

自由基在骨骼肌缺血再灌注损伤中作用的实验性研究

王立金¹, 王 慧², 方玉荣¹, 汪思应³

(1. 安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001; 2. 淮南第二矿工医院, 安徽 淮南 232052; 3. 安徽医科大学病理生理学教研室, 安徽 合肥 230022)

摘要:目的 研究自由基在骨骼肌缺血再灌注损伤中的作用。方法 用 32 kg 重物挤压家兔双后肢大腿和臀部 4 h 或 5 h 制作骨骼肌缺血再灌注损伤的动物模型, 分别测定实验动物的血浆、组织自由基及细胞损伤的变化。结果 两挤压伤组在解压后 2 h 内平均动脉压明显低于对照组 ($P < 0.05$), 血浆丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)含量和 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酸酶(NAG)活性在解压后 24 h 均高于对照组 ($P < 0.05$ 或 < 0.01); 两挤压伤组比较: 压伤 5 h 组平均动脉压在解压后 2 h 内低于压伤 4 h 组 ($P < 0.05$), 而血浆 MDA、NO、NAG 及组织 MDA、NO 也高于压伤 4 h 组 ($P < 0.05$)。结论 骨骼肌缺血时可产生大量的自由基, 从而造成骨骼肌缺血再灌注损伤。

关键词: 自由基; 缺血再灌注损伤; 挤压伤; 家兔

中图分类号: R642 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)02-0068-03

Effect of free radical on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscles

WANG Li-jin¹, WANG Hui², FANG Yu-rong¹, WANG Si-ying³

(1. Department of Pathophysiology, Medical College, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China; 2. Huainan Second Miner's Hospital, Huainan 232052 China; 3. Department of pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Abstract: Objective To explore the role of free radical played in ischemia-reperfusion injury of skeletal muscles. **Method** The experimental ischemia-reperfusion injury model was made by crushing the hindlimbs and buttocks of the rabbit with a 32 kg heavy object for 4 h or 5 h (two groups), then measured the activities of SOD, NAG and the levels of MDA, NO in plasma and crushed muscles respectively. **Result** The mean arterial blood pressures of the rabbits in both crushing groups were lowered comparing with that of the control ($P < 0.05$) two hours after removing the object, while the NAG activity and the levels of MDA, NO were obviously raised ($P < 0.01$) 24 h after removing the object. The levels of MDA, NO in heart, lung, liver, kidney, intestine and skeletal muscle tissues in both crushing groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). BP in crushing 5 h group was lower than that in crushing 4 h group ($P < 0.05$), while the activity of NAG and levels of MDA, NO in plasma and in tissues in crushing 5 h group were higher than those in crushing 4 h group ($P < 0.05$). **Conclusion** The free radicals were induced by ischemia-reperfusion injury of skeletal muscles and related to time of skeletal muscles ischemia.

Key words: Free radicals; Ischemia-reperfusion injury; Crush injury; Rabbits

挤压伤是临床上一种常见的创伤, 由于临床上挤压伤发病部位不同, 挤压时间不同, 轻重不一, 其表现差异较大。本文用动物实验研究挤压伤的发病机制, 为临床防治挤压伤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 制作动物模型的方法

健康家兔 50 只, 体重 (2.12 ± 0.16) kg, 雌雄各半, 实验前禁食 12 h。实验时家兔被仰卧固定于兔台上, 在普鲁卡因局部麻醉下, 行颈正中切口, 分离颈外静脉并插管, 用以取血; 分离颈总动脉并插管, 连压力换能器, 接 RM-6200 四道生理记录仪 (成都仪器

厂) 用以测量动脉血压。测定基础血压后, 将颈部导管引至颈部皮下, 露出体外, 缝合切口, 将动物俯卧固定于兔台上, 用薄泡膜放于兔双后肢的大腿和臀部, 用于固定受压部位, 上压 32 kg 重物^[1]。

