创伤性休克时自由基对 5 个重要器官及肝线粒体的损伤作用*

陈惠孙 汪江淮 刁有芳 田昆仑 王 涛 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 一侧股骨粉碎性骨折伴失血 15%体重之大白鼠,致伤后 1h ,心、肺组织 MDA 明显升高($P<0.05$),肺组织 SOD 明显下降($P<0.05$),肝线粒体悬液 MDA 和 SOD 呈同步显著升高($P<0.05$)。致伤后 3h ,心、肝、肾、肺组织 MDA 升高更甚($P<0.01$),心、肾、肠组织 SOD 亦升高 ($P<0.05\sim0.01$),肝线粒体悬液 MDA 更为升高($P<0.01$),而 SOD 则出现下降($P<0.05$)。致伤后 5h,5 个测定器官组织 MDA 均升高显著($P<0.01\sim0.001$),而 SOD 均呈下降趋势($P<0.01\sim0.001$),此时肝线粒体悬液 MDA 和 SOD 反相变化更甚($P<0.01\sim0.001$)。血浆 MDA 随致伤时间延长而逐渐增高($P<0.05\sim0.001$),溶血液 SOD 逐步下降($P<0.05\sim0.01$),反映溶酶体破裂的血浆 β-葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶亦随致伤时间而增高($P<0.05$-0.001)。上述结果证实大白鼠创伤性休克时氧自由基对细胞和肝线粒体的损伤作用。

关键词 大鼠;休克,创伤性;自由基;丙二醛;超氧化物歧化酶类;线粒体

自由基经脂质过氧化作用引起的细胞和亚细胞膜结构和功能的破坏,可能是创伤和休克早期阶段细胞受损的一条主要途径,同时也是各类休克向不可逆发展以及发生多器官功能衰竭的重要机制之一[1,2]。

我们已经相继报告了氧自由基在肠系膜上动脉夹闭休克和重度失血性休克中的作用[3,4],本实验在大白鼠创伤性休克模型上,通过测定血浆,溶血液,心、肝、肾、肺、肠 5 个重要脏器组织 ,肝线粒体悬液中自由基脂质过氧化的代谢产物丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量和内源性超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)活性的变化,以及血浆溶酶体酶的变化,以期探讨氧自由基在创伤性休克发生发展中的作用地位及其对细胞和肝线粒体的损伤效应。

1 材料和方法

Wistar 种大白鼠 32 只,性别不拘,体重 220±20g,随机分为对照组($n=8$);休克 1。组 ($n=8$);休克 3。组($n=8$)和休克 4。组 ($n=8$)共 4 组。动物实验前禁食 24h,自由饮水。2%普鲁卡因局麻下行气管切开插管,自主呼吸。右颈总动脉插管经金属三通管分别连接贮血瓶和血压计,备放血和监测血压。以特制台钳造成鼠右侧股骨中下 1/3 处粉碎性骨折,同时在 5~7min 内按丢失 15% 体重的血容量经右颈总动脉放血。各组至实验时限后经右颈总动脉快速放血致死,留血,取心、肝、肾、肺、肠组织待测定 MDA 和 SOD ,同时取肝组织匀浆,按差速离心法制成肝线粒体悬液待测定 MDA 和 SOD 。对照组动物除不造成右股骨骨折和不放血外,其他操作同实验组。

组织和血浆 MDA 含量的测定按 Fletcher 法[5]改良[6],结果分别以 nmol/g 湿重组织和 nmol/ml 表示。线粒体悬液 MDA 含量的测定按 TBA 荧光法[7],结果以 nmol/mg 蛋白表示。血浆、溶血液、组织和线粒体悬液中 SOD 活性的测定按化学发光法[4],化学发光测定系统为黄嘌呤氧化酶 - 次黄嘌呤 - Luminol - 碳酸钠缓冲液 (0.05mol/L,pH 10.2,EDTA 0.1 mmol/L)系统,黄嘌呤氧化酶为西德 Boehringer 产品,次黄嘌呤为瑞士 Fluka 产品,Luminol 为北京化工厂产品,结果以 u/mg 蛋白表示。血浆乳酸、酸性磷酸酶和 β-葡萄糖醛酸酶的测定分别按单一酶微量比色法和一般比色法。

所有实验原始数据依 Student's 检验进行统计学处理,结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

造成大白鼠一侧股骨粉碎性骨折伴放血体重的15%后，血压立即降至 4.80±1.07kPa，以后有所回升，但至休克 5h 又复下降(图 1)，12h 内动物死亡率为83%(5/6)。

