DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.02.006

大鼠实验性脓毒症休克条件下细胞、亚细胞损伤及其机理探讨

陆松敏 刘建仓 王成英 刘光海 郭素清 陈惠孙 （第三军医大学野战外科研究所二室）630042

提 要 实验研究了盲肠结扎穿孔(CPL)致大鼠实验性脓毒症休克条件下肝细胞、骨骼肌细胞膜电位，微粒体膜流动性、微粘度及膜脂分子排列有序性系数，并测定了脂质过氧化物、磷脂酶 A_2 和唾液酸。结果说明大鼠脓毒症休克早期(CPL 后 10h)、晚期(CPL 后 20 h)肝细胞和骨骼肌静息跨膜电位差明显下降。且肝细胞膜电位下降比骨骼肌细胞膜电位及血压的改变均早且重。肝组织脂质过氧化物升高 1.6 倍，唾液酸含量下降($P<0.01$)。微粒体膜流动性降低($P<0.01$)，微粘度升高($P<0.01$)，分子排列有序性系数升高($P<0.01$)。血浆 PLA_2 从 874.2±84.5u/ml 升高至 2074.2±695.0u/ml($P<0.01$)，肝组织 PLA_2 升至 2943.3±471.8u/ml tissue。结果提示：脓毒症休克时细胞和亚细胞损伤的可能机制是：PLA_2 激活，膜上唾液酸含量增加，膜的电负性下降，膜脂区分子流动性下降，膜脂分子结构和构型产生变化。

关键词 休克，脓毒性；膜电位；微粒体；磷脂酶 A 类

尽管抗菌素治疗已有很大进展，但是脓毒症休克综合症仍是临床疾病最常见的死因。在美国每年大约有 100 000～300 000 病人死于脓毒血症，革兰氏阴性菌病例的死亡率仍为 30%～80%，因此进一步搞清脓毒症休克的病因学，研究脓毒血症条件下细胞、亚细胞水平的变化是十分重要的。本实验采用大鼠盲肠结扎穿孔致脓毒血症的休克实验模型，研究细胞膜电位、微粒体膜流动性、脂质过氧化和磷脂酶 A_2(PLA_2)变化。进一步阐述休克的机理。

1 材料和方法

雄性体重 250g 左右的大鼠，采用盲肠结扎穿孔法制造脓毒症休克模型：即将动物空腹 24h，乙醚麻醉，腹部正中切口，暴露盲肠，在远离回盲瓣处结扎盲肠，用 1 号输血针头贯通穿刺盲肠后纳回腹腔，两层缝合关闭腹腔，腹股沟处皮下注射生理盐水 15ml，禁食、禁水。观察记录血压、呼吸、心电图。手术在无菌条件下进行。动物造型后 10 h 为脓毒症早期；20 h 为脓毒症休克晚期。

1.1 实验分为 4 组

正常对照组。假手术组，早期脓毒症休克组，晚期脓毒症休克组，每组动物 10 只。假手术组除不进行盲肠结扎穿孔外其它处理同脓毒症休克组。

每组动物于测定前用戊巴妥钠腹腔注射麻醉。颈外动脉插管观察血压和抽取血样本。同时测定肝细胞和骨骼肌细胞膜电位，然后抽取血样本，取肝组织测定脂质过氧化物和磷脂酶 A_2，及肝微粒体膜流动性、微粘度和分子排列有序性系数。

1.2 肝细胞膜电位测定

打开腹腔将肝左叶取出剪去下方韧带，将肝叶放在一个用纱布复盖、上有 Ag-AgCl 电极的塑料板上，肝叶上方置一高 3mm、直径为 5mm 的乳胶圈，圈内形成一个小井，井内充满生理盐水。微电极插入此井，校正零点和测定肝细胞膜电位，玻璃电极采用直径 1.2mm 硬质玻璃毛细血管，用 B-80 型微电极拉制器拉制成微电极，其尖端直径小于 0.1μm，以 2M KCl、0.5M KNO_3 灌注电极，电极电阻大于 10MΩ，用半浮置螺旋银丝玻璃电极为测定电极，通过高阻抗 VDF 前置追随器，输入微电极放大器和 SBR－1 型双线示波器。用 MD－1 型微电极推进器将微电极插入盐水中，以短路平衡零点。电极继续推进入肝脏记录膜电位。