1.2 分组

(1) 压伤 4 h 组 20 只; (2) 压伤 5 h 组 20 只, 解除挤压后, 将动物仰卧固定于兔台上, 观察血压 2 h, 取出动脉插管, 释放动物, 正常喂养; 上述 2 组解压 24 h 后分别采血, 并处死动物立即取心、肺、肝、肾、小肠及挤压伤处的骨骼肌组织。(3) 正常对照组 10 只, 手术后不挤压, 观测 24 h 后分别采血, 处死动物并取同上部位的组织。

1.3 标本测定

取静脉血测定血浆丙二醛 (MDA, 硫代巴比妥酸

收稿日期: 2003-08-04; 修回日期: 2004-01-13

作者简介: 王立金 (1963-), 男, 安徽霍邱人, 硕士, 副教授, 从事创伤、休克与多器官功能障碍综合征研究。

法)、超氧化物歧化酶 (SOD, 核黄素光照法)、一氧化氮 (NO, 用其代谢物 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 反映, 硝酸还原酶法)、N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酸酶 (NAG, 对硝基苯酚比色法^[2], 对硝基苯 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖购于上海医学化工研究院)。分别于家兔解除挤压 24 h 后, 取心、肝、肺、肾、小肠和骨骼肌 (骨骼肌组织取于受压部位) 组织, 每次取材部位固定; 用生理盐水制成 10% 组织匀浆液, 离心后上清液用于测定组织 MDA 和 NO 的含量。MDA、SOD 和 NO 的试剂盒

购于南京聚力生物工程研究所。

1.4 统计学处理

所有资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各組间比较采用 *t* 检验或 χ^2 检验。

2 结果

2.1 实验各组血压的变化

两挤压伤组家兔在解压后血压迅速下降, 在 15 ~ 120 min 间, 均低于对照组; 压伤 5 h 组血压亦明显低于压伤 4 h 组, 见表 1。

表 1 实验家兔解压后 2 h 内的血压变化 ($\bar{x} \pm s$)

mmHg

组别	基础血压	解压前	解 压 后				
			15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	131.3 ± 11.3	132.0 ± 11.3	132.8 ± 11.3	134.5 ± 12.0	129.8 ± 12.0	129.0 ± 10.5	129.0 ± 6.8
压伤 4 h 组	131.3 ± 12.0	123.8 ± 10.5	102.8 ± 7.5 ^{▲*}	104.3 ± 1.8 ^{▲*}	102.8 ± 6.8 ^{▲*}	101.3 ± 6.8 ^{▲*}	99.0 ± 6.0 ^{▲*}
压伤 5 h 组	132.0 ± 11.3	122.3 ± 9.8	88.5 ± 6.0 ^{▲▲}	90.8 ± 7.5 ^{▲▲}	88.5 ± 6.0 ^{▲▲}	86.3 ± 6.0 ^{▲▲}	84.0 ± 6.0 ^{▲▲}

两压伤组与对照组比较 [▲]*P* < 0.05, ^{▲▲}*P* < 0.01; 两压伤组之间比较 **P* < 0.05

2.2 实验各组血浆 MDA、SOD、NO 和 NAG 的变化

挤压伤家兔在解除挤压后, 血浆 MDA 逐渐升高, 并有显著的统计学意义; 压伤 5 h 组血浆 MDA 亦明显高于压伤 4 h 组。挤压伤家兔血浆 SOD 变化表现为解除挤压后升高, 但无统计学意义; 压伤 5 h 组在解压后 6 h 至 24 h 间, 血浆 SOD 明显低于对照组, 24 h

时也低于压伤 4 h 组, 均有统计学意义。挤压伤家兔血浆 NO 变化表现为解除挤压后, 血浆 NO 逐渐升高 (*P* < 0.01), 两挤压伤组之间差异也有显著性 (*P* < 0.01)。挤压伤组在肢体解除挤压后, 血浆 NAG 比对照组高, 且压伤 5 h 组比压伤 4 h 组血浆 NAG 升高更明显, 见表 2。

表 2 实验家兔血浆 MDA、SOD、NO 和 NAG 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

