DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.02.004

大白鼠肠系膜上动脉夹闭休克时SOD抗脂质过氧化损伤的研究

汪江淮 王涛 陈惠孙 田昆仑 刁有芳 (野战外科研究所 二室)

提 要 本实验探讨大白鼠肠系膜上动脉夹闭休克时输注SOD的抗脂质过氧化作用和细胞保护效应。松夹1 h,实验组肠和心肌MDA较对照组明显升高($P<0.05$),而SOD治疗组肠和心肌MDA明显低于实验组($P<0.05$),与对照组无显著差异($P>0.05$)。松夹2 h,实验组肠、心、肝、肺MDA均明显高于对照组($P<0.05\sim0.01$),而SOD治疗组肠、心、肺MDA仍低于实验组($P<0.05$),但较对照组明显升高($P<0.05$)。此外,SOD治疗组血浆β-葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶明显低于实验组,动物存活时间明显延长。

关键词 超氧化物歧化酶类; 游离基类; 丙二醛; 动脉,肠系膜上; 休克

近年来,已有越来越多的研究表明,自由基特别是氧衍生的自由基(包括超氧自由基、O_2^-;羟基、OH·; 过氧化氢、H_2O_2;和单线态氧、$^1O_2$)经脂质过氧化作用参与休克过程中的细胞损伤过程[1][2]。因此,应用自由剂清除酶(剂)来阻断或/和防治休克时自由基介导的细胞损伤,无疑为休克时的细胞保护和细胞复苏提供了一条新的重要途径。

本实验通过观察大白鼠肠系膜上动脉夹闭(Superior Mesenteric Artery Occlusion, SMAO)休克时动物存活率,血浆溶酶体酶,以及肠、心肌、肝、肾、肺组织中自由基脂质过氧化的代谢产物丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量的变化,探讨SMAO休克时超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)治疗对抗自由基脂质过氧化反应的作用及其细胞保护效应。

材料和方法

Wistar种大白鼠35只,雌雄兼有,称重247±13 g,随机化分为5组:对照组(N=7);松夹1°实验组(N=7);松夹1°治疗组(N=7);松夹2°实验组(N=7);松夹2°治疗组(N=7)。实验前动物禁食24 h,自由饮水。2%普鲁卡因局麻下行气管切开插管,自主呼吸。右颈总动脉插管接血压计监测血压。腹正中切开,分离肠系膜上动脉,以无创动脉夹夹闭后,关闭腹腔。动物全身肝素化(80U/100g体重),夹闭1 h后松夹。松夹1°和松夹2°治疗组于松夹前15 min经颈总动脉输注SOD(苏州医学院提供,2400U/mg蛋白)15000U/kg体重。各组至实验时限后,经颈总动脉快速放血致死,留血,取肠、心肌、肝、肾、肺组织。对照组动物除不夹闭肠系膜上动脉外,其它操作同实验组。

组织MDA含量的测定按Fletcher法[3]改良[4]。准确称取肠、心肌、肝、肾、肺组织150mg至匀浆管内磨碎,加入氯仿-甲醇混合液(2:1)2ml,在YQ-3型匀浆机上制成匀浆,再以氯仿-甲醇混合液2 ml洗涤匀浆管后并入,45℃水浴5 min,加等量重蒸水漩涡混合1 min,离心,取下层液相1 ml,在RF-250岛津荧光分光光度计上比色测定,激发波长分别为350、353、345、350、355 nm,发射波长分别为435、485、475、465、460 nm,结果以nmol/g湿重组织表示。血浆β-葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶按比色法测定。

所有数据均按方差分析进行统计学处理,结果以均数±标准差($\bar{X}\pm SD$)表示。

结果

一、SOD治疗对休克动物存活率和血压的影响

夹闭肠系膜上动脉1 h后松夹,未给SOD组(N=6)松夹后4 h动物死亡率为67%(4/6),松夹后6 h动物全部死亡(6/6),平均存活时间为230±44 min。SOD治疗组(N=6)松夹后4 h动物死亡率为17%(1/6),松夹后6 h动物死亡率为50%(3/6),松夹后8h动物全部死亡(8/8),平均存活时间为334±74 min。

