DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.06.026
第16卷第6期 第三军医大学学报 Vol,16,No.6
1994年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec.1994

经验交流

大鼠脑线粒体呼吸功能测定的方法探讨*

An approach to measure the respiratory activity of isolated cerebral mitochondria in rats

李露斯 郑彩梅 (第三军医大学西南医院神经内科) 630038

线粒体是独特而重要的细胞器。它最主要的功能是通过氧化磷酸化以ADP和无机磷合成ATP供细胞内多种化学反应与功能的能量需要。线粒体的呼吸正常与否,常常能代表线粒体的功能。呼吸控制率(RCR)是表达线粒体功能最灵敏的指标[1]。

国内外不少学者成功地提取了动物肝、心、肾、肺的线粒体并较稳定地测定了其RCR[2]。由于脑线粒体提纯技术复杂,脑组织所含脂类、髓鞘、突触多,脑细胞对缺氧又特别敏感,使对脑线粒体生理与病理状态功能测试工作远远落后于对其它组织的研究[3,4]。国外有一些脑线粒体呼吸功能测定的报道,将其作为一些急性缺血缺氧实验的主要观察指标。国内做此项工作还不多。本文是我实验室一年来研究大鼠脑线粒体形态与功能的条件和方法的探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康Wistar大鼠30只,雌雄皆有,体重180±40 g。由本校动物所提供。

1.2 仪器设备

1.2.1 低温高速离心机(J_2-21型,Beckman)。

1.2.2 氧电板(上海植物生理研究所)。

1.2.3 恒温循环水浴箱(国产)。

1.2.4 记录仪(重庆仪表总厂)。

1.2.5 721分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2.6 电子显微镜(H-300型,日本)。

1.3 药品与试剂

ADP系美国Sigma公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组:(1)脑匀浆组;(2)粗制脑线粒体组;(3)提纯脑线粒体组。每组10只动物。

1.4.2 分离介质:0.025 mol/L蔗糖、0.075 mol/L甘露醇、1 mmol/L EGTA,pH7.4,Tris调。

1.4.3 大鼠脑线粒体的分离,采用改良的Clark技术[3]。

脑匀浆:大鼠断头后在30 s之内迅速取出大脑半球(去除脑干和小脑)浸入带冰渣的分离介质中剪碎,用分离介质洗三次,玻璃匀浆器手工匀浆(8上8下)制得脑匀浆。

粗制脑线粒体:将脑匀浆差速离心,2000×g 3 min,取上清。125 000×g 8 min,沉淀为粗制脑线粒体。

提纯脑线粒体:用3% Ficoll溶液10 ml(3% Ficoll,0.12 mol/L蔗糖,0.03 mol/L甘露醇和25 μmol/L EDTA-K pH7.4)悬浮粗制线粒体,仔细分层入6% Ficoll液20 ml中,(6% Ficoll,0.24 mol/L蔗糖,0.06 mol/L甘露醇和50 μmol/L EDTA,pH7.4),离心10 400×g 30 min,取沉淀,用分离介质再悬浮沉淀离心12 100×g 10 min后得到的沉淀为提纯的脑线粒体。