项目	组别	基础值	解压前	解 压 后			
				0.5 h	2 h	6 h	24 h
MDA (mmol/L)	对照组	1.56 ± 0.24	1.57 ± 0.26	1.58 ± 0.29	1.59 ± 0.30	1.64 ± 0.35	1.66 ± 0.35
	压伤 4 h 组	1.57 ± 0.26	1.69 ± 0.34	2.30 ± 0.43 ^{▲▲*}	2.69 ± 0.52 ^{▲▲*}	2.95 ± 0.56 ^{▲▲*}	3.43 ± 0.58 ^{▲▲*}
	压伤 5 h 组	1.56 ± 0.25	1.70 ± 0.36	2.78 ± 0.55 ^{▲▲}	3.44 ± 0.61 ^{▲▲}	3.72 ± 0.57 ^{▲▲}	4.18 ± 0.59 ^{▲▲}
SOD (U/L)	对照组	126.9 ± 11.5	127.7 ± 11.7	128.7 ± 11.9	129.7 ± 12.2	129.8 ± 11.9	129.7 ± 13.2
	压伤 4 h 组	126.8 ± 12.1	129.9 ± 12.6	138.3 ± 13.0	123.9 ± 10.9	119.7 ± 11.3	110.2 ± 12.8*
	压伤 5 h 组	126.7 ± 11.2	130.5 ± 12.9	135.1 ± 12.4	115.3 ± 14.0	110.6 ± 13.3 [▲]	89.1 ± 12.0 [▲]
NO (μmol/L)	对照组	27.2 ± 2.8	27.6 ± 3.0	27.9 ± 3.3	28.3 ± 3.2	29.3 ± 3.1	29.5 ± 3.4
	压伤 4 h 组	27.4 ± 3.0	29.9 ± 3.3	48.6 ± 4.3 ^{▲▲*}	58.8 ± 4.4 ^{▲▲*}	63.2 ± 5.6 ^{▲▲*}	66.3 ± 6.2 ^{▲▲*}
	压伤 5 h 组	27.3 ± 2.9	30.7 ± 3.5	55.2 ± 4.9 ^{▲▲}	68.5 ± 5.6 ^{▲▲}	79.3 ± 6.8 ^{▲▲}	89.8 ± 6.9 ^{▲▲}
NAG (U/L)	对照组	16.0 ± 2.7	16.2 ± 2.8	16.4 ± 2.8	16.6 ± 2.9	16.9 ± 3.0	17.1 ± 3.5
	压伤 4 h 组	15.7 ± 2.9	18.4 ± 3.2	33.1 ± 4.2 ^{▲▲*}	37.6 ± 3.9 ^{▲▲*}	42.8 ± 4.5 ^{▲▲*}	49.7 ± 4.5 ^{▲▲*}
	压伤 5 h 组	16.1 ± 2.8	19.6 ± 3.4	40.7 ± 4.8 ^{▲▲}	50.4 ± 5.1 ^{▲▲}	59.2 ± 7.1 ^{▲▲}	67.0 ± 7.6 ^{▲▲}

两压伤组与对照组比较 [▲]*P* < 0.05, ^{▲▲}*P* < 0.01; 两压伤组之间比较 **P* < 0.05 ***P* < 0.01

2.3 实验各组器官组织 MDA 和 NO 含量变化

实验家兔组织 MDA 变化表现为: 挤压伤各组心、肺、肝、肾、小肠和骨骼肌组织 MDA 均比对照组高; 压伤

5 h 组比压伤 4 h 组升高更为明显。挤压伤各组组织 NO 表现明显高于对照组组织 NO (*P* < 0.01), 压伤 5 h 组则比压伤 4 h 组升高更为明显 (*P* < 0.01), 见表 3。