松夹后2h,实验组动物血压为8.26±1.73 kPa,SOD治疗组动物血压为9.86±1.20 kPa(图1)。

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

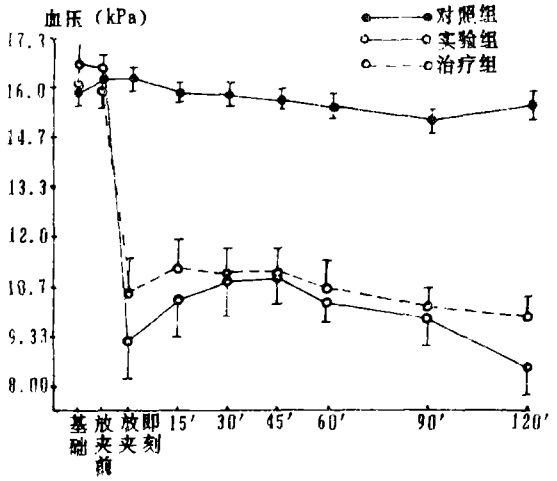


图 1 *SMAO* 休克和 *SOD* 治疗对血压的影响

二、*SOD* 治疗对血浆溶酶体酶的影响

松夹 1h，实验组血浆 β－葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶分别较对照组增加 105%（$P<0.01$）和 60%（$P<0.01$），而治疗组血浆 β－葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶分别较实验组降低 56%（$P<0.01$）和 25%（$P<0.05$）但酸性磷酸酶已高于对照组（$P<0.05$）。松夹 2h，血浆中的两种酶较对照组均明显升高（$P<0.01$），但治疗组血浆 β－葡萄糖醛酸酶仍明显低于实验组（$P<0.01$）（表 1）。

三、*SOD* 治疗对各脏器组织 *MDA* 含量的影响

松夹 1°实验组肠和心肌组织 MDA 分别较对照组增加 66%（$P<0.05$）和 55%（$P<0.05$），而松夹 1°治疗组肠和心肌组织 MDA 分别较松夹 1°实验组减少 42%（$P<0.05$）和 41%（$P<0.05$），与对照组无显著差别（$P>0.05$）。松夹 2°实验组肠、心肌、肝、肺组织 MDA 分别较对照组增加 126%（$P<0.01$）、69%（$P<0.01$）、36%（$P<0.05$）和 28%（$P<0.05$），松夹 2°治疗组肠、心肌、肺组织 MDA 分别较松夹 2°实验组减少 28%（$P<0.05$）、25%（$P<0.05$）和 13%（$P<0.05$），但较对照组明显增高（$P<0.05$）（表 2，图 2）。

表 1. 血浆 β－葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶的变化

	对照组 (n=7)	松夹 1° 实验组 (n=7)	松夹 1° 治疗组 (n=7)	松夹 2° 实验组 (n=7)	松夹 2° 治疗组 (n=7)
β－葡萄糖醛酸酶 (U/ml)	830 ± 150	1703±341 **	1092±308 △△	2201±384 **	1799±359 △△ **
酸性磷酸酶 (U/ml)	19.24±3.68	30.84±5.13 **	24.59±5.25 *△	35.89±4.91 **	33.59±6.25 **

