DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.05.008

急性胆道感染时肝脏能量代谢改变及其防治的实验研究*

孙文兵 韩本立 李 昆 段恒春 王加文 尹国清 (第三军医大学西南医院肝胆外科中心) 630038

提 要 本文以肝细胞线粒体呼吸速率(S)、呼吸控制率(RCR)、氧化磷酸化效率(ADP/O)和肝脏 ATP 含量为指标测定了大鼠急性梗阻性胆管炎(AOC)时线粒体呼吸功能的变化,并观察了异搏停和地塞米松对线粒体损害的防治效果。结果发现,AOC 术后 6h 时线粒体Ⅳ态呼吸速率(S_4)即有明显增强,RCR、ADP/O 和肝脏 ATP 含量明显降低,而异搏停和地塞米松对 AOC 的治疗组在术后 48h 内各指标均无明显变化。结果提示,AOC 早期即能够引起严重的肝细胞线粒体呼吸功能损害和能量代谢障碍,异搏停和地塞米松能够有效地防治 AOC 所致的肝细胞线粒体呼吸功能和能量代谢障碍。

关键词 胆管炎;线粒体;异搏定;地塞米松

急性梗阻性胆管炎是常见的胆道疾患,常常引起肝脏功能衰竭甚至多系统器官衰竭(MSOF)[1]。急性胆道感染早期,肝脏功能衰竭主要是肝细胞能量代谢功能的衰竭[2],本文旨在探讨急性梗阻性胆管炎时肝脏产能机制——线粒体呼吸功能的变化及其防治措施,为临床防治胆源性 MSOF 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型与分组

健康 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 200±20g,随机分为 5 组:(1)假手术对照组(sham operation,SO);(2)胆道梗阻组(bile duct ligation,BDL);(3)急性梗阻性胆管炎组(acute obstructive cholangitis,AOC);(4)异搏停治疗组(verapamil treated,VET);(5)地塞米松治疗组(dexamethasone treated,DET)。BDL 组是在 1%戊巴比妥麻醉下(30mg/kg)经上腹正中切口双重结扎胰外部分胆管而成,AOC 组是在 BDL 基础上经近端胆管内注入 $O_{111}B_4$ 型大肠杆菌(5×10^9 cfu/ml) 1ml/kg,VET 和 DET 是在 AOC 前 30min 分别向腹腔内注射异搏停(2mg/kg,江苏兴化县制药厂)和地塞米松(4mg/kg,湖北制药厂)而成,SO 组除不结扎胆管外,其余操作均同 BDL 组。

1.2 肝细胞线粒体悬液制备和呼吸功能测定

1.2.1 肝细胞线粒体悬液的制备

按 Johnson[3]方法进行。取一定量的肝组织,用 0.25mol/L 蔗糖液洗净血迹,剪碎,用手动 Teflon 匀浆器制成 1:4(W/V)匀浆液,3 000rpm 离心 10min 后,取上清再 10 000rpm 离心 5min,取沉淀洗涤 1 次,用蔗糖液制成线粒体蛋白浓度为 20mg/ml 的悬液。线粒体蛋白浓度的测定参考 Lowry 法[4]。

1.2.2 呼吸功能测定

按 Estabrook[5]氧电极法进行。反应温度 29℃,总体积 2.0ml,测定体系含 0.225mol/L 蔗糖、1mmol/L EDTA、5mmol/L $MgCl_2$、15mmol/L KH_2PO_4、50mmol/L Tris HCl pH7.2 缓冲液。加入线粒体悬液 50μl,保温 2min 后加入底物 0.2mol/L 琥珀酸钠 40μl,1min 后再加入 90mmol/L ADP 5μl。测出Ⅲ态(S_3)和Ⅳ态(S_4)呼吸率,计算呼吸控制率(respiratory control ratio,RCR)和氧化磷酸化效率(ADP/O)。

