

· 基础研究 ·

不同幅度脉冲膈肌起搏对兔膈肌 SOD、MDA、总抗氧化能力的影响

向毅 陈钢 王胜军 方勇军 蔡瑞君 邓亲恺

【摘要】目的 探讨不同幅度脉冲膈肌起搏(diaphragm pacing, DP)对新西兰大白兔膈肌的影响。**方法** 建立兔颈部 DP 模型,测定无起搏(A)组及脉冲幅度匀速增加(B)组、恒定(C)组、匀速减小(D)组起搏后膈肌组织 SOD、MDA 及 T-AOC。**结果** ①DP 后,B 组较 A 组 MDA 含量增加,SOD 及 T-AOC 减小($P>0.05$);②DP 后,C 组及 D 组较 A 组 MDA 含量增加,SOD 及 T-AOC 减小($P<0.05$);③DP 后,B 组较 C 及 D 组 MDA 含量少,SOD 及 T-AOC 活力强($P<0.05$)。**结论** ①脉冲幅度匀速增加通过减少氧自由基的产生,抗氧化能力的干扰,可能减缓了膈肌疲劳(diaphragm failure, DF)的发生,②脉冲幅度匀速增加与脉冲幅度恒定和匀速减小相比,是一种更为合理的 DP 方式。

【关键词】 膈肌起搏; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 总抗氧化能力

The effect of various pulse amplitudes on the amount of SOD, MDA, and T-AOC in the diaphragm of rabbit after diaphragm pacing XIANG Yi*, CHEN Gang, WANG Sheng-Jun, FANG Yong-Jun, CAI Rui-Jun, DENG Qin-Kai. * Department of Cardiothoracic Surgery, Nanfang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】Objective To explore the effect of various pulse amplitudes on the amount of MDA, SOD and the total anti-oxidation capacity (T-AOC) in the diaphragm of Zelanian rabbit after diaphragm pacing. **Methods** Twenty-four rabbits were used for establishing the diaphragm pacing model and then divided into groups A, B, C and D. No diaphragm pacing (DP) was administered with group A, while pacing with gradual increasing, gradual decreasing and constant pulse amplitude were administered, respectively, in groups B, C and D. The concentration of MDA, the activity of SOD and T-AOC were examined. **Results** Two hours of DP with gradual increasing pulse amplitude caused increase of the amount of MDA and decrease of SOD and T-AOC as compared with those without DP ($P>0.05$). Two hours of DP with both gradual decreasing and constant pulse amplitude caused increase of MDA and decrease of SOD and T-AOC ($P<0.05$) as compared with those without DP. DP with gradual decreasing or constant pulse amplitude exerted a significantly larger effect as regard to the increase of MDA and decrease of SOD and T-AOC ($P<0.05$) than with the gradual decreasing pulse amplitude. **Conclusion** DP with gradual increasing pulse amplitude might be able to decrease the incidence of diaphragm failure (DF) through decreasing oxygen-derived free radicals and maintain the anti-oxidation capability.

【Key words】 Diaphragm pacing; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Total anti-oxidation capability

近年来,膈肌起搏(diaphragm pacing, DP)已作为一种新型辅助通气技术而得到了较为广泛的运用,但对于不同幅度脉冲导致呼吸肌功能早期改变的原因尚不十分清楚,本研究以微电脑程控脉冲电流,对新西兰大白兔 DP 模型膈肌组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)及总抗氧化能力(total antioxidation capability, T-AOC)的变化进行对比观察,探讨不同幅度脉冲 DP 对兔膈肌 SOD、MDA、T-AOC 的影响。

材料与方法

一、实验动物

新西兰大白兔 24 只(第一军医大学实验动物中心提供),体重 2.0~2.5 kg,雌雄不拘。随机将动物分为 4 组,每组 6 只。A 组为无起搏对照组;B 组为脉冲幅度匀速增加组,脉冲幅度 0.5 mA→1.0 mA;C 组为脉冲幅度恒定组,脉冲幅度保持在 0.75 mA;D 组为脉冲幅度匀速减小组,脉冲幅度 1.0 mA→0.5 mA。

