



犬膈肌起搏后疲劳膈肌腺嘌呤核苷酸、SOD、MDA含量及线粒体改变

膈肌起搏(Diaphragm pacing, DP)是近30年迅速发展的一项肺通气功能辅助技术,其基本功能由功能性电刺激(Functional electrical stimulation, FES)膈神经引起收缩而实现。但在实际应用过程中,呼吸肌功能失调,尤其是膈肌疲劳(Diaphragm fatigue, DF)仍为影响DP治疗效果的因素之一。DF是指膈肌在持续收缩的情况下,不能再维持所需要的或预定的肌力,也因此不能继续产生呼吸所需的跨膈压。其发生机制可以是中枢神经系统发出的冲动不足、神经肌肉接头传递或膈肌收缩过程中某一环节障碍或诸因素的综合作用。本研究采用高效液相色谱分析(HPLC)、黄嘌呤氧化酶比色及硫代巴比妥比色法观察犬膈肌起搏后疲劳膈肌腺嘌呤核苷酸、SOD、MDA含量及膈肌线粒体形态学变化,旨在探讨膈肌起搏后膈肌疲劳的发生机制。

1 材料和方法

1.1 实验对象

8只健康成年实验犬(南方医院实验动物所提供),雄性5只、雌性3只,体质量18~21 kg。

1.2 仪器与试剂

M244型HPLC(Waters Ltd., USA), M785A紫外/可见光可变波长检测器(ABI Ltd., USA); ATP、ADP、AMP(中国科学院上海生物化学研究所); SOD、MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 实验过程

实验犬静脉硫贲妥钠麻醉(25 mg/kg·b.w.),放置水囊三腔管,分别自颈部两侧解剖出膈神经,连接起搏电极,用膈肌起搏器(射频参数:电压20~50 V,电流0.3 mA,频率10 Hz)。自上腹正中小切口进腹,安置膈肌肌电采集导联,电刺激诱发疲劳,射频开始后连续监测,每15 min采样1次,共8次,通过跨膈压及膈肌肌电图描记判定膈肌疲劳并予量化。分别于疲劳前后取少量膈肌组织(2块/次,0.2~0.3 g/块)。

1.4 膈肌组织ATP、ADP、AMP含量的测定[1][2]

1.4.1 色谱条件 色谱柱BondopakC₁₈,柱体积0.5 cm×30 cm;紫外检测波长254 nm,0.01AUFS;进样体积50 μl。

1.4.2 样品制备 取膈肌组织200 mg碾碎,混合匀浆,离心。上清用1 mol/L KOH中和至pH值6~7,再离心,留取上清50 μl进样。

1.4.3 结果测算 用ATP、ADP、AMP标准品得出标准峰面积。将膈肌组织ATP、ADP、AMP所得峰面积与标准峰面积相比,得出膈肌组织ATP、ADP、AMP的含量。

1.5 膈肌组织SOD、MDA含量的测定

1.5.1 样品制备 取出液氮保存的膈肌组织块0.2 g生理盐水漂洗,拭干,称质量;取预冷的匀浆介质2 ml,剪碎组织块进行匀浆并以3 000~4 000 r/min低温离心10~15 min,取上清液测定。

1.5.2 结果测算 测定SOD采用黄嘌呤氧化酶比色法,取30 μl样品按试剂盒流程操作,于722型分光光度计550 nm处比色,计SOD含量(单位:NU/mg·prot);MDA采用硫代巴比妥比色法,取100 μl样品按试剂盒

流程操作, 722型分光光度计532 nm处比色, 计SOD、MDA含量(单位: nmol/mg·prot)。

1.6 电镜观察

分别取疲劳及正常膈肌组织约2 mm³, 浸于2%戊二醛缓冲液中固定, 再浸于1%锇酸中后固定1 h。逐级脱水, Spurr's树脂浸透包埋, 超薄切片, 透射电镜观察。

1.7 统计学分析

测定结果行Dunnett t检验。

2 结果

2.1 膈肌组织ATP、ADP、AMP、AXP水平的变化

疲劳膈肌组织ATP、ADP、AXP含量较正常膈肌组织均显著降低, 而AMP含量疲劳前后无显著差异(表1)。

表 1 疲劳前后膈肌 ATP、ADP、AMP、AXP 含量比较

($\mu\text{g/g}\cdot\text{b.w.}$, $n=16$, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of the contents of ATP, ADP, AMP and AXP before and after diaphragm fatigue

($\mu\text{g/g}\cdot\text{b.w.}$, $n=16$, $\text{Mean}\pm\text{SD}$)