三种悬浮液均用分离介质稀释至20 mg Protein/ml备用。

以上所有操作均在0~2℃条件下进行,分离介质务必保持有冰渣状态。

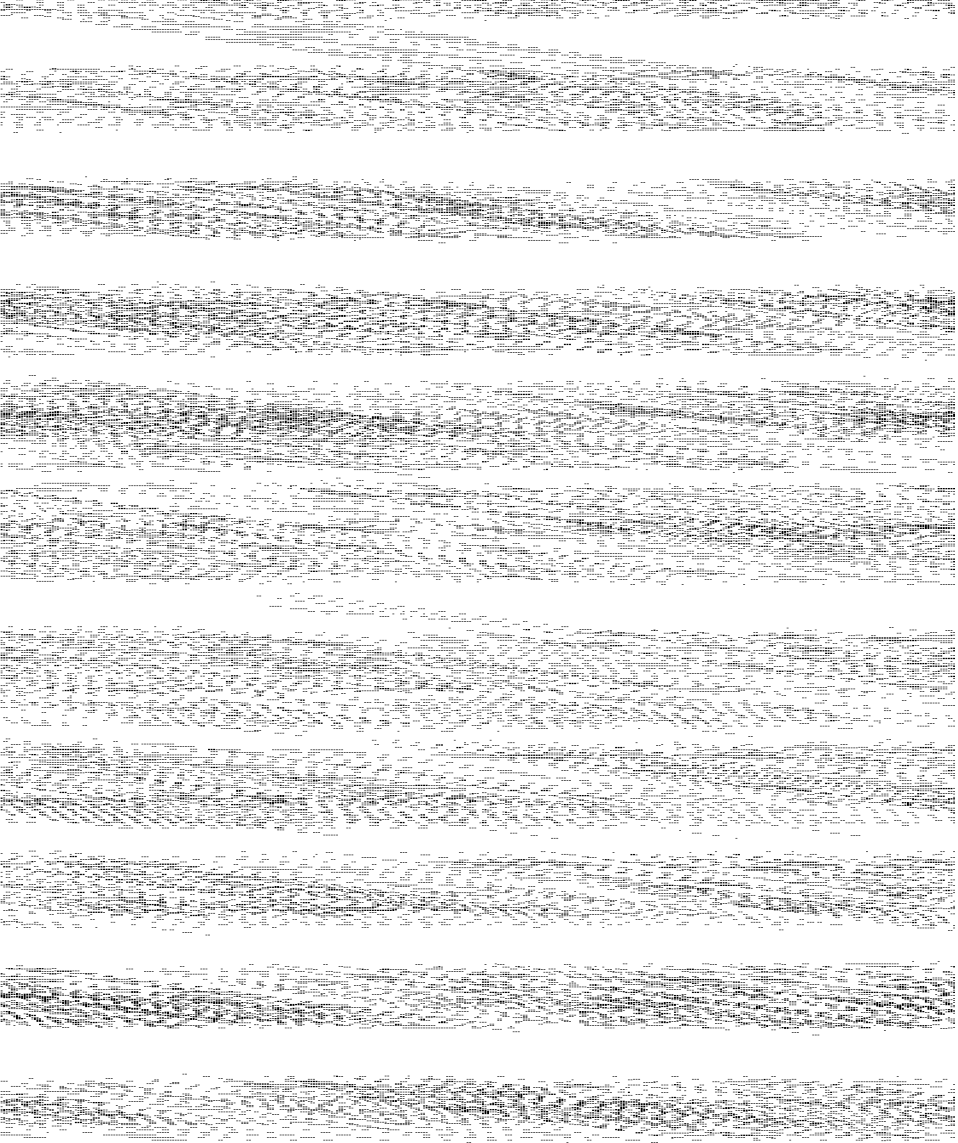
用Lowry法测定各悬浮液蛋白[5]。

1.4.4 电镜观察,将提纯的脑线粒体沉淀1 mm^3置入3%戊二醛固定液中固定。冲洗后用1%锇酸固定,逐渐丙酮脱水,环氧树脂618包埋,制超薄切片后用H-300型电镜观察。记录并照相。

1.4.5 脑线粒体呼吸功能测定采用氧电极法[4](120 mmol/L KCl,15 mmol/L Tris-Cl,Tris-PO_4 75 mmol/L蔗糖,25 mmol/L甘露醇,0.05 mmol/L EDTA-K,pH7.4),温度30℃孵育2 min,加入底物10 μl(5 mmol/L丙酮酸钠+5 mmol/L苹果酸钠)后加入ADP(200 nmol),测得氧气的消耗率为呼吸三态(nmol of O_2/min/mg of protein),待ADP完全磷酸化,氧气的消耗速度下降,此时测得的氧气消耗率为呼吸四态,三态/四态之比率为RCR。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39270273

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



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

4731
5 Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Bio Chem. 1951, 193: 265～275
6 Lai JCK, Clark JB. Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain. Methods Enzymol, 1979, 55: 51～60
7 Hart Schutz, Peter R, Silverstein, et al. Brain mitochondrial function after ischemia and hypoxia. Arch Neurol, 1973, 29: 408～416

(收稿: 1993-12-13; 修回: 1994-10-04)

对急性重症胆管炎诊断标准的几点建议——16年病例总结

Several suggestions on the diagnostic criteria for acute severe cholangitis —— a review of 16 years experience

孙文兵 韩本立 何振平 蔡景修 顾红光 周永碧 李智华 王救川 (第三军医大学西南医院肝胆外科中心) 630038

中华医学会1983年提出的急性重症胆管炎(ACST)诊断标准[1]促进了ACST临床研究和外科救治水平的进步。近年来,我们在对ACST的临床治疗和研究中,深感该标准尚有不足,故提出了几点建议共同道们参考。

1 临床资料

1.1 纳入标准和一般情况

我科自1975年1月至1990年12月间共收治急性胆管炎145例,其中符合全国胆道疾病专题讨论会制定的ACST诊断标准者[1]142例,男性55例,女性87例,年龄19～82岁。33例死亡,病死率为23.2%。

1.2 预后危险因素

将1975年1月至1988年12月间收治的121例ACST作为训练样本,1989年1月至1990年12月间收治的21例作为验证样本,选出每个病人的22项可能对预后有影响的指标并量化,通过运用SOMS软件包对训练样本中的121例病人进行单因素和多因素逐步回归分析,从中确定年龄、平均动脉压(MBP)、弥漫性腹膜炎(GP)、血清白球蛋白比值(AGR)、血培养(BC)和系统器官衰竭数(NFOS)6个因素为ACST预后危险因素[2],其中以NFOS与其预后关系最为密切,AGR次之。最后计算出ACST生存数学模型: $Y=0.485+0.003$年龄-0.040 MBP$+0.230$ GP-0.247 AGR$+0.221$ BC$+0.211$ NFOS。其中Y值为死亡概率。该模型与病人预后有很好的相关性($r=0.7571$, $P<0.001$),说明病人的死亡危险性与年龄、GP、BC和NFOS呈正相关,与MBP和AGR呈负相关。

1.3 预后危险因素与ACST诊断标准中各因素的比较

本模型中的几项指标和ACST诊断标准中的指标有同有异,现将其意义列表1比较。由表1看出,模型中的年龄和AGR是反映系统器官功能储备的较好指标,提示不同年龄阶段时ACST的临床表现有其特殊性。

表1 本模型和"标准"中各项指标的意义

指标意义	全国ASCT诊断标准	本模型指标
系统器官功能储备		(1)年龄
		(2)AGR
胆管炎病理发展阶段	①脉搏>120次/min	(3)弥漫性腹膜炎
	②WBC>20×10^9/L	
	③体温>39℃或<36℃	
胆血屏障受累	④血培养	(4)血培养
	⑤胆汁为脓性伴胆压明显升高	
系统器官受累	⑥休克	(5)平均动脉压
	⑦精神症状	(6)NFOS

1.4 老年ACST

年龄≥60岁为老年。142例ACST中,38例为老年病人,占26.8%,男性20例,女性18例,14例死亡,病死率为36.8%;非老年病人104例,死亡19例,病死率为18.3%,两组病死率比较有显著统计学差异($\chi^2=4.39$, $P<0.05$)。另外,两组在原发病、术前术后并发症等方面也有显著差异,分别见表2和表3。

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