DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.02.015

肠系膜上动脉夹闭性休克大鼠肝线粒体损伤及抗损伤的实验研究

蒋建新 汪江淮 陈惠荪 田昆仑 习有芳 王 涛（第三军医大学 野战外科研究所二室）630042

提 要 本文在大鼠肠系膜上动脉夹闭(SMAO)休克后，观察了肝线粒体呼吸功能的变化，并比较了多种自由基清除酶（剂）对肝线粒体功能的保护作用。松夹1h，实验组RCR较对照值明显下降（$P<0.05$），而P/O值无明显减少。松夹2h，RCR下降更甚（$P<0.01$），P/O值亦下降明显（$P<0.05$）。表明SMAO休克时，肝线粒体呼吸功能严重障碍，ATP合成减少。松夹1h后，ALLO组、SOD+CAT组、SOD+ALLO组和SOD+ALLO+CAT组的RCR，P/O值均较对照值无明显下降（$P>0.05$），而较实验组明显升高（$P<0.01$），松夹2h后，ALLO组RCR虽较对照值有明显降低（$P<0.01$），但仍明显高于实验组（$P<0.01$）。其它各联合治疗组RCR，P/O值均仍较对照值无明显减少。各治疗组动物平均存活时间均显著高于实验组。表明各自由基清除酶（剂）对SMAO休克时，大鼠肝线粒体功能有不同程度的保护作用，以联合治疗效果较好。

关键词 休克；肠系膜血管闭塞；线粒体，肝；游离基类；大鼠

我们已有实验证实[1][2]，氧衍生的自由基在肠系膜上动脉夹闭（Superior Mesenteric Artery Occlusion, SMAO）休克的发生、发展中起着重要作用。本文探讨SMAO休克时，大鼠肝线粒体呼吸功能的变化，并观察、比较了各种自由基清除酶(剂)对肝线粒体功能的保护作用。

1 材料与方法

Wistar大白鼠88只，雌雄不拘，体重208±16g，随机分对照组（$n=8$），松夹1h（$n=8$）、2h（$n=8$）实验组，ALLO别嘌呤醇（Allopurinol, ALLO）治疗松夹1h（$n=8$）、2h（$n=8$）组，SOD(超氧化物歧化酶)(Superoxide Dismutase, SOD)+CAT(过氧化氢酶)(Catalase, CAT)治疗松夹1h（$n=8$）、2h($n=8$)组，SOD+ALLO治疗松夹1h（$n=8$）、2h（$n=8$）组，SOD+ALLO+CAT治疗松夹1h（$n=8$）、2h($n=8$)组。实验前动物禁食过夜，自由饮水。3%戊巴比妥钠（4mg/100g体重）腹腔注射麻醉。气管切开插管，自主呼吸。右颈总动脉插管供测血压和给药。腹正中切口，生理盐水纱布保护下找出并分离肠系膜上动脉。用无创动脉夹闭后，关闭腹腔。动脉全身肝素化（80u/100g体重）。夹闭1h后松夹。给药各组于松夹前15min经颈总动脉注射SOD（苏州医学院）15000u/kg体重或CAT（Sigma）40000u/kg体重或于实验前24h口饲ALLO（Sigma）100mg/kg体重，并于夹闭即刻腹腔注射ALLO 50mg/kg体重。实验组动物给予等量生理盐水。对照组动物除不夹闭肠系膜上动脉和给药外，其它操作同实验组和治疗组。

肝线粒体分离按Aprille[3]方法进行。用氧电极测线粒体呼吸功能。测定介质组成(mmol/L)：蔗糖225、EDTA 1、$MgCl_2$ 5、KCl 15、KH_2PO_4 15、Tris 50，pH7.5。总体积2ml。加入2mg线粒体蛋白和琥珀酸钠(终浓度10mmol/L)，1min后，加入400nmol ADP。在3066型水平台式记录仪上记录反应曲线。计算呼吸控制率（respiratory control rate, RCR）和P/O值。

结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。数据按Student's检验，统计其显著差异性

2 结 果

2.1 动物存活率

实验组动物存活率在松夹4h为33%，而在6h动物全部死亡。平均存活时间228±48min。各治疗组动物存活率均有不同程度地提高。其中SOD+CAT，SOD+ALLO和SOD+ALLO+CAT组动

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

物的平均存活时间较实验组明显延长（$P<0.05\sim0.01$），见表1。

松夹前，血压与基础值无显著差异，但松夹即刻，血压从16.5kPa迅速降到9.2kPa，松夹30min回升到10.9kPa，松夹2h，又复降至8.53kPa。在松夹2h，ALLO治疗组血压为8.9kPa，与基础值差异显著（$P<0.01$），但SOD+ALLO，SOD+CAT和SOD+ALLO+CAT治疗组血压仍分别为10.5kPa，9.65kPa和12.54kPa分别较实验组松夹2h的血压升高显著（$P<0.05$，$P<0.05$，$P<0.01$）。