1.3 肝组织 ATP 含量测定

参考 Kimmich[6]法进行。活杀动物后迅速取适量的肝组织于液氮内。称取 0.20~0.25g 于预冷的研钵中,加入 20 倍体积的 0.4mol/L $HClO_4$ 制成匀浆,3 000rpm 离心 5min,取上清液 3ml 用 5.0mol/L

* 国家自然科学基金资助项目

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

K_2CO_3 调至 pH7.6，离心，取上清液 50μl 于比色管，放入发光光度计暗室内，然后迅速注入 1ml 荧光素酶混合液，发光初始峰值为样品光强。结果按标准曲线计算，以 μmol/g 肝组织表示。

以上各指标的测定时相点均为术后 0、6、12、24 h 和 48 h。

1.4 数据处理

用本校数理统计教研室统计程序包作方差分析。

2 实验结果

2.1 大鼠病死率

SO、BDL、VET 和 DET 各组各时相大鼠病死率均为 0，AOC 组 24 h 和 48 h 时分别为 15%(3/20)和 40%(8/20)，AOC 48h 与其余各组各时相相差非常显著($P<0.002$)。

2.2 肝脏线粒体呼吸速率(S)和 RCR

BDL 组术后 24h 时 S 明显增强，以 S_4 为明显，RCR 降低，变化持续至 48h；AOC 组 6h 时 S_4 即有明显增强，RCR 降低，变化持续至术后 48h，其变化程度较 BDL 组更明显；VET 和 DET 组 S 和 RCR 均无明显变化，各组 RCR 的变化情况见图 1。

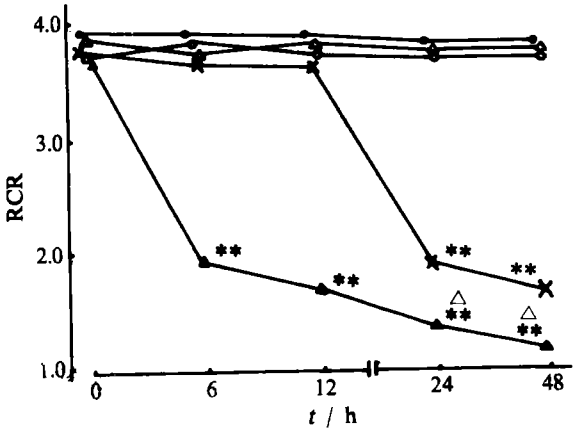


图 1 各组 RCR 的变化（$n=6$，$\bar{x}\pm s_x$）

**与 SO 或 BDL 组比较 $P<0.01$；

△与 BDL 组比较 $P<0.05$；(●)SO；(×)BDL；(▲)AOC；(△)VET；(○)DET

2.3 ADP/O 和肝脏 ATP 含量

BDL 组 24h 至 48h 时 ADP/O 和肝脏 ATP 含量均有明显降低；AOC 组 6h 时两者即有明显降低，持续至 48h，其降低程度较 BDL 组更明显；VET 和 DET 组术后 48h 内两者均无明显变化，见图 2。