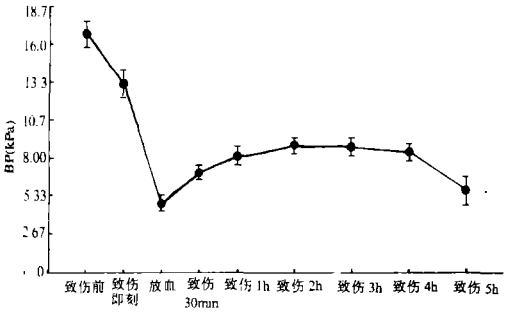


图 1 大鼠创伤性休克时血压的变化

休克后 1h，血浆乳酸、酸性磷酸酶和 β-葡萄糖醛酸酶即明显升高 ($P<0.05$)，并呈逐步升高趋势(表1)。血浆 MDA 在休克 1h 即有升高($P<0.05$)，而溶血液 SOD 至休克 3h 才有明显下降 ($P<0.05$)(表2)。

组织 MDA 和 SOD 的变化见表 3～4。休克后 1h，心、肺组织 MDA 较对照已有明显升高 ($P<0.05$)，而肺组织 SOD 明显下降 ($P<0.05$)。休克后 3h，心、肝、肾、肺组织 MDA 升高更甚 ($P<0.01$)，组织 SOD 除肺外，心、肾、肠亦明显增高 ($P<0.05\sim0.01$)。休克后 5h，5 个测定器官组织 MDA 均显著增高($P<0.01\sim0.001$)，而组织 SOD 均明显下降 ($P<0.05\sim0.001$)。

表 5 示线粒体悬液 MDA 和 SOD 的改变。休克 1h，尽管肝组织中 MDA 和 SOD 没有明显改变($P>0.05$)，但肝线粒体悬液中 MDA 已有显著升高($P<0.05$)，线粒体悬液 SOD 呈代偿性升高($P<0.05$)图 2。

表 1 血乳酸、酸性磷酸酶、β-葡萄糖醛酸酶变化

	对照组 ($n=8$)	休克 1h 组 ($n=8$)	休克 3h 组 ($n=8$)	休克 5h 组 ($n=8$)
乳 酸(mmol/L)	2.518±0.415	3.949±0.811*	5.884±1.634**△	7.537±1.918***△
酸性磷酸酶(u/ml)	19.100±3.87	24.930±4.54*	30.020±6.12**	38.530±5.91***
β-葡萄糖醛酸酶 (u/ml)	877.000±186	1366.000±302*	1895.000±412***△	2054.000±403***

系对照组相比，$P<0.05$，**$P<0.01$，***$P<0.001$；△系与邻近值相比，$P<0.05$

表 2 血丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)变化

	对照组 ($n=8$)	休克 1h 组 ($n=8$)	休克 3h 组 ($n=8$)	休克 5h 组 ($n=8$)
血浆 MDA(nmol/ml)	1.71±0.38	2.67±0.92*	2.91±0.48**	3.49±0.87***
血浆 SOD(u/ml)	132.53±8.83	140.96±9.61	143.07±9.3+1	143.17±8.65
溶血液 SOD(u/ml)	6598.00±709	6669.00±925	5283.00±1084*△	4094.00±1126***△

系与对照组相比，$P<.05$，**$P<0.01$，***$P<0.001$；△系与邻近值相比，△$P<0.05$

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3 各器官组织 MDA (nmol/g 湿重组织)的变化

	对照组 (n =8)	休克 1h 组 (n =8)	休克 3h 组 (n =8)	休克 5h 组 (n =8)
心	0.843±0.198	1.169±0.212*	1.272±0.356**	1.698±0.217***△△
肝	7.675±0.869	8.209±1.271	10.957±2.806**	12.462±2.118***
肾	1.302±0.279	1.378±0.308	2.156±0.444**△	2.512±0.562***
肺	1.479±0.348	2.030±0.301*	2.347±0.474**	2.609±0.357***
肠	0.793±0.181	0.839±0.234	1.062±0.275	1.173±0.289**

系与对照组相比，$P<0.05$，**$P<0.01$，***$P<0.001$；△系与邻近值相比。△$P<0.05$，△△$P<0.01$

表 4 各器官组织 SOD (u/mg 蛋白) 的变化

	对照组 (n =8)	休克 1h 组 (n =8)	休克 3h 组 (n =8)	休克 4h 组 (n =8)
心	98.15±8.19	91.70±10.27	124.06±14.57**△△	65.55±7.85**△△△
肝	120.18±10.85	116.26±8.38	124.60±8.03	80.89±6.89***△△△
肾	114.25±9.06	113.15±12.13	129.01±9.14*△	86.29±7.15**△△△
肺	103.69±10.87	83.14±11.35*	84.31±7.36**	60.74±7.71***△
肠	58.11±6.81	71.49±6.41*	74.82±6.32*	50.79±5.54*△△

