

犬膈肌起搏后疲劳膈肌腺嘌呤核苷酸ATP、ADP、AMP、AXP、SOD、MDA 含量及线粒体改变

曹文峰, 陈钢, 蔡瑞君, 第一军医大学附属南方医院胸外科, 广东广州 510515 宛

摘要目的 探讨膈肌起搏后膈肌疲劳的发生机制。方法 电刺激犬膈神经复制疲劳, 测定疲劳前后膈肌 ATP、ADP、AMP、AXP、SOD、MDA 含量, 同时观察膈肌线粒体的形态变化。结果 疲劳后 ATP、ADP、AMP、AXP、SOD 含量低于疲劳前, MDA 含量高于疲劳前, AMP 水平无显著差异。疲劳膈肌线粒体出现肿胀、嵴模糊, 少数线粒体空泡变性等可逆性变化。结论 膈肌细胞 ATP 过度消耗及合成障碍, 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。

关键词膈肌起搏; 膈肌疲劳; 腺嘌呤核苷酸; 线粒体

中图分类号: R-33; Q493.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2001)11

曹文峰, 陈钢, 蔡瑞君, 第一军医大学附属南方医院胸外科, 广东广州 510515 宛

CAOWen-feng, CHENGang, CAIRui-jun

(Department of Cardiothoracic Surgery, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Objective To explore the possible mechanisms for the occurrence of diaphragm fatigue induced by diaphragm pacing. Methods The phrenic nerve of 8 dogs were exposed and subjected to stimulation with the electric pulses emitted by a diaphragm pacemaker to induce diaphragm fatigue models, and the contents of ATP, ADP, AMP and AXP in the diaphragm muscles before and after diaphragm pacing were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The contents of SOD and MDA were also measured and the morphological alteration of the mitochondria observed with transmission electron microscope. Results The contents of ATP, ADP, AXP and SOD were found significantly lower but MDA was higher during fatigue than those in normal conditions, while AMP content manifested no obvious change. Some mitochondria in the diaphragm muscle swelled and in a few cases, vacuolar degeneration was observed. Conclusion The exhaustion and synthesis disturbance of ATP may explain the generation of diaphragm fatigue, and the reduction of dynamophore and ultrastructural injuries of the cells induced by oxygen free radicals may also contribute to this result.

Key words diaphragm pacing; diaphragm fatigue; adenine nucleotide; mitochondria

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(ATP、ADP、AMP、AXP)、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, 体重 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

实验犬静脉注射硫贲妥钠麻醉 (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

收稿日期: 2001-3-16

作者简介: 曹文峰, 1970 年, 甘肃会宁人, 1993 年毕业于甘肃中医药大学, 硕士, 主治医师, 电话: 020-85141114-87240

应值为负数而理论上杀伤效应应随效靶比的增加而增高。因此若须提高效率则可适当减少靶细胞接种量。但靶细胞浓度低于或高于一定数值时细胞的生长状态会受影响。由本实验可知靶细胞最少不能低于 1.25 伊⁰³/孔。否则 D₅₀ 不随靶细胞数增多而增加。以上是 MTT 比色法用于免疫细胞的杀瘤活性测定时不如同位素方法敏感的主要原因。另外用作实验的效应细胞及靶细胞必须保证同时处于较好的活性状态。否则实验结果不可靠。本实验中几种贴壁生长的肿瘤细胞 D₅₀ 尚有一定差距。考虑几种细胞生长状态不同是其中一个重要影响因素。另外我们经多次实验证实。在加溶解剂前须完全吸弃培养液。否则 DMSO 与孔中残存的 MTT 发生反应及孔中残存的培养液会影响甲胍溶解后的 D₅₀。MTT 比色法在测定免疫效应细胞的细胞毒活性时还必须注意效靶比。杀伤时相以及靶细胞对效应细胞的敏感程度等。只有在注意到上述主要条件时 MTT 比色法用于免疫细胞的杀瘤活性测定才具有既安全又可靠等优点。

(上接 838 页)

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^[1]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^[2]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过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、AMP、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

参考文献

- 1 刘乐琴,程一棹,瞿丹兵,等.人 PHA 预刺激的 LAK 细胞与常规制备的 LAK 细胞生物学特性的比较.上海免疫学杂志,1994,14(6):321-4.
- 2 袁小林,程一棹,王艳,等.PHA-LAK 细胞激活培养过程中多项免疫学指标的动态分析.上海免疫学杂志,1997,17(4):204-6.
- 3 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods, 1983, 65(5):55.
- 4 王艳平,陈晓禾,张文庚,等.以 SMMC-7721 为靶细胞 MTT 法检测 LAK 细胞活性方法的建立.中国肿瘤临床与康复,1999,6(3):3-5.
- 5 王琦,王波,白惠卿.改良的 MTT 比色法测定 NK 细胞杀伤活性.宁夏医学院学报,1999,21(2):86-7.
- 6 何金生,李瑞珠,宗庭益.MTT 还原法检测 NK 细胞活性的方法学研究.中国免疫学杂志,1996,12:356-8.
- 7 雷殿良,马霄,顾磊,等.MTT 比色法测定促肝细胞生长物质对肝细胞生长的刺激活性.微生物学免疫学进展,1999,27(3):16-20.
- 8 吴军,王晓怀,杨太成.MTT 比色法及其在肿瘤生物治疗效果检测中的应用.广东医学,2001,22(增刊):146-7.

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苷.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.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. Acta Physiol Scand, 1990, 139(3):459-66.
- 4 Whitlock DM, Terjung RL. ATP depletion in low twitch red muscle of rat. Am J Physiol, 1987, 253(3pt1):c426-32.
- 5 Vinogradova IA, Shevchenko AI. The pharmacological correction of respiratory musculature fatigue. Eksp Klin Farmakol, 1997, 60(4):35-7.
- 6 Bark H, Nizri M, Tarasuik A. Effect of hyperphosphatemia on diaphragmatic strength and endurance. J Appl Physiol, 1992, 73(1):82-7.
- 7 Aldrich TK. Respiratory muscle fatigue. 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. Am Rev Respir Dis, 1989, 139: A162-3.
- 9 Shindoh C, Di Marco A, Thomas A. Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. J Appl Physiol, 1990, 68(5):2107-13.