表 3 实验家兔各器官组织 MDA 和 NO 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	组 别	心	肺	肝	肾	小肠	骨骼肌
MDA (nmol/g wet)	对照组	274 ± 28	358 ± 31	271 ± 28	280 ± 28	220 ± 25	279 ± 29
	压伤 4 h 组	375 ± 25 ^{▲*}	435 ± 28 ^{▲*}	360 ± 30 ^{▲*}	442 ± 32 ^{▲*}	316 ± 30 ^{▲*}	353 ± 23 ^{▲*}
	压伤 5 h 组	443 ± 30 ^{▲▲}	585 ± 32 ^{▲▲}	486 ± 29 ^{▲▲}	600 ± 33 ^{▲▲}	381 ± 29 ^{▲▲}	440 ± 30 ^{▲▲}
NO (nmol/g wet)	对照组	24.8 ± 1.7	27.1 ± 1.5	27.4 ± 1.2	22.9 ± 1.9	26.5 ± 1.3	23.3 ± 1.4
	压伤 4 h 组	46.6 ± 3.2 ^{▲▲*}	44.4 ± 3.2 ^{▲▲*}	54.3 ± 3.5 ^{▲▲*}	51.4 ± 3.5 ^{▲▲*}	59.3 ± 3.0 ^{▲▲*}	57.0 ± 3.3 ^{▲▲*}
	压伤 5 h 组	60.7 ± 3.3 ^{▲▲}	69.2 ± 3.8 ^{▲▲}	81.6 ± 3.7 ^{▲▲}	78.4 ± 4.1 ^{▲▲}	72.4 ± 3.3 ^{▲▲}	70.6 ± 3.6 ^{▲▲}

两压伤组同对照组比较 [▲]*P* < 0.05, ^{▲▲}*P* < 0.01; 两压伤组之间比较 **P* < 0.05 ***P* < 0.01

3 讨论

挤压伤并发症的多少以及死亡率的高低均与病人受挤压的时间有关^[3]。本研究结果显示, 挤压伤后, 平均动脉压明显降低(同对照组比较), 解除挤压后肢体挤压 5 h 比肢体挤压 4 h 血压下降更为明显, 提示挤压时间越长, 骨骼肌缺血时间越长, 解除挤压后血压下降亦越明显, 导致并发症和死亡率也越高。

挤压伤在解除挤压后, 挤压处的骨骼肌出现了典型的缺血再灌注损伤, 其机制比较复杂, 自由基大量产生可能是主要机制之一。在组织缺血缺氧时, 由于 ATP 含量降低, 离子转运功能障碍, Ca^{2+} 进入细胞激活 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶, 促使黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶。另由于 ATP 分解, ADP、AMP 含量升高, 并依次分解生成次黄嘌呤, 故缺血组织中次黄嘌呤大量堆积; 再灌注时, 大量分子氧随血液进入缺血组织, 黄嘌呤氧化酶在催化次黄嘌呤转变为尿酸的两步反应中, 产生大量氧自由基—— O_2^- 。同时细胞内的一氧化氮合酶(NOS)亦被激活, 促使 L-精氨酸转换成瓜氨酸和 NO, 而 NO 和氧自由基相互促进作用^[4,5], 两者可迅速反应生成具有强氧化性物质——过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)。这些自由基可与细胞各种成分, 如膜磷脂、蛋白质、核酸等发生反应, 造成细胞结构损伤和功能代谢障碍。本结果显示, 脂质过氧化物的终产物之一——MDA, 在挤压伤组血浆及受压组织中均明显升高, 解压后升高更显著。作为清

除 O_2^- 的特异性酶——SOD, 主要存在于细胞内, 在解除挤压后, 由于细胞损伤释放出大量 SOD, 使挤压伤组血浆 SOD 升高; 但随着氧自由基的大量消耗, 血浆 SOD 逐渐下降。作为氮自由基, NO 在挤压伤组中也逐渐增加。上述情况均表明, 挤压伤后骨骼肌有大量自由基产生^[6], 并造成组织损伤, 且与骨骼肌缺血时间有密切关系, 挤压伤 5 h 组比挤压伤 4 h 组产生的自由基明显增多, 而反映脂质损伤的指标——血浆和组织 MDA (脂质过氧化物的终产物) 含量、血浆 NAG (细胞溶酶体内的一种酸性水解酶) 活性均明显增高。提示肢体损伤程度与挤压时间密切相关, 挤压时间愈长, 再灌注损伤越重, 机体损害越多, 并发症较多。