系与对照组相比，$P<0.05$，**$P<0.01$，***$P<0.001$；△系与邻近值相比，△$P<0.05$，△△$P<0.01$，$P^{\triangle\triangle}<0.001$

表 5 线粒体悬液 MDA 和 SOD 的变化

	对照组 (n =8)	休克 1h 组 (n =8)	休克 3h 组 (n =8)	休克 5h 组 (n =8)
MDA(nmol/mg 蛋白)	72.74±5.55	88.65±9.21*	101.47±12.76**△	114.74±11.48***
SOD(u/mg 蛋白)	86.35±7.72	98.58±10.13*	74.29±6.03*△△	57.09±5.65***△

系对照组相比，$P<0.05$，**$P<0.01$，***$P<0.001$；△系与邻近值相比，△$P<0.05$，△△$P<0.01$

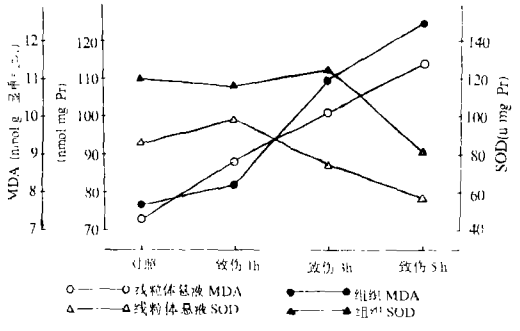


图 2 肝组织和肝线粒体悬液 MDA 和 SOD 变化

3 讨论

本实验采用造成大白鼠一侧股骨粉碎性骨折加失血 15% 体重血容量的方法，能够较好地控制创伤的严重程度。从致伤后动物血压和血浆乳酸的变化，以及致伤 12h 内动物死亡率结果分析，亦是一较成功的创伤性休克模型。

从心、肝、肾、肺、肠 5 个测定器官来看，休克后 1h ，心、肺组织 MDA 首先显著升高。休克

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后 3h，除心、肺组织外，肝、肾组织 MDA 亦明显升高。至休克 5h，5 个测定器官组织无一例外发生了脂质过氧化损伤。MDA 是氧自由基与细胞、亚细胞膜磷脂中多不饱和脂肪酸经脂质过氧化反应形成的一类代谢产物，测定其含量，不仅可以反映创伤与休克时自由基的生成与否，同时也可以反映细胞和亚细胞膜脂质过氧化损伤的严重程度[3]。本实验结果表明，创伤性休克时 5 个测定生命器官组织均有氧自由基生成以及脂质过氧化损伤的发生，其中以心、肺器官受损最早。

组织内源性 SOD 是机体清除氧自由基的首要防线，其活力的高低反映了机体清除能力的强弱[8]。本实验中，休克 3h 除肠组织 SOD 的代偿性升高防止了肠组织 MDA 的升高外，心、肾组织 SOD 的代偿性升高并不足以免除该两器官组织发生脂质过氧化损伤。休克 5h，5 个测定生命器官组织 SOD 均已显著低于对照组，提示休克晚期内源性 SOD 活性广泛而严重的抑制和受损，此时各器官组织发生严重的脂质过氧化损伤。Ferrari 等[9]指出心肌缺血再灌流损伤时总的 SOD 和线粒体 SOD 活性均呈明显抑制，而本实验创伤性休克时除肺组织 SOD 外，其他器官组织 SOD 活性均先呈代偿性升高，尔后再明显抑制趋势，失血性休克时亦呈此表现[4]。

本实验中我们尚观察了肝线粒体悬液 MDA 和 SOD 的改变情况，有意义的是休克后 1h，尽管肝组织 MDA 含量和 SOD 活性没有显著变化，但是，肝线粒体悬液 MDA 已明显高于对照组，这一结果表明肝线粒体的氧自由基生成和脂质过氧化损伤的发生较早。此外，血浆酸性磷酸酶和 β-葡萄糖醛酸酶在休克后的持续升高，从另一方面证实存在着和脂质过氧化反应有关的溶酶体膜的严重损伤和破坏。