2.2 SMAO休克时肝线粒体呼吸功能的变化及各自由基清除酶（剂）的保护作用

松夹1h，实验组RCR较对照组下降24%（$P<0.05$），松夹2h，下降39%（$P<0.01$），P/O也下降显著（$P<0.05$）。ALLO，SOD+CAT，SOD+ALLO，SOD+ALLO+CAT组在松夹1h，RCR分别较实验组升高16%（$P<0.01$），21%（$P<0.01$），22%（$P<0.01$）和43%（$P<0.01$），而较对照组无显著下降（$P>0.05$），在松夹2h，各治疗组RCR仍分别较实验组升高26%（$P<0.01$）、39%（$P<0.01$）、46%（$P<0.01$）和78%（$P<0.01$），但ALLO组RCR已较对照组显著下降23%（$P<0.01$）（表2，3）。

表1 动物存活率和平均存活时间

	松夹				平均存活时间（min）
	4h（%）	6h（%）	8h（%）	12h（%）	
实验组	33(2/6)	0(0/6)			228±48
ALLO	50(3/6)	50(3/6)	00(0/6)		307±71
SOD+CAT	67(4/6)	67(4/6)	17(1/6)	0(0/6)	361±76*
SOD+ALLO	83(5/6)	50(3/6)	33(2/6)	0(0/6)	403±10.*
SOD+ALLO+CAT	83(5/6)	83(5/6)	50(3/6)	17(1/6)	498±141**

与实验组相比 * $P<0.05$，** $P<0.01$

表2 松夹1h肝线粒体呼吸功能的变化

	对照	实验	ALLO	SOD+CAT	SOD+ALLO	SOD+ALLO+CAT
RCR	4.93±0.48	3.72±0.54$^{\Delta}$	4.32±0.75**	4.51±0.37**	4.56±1.23**	5.31±1.99**
P/O	2.10±0.57	1.90±0.37	1.55±0.39	1.87±0.35	1.75±0.25	1.92±0.15

与对照值相比，$^{\Delta}P<0.05$；与实验组相比，**$P<0.01$

表3 松夹2h肝线粒体呼吸功能的变化

	对照	实验	ALLO	SOD+CAT	SOD+ALLO	SOD+ALLO+CAT
RCR	4.93±0.48	3.02±0.43$^{\Delta\Delta}$	3.81±0.57**	4.19±0.62**	4.41±0.52**	5.40±0.15**
P/O	2.10±0.57	1.29±0.13$^{\Delta}$	1.56±0.45$^{\Delta\Delta}$	1.79±0.26	1.74±0.32	1.88±0.13

与对照值相比，$^{\Delta}$ $P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$；与实验组相比，** $P<0.01$

3 讨 论

本实验表明，各氧自由基清除酶（剂）都能明显延长SMAO休克动物的平均存活时间，提高动物存活率和升高动物血压等。这再一次阐明了脂质过氧化损伤在SMAO休克发病机制中的重要性[1][2]。

线粒体是细胞内能量生成的中心。其呼吸功能常以RCR和P/O值表示。本实验选用琥珀酸钠作底物，所测得的对照大鼠肝线粒

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

体P/O值稍高于理论值（P/O = 2），这在其它作者的文献中也有类似报道[3][4]。这可能是由于实验测定值与理论推算值之间存在一定的差异，此外与实验条件也有一定的关系。本实验发现，松夹1 h，实验组肝线粒体RCR较对照值明显下降，在松夹2 h，下降更甚，P/O值也下降显著。说明SMAO休克过程中，肝线粒体氧化磷酸化功能严重受损，使细胞内能量合成不足，从而提示SMAO休克时肝线粒体损伤与肝细胞损伤的相关性。

实验亦发现，各氧自由基清除酶（剂）均能明显提高SMAO休克大鼠肝线粒体的RCR，P/O值，改善休克大鼠肝线粒体的呼吸功能，说明氧自由基介导的脂质过氧化损伤亦是SMAO休克时肝线粒体受损的重要原因。这可能是因为氧自由基能与线粒体膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应，生成过氧化物（如丙二醛），使膜上不饱和脂肪酸含量减少。从而使膜流动性下降[5]，后者通过使线粒体内各呼吸链成分在膜脂双层中的运动减弱，电子传递受阻，而使氧化磷酸化功能发生障碍[6][7]。