※ 系与对照组相比　※ $P<0.05$　※※ $P<0.01$　△ 系与实验组相比　△ $P<0.05$　△△ $P<0.01$

表 2　各脏器组织 *MDA*（*nmol /g* 湿重组织）的变化

	对照组 (n=7)	松夹 1° 实验组 (n=7)	松夹 1° 治疗组 (n=7)	松夹 2° 实验组 (n=7)	松夹 2° 治疗组 (n=7)
肠	0.86±0.17	1.43±0.39 ※	1.01±0.21 △	1.94±0.45 ※※	1.52±0.34 △※
心	0.86±0.26	1.33±0.41 ※	0.94±0.16 △	1.45±0.25 ※※	1.16±0.28 △※
肝	7.42±0.81	8.58±0.50	7.75±0.85	10.06±2.35 ※	9.67±1.20 ※
肾	1.57±0.56	1.67±0.37	1.54±0.53	1.82±0.46	1.71±0.34
肺	1.49±0.28	1.61±0.33	1.37±0.17	1.90±0.27 ※	1.68±0.22 △※

※ 与对照组相比　※ $P<0.05$　※※ $P<0.01$　△ 与实验组相比　△ $P<0.05$　△△ $P<0.01$

讨　论

氧衍生的自由基中，超氧自由基经自发或酶促的歧化反应生成过氧化氢，超氧自由基和过氧化氢又可经金属铁介导的 Haber－Weiss 反应生成羟基，因此，超氧自由基是各种氧衍生的自由基的主要来源。生物体内超氧自由基的生成有多种途径，其中细胞内的生成途径包括胞浆中黄嘌呤－黄嘌呤氧化酶系统、微粒体中 NADH－细胞色素 P－450 和线粒体中的单价泄漏，细胞外的生成途径主要是白细胞

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

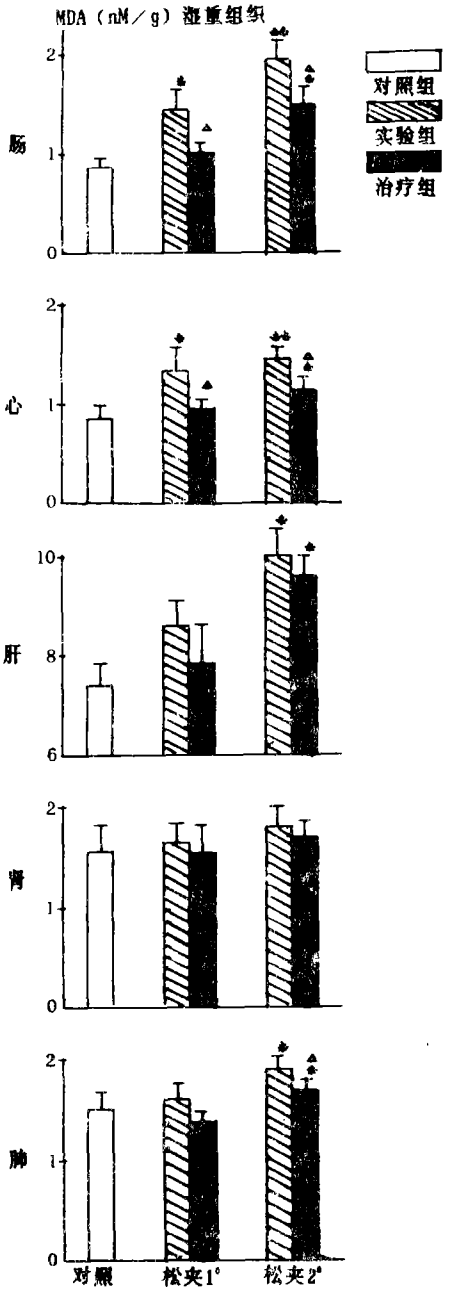


图 2 *SMAO* 休克和 *SOD* 治疗对各脏器组织 *MDA* 的影响

生成系统。SOD是超氧自由基的特异性清除酶，通过歧化反应使超氧自由基生成过氧化氢，后者在过氧化氢酶作用下生成水。细胞内富含SOD，包括胞浆中的Cu、Zn－SOD和线粒体中的Mn－SOD，但细胞外液SOD含量极低，因此其清除超氧自由基的能力很弱。

