

· 论 著 ·

## 全身炎症反应综合征大鼠心脏腺苷酸水平的动态变化及意义探讨

李巍<sup>1</sup>, 刘春峰<sup>1</sup>, 袁壮<sup>1</sup>, 李强<sup>2</sup>, 苏力<sup>2</sup>, 岳晓红<sup>3</sup>

(中国医科大学第二临床学院1. 儿科; 2. 中心实验室, 辽宁 沈阳 110003; 3. 沈阳医学院附属中心医院儿科, 辽宁 沈阳 110024)

**[摘要]** 目的 对大鼠全身炎症反应综合征(SIRS)模型心肌细胞结构、能量代谢的变化进行研究,以期进一步了解心肌能量代谢改变在SIRS向多器官功能障碍综合征发生发展过程中的作用。方法 Wistar大鼠随机分为SIRS-A组(内毒素注射后1h)、SIRS-B组(内毒素注射后3h)及对照组(Con)。高效液相色谱法测定各组大鼠心肌ATP、ADP和AMP的含量。大鼠心肌细胞进行透射电镜检查。结果 ①SIRS-A组ATP、ADP及AMP含量分别为 $(1.51 \pm 0.39) \times 10^{-1}$ ,  $(3.22 \pm 0.59) \times 10^{-1}$ 和 $(2.17 \pm 0.56) \times 10^{-1}$  mmol/g; SIRS-B组为 $(1.31 \pm 0.53) \times 10^{-1}$ ,  $(2.75 \pm 0.74) \times 10^{-1}$ ,  $(1.88 \pm 0.57) \times 10^{-1}$  mmol/g; 对照组为 $(2.57 \pm 0.82) \times 10^{-1}$ ,  $(5.75 \pm 0.69) \times 10^{-1}$ ,  $(5.35 \pm 0.76) \times 10^{-1}$  mmol/g, 3组ATP、ADP和AMP含量差异有显著性( $P < 0.05$ 或 $0.01$ )。SIRS-A组、SIRS-B组的ATP、ADP和AMP含量低于对照组( $P < 0.05$ ); SIRS-B组与SIRS-A组之间ATP、ADP和AMP含量差异无显著性( $P > 0.05$ )。②透射电镜观察可见SIRS大鼠心肌细胞线粒体排列紊乱, 空泡变性, 肌纤维水肿。结论 能量代谢障碍和线粒体功能结构的改变等在SIRS发展为MODS过程中起到了重要的作用。

**[关键词]** 全身炎症反应综合征; 多器官功能障碍综合征; 腺苷三磷酸; 高效液相色谱; 心肌; 大鼠

**[中图分类号]** R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)06-0639-04

## Changes and Significance of Adenylic Acid Metabolism in the Myocardium of Rats with the Systemic Inflammatory Response Syndrome

LI Wei, LIU Chun-Feng, YUAN Zhuang, et al.

Department of Pediatrics, Second Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110003, China

**Abstract:** **Objective** To study the changes of the myocardial cellular structure and energy metabolism and to explore the effects of myocardial energy metabolic disorders on the development into the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in systemic inflammatory response (SIRS) rats. **Methods** The SIRS rat model was created by injecting high-dose endotoxin (20 mg/kg). The contents of ATP, ADP and AMP were measured with the method of HPLC in the myocardium of the SIRS-A group rats (1 hour after injections of endotoxin), the SIRS-B group rats (3 hours after injections of endotoxin) and the control group rats (no endotoxin was given). The pathological changes in all the SIRS rats were studied with the electron microscope. **Results** The contents of ATP, ADP and AMP in the SIRS-A group rats [ $(1.51 \pm 0.39) \times 10^{-1}$ ,  $(3.22 \pm 0.59) \times 10^{-1}$  and  $(2.17 \pm 0.56) \times 10^{-1}$  mmol/g] and the SIRS-B group rats [ $(1.31 \pm 0.53) \times 10^{-1}$ ,  $(2.75 \pm 0.74) \times 10^{-1}$  and  $(1.88 \pm 0.57) \times 10^{-1}$  mmol/g] were lower than those in the control group rats [ $(2.57 \pm 0.82) \times 10^{-1}$ ,  $(5.75 \pm 0.69) \times 10^{-1}$  and  $(5.35 \pm 0.76) \times 10^{-1}$  mmol/g] ( $P < 0.05$ ). No significant difference in the ATP, ADP and AMP contents was found between the SIRS-A group rats and SIRS-B group rats. Under the electron microscope, the mitochondria in myocardium cells revealed structural disorders with vacuolar degeneration and edematous myocardial fibers in all the SIRS rats. **Conclusions** Energy metabolism disorders and mitochondria dysfunctions of the myocardium may play an important role in the development of SIRS.