一般认为，休克过程中，体内氧自由基的生成途径主要有：黄嘌呤氧化酶生成系统、线粒体内单价泄漏和中性白细胞的“呼吸爆发”等。其中黄嘌呤氧化酶生成系统是细胞内自由基的主要来源。上述途径首先主要生成超氧自由基(O_2^-)，后者经歧化反应生成过氧化氢（H_2O_2），H_2O_2与O_2^-再反应生成OH·。这些氧衍生的自由基对细胞都有明显的杀伤作用。因此应用外源性自由基清除酶（剂）可能是防治休克的有效途径。而已有实验表明，休克时，体内SOD活性明显降低[2]。这也进一步支持了应用外源性自由基清除酶（剂）的重要性。SOD是O_2^-的特异性清除酶，通过歧化反应使O_2^-生成H_2O_2，后者可在CAT作用下生成水，同时SOD亦可减少O_2^-经Haber-Weiss生成OH·。CAT只能清除H_2O_2，对O_2^-和OH·则无效。ALLO可阻止黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶，从而可阻断黄嘌呤氧化酶的自由基生成途径。从实验结果看，单用ALLO治疗仅在松夹1 h有作用，这表明休克时，体内氧自由基的其它生成途径在组织脂质过氧化损伤中仍起重要作用。因此，SOD与CAT或ALLO伍用，尤其是当SOD + ALLO + CAT伍用时，其抗肝线粒体损伤和抗休克的效果较单用ALLO时好得多。SOD + ALLO似乎要比SOD + CAT治疗效果好，因为前者既能阻断自由基生成的主要途径，又能清除体内已生成的O_2^-，而后者只能起到清除体内已生成的自由基的被动作用。然而当SOD + ALLO + CAT伍用时，则能互相取长补短，达到最佳疗效。上述结果提示，休克条件下氧自由基的清除应从多个环节入手。

综上所述，本实验再一次证实氧自由基在SMAO休克发病过程中的重要地位。肝线粒体损伤可能是氧自由基引起的肝细胞损伤的始动环节。各氧自由基清除酶（剂）对肝线粒体功能有明显的保护作用，以伍用效果最好。

参考文献

1. 汪江淮　陈惠荪　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；5：325～328
2. 汪江淮　王涛　陈惠荪。肠系膜上动脉夹闭休克时超氧化物歧化酶抗脂质过氧化作用研究。生物化学与生物物理学报　1989；21：253～256
3. Aprille JR, Hom JA, Rulfs J. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. J Trauma 1977; 17: 279～288
4. Max SR, Garbus J, Wehman HJ. Simple procedure for rapid isolation of functionally intact mitochondria from human and rat skeletal muscle. Anal Biochem 1972; 46: 576～584
5. 程伯基。心磷脂与线粒体内膜。生理科学进展　1987；18：39～44。
6. Hackenbrock CK. Lateral diffusion

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

and electron tranfser in the mitochondrial inner membrane. Trends Biochem Sci 1981; 6:151～158
7. Slater EC, Berden JA, Herweijer MA. A hypothesis for the mechanism of respiratory-chain phosphorylation not involving the electrochemical gradient of protons as obligatory intermediate. Biochim Biophys Acta 1985; 811:217～231
(收稿: 1991-07-22; 修回: 1992-01-09)

Studies on hepatic mitochondrial injury and their anti-injury capacity after superior mesenteric artery occlusion shock in the rat

Jiang Jianxin, Wang Jianghuai, Chen Huisun, et al (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract Changes of hepatic mitochondrial respiratory function and the protective effects of several free radical scavenging enzymes or drugs on the mitochondrial functions were observed after superior mesenteric artery occlusion shock was inflicted to the rat. It was found that there was an obvious decrease of respiratory control rate (RCR) in the 1st hour after the occlusion was released and a further decrease in the 2nd hour, and P/O value decreased significantly at the same time, which indicates that mitochondrial dysfunction does occur in the shock due to superior mesenteric artery occlusion. However, RCR ard P/O value did rot significantly decrease in the 1st hour after occlusion releasing in the treated groups with allopurinol (ALLO), a combination of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), a combination of SOD and ALLO, and a combination of SOD, ALLO, and CAT as compared with those of the control, and were markedly higher as compared with those of the experimental group. In the 2nd hour after occlusion releasing, RCR of the ALLO treated group was significantly lower than that of the control and remained significantly higher than that of the experimental group. The average survival time of the animals was much longer in the treated groups than in the experimental group.

Our findings demonstrate that free radical scavengers, SOD, CAT, and ALLO especially a combinaton of them can exert protective effects of different degrees on the mitochondrial respiratory function during a shock due to superior mesenteric artery occlusion.

Key words shock; mesenteric vascular occlusion; mitochondria, liver; free redical; rats

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