	Normal	Fatigue	<i>t</i>	<i>p</i>
ATP	190.58±47.57	7.39±2.98	15.5	0.000
ADP	3.37±1.30	1.39±0.82	6.71	0.000
AMP	1.59±0.68	1.68±0.45	0.392	0.701
AXP	189.28±43.6	10.46±3.42	16.269	0.000

2.2 膈肌组织SOD、MDA水平的变化

疲劳膈肌组织SOD含量较正常膈肌组织显著降低, 而MDA含量显著升高(表2)。

表 2 疲劳前后膈肌 SOD、MDA 含量比较

($\mu\text{g/g}\cdot\text{b.w.}$, $n=16$, $\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of the contents of SOD and MDA before and after diaphragm fatigue

($\mu\text{g/g}\cdot\text{b.w.}$, $n=16$, $\text{Meam}\pm\text{SD}$)

	Normal	Fatigue	<i>t</i>	<i>P</i>
SOD(nU/mg)	133.4±18.73	81.3±16.45	8.742	0.000
MDA(nmol/mg·prot)	2.512±0.296	3.91±0.4838	-9.096	0.000

2.3 膈肌线粒体形态变化

疲劳膈肌细胞线粒体排列紊乱, 部分线粒体出现肿胀, 嵴模糊并有空泡变性出现(图1)。

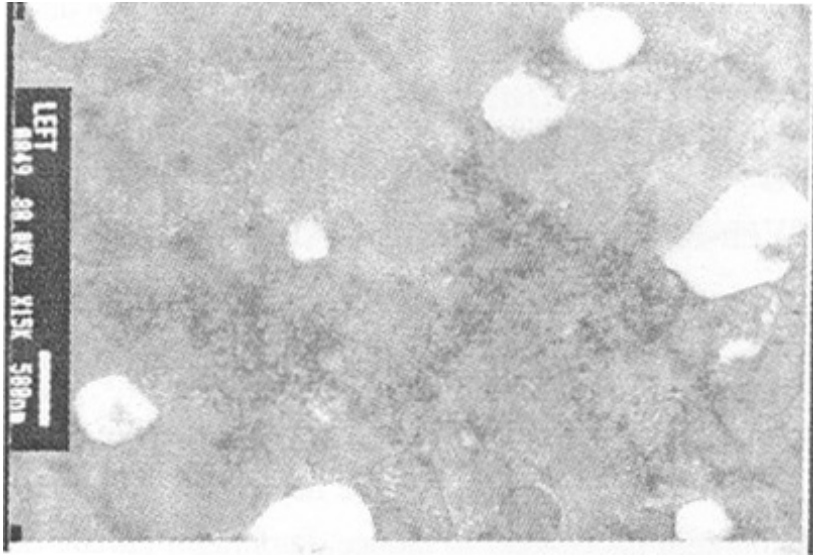


图1 疲劳膈肌部分线粒体 ($\times 15\ 000$)
Fig.1 Mitochondrias in fatigued diaphragm ($\times 15\ 000$)

3 讨论

ATP不仅是肌球蛋白横桥产生肌力的直接能源，也是维持钠钾泵的功能所必需的。另外，肌质网摄取 Ca^{2+} 亦消耗ATP。这些能量代谢过程某个环节发生障碍都可能导致肌肉疲劳。在ATP的消耗是否参与了疲劳过程这个问题上存有一些争议，有人发现骨骼肌在高强度疲劳时，细胞内ATP都很少下降到运动前水平的70%以下，而且在此时，细胞ATP浓度比肌纤维最大收缩力所需要的量高100多倍[3]。其解释是，因其它因素引起的疲劳在ATP尚未耗竭时就降低了细胞对ATP的利用率，如 H^+ 引起ATP水解酶活性的降低等。所以疲劳时ATP浓度仍保持在较高水平。膈肌亦属于骨骼肌，其收缩-舒张循环对ATP及细胞外 Ca^{2+} 内流有很强的依赖性，肌浆网摄取 Ca^{2+} 及肌纤维滑动均需ATP水解直接供能[4]。Vinogradova等[5]报道ATP有很好的膈肌抗疲劳作用。Bark[6]等在实验中发现高磷酸血症可增加膈肌抗疲劳的特性，其机制可能与磷酸盐缓冲系统，缓解膈肌疲劳时细胞内酸中毒有关。

亦有研究[7]认为发生疲劳的膈肌不仅只存在着代谢或收缩功能的障碍，可能还存在着膈肌亚细胞结构的损害。近期还发现，氧自由基堆积在膈肌疲劳的发生机制中也起着重要作用，且横纹肌过度剧烈收缩及缺血再灌注后均能产生大量氧自由基，引起肌肉组织的损害。Anzueto等[8]发现大鼠经阻力负荷吸气后，在跨膈压、疲劳指数显著下降的同时，膈肌组织中的脂质过氧化物丙二醛含量明显增多，氧化型谷胱甘肽与谷胱甘肽比值增大。Shindoh等[9]发现，应用超强脉冲电流刺激兔活体引起的膈肌疲劳，能被N-2酰半胱氨酸和超氧化物歧化酶所抑制，直接证明了氧自由基是引起DF发生的重要原因，认为氧自由基通过诱导脂质超氧化而损害细胞的膜结构是其对许多组织损害的主要原因。