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

记录肝细胞膜电位后记录大鼠在体缝匠肌膜电位，参比电极为带盐桥的甘汞电极。

丙二醛的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)反应。磷脂酶 A_2 测定参见陈思锋法[1]。微粒体制备：取肝脏 5g，剪去包膜和脂肪、结缔组织，加 3ml 冷 Tris-HCl 缓冲液(含蔗糖)，剪碎匀浆，再以差速离心制备微粒体。微粒体膜流动性测定：取 0.3mg/ml 蛋白的微粒体悬液 2ml，加 2×10^{-6}MDPH 2ml，在 25℃温育 30min 后，在 MPF－4 型荧光分光光度计上测定荧光偏振度 P 值，计算细胞膜脂区分子的微粘度(η)和分子排列各向异性系数 r。其中：

$$P=\frac{I_{VV}-G\,I_{VH}}{I_{VV}+G\,I_{VH}},\gamma=\frac{2P}{3-P},\bar{\eta}=\frac{2P}{0.46-P}$$

I_{VV}：起偏器光轴为垂直方向，检偏器光轴为垂直方向的荧光强度；I_{VH}：起偏器光轴方向为垂直方向，检偏器光轴为水平方向。G 为校正因子。$G=I_{HV}/I_{HH}$。

2 实验结果

2.1 一般临床资料

2.1.1 活存时间和活存率：CLP 后 10hr 动物活存率 100%，18 h 为 100%，24 h 为 60%，30 h 为 20%，36 h 后全部死亡。动物平均活存时间为 25.5±5.3 h。

2.1.2 心率、体温、呼吸、血压的变化：脓毒症早期血压下降，心率、呼吸变化不大。晚期血压显著下降、呼吸减慢。心率减慢。心电出现房室分离、室扑、室颤等频死性变化。动物精神萎靡、耸毛、无力抽搐乃至死亡(见表 1)。

表 1 心率、体温、呼吸、血压的变化

Tab 1 The changes of heart rate, body temprature, blood pressure

group	*n*	heart rate	body temprature	respiratory rate	blood pressure	electrocardiogram
Normal control	10	489±35	37.5±1.3	132±18	17.6±0.8 133±6	rhythmia
Sham-operated 10 h	10	510±55	38.2±0.4	117±14	17.6±0.8 132±6	rhythmia
20 h	10	470±58	38.2±0.5	122±9	16.3±1.2 122±9	rhythmia
Earlier septic shock	10	495±38	35.5±1.8	131±18	13.1±0.66 98±52	arrhythmia
Later septic shock	10	374±198	34.4±2.5	83±50	8.6±6.8 65±51	postmortem electrocardiogram

2.2 肝细胞膜电位和骨骼肌细胞静息跨膜电位

膜电位的改变，肝细胞膜电位的正常值为－42.08±1.08mV，骨骼肌细胞静息跨膜电位为－87.00±5.10mV。脓毒症休克后细胞跨膜电位差明显下降，肝细胞膜电位差减少 49.95%，骨骼肌细胞跨膜电位差下降 33.5%。假手术组细胞膜电位也有所下降。以上结果可见在脓毒症早期(造型后 10 h)细胞膜电位已产生重度变化，且肝细胞膜电位的变化比骨骼肌细胞膜电位变化早且重，而此时动物血压变化不大(见图 1，图 2)。

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

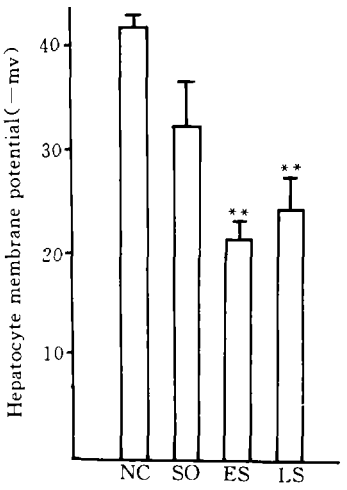


图 1 肝细胞跨膜电位的改变

Fig 1 The changes of hepatocyte membrane potential in sepsis rats. NC + Mormal Control Group; SO = Sham-operated Group; ES = Earlier septic shock Group; LS = Later septic shock Group. * *: Significant differences ($P < 0.01$) compared with NC and SO.