**[收稿日期]** 2001-02-21; **[修回日期]** 2001-08-24

**[作者简介]** 李巍(1972-), 女, 硕士, 主治医师。

**Key words:** Systemic inflammatory response syndrome; Multiple organ dysfunction syndrome; ATP; HPLC; Myocardium; Rat

全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的发生发展是个错综复杂的过程,SIRS发展为多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的机理研究得较多,虽然多数学者已接受该过程是各方面因素综合作用的结果这一观点,但临床治疗MODS效果仍不满意。目前,生命器官的缺血缺氧、能量代谢障碍、氧输送和氧消耗之间关系失调在这一过程中起着重要作用的观点日益引起大家的关注<sup>[1]</sup>。Iannoli<sup>[2]</sup>证实内毒素制造的SIRS模型存在骨骼肌的微循环障碍、氧合作用及生物化学改变。为进一步研究SIRS发展为MODS是否由于微循环障碍、组织细胞缺血缺氧,进而引起能量代谢障碍和细胞形态功能的改变,本实验以内毒素诱发的SIRS为模型,监测心肌ATP、ADP和AMP含量的动态变化,观察心肌细胞超微结构的改变,从能量代谢及亚细胞结构改变等方面深入认识SIRS发展为MODS的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组及模型制备

Wistar大鼠30只,体重240~260g,雌雄各半,按同窝随机分3组:对照组、SIRS-A组(内毒素注射后1h)和SIRS-B组(内毒素注射后3h),每组各10只。大肠杆菌内毒素E. Coli O<sub>55</sub>B<sub>5</sub>购自美国Sigma公司。实验动物Wistar大鼠由中国医大二院动物实验室提供。

大鼠予戊巴比妥40mg/kg腹腔注射,待麻醉生效后,监测直肠温度、心率、呼吸、球后静脉丛取血查WBC、中性分叶核数量。SIRS组大鼠按20mg/kg腹腔注射大肠杆菌内毒素,对照组腹腔注射等量无菌生理盐水。分别于给药后1h和3h,以直肠温度、心率、呼吸、血WBC、中性分叶核数量的变化和血TNF- $\alpha$ 作为观察是否达到SIRS指标。剖开胸腔,暴露心脏。快速离断心脏,液氮保存的铝夹在心脏原位冰冻,取组织100mg,置于液氮中低温保存,HPLC检测腺苷酸水平。取心肌组织约1mm<sup>3</sup>放入2.5%戊二醛与二甲砷酸缓冲液中固定,进行透射电镜观察。

动物SIRS的参照标准<sup>[3]</sup>:①直肠温度较对照组升高或降低0.8℃;②呼吸频率超过对照组2倍,或PaCO<sub>2</sub>小于对照组的75%;③心率超过对照组的2倍;④血WBC总数大于对照组的2倍,或小于对

照组的50%,分叶核总数大于10%;⑤炎症性介质如TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6和PLA<sub>2</sub>显著增多。

### 1.2 方法

**1.2.1 ATP、ADP和AMP含量测定** HPLC液相色谱仪(美国Waters公司产品),ATP、ADP和AMP标准品购自美国Sigma公司。预柱为Nova-pak C18,色谱柱为Nova-pak C18(3.9mm×150mm),柱温为室温,流动相为pH5.3的0.1mol/L磷酸二氢铵缓冲液,流速为0.9ml/min。进样量为20 $\mu$ l,紫外线检测波长为254nm,灵敏度为0.01A。取液氮保存的组织50mg放入0.5ml的10%高氯酸中,在冰浴下间断超声匀浆3min,在4℃以8000r/min离心5min,取上清液400 $\mu$ l,用1mol/L碳酸钾调pH值至7.0。在4℃以8000r/min离心5min,取上清液20 $\mu$ l进样检测,得出峰面积。将ATP、ADP和AMP标准品分别配制成0.01mmol/L,0.02mmol/L,0.0625mmol/L和0.125mmol/L的标准液,取20 $\mu$ l进样,得出标准曲线。使标准品浓度与峰面积呈良好的线性关系。将样品ATP、ADP和AMP获得的峰面积与标准峰面积相比,计算出样品ATP、ADP和AMP的含量( $\mu$ mol/g)。