本实验结果发现膈肌ATP、ADP、AXP、SOD含量疲劳前明显高于疲劳后，而MDA含量疲劳前低于疲劳后，AMP在疲劳前后无显著性差异。其机制可能与以下因素有关：(1)膈肌纤维过度收缩消耗了ATP，在能量过度消耗时ADP亦可水解为AMP并释放出能量供给肌细胞；(2)膈肌疲劳时其肌细胞内产生氧自由基增多，氧自由基增多对线粒体膜的损害导致能量代谢障碍、对内质网膜的损害导致兴奋-收缩藕联障碍及对肌细胞损害导致其去极化和动作电位传递障碍，这三者造成膈肌收缩障碍后致疲劳；(3)线粒体出现增生、水肿并有空泡样变性等使线粒体功能发生障碍，但属于可逆性变化，ATP合成不足，与本研究结果相符合。因此，膈肌细胞ATP过度消耗、合成障碍、直接供能物质减少以及氧自由基对亚细胞结构损伤可能是膈肌起搏后膈肌疲劳发生的原因。

参考文献：

[1] 陈亮, 何凤慈, 康丕顺, 等. 反相高效液相色谱法测定慢性肾功能衰竭家兔肾组织中的磷酸腺

昔[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(2): 71-3.

[2] 华旭初, 张枫桐, 邱仞之, 等. 兔热暴露时脑能量代谢的变化[J]. 工业卫生与职业病, 1999, 25(2): 95-7.

[3] Soderlund K, Hultman E. ATP content in single fiber from human skeletal muscle after electrical stimulation and during recovery[J]. Acta Physiol Scand, 1990, 139(3): 459-66.

[4] Whitlock DM, Terjung RL. ATP depletion in slow twitch red muscle of rat[J]. Am J Physiol, 1987, 253(3 pt 1): c426-32.

[5] Vinogradova IA, Shevchenko AI. The pharmacological correction of respiratory musculature fatigue[J]. Eksp Klin Farmakol, 1997, 60(4): 35-7.

[6] Bark H, Nizri M, Tarasuik A, et al. Effects of hyperphosphatemia on diaphragmatic strength and endurance[J]. J Appl Physiol, 1992, 73(1): 82-7.

[7] Aldrich TK. Respiratory muscle fatigue[J]. Clin Chest Med, 1988, 9(2): 225-36.

[8] Anzueto A. Free radicals activation and lipid peroxidation occurring in the rat diaphragm during resistive breathing[J]. Am Rev Respir Dis, 1989, 139: A162-3.

[9] Shindoh C, DiMarco A, Thomas A, et al. Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue[J]. J Appl physiol, 1990, 68(5): 2107-13.

参考文献:

[1] 陈亮, 何凤慈, 康丕顺, 等. 反相高效液相色谱法测定慢性肾功能衰竭家兔肾组织中的磷酸腺昔[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(2): 71-3.

[2] 华旭初, 张枫桐, 邱仞之, 等. 兔热暴露时脑能量代谢的变化[J]. 工业卫生与职业病, 1999, 25(2): 95-7.

[3] Soderlund K, Hultman E. ATP content in single fiber from human skeletal muscle after electrical stimulation and during recovery[J]. Acta Physiol Scand, 1990, 139(3): 459-66.

[4] Whitlock DM, Terjung RL. ATP depletion in slow twitch red muscle of rat[J]. Am J Physiol, 1987, 253(3 pt 1): c426-32.

[5] Vinogradova IA, Shevchenko AI. The pharmacological correction of respiratory musculature fatigue[J]. Eksp Klin Farmakol, 1997, 60(4): 35-7.

[6] Bark H, Nizri M, Tarasuik A, et al. Effects of hyperphosphatemia on diaphragmatic strength and endurance[J]. J Appl Physiol, 1992, 73(1): 82-7.

[7] Aldrich TK. Respiratory muscle fatigue[J]. Clin Chest Med, 1988, 9(2): 225-36.

[8] Anzueto A. Free radicals activation and lipid peroxidation occurring in the rat diaphragm during resistive breathing[J]. Am Rev Respir Dis, 1989, 139: A162-3.

[9] Shindoh C, DiMarco A, Thomas A, et al. Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue[J]. J Appl physiol, 1990, 68(5): 2107-13.