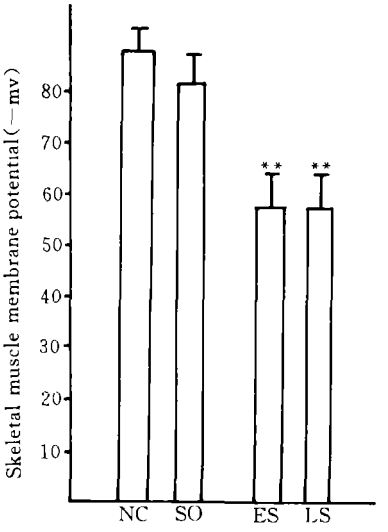


图 2 骨骼肌细胞跨膜电位的改变

Fig 2 The changes of skeletal muscle membrane potential in sepsis rats. NC = Normal control group; SO = Sham-operated group; ES = Earlier septic shock group; LS = Later septic shock group. * *: Significant differences ($P < 0.01$) compared with NC and SO.

2.3 肝细胞脂质过氧化物含量

肝组织脂质过氧化物丙二醛含量正常值为 3.493±0.872mmol/mg 蛋白，假手术组为 3.745±0.387mmol/mg 蛋白，脓毒症休克早期肝细胞 MDA 含量为 5.595±0.453mmol/mg 蛋白，与对照组差别非常显著（$P < 0.01$），为对照值的 1.6 倍。

2.4 血清唾液酸含量

正常值为 47.660±3.270mg/dl，假手术组为 55.660±5.631mg/dl，而 CPL 10 h 后血清唾液酸含量为：31.5±4.623mg/dl，与对照组和假手术组相比下降非常显著（$P < 0.01$）。

2.5 肝脏微粒体膜流动性、微粘度及各向异性系数

盲肠结紮穿刺所至脓毒症休克肝细胞微粒体膜荧光偏振度显著升高，膜脂区分子流动性显著降低（$P < 0.01$），微粘度显著升高（$P < 0.01$），脂双层分子排列有序性系数显著升高（$P < 0.01$）（见表 2）。

表 2 肝微粒体膜流动性、微粘度及各向异性系数

Tab 2 The membrane fluidity, microviscosity, order coefficient of hepatocyte microsomes

Group	n	fluorescence polzrization $\bar{P} \pm s_{\bar{x}}$	microviscosity $\bar{\eta} \pm s_{\bar{x}}$	order coefficient $\bar{\gamma} \pm s_{\bar{x}}$
Normal Contral group	10	0.186±0.004	1.361±0.049	0.132±0.002
Sham-operation	10	0.190±0.005	1.419±0.062	0.135±0.003
Earlier septic shock group	10	0.245±0.005**	2.276±0.105**	0.178±0.003**

* * control *vs* sham-operation, $P < 0.01$

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

2.6 血浆、肝组织 PLA_2 的变化

表 3 PLA_2 的改变

Tab 3 Changes of phospholipasel A_2 (PLA_2)

Group	n	plasma P<A_2(u/ml)	liver PLA_2(u/g tissue)
Normal Contral group	10	874.0±84.5	1874.6±349.0
Sham-aperation group	10	986.5±484.5	1855.1±438.0
Earlier septic shock group	10	2074.2±695.0**	2943.3±471.8**
Later septic shock group	10	1849.2±213.0**	2639.2±449.4**

** control *vs* sham-operation, $P<0.01$

脓毒症休克时血浆和肝组织磷脂酶 A_2 的含量均大幅度升高，早期脓毒症休克组血浆磷脂酶 A_2 的含量为正常值的 2.37 倍，肝组织 PLA_2 含量为正常值的 1.57 倍，晚期脓毒症休克组血浆 PLA_2 含量为对照值的 2.12 倍，肝组织为对照值的 1.41 倍。早期、晚期磷脂酶含量差别不大。

3 讨论

本文指出在脓毒症休克早期心率、血压、呼吸变化不大的条件下，细胞膜电位已产生了非常显著的变化（$P<0.01$）。肝细胞膜电位差降为伤前的 50%，骨骼肌细胞膜电位降为伤前的 66.5%，而血压仍为伤前的 73%，结果说明细胞水平的改变远早于血压的变化。肝细胞膜电位的改变是休克早期的重要事件，它比骨骼肌细胞膜电位和血压的变更早重，是反映休克损伤的敏感指标[1,2]。

