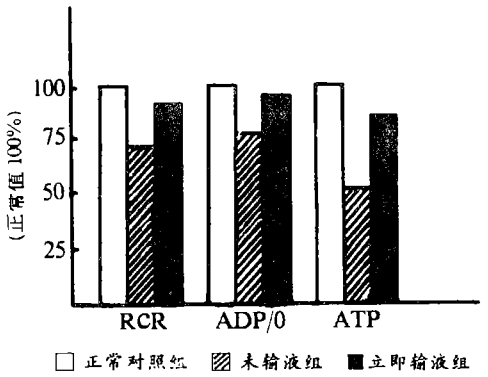


图 2 烧伤肾 RCR、ADP/O 和 ATP 变化比较

关于立即输液对烧伤狗线粒体呼吸功能损伤的影响。从图 1、2 可以看出，立即输液肝、肾线粒体 RCR 值、ADP/O 比值与 ATP 含量均较烧伤组有明显增高，与正常对照组比较无明显差异（$P > 0.05$）。由此可见，烧伤后立即输液，可有助于减少对肝、肾线粒体呼吸功能的损害。结果提示，重度烧伤采用立即输液，对肝、肾正常生理功能有保护作用。有关输液在烧伤并发症防治中的作用仍在继续研究中。

参考文献

1. Kosamond J. The molecular biology of the mitochondrion. Biochem J, 1982; 202: 1
2. Ukikusa M, Kamiyama Y, Sato T, et al. Pathophysiology of hemorrhagic shock. II. Anoxic metablism of the rat liver following acute blood loss in the rat. Circulatory shock, 1981; 8: 483
3. White R, Mela L, Bacalzo L, et al. Hepatic ultrastructure in endotoxemic hemorrhage, and hypoxia: Emphasis on mitochondrial changes. Surgery, 1973; 73: 525
4. Johnson D, Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria. In Colowick SP and Kaplan NO. Ed Methods in Enzymology. New York and Londo: Academic press, 1967: 94
5. Jung K, Pergande M. Influence of cyclosporin A on the respiration of isolated rat kidney mitochondria. FEBS lett, 1985; 183: 2447
6. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarograpic measurement of ADP: O rations. In Colowick SP and Kaplan NO. Ed Methods in Enzymology. Academic press. New York and London: Academic press, 1967; 10: 41
7. Kimmich GA, Randles J, Brand J. Assay of picomole of amounts of ATP, ADP, AMP using the luciferase enzyme system. Anal Biochem, 1975; 69: 187
8. Ganote C, Mcgarr J, Liu S, et al. Oxygen-induced enzymic release: Assessment of mitochondrial function in anoxic myocardial injury and effects of the mitochondrial uncoupling agent 2, 4－dinitrophenol (DNP). J Mol Cell Cardiac, 1980; 12: 387
9. Aprille J, Kom J, Rulfs J. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following injury. J Trauma, 1977; 17: 279
10. 陈宗荣 陈意生 孟小明，等。放射复合伤时大鼠肝线粒体呼吸功能障碍。创伤杂志，1986; 2(1): 7
11. Baue AE, Sayeed MD. Alteration in the functional capacity of mitochondria in hemorrhagic shock. Surgery, 1970; 68: 40
12. Mela L, Bacalzo L, Miller L. Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondrial in hemorrhagic and endotoxin shock. Am J Physiol, 1971; 220: 571

（收稿：1991-10-30；修回：1992-07-17）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Changes of mitochondrial function and hepatic and renal ATP level after severe burn injury in dogs

Mao Xiangqian, Peng Jiahe, Kang Yunsheng, et al (Department of Biochemisty, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Respiratory control rate (RCR), ADT/O ratio and ATP content of the liver and kidneys were determined to evaluate the effects of 50% TBSA third degree burns on the respiratory function of the mitochondria in the liver and kidneys in dogs. It was found that the stage 4 respiratory rate was increased significantly postburn ($P<0.01$). RCR, ADT/O ratio and ATP level were significantly decreased to 43.1%, 70.6% and 40.1% in the liver and 73.4%, 76.2% and 51.4% in the kidneys as compared with those of the normal control ($P>0.01$). Yet in the group of dogs with immediate fluid replecement after burn injury, RCR, ADT/O ratio and ATP level were 96.5%, 95.4% and 98.8% in the liver and 88.7%, 93.5% and 85.0% in the kidneys as compared with those of the normal control ($P>0.05$).

These findings indicate that severe burns can destroy the coupled phosphorylation in the mitochondria and impair their capability to produce ATP. Immediate fluid infusion after burns can protect the mitochondrial function effectively.

Key words severe burns; respiratory control rate; ADT/O ratio; mitochondrial function

误服达美康致低血糖昏迷一例报告

于晓群 (第三军医大学西南医院内分泌科) 630038
雷 撼 (第三军医大学西南医院急诊科) 630038

达美康(Gliclazide)系第二代磺酰脲类口服降血糖药。非糖尿病人误服致低血糖昏迷未见文献报告。现报告我院近期抢救成功一例。

患者 男,84 岁。于 1992 年 2 月 18 日 9、14 和 21 时误服达美康 3 次,每次 3 片,总量 720mg。24 时觉双下肢麻木无力。次晨不能行走。无头痛、呕吐。正常进食。下午进晚餐时,感心慌、手抖、出汗。18 时家人发现患者大汗,四肢及面部肌肉抽搐,持续约 5min,随后意识丧失、呼之不应、鼾声大起,遂送我院。既往无糖尿病、高血压和肝、肾疾病史。无类似发作史。入院查体:BP 25.5/15.5 kPa,呈昏迷状态。呼吸急促,呼出气无酮味。双瞳等大等圆,光反射迟钝。左侧鼻唇沟浅。颈软,双肺满布鼾音。心率 110 次/min、律齐、无杂音。腹部(-)。四肢肌力Ⅱ级以上,肌张力正常。双侧巴氏征(+)、查多克征(+)。因患者有大剂量达美康服用史,即采血查血糖,静注 50% GS 40ml,10% GS 持续静滴,患者意识逐渐恢复,5min 后,能正确回答问题。血糖报告为"0"。ECG 示窦速,轻度心肌缺血改变。证实低血糖昏迷诊断,补糖治疗 3d,监测血糖正常,痊愈出院,短期内随访无后遗症。

讨论

达美康致糖尿病人低血糖昏迷已有文献报告[1]。但致非糖尿病人低血糖昏迷国内外均未见报道。本例患者服用大量达美康(720mg),服药后 33 h 发生昏迷,其原因为达美康在老年人血中半衰期较长(20.5 h)[2],以及老年人器官功能减退,药物代谢减慢,药效叠加。非糖尿病人误服降糖药是低血糖昏迷原因之一[3]。临床上应注意鉴别诊断。发生低血糖昏迷的老年患者,症状和体征多不典型,常发展为重症易误诊为脑血管意外[4]。所以,如有服药史,应立即抢

(下转 462 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net