参考文献:

[1] 王立金, 王慧, 方玉荣. 挤压伤引起多器官功能障碍综合征的实验研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16 (6): 152-155.
 [2] 杨振修, 冯仁丰, 陆慈安. 唾液和尿液 N-乙酰β-D-氨基葡萄糖苷酶的测定方法及其临床意义 [J]. 上海医学, 1983, 6: 228.
 [3] 王立金, 金丽娟, 王静珍, 等. 挤压伤引起多器官衰竭的动物模型 [J]. 中国病理生理杂志, 1994, 10 (2): 220-221.
 [4] Richter C, Schweizer M, Ghafounifar P. Mitochondria, nitric oxide and peroxynitrite [J]. Methods Enzymol, 1999, 301 (3): 381-393.
 [5] 王立金, 汪思应, 方玉荣. 挤压伤后丙二醛和一氧化氮的变化 [J]. 中国基层医药, 2002, 9 (6): 531-532.
 [6] 方玉荣, 王立金, 李文月, 等. 辅酶 Q_{10} 和甘露醇在挤压伤中的治疗作用 [J]. 淮南矿业学院学报, 1996, 16 (1): 61-64.

· 病例报告 ·

误服过氧乙酸致食道下段 严重狭窄 1 例报告

杜 军, 白 路, 赵文静

(沈阳军区总医院, 辽宁 沈阳 110016)

患者, 男, 56 岁, 病案号: 329761。自述 2003 年 5 月因口渴误服过氧乙酸原液约 20 ml, 即感口腔、咽部、胸骨后烧灼样疼痛。在当地医院给予口服鸡蛋清、牛奶、氢氧化铝凝胶等对症治疗, 症状减轻于 7 d 后出院。平素健康, 无胃肠疾病史。近 2 个月逐渐出现吞咽困难, 并渐加重至仅能进流食, 体重减少 10 kg。在当地医院做钡餐检查发现食道中下段狭窄。8 月 25 日于我院做胃镜检查, 诊断为食道下段狭窄(化学灼伤), 拟实施食道气囊扩张术。查体: 一般情况稳定, 头颈部、肺部及肝脾无异常, 心脏节律正常。脊柱四肢正常, 未引出病理反射。胸片和心电图正常。

胃镜检查报告: 食管距门齿 33~41 cm 见管腔环形狭窄, 四周凹凸不平, 胃镜不能通过, 行 10 mm 气囊注水分两段扩

张, 第一段注气 1 个大气压, 第二段注气 1.5 个大气压, 每段持续 1 min, 扩张后管腔明显增大, 镜身可顺利通过, 创面轻度出血, 用止血水 100 ml 喷洒止血, 患者除胸骨后有胀感外无明显疼痛。留院观察, 静脉滴注抗生素, 口服云南白药等对症治疗 3 d。

讨论 过氧乙酸 (peracetic acid) 是具有强大氧化能力的消毒剂。较高浓度过氧乙酸对皮肤有强烈刺激作用。浓酸使蛋白质与角质溶解或凝固, 呈界限明显的组织灼伤, 口服者在口腔、食管、胃黏膜出现病变, 严重者可穿孔。由于烧灼伤疤痕收缩, 而致食管、胃部狭窄和粘连性肠梗阻等后遗症。

本例患者仅误服约 20 ml 过氧乙酸 3 个月后发现严重食道狭窄, 可能与特异体质有关。因此我们建议: (1) 对此类口服者应按照接触工业化学性强酸物质处理原则治疗; (2) 立即就地取材, 口服清水稀释, 或鸡蛋清、牛奶、豆浆等保护胃、食道黏膜; (3) 入院后给予胃黏膜保护剂、制酸剂和 H_2 受体阻滞等改善症状; (4) 恢复期如出现渐进性吞咽困难, 可根据服毒时间长短选择钡餐或胃镜检查; (5) 对口服过氧乙酸者痊愈后一年内应每 3 个月做一次胃镜或钡餐检查, 以判断食道和胃肠损害情况。

(收稿日期: 2003-09-19)