**1.2.2 心肌细胞透射电镜检查** 心肌组织1mm<sup>3</sup>于2.5%戊二醛溶液与二甲砷酸缓冲液中固定60min,于1%四氧化锇中固定2h,丙酮脱水,环氧树脂包埋,60℃固化,醋酸铀和枸橼酸铅双重染色超薄切片,透射电镜观察。

### 1.3 统计学处理

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异显著性分析应用F检验,两两比较用q检验。

## 2 结果

### 2.1 SIRS模型的观察

按照上述标准,SIRS-A组、SIRS-B组共20只大鼠全部达到动物SIRS的诊断标准,对照组均未达到。

### 2.2 心肌ATP、ADP和AMP含量

对照组、SIRS-A组、SIRS-B组的ATP、ADP和AMP含量差异有显著性( $P < 0.05$ 或 $0.01$ )。SIRS-A、SIRS-B组的ATP、ADP和AMP含量均低于对照组( $P < 0.05$ ),SIRS-A组和SIRS-B组的ATP、ADP和AMP含量差异无显著性( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 3组大鼠心肌ATP、ADP和AMP水平的变化

Table 1 The level of ATP, ADP and AMP in myocardium of rats in 3 groups (n=10,  $\bar{x} \pm s$ ,  $\times 10^{-1}$  mmol/g)

| 组别     | ATP                    | ADP                    | AMP                    |
|--------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 对照组    | 2.57±0.82              | 5.75±0.69              | 5.35±0.76              |
| SIRS-A | 1.51±0.39 <sup>a</sup> | 3.22±0.59 <sup>a</sup> | 2.17±0.56 <sup>a</sup> |
| SIRS-B | 1.31±0.53 <sup>a</sup> | 2.75±0.74 <sup>a</sup> | 1.88±0.57 <sup>a</sup> |
| F值     | 4.85                   | 11.45                  | 7.46                   |
| P      | <0.05                  | <0.01                  | <0.01                  |

注: a 与对照组比较 P<0.05

2.3 心肌细胞透射电镜检查

电镜下内毒素注射后1h就出现心肌细胞线粒体排列紊乱、体积增大、嵴肿胀等改变,部分出现空泡变性。心肌纤维排列不整齐,部分心肌纤维水肿,肌丝束分离。Z线和闰盘扭曲,Z线间距离缩短。细胞核核膜凹陷较多。内毒素注射后3h组上述改变更为显著,甚至出现肌纤维肿胀断裂,肌丝束分离。(见图1~4)



图1 对照组(×16.8K倍)  
肌节各区带清晰可见,心肌纤维和线粒体排列整齐,核膜结构完整。



图3 SIRS-A组(×21K倍)  
局部肌丝聚集,Z线间距离缩短,核膜不清,周围心肌纤维水肿,闰盘扭曲。



图2 SIRS-A组(×11.2K倍)  
心肌纤维和线粒体排列紊乱,线粒体增多,形态异常出现空泡变性。Z线间距离缩短。细胞核膜凹陷较多,染色质聚集

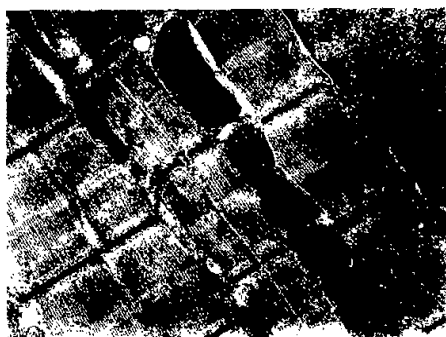


图4 SIRS-B组(×21K倍)  
线粒体峰肿胀,膜不完整,空泡变性。肌纤维肿胀断裂,肌丝束分离。间质水肿

图1~4 3组心肌细胞透射电镜检查

Figure 1~4 The findings of 3 groups under the electron microscope

3 讨论

全身炎症反应综合征(SIRS)自1991年美国ACCP/SCCM正式提出后,已经得到了广泛的重视,统计学资料表明临床大部分ICU患者属SIRS范畴。SIRS概念的提出在一定程度上解释了临床上