本实验在大白鼠创伤性休克模型上证实，氧自由基经脂质过氧化反应可引起多个生命器官组织细胞和肝线粒体的损伤，同时各器官内源性 SOD 活性在休克晚期均有程度不同的明显抑制。尽管创伤性休克时的细胞损伤有多种途径，但氧自由基介导的脂质过氧化无疑是早期细胞损伤的主要途径；而多个生命器官组织的脂质过氧化损伤则可能是创伤性休克向不可逆发展以及多器官功能衰竭发生的重要机制之一。

参考文献

1. Sugino K, Dohi K, Yamada K, et al. The role of lipid peroxidation in endotoxin induced hepatic damage and the protective effect of antioxodant. Surgery 1987; 101:746
2. 汪江淮 陈惠孙。休克和自由基。人民军医 1988;(2):17
3. 汪江淮 陈惠孙 王涛。自由基在大白鼠肠系膜上动脉夹闭休克中作用的研究。中国病理生理杂志 1989;5:325
4. 汪江淮 陈惠孙 王涛，等。重度失血性休克时自由基作用地位的研究 中华实验外科杂志 1989; 6:116
5. Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. Anal Biochem 1973; 52:1
6. 王涛 汪江淮 陈惠孙。生物组织中 LPO 的荧光测定。第三军医大学学报 1989; 11:77
7. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid pero-xides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95:351
8. Simmons K. Defense against free radicals has therapeutic implications. JAMA 1984; 251:2187
9. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al. Oxygen-media-ted myocardial damage during ischemia and reperfusion: Role of the cellular defences against oxygen toxicity. J Mol Cell Cardial 1985; 17:937

（收稿：1991-03-28；修回：1992-02-15）

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Injurious effects of free radicals on 5 organs and hepatic mitochondria during traumatic shock in rats

Chen Huisun, Wang Jianghui, Diao Youfang, et al. (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract A model of traumatic shock was established in rats by comminutedly fracturing of the right femur and bleeding of 15% of the body weight. In the 1st hour after injury, the content of malondialdehyde (MDA) of the heart and the lungs increased, the activity of superoxide dismutase (SOD) in the lungs decreased, and the MDA content and SOD activity in hepatic mitochondria increased synchronously. In the 3rd hour after injury, the MDA content increased not only in the heart, the lungs and hepatic mitochondria but also in the liver and the kidneys, and the SOD activity increased in the heart, the kidneys and the intestinal tract but decreased in hepatic mitochondria. There were further marked elevation of MDA content and progressive inhibition on SOD activity in the 5 vital organs and hepatic mitochondria in the 5th hour after injury. When shock continued to progress, the plasma MDA content increased gradually, the SOD activity of the hemolytic blood decreased, and the activities of plasma acid phosphatase and β-glucuronidase, the indicators of lysosome destruction, increased markedly. These findings suggest that the oxygen-derived free radicals are responsible for the damages to cells of the vital organs and subcellular organelles during traumatic shock.

Key words rat; shock, traumatic; free radicals; malondialdehyde; superoxide dismutase; mitochondra

科研简报

人工合成丁型肝炎病毒(HDV)抗原片段初报

第三军医大学西南医院传染科 (630038)
中国科学院上海生化所合成组 (200032)

丁型肝炎病毒抗原(HDAg)是迄今证实的由该病毒编码的唯一单链蛋白。现已证实 HDAg 有与 HDV 核酸结合的活性，为 HDV 复制所必需。深入进行 HDAg 生物活性的研究有助于阐明 HDV 感染者的病情发展和预后。由于天然 HDAg 材料来源困难，提取纯化过程复杂、产率低、产物稳定性差，很难获得纯度高、稳定性好、足量的 HDAg 。为此，我们参考现有文献资料自行选择、设计并合成了含天然 HDAg 上的部分片段的 29 ，已初步证实它具有天然 HDAg 的部分活性，能专一地为天然抗 HD 抗体所识别。ELISA 试验表明包被合成抗原与已知抗 HD 抗体阳性血清呈阳性反应，并对天然 HDAg 与抗 HD 抗体反应有竞争作用。试验还表明该合成抗原与鼠血清、兔血清、单纯丙肝抗体阳性血清、单纯甲肝抗体阳性血清无免疫交叉反应。用合成抗原建立 ELISA 法，检测 300 例献血员标本，其中仅有 1 例丁肝抗体阳性，经证实该份标本同时 ALT 活性增高。检测的 177 例住院各型肝炎患者血标本中，有 12 例为抗 HD 抗体阳性(6.78%)。

HDV 合成抗原的获得及应用替代了天然丁肝病毒抗原，为 HDAg 生物学活性的深入研究，HDV 感染的流行病学研究及丁型肝炎发病机理的研究创造了基础和条件。 (郑 红稿)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net