休克状态下，由于细胞缺氧，胞浆中黄嘌呤－黄嘌呤氧化酶系统受到激活，超氧自由基大量生成，超氧自由基以及其它氧衍生的自由基如羟基，通过与细胞膜和亚细胞膜中多不饱和脂肪酸的脂质过氧化反应引起细胞损伤，破坏细胞结构和功能的完整性，而且脂质过氧化产物尚可进入细胞外液发挥远距离效应[5]。另一方面，休克过程中产生的各种毒素，特别是SMAO休克时产生的肠源性毒素和感染性休克时产生的内毒素均可激活外周血中白细胞释放超氧自由基进入细胞外液，这些超氧自由基除参与脂质过氧化反应外，尚可引起补体激活[6]、血小板聚集[7]、以及内皮细胞损伤[8]。本实验结果表明，松夹1°实验组肠、心肌组织MDA明显升高。松夹2°实验组除肠、心肌组织MDA升高更甚外，肝、肺组织MDA亦明显升高，表明SMAO休克时氧衍生的自由基可引起多个生命器官组织的脂质过氧化损伤。松夹1°和2°实验组血浆β－葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶持续明显升高，提示亚细胞器如溶酶体膜完整性的破坏和解体。

休克时超氧自由基的大量生成、内源性SOD活性的明显抑制[9]、以及细胞外液SOD的含量不足，均提示应用自由基清除酶如SOD来防治休克时自由基介导的细胞损伤是细胞复苏和保护的一条重要途径。Mckechnie[10]，Lefer[1]等分别证实SOD在创伤性和内毒素休克中的治疗效应。本实验结果表明，SOD治疗明显延长SMAO休克大白鼠的存活时间。在松夹1°治疗组，SOD明显抑制肠、心肌组织MDA的生成和β－葡萄糖醛酸酶的释放。松夹2°治疗组，肠、心肌、肺组织MDA含量和血浆β－葡萄糖醛酸酶仍明显低于松夹2°实验组。休克时输注外源性SOD的作用部位尚不清楚，有人认为SOD是一大分子，不能通过细胞膜，因此其主要作用部位是细胞外间隙[11]。

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

也有人认为休克时膜对 SOD 的通透增加，SOD 可进入细胞发挥作用[12]。不管其作用部位，本实验结果表明 SMAO 休克时输注 SOD 能明显减少自由基介导的脂质过氧化损伤，稳定溶酶体膜，延长休克动物的存活时间。

本实验松夹 2°治疗组肠、心肌、肺组织 MDA 和血浆溶酶体酶均已显著高于对照组，提示 SOD 抑制 MDA 生成和溶酶体酶释放的作用已经减弱，这可能与 SOD 在体内的半衰期过短有关[13]。因此增加 SOD 的给药次数，特别是延长 SOD 的体内半衰期 对于提高 SOD 的治疗效应将是有意义的。

参 考 文 献

1. Lefer Am, et al. Benificial action of a free radical scavenger in traumatic shock and myocardial ischemia. Circ Shock 1981; 8: 272
2. Parks DM, et al. Role of oxygen free radicals in shock ischemia and organ preservation. Surgery 1983; 94: 428
3. Fletcher BL, et al. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissue. Anal Biochem 1973; 52: 1
4. 王涛，等. 生物组织中 LPO 的荧光测定。第三军医大学学报 1989；11(1)：77
5. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. Biochem J 1984; 222: 1
6. Parrish DA, et al. Pulmonary response of fifth component of complement－sufficient and －deficient mice to hyperoxia. J Clin Invest 1984; 74: 959
7. Handin RI, et al. Enhancement of pletelet function by superoxide anion. J Clin Invest 1977; 59: 959
8. Sacks T, et al. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement－stimulated granulocyte. J Clin Invest 1978; 61: 1161
9. Mc Cord JM, et al. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 1985; 312: 159
10. Mckechnie K, et al. Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats. Circ Shock 1986; 19: 429
11. Kunimoto F, et al. Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats. Circ Shock 1987; 21: 15
12. Brawn K, et al. Superoxide radical and superoxide dismutase: threat and defense. Acta Physiol Scand 1980; 492(suppl): 9
13. Grange DN, et al. Role of superoxide radicals in intestinal ischemia Gastroenterology 1981; 81: 22