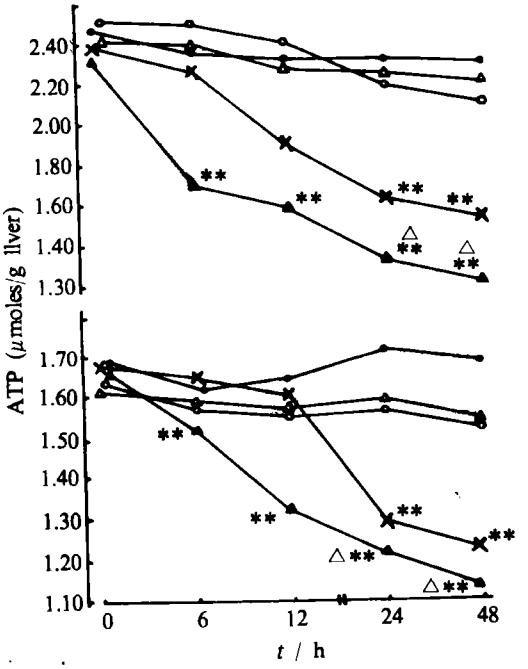


图 2 各组 ADP/O 和 ATP 的改变（$n=6$，$\bar{x}\pm s_x$）

注：符号表示同图 1

3 讨 论

肝细胞能量代谢功能损害是急性胆道感染早期的病理生理改变之一，其损害程度与预后关系密切[7]，胆道感染时肝细胞受损的具体机制仍不清楚，线粒体是肝细胞主要产能场所，它对于维持肝细胞的功能具有重要意义，因此，研究其在急性胆道感染时的变化规律并探讨其防治措施，对于胆源性肝衰及 MSOF 的预防具有重要意义。

AOC 时肝细胞能量代谢受损有以下主要致病因素，当胆道梗阻时，胆道压力骤升，肝窦受压，导致肝脏有效血流量不足，致使肝细胞缺氧酸中毒，肝细胞有氧代谢障碍；另外，细菌

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

和毒素也可导致肝细胞受损，本资料结果显示，BDL 组肝细胞能量代谢受损迟于 AOC 组，说明 AOC 组术后早期肝细胞能量代谢障碍主要是由于细菌和毒素的作用。

肝脏枯否细胞(KC)作为机体主要防御机制之一，能够快速被细菌或毒素激活，其功能在致病早期呈持续增强状态[2]。KC 吞噬细菌和毒素后释放许多有益或毒性因子，后者能够引起肝细胞损伤[8]，Cerra[9]等亦认为感染状态下肝细胞损伤与 KC 参与的免疫应答中产生的毒性因子关系密切。地塞米松能够抑制 KC 功能，阻止淋巴因子的分泌[10]，本研究显示，地塞米松能够有效地保护肝细胞线粒体呼吸功能，这既反证了以上理论，又解释了临床上皮质激素在治疗感染中的作用。

细胞和线粒体内外 Ca^{++} 稳态对于细胞和线粒体的正常代谢活动极为重要，AOC 时各种致伤因素如缺血缺氧、细菌、内毒素可引起细胞膜结构破坏和膜上的 Ca^{++}-ATPase 受抑，细胞外高浓度的 Ca^{++} 顺电化学梯度大量涌入细胞内，线粒体代偿性摄入 Ca^{++}，导致线粒体 Ca^{++} 超载，这是细胞不可逆损伤的因素之一[11]，线粒体内 Ca^{++} 超载，使线粒体膜结构受损，呼吸功能受抑，氧化磷酸化耦联遭到破坏，造成 ADP/O 和 ATP 含量下降。异搏停作为一种钙离子通道阻滞剂，已被证明能够阻断细胞膜钙离子通道，阻止钙离子流入胞浆，预防细胞和线粒体内 Ca^{++} 超载，保护线粒体能量代谢[12]，本研究结果显示，异搏停能够有效地防止 AOC 后肝细胞线粒体呼吸功能受损，保护肝细胞产能机制完整，与 Widener[12]报告结果相一致。

总之，AOC 和 BDL 早期即能够引起线粒体呼吸功能严重损害，KC 产生的毒性介质可能是线粒体受损的主要因素，线粒体 Ca^{++} 超载是线粒体受损的机理之一，异搏停和地塞米松能够有效地保护 AOC 时线粒体呼吸功能。