Shire GT 报告给猴子输注活大肠杆菌引起脓毒症休克，骨骼肌膜电位差进行性下降，细胞内水、钠、氯升高，而钾漏出。Demenles JE 报告脓毒症休克狗血清可抑制兔乳头肌动作电位，静息电位下降 37%。脓毒症休克时细胞功能障碍，离子逆浓差跨膜运转能力下降。有些作者认为是能量合成障碍，细胞内 ATP 含量下降。Shires[3]和 Peizman Illner 报告在失血性休克和内毒素休克时 ATP 含量并未下降，因此提出离子运转障碍、膜电位下降并非因能量产生障碍，而是能量利用障碍。再者钠-钾泵功能的完整有赖于微环境的稳定，脓毒症致使膜脂分子结构和构型改变，从而直接影响泵功能[5]。

细胞膜主要是由磷脂、类固醇和糖脂组成，而糖脂和蛋白相结合形成的糖蛋白分布于细胞表面。糖蛋白的寡多糖链在细胞识别过程和配体受体识别过程中起着重要作用，而寡多糖链末端的唾液酸作用则更为重要。唾液酸在细胞表面起着滋养细胞膜掩盖表面抗原、增加膜表面电负性的作用。一旦唾液酸的含量下降，就增加了红细胞的凝集、促进溶血、降低其电负性。近来发现唾液酸含量与膜的基本性质密切相关，癌症患者唾液酸含量下降[6]。

脓毒症休克肝脂质过氧化物含量升高。生物膜和亚细胞膜是脂质过氧化损害的主要发生部位，而亚细胞中，又以微粒体居首，本研究发现肝细胞脂质过氧化物含量升高的同时微粒体膜脂区流动性明显下降。这可能是由于脂质过氧化后产生短链丙二醛进入水相，然后和膜蛋白、膜脂上的 NH2 交联形成 Schiff's 硷，从而降低膜流动性。同时脂质过氧化降低了膜磷脂的不饱和度，使得脂双层

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

分子有序性增加，流动性下降。Dobrefsov 用荧光法证明 415A 反射点强度增加，而 460A 弥散点反射强度增加。Conde GP 证明给大肠杆菌内毒素后磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺含量大幅度下降，游离脂肪酸含量上升[7]。不饱和脂肪酸含量下降，膜流动性下降。

关于内毒素休克时膜损伤的机理争论很多，近来康格非、Mohamed Shakir KM 报告注射内毒素几分钟之后即可激 活血浆、肝、肠组织中的磷脂酶 A_2，从而控制了前列腺素的生物合成，引起膜磷脂水解产生溶血性磷脂和花生四烯酸。花生四烯酸再在环氧化酶、脂氧化酶催化下代谢生成前列腺素、白三烯、血栓素等血管活性物质。Wendel 证明白三烯 D4 可导致肝短暂缺血，而白三烯半衰期只有几分钟，失活后引起缺血再灌流产生[8]，另一些学者证明花生四烯酸的酶促代谢过程中产生自由基。关于磷脂酶 A_2 和脂质过氧化的关系，我们在体外培养细胞的研究中证明：内毒素可直接激活 PLA_2，同时又促进脂质过氧化。磷脂酶 A_2 可模拟内毒素引起膜损伤，磷脂酶 A_2 的抑制剂可保护细胞免受内毒素损伤。

简言之：脓毒症休克时膜电位下降、膜流动物性降低、微粘度升高、分子排列有序性增加，膜脂质过氧化物含量升高。以上细胞损伤与内毒素激活 PLA_2、触发各种脂介质和自由基损伤有关，其中 PLA_2 可能是膜损伤的总启动因子[10]。

参考文献

1. Sayeed MM, Adler RJ, Chaudry IH, et al. Effect of hemorrhagic shock on hepatic transmesbrane potentials and intracellrlar electrolytes, in vivo. Am J Physiol, 1981;240:R211
2. Holliday J, Illner HP, Shires GT, et al. Liver cell membrane alteration during hemorrhagic shoch in rat. J Surg Res, 1981;31:506
3. shire GT, Peitzman AB, Illner H, et al. Changes in red cell transmenbrae potential, electrolytes and energy content in septic shock. J Trauma, 1983;23(9):769～774
4. Demenls J E. A physiologic explanation for cardiac deterioration in septic shock. J Surg Res, 1984;31:506
5. Liu Maw-Shung. Mechanisms of myocardial membrane alterations in endotoxin shock roles of phospholipase and phosphorylation. Circulatory Shock, 1990;30:43～49
6. 林克椿 聂松青。细胞膜的流动性。生理科学进展，1985;16(1):83～89
7. Conde G P, Garcia B, Municio AM, et al. In vitro and vivo effects of E coli endotoxin on mitochondrial phospholipase A_2 activity. PEBS Lett, 1981;127:115～120
8. Mohamed Shakin KM O'brian-JT, Gartner SL, et al. Enhanced phospholipase A_2: Activity in rat plasma, liver, and intestinal follwing endotoxin treatment: A possible explanation for the pritective effect of Indomethacin in endotoxic Shock. Matablism, 1985;34:176
9. Vadas P, Pruzanski W, Stefanki EVA, et al. Pathogenesis of hypotension in septic shock: correlation of circulating phospholipase A_2 levels with circulatory collapse. Critical Care Medicine, 1988;16(1):1
10. Lefer AM. Significance of lipid mediators in shock states. Circulatory Shock, 1989;27:3～12