许多MODS的发生发展过程,为临床解决这一棘手的问题指出了新的研究方向。目前人们对SIRS发生和发展转化为MODS的机理进行了大量研究,相继提出许多假说<sup>[3]</sup>,如缺血-再灌注假说、细菌毒素假说、胃肠道假说、炎症失控假说、二次打击假说、基因调控假说等。各种假说从不同角度探讨SIRS发展为MODS的发生机理。现多认为是各方面因素

综合作用的结果。推测在 SIRS 发展到 MODS 的过程中各种因素作用的最终结局是组织器官的能量障碍或衰竭,而这又成为脏器功能障碍或衰竭的最根本原因。本文拟通过观察 SIRS 大鼠心肌高能磷酸化合物的改变及心肌超微结构的变化来证实这一观点。

本实验证实在内毒素注射后 1 h 和 3 h,大鼠心肌的 ATP、ADP 和 AMP 较正常明显下降,且随着 SIRS 持续时间延长有进一步下降的趋势。伴随着这种变化,心肌细胞线粒体也发生了明显的改变,出现心肌细胞线粒体排列紊乱,体积增大,嵴肿胀等改变,部分出现空泡变性。心肌纤维及细胞核也出现了病理改变。推测其他脏器也存在类似改变,这些变化表明 SIRS 时确实存在细胞能量代谢障碍及超微结构的损害,说明 SIRS 发展为 MODS 的最终原因可能为能量衰竭。

SIRS 时 ATP 生成减少可能与微循环障碍及细胞内耗氧途径的破坏有关。微循环障碍可导致心肌细胞的缺血缺氧,此外有研究证实 SIRS 时存在病理性的氧供依赖即氧输送( $\text{DO}_2$ )和氧消耗( $\text{VO}_2$ )之间关系失调。在充分供氧的情况下组织器官  $\text{VO}_2$  保持恒定,不依赖于  $\text{DO}_2$ ,当  $\text{DO}_2$  降低时,机体是通过增加组织摄取氧而使  $\text{VO}_2$  仍保持恒定的,而在  $\text{DO}_2$  低于一定程度( $\text{DO}_{2\text{crit}}$ )时, $\text{VO}_2$  生理性地随  $\text{DO}_2$  的降低而降低,呈线性相关。在发生败血症时, $\text{VO}_2$  病理性地随  $\text{DO}_2$  的降低而降低,呈线性相关,即  $\text{DO}_2$ 、 $\text{VO}_2$  和组织摄取氧均降低<sup>[4,5]</sup>。ATP 的生成包括无氧酵解和有氧化二个环节,在 SIRS 早期,机体处于“高动力状态”,组织细胞需氧量应增多,而

实际上组织获取氧量减少,则这必然存在无氧酵解相对增强,有氧化减弱,因此推测生成 ATP 的有氧化环节受阻。

由于正常心肌线粒体的功能是产生 ATP,而出现缺血缺氧后,线粒体转化成消耗 ATP 的细胞器。SIRS 早期有氧化生成的 ATP 减少,无氧酵解生成的 ATP 增多,线粒体要消耗大量由无氧酵解而产生的 ATP,随着 ATP 的消耗,能量供应不足以线粒体所需,则线粒体开始出现排列紊乱,体积增大,嵴肿胀,部分出现空泡变性等改变,这样,由于线粒体结构和功能严重受损,又导致组织利用氧生成 ATP 的能力进一步下降。而高能磷酸化合物的缺乏可以进一步加重心肌组织的损伤。提示对于上述各发展环节及时进行针对性治疗,可能会扭转 SIRS 的发展。

#### [参 考 文 献]

- [1] 刘春峰,袁壮. 内脏缺血缺氧代谢障碍在 SIRS 和 MODS 中的作用[J]. 小儿急救医学,2000, 7(4): 74-78.
- [2] Iannoli ED, Gayeski TE. Skeletal muscle function, oxygenation and biochemistry in an endotoxemic model of SIRS[J]. Adv Exp Med Biol, 1997, 428(2): 333-341.
- [3] 盛志勇,胡森. 多器官功能障碍综合征[M]. 北京:科学出版社,1999, 18-63.
- [4] Crouse ED, Julian MW, Dorinsky PM. High-dose endotoxin (LPS), but not ischemia/reperfusion (I/R) injury, causes systemic organ  $\text{VO}_2$ - $\text{DO}_2$  alterations[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 151(1): 323-328.
- [5] Chittock DR, Russell JA. Oxygen delivery and consumption during sepsis[J]. Clin Chest Med, 1996, 17(1): 263-278.

(本文编辑:俞燕)