参考文献

1. 孙文兵 韩本立。重症胆管炎 121 例的临床分析。临床肝胆病杂志，1991；7(2)：92
2. 孙文兵 韩本立 段恒春，等。胆道感染时肝脏枯否细胞吞噬功能的改变。第三军医大学学报，1991；13(5)：509
3. Johnson D, Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria. Methods in Enzymology, 1967; 10(1): 94
4. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin-phend regent. J Biol Chem, 1951; 193(2): 265
5. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. Methods in Enzymology, 1967; 10(1): 41
6. Kimmich GA, Randles J, Brand JS. Assay of picomole of amounts of ATP、ADP、AMP using the luciferase enzyme system. Anal Biochem, 1975; 69(1): 187
7. 孙文兵 韩本立 王敖川，等。121 例重症胆管炎危险因素的多因素回归分析。第三军医大学学报，1991；13(3)：284
8. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, et al. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. Ann Surg, 1991; 212(4): 462
9. Cerra FB, West M, Billiar TR, et al. Hepatic dysfunction in multiple systems organ failure as a manifestation of altered cell—cell interaction. Prog Clin Biol Res, 1989; 308(4): 563
10. Karch U, Peters T, Decker K. The release of tumor necrosis factor from endotoxin-stimulated rat Kupffer cell is regulated by prostaglandin E_2 and dexamethasone. J Hepato, 1988; 7(3): 352
11. Robertson SP, Potter JD, Rouslin W. The Ca^{2+} and Mg^{2+} dependance of Ca^{2+} uptake and respiratory function of porcine heart mitochondria. J Biol

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

Chem,1982;257(4):1743
12. Widener LL,Mela-Riker LM. Verapamil pretreatment preserves mitochondrial function and tissue magnesium in the ischemic kidney. Circ Shock, 1984;13(1):27

(收稿:1991-08-08;修回:1992-06-19)

A sduty on changes of hepatic energy metabolism and their management in acute obstructive cholangitis in rats

Sun Wenbing,Han Benli,Li Kun,et al (Hepatobiliary Surgery Center,Southwest Hospital,Third Military Medical College,Chongqing,630038)

Abstract Mitochondrial respiratory rate,respiratory control rate (RCR),oxidative phosphoryiation efficiency (ADP/O),and hepatic ATP content were determined in rats under 5 conditions including acute obstructive cholangitis (AOC),bile duct ligation (BDL),verapamil pretreatment in AOC (VET),dexamethasone pretreatment in AOC (DET),and sham operation (SO). It was found that mitochondrial respiratory rate especially its state 4 phase was significantly increased and RCR,ADP/O,and ATP were significantly decreased at 6th hour after AOC and at 24th after BDL. These changes occurred earlier and more dramatically in AOC than in BDL. Pretreatment with verapamil or dexamethasone in AOC could minimize the changes of RCR,ADP/O and ATP in varying intervals.

The findings indicate that AOC and BDL can both result in severe functional impairment of the mitochondria of hepatocytes and verapamil and dexamethasone exert effective protection on the mitochondrial functions of respiration and energy metablism.

Key words cholangitis;mitochondrium;verapamil;dexamethasone

外固定器治疗胫腓骨开放性骨折的护理

刘伶俐 (第三军医大学西南医院骨科) 630038

胫腓骨开放性骨折是一种常见的开放性损伤。传统治疗是复位、石膏固定、骨牵引或开放复位内固定。由于固定时间长、易感染、骨愈合慢,故目前多倡用外固定器治疗。因其具有复位和固定的特点,不会进一步破坏局部血液循环,且便于早期功能锻炼[1]。我科自 1983 年至 1990 年,采用半环槽式外固定器治疗胫腓骨开放性骨折 58 例,疗效满意。护理工作中,以心理护理贯穿始终,重点预防感染和加强功能锻炼。现将护理体会报告如下:

1 临床资料

本组 58 例,男 47 例,女 11 例;年龄 8～64 岁,平均 29 岁。车祸 22 例、跌伤 20 例、砸伤 7 例、机器绞伤或挤压伤 6 例、爆炸伤 3 例。胫腓骨上 1/3 骨折 6 例、中 1/3 10 例、中下 1/3 42 例。均为不稳定性骨折,多

(下转 440 页)

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