(收稿：1992-04-03；修图：1992-12-01)

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

Study of cellular and subcellular damages and their pathogenesis in septic shock in rats

Lu Songmin, Liu Jiancang, Wang Chengying, et al (Research Instutute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract The changes of hepatocyte and skeletal muscle membrane potential, the membrane fluidity of microsomes, microviscosity, and the order coefficient of the arrangement of membrane lipid molecules were determined in rats after their cecum was ligated and punctured to induce septic shock. Lipid peroxides of plasma and the liver, phospholipase A_2 and salivary acid were determined as well. It was found that both in the first 10 hours and the next 20 hours of septic shock, the resting membrane potential of hepatocytes and skeletal muscles was significantly suppressed as compared with that of the sham-operated rats. The membrane potential of hepatocytes was suppressed prior to the decrease of blood pressure and much earlier and much more severe than that of skelatal muscles. Lipid peroxides of the liver were increased by 1.6 fold ($P<0.01$) and salivary acid was decreased significantly ($P<0.01$). The membrane fluidity of microsomes was reduced ($P<0.01$) and microviscosity and the order coefficient of membrane lipid molecules were increased ($P<0.01$). Plasma phospholipase A_2 was elevated to 2074.2±6950u/ml ($P<0.01$) and hepatic phospholipase A_2 to 2943.3±471.8u/ml tissue. These findings suggest that septic shock modifies the molecular structure of the membrane, activates phospholipase A_2, and decreases the content of salivary acid.

Key words shock, septic; membrane potentials; microsomes; phospholipases A

原发性肾上腺恶性淋巴瘤一例

张 勇 李为兵* 梁智勇* （第三军医大学西南医院血液科）630038

彭××，男，48 岁，电工。住院号 171683。因反复寒战、高热 39 d，于 1990 年 12 月 6 日入院。查体：T 36.8℃，BP 14/10kPa。浅表淋巴细胞不肿大。胸骨无压痛。心肺（－）。肝肋下 1cm，脾侧位 1.5cm，均质中无压痛。Hb129g/L，WBC5.3×10⁹/L，N0.77，L 0.23，PLT 154×10⁹/L。血沉 24mm/1h。肝肾功能正常。B 超示“右肝后叶占位病变：肝脓肿？肝癌？”CT 示“右肝后方之肿块很可能来自肾上腺”。第 2 次 B 超示“右肾上腺 6.1cm×6.5cm 不均质肿块”。ivp 示“右肾上盏基底部上方向下受压，结合 CT 考虑肾上腺占位”。γ-扫描示“右肝前上、前下段稀疏区，考虑占位不能除外”。1991 年 1 月 17 日部腹探查，见右肾上腺内侧一约 12cm×8cm×2cm 包块，切除包块及右上肾送病理检查：肿块切面呈灰白色，部分区域有坏死。镜检：大量瘤细胞呈片团状或弥漫分布，细胞呈圆形、椭圆形，较小。胞浆少。核圆形、卵圆形、深染，见核裂像。诊断为“右肾上腺非何杰金淋巴瘤（NHL）（小淋巴细胞型）。术后查骨髓象大致正常。1 月 28 日予以“COP”方案化疗，患者迅速衰竭，2 月 10 日死亡。

本病例特点：(1)中年男性；(2)起病急、病程短；(3)以寒战、高热为突出表现；(4)浅表淋巴结不大，但肝脾大；(5)血象、骨髓象正常或基本正常；(6)有消瘦、乏力、纳差，病程中有低血压，24 h 尿 17-OH

（下转 121 页）

* 本院泌尿科
** 本院病理科

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