（收稿：1988. 3. 18；修回：1988. 12. 13）

Oxygen－derived Free Radicals Induced Cellular Injury in Superior Mesenteric Artery Occlusion Shock: Protective Effect of Superoxide Dismutase (SOD)

Wang Jianghuai, et al

(*Research Institute of Surgery, Third Military Medical College*)

Intraaterial injection of superoxide dismutase (SOD)15000U/kg 15 min before releasing the obstruction is given. 35 rats are divided into 3 groups: group1, 7 for control; group 2, 14 for releasing the obstruction for 1 h; in which (7 as 2A, 7 as 2B) 2B are given SOD; group 3, 14 for releasing the obstruction for 2 h, in which (7 as 3a, 7 as 3B) 3B given SOD. The results show: the content of malondialdehyde (MDA) in bowel, and heart tissue in 2A increases 66% and 55% ($p<0.05$) compared to group 1, content of MDA in 2B in the same kind of tissue decrease 42% and 41% ($p<0.05$) vis 2A, and no significant change ($p>0.05$) vis group 1; contents of MDA in bowel, heart, liver, and lung tissues in 3A increase 126%, 69%, 36%, and 28% ($p<0.01$, 0.05) vis group 1, but in 3B they are lower than 3A($p<0.05$), higher than group 1 ($p<0.05$). Plasma β－glucuronidase and acid phosphatase in 2B and

（下转105页）

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

5. Maloneg JV, et al. Paradoxical respiration and "pendecluft" J, Thorac. cardiovasc, Surg 1961; 41 (3) : 291
6. Shackford SR, et al. Selective use of ventilation therapy in flail chest injury J. Thorac. cardiovasc, 1981; 81: 194
7. Rebihan M, Litwin MS. Morbidity and Mortality associated with flail chest injury. Areview of 83 cases. J. Trauma. 1973; 13(8) 663
8. Schall MA, et al. The unchanged Mortality of flail chest injuties. J. Trauma. 1979; 19: 492
9. Duff JM, et al. Flail chest, A clinical review and physiological studdy. J. Trauma. 1968; 8(1) 63
10. Downs JB. Invited Editorial Comment. Arch. Surg 1978; 113: 902
11. Trinkle JK. Management of Major thoracic wall Trauma. Current surg. 1981; 42(3) : 181

(收稿: 1988. 9. 8; 修回: 1989. 1. 16)

The Respiratory Pathophysiology and Traction Treatment of Traumatic Flail Chest : An Experimental Study on Dogs

Song Xiuming , et al
(*Department of Thoracic Surgery , Daping Hospital , Third Military Medical College*)

The pathophysiology and treatment of flail chest was studied on a modified Maloney's model in 10 dogs. Pendulum airflow was not found in this experiment. It is concluded that the pathophysiological changes of the flail chest is mainly caused by paradoxical respiration, and the traction of the flail segment is a sim le and effective method of treatment. This study provides some experimental and clinical data for the treatment of flail chest.

Key words : Flail chest/TH ; Traction/MT

(上接 98 页)

3B are much lower than 2A and 3A . The survival time of shocked animals treated with SOD is markedly prolonged . The results suggest that administration of SOD can protect cells against the peroxidative tissue damage produced by oxygen-derived free radicals , depress the release of lysosome enzymes and prolong the survival time of shocked animals .

Key words : Superoxide dismutase/PD ; Free radicals ; Malondialdehyde ; Artery , superior mesentery ; Shock

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