二、膈肌起搏模型制备

兔耳缘静脉注入 25% 乌拉坦 4~5 ml/kg 体重,麻

基金项目:广东省自然科学基金项目(No. 2002392)

作者单位:510515 广州,第一军医大学南方医院胸外科(向毅、陈钢、蔡瑞君);第一军医大学生物医学工程系(王胜军、方勇军、邓亲恺)

醉后固定于兔台,电毁损其延髓面神经后核内侧区,颈下方胸骨上切迹弧形切口,长约 6 cm,颈内静脉和胸锁乳突肌之间分离见横行臂丛神经,其内侧即为向内下纵行走行膈神经。用玻璃针分离膈神经 2 cm 挂于双极电极,湿盐水湿润神经,防干。创口皮肤做一皮兜,皮兜内近膈神经处滴入 40℃ 液体石蜡。双极电极连于膈肌起搏器(第一军医大学医工系研制)。以呼吸频率 50 次/min,吸、呼比 1:2,脉冲间隔时间 40 ms,行 DP 2 h。

三、标本的测定

SOD 活性用黄嘌呤氧化酶法测定,MDA 含量用硫代巴比妥酸法测定,T-AOC 用铁-菲啉类物质法测定(试剂盒均由南京建成生物工程研究所生产)。严格按照试剂盒说明书操作。蛋白质检测用考马斯亮蓝法^[1]。

四、标本的电镜观察

每只实验动物实验结束,取 1 mm × 1 mm × 1 mm 膈肌组织置于 2% 冰戊二醛溶液固定后,1% 锇酸溶液后固定,漂洗,脱水,浸透,包埋,孵育,制作超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色 JEM-1200EX 透射电镜下观察,摄像。

五、统计学分析

所有实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS(10.0 版本)软件进行方差分析。

结 果

一、各实验组膈肌超微结构观察

经电镜下观察,各组肌节结构整齐,糖原颗粒多,胞核呈梭形,无核周间隙,线粒体无空泡样改变(图 1~4)。

二、不同幅度脉冲 DP 对新西兰大白兔膈肌的影响

不同幅度脉冲 DP 2 h 后,各组兔膈肌 SOD、MDA、T-AOC 的变化见表 1。



图 1 A 组膈肌组织(醋酸铀-柠檬酸铅染色 ×10 000)
注:膈肌肌原纤维排列整齐,无核周间隙,线粒体排列规则,无空泡样改变

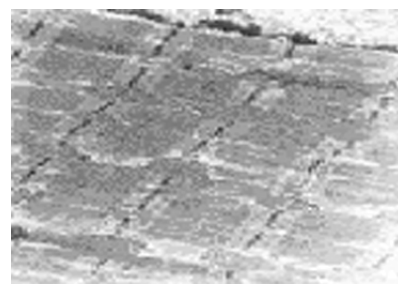


图 2 B 组膈肌组织(醋酸铀-柠檬酸铅染色 ×10 000)
注:膈肌肌节结构整齐,Z 线清晰,线粒体均匀分布在肌原纤维之间

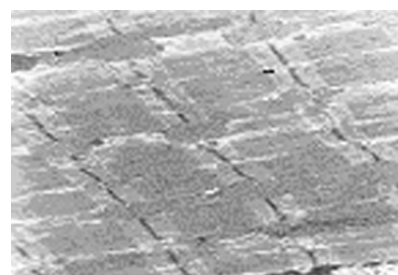


图 3 C 组膈肌组织(醋酸铀-柠檬酸铅染色 ×10 000)
注:膈肌肌原纤维排列整齐,Z 线清晰,线粒体呈圆形、卵圆形,嵴清晰,无电子密度改变



图 4 D 组膈肌组织(醋酸铀-柠檬酸铅染色 ×10 000)
注:膈肌肌原纤维排列整齐,无核周间隙

表 1 不同幅度脉冲 DP 对 4 组兔膈肌 SOD、MDA、T-AOC 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA (nmol/mg · pro)	SOD (U/mg · pro)	T-AOC (U/mg · pro)
A 组	6	50.22 ± 6.76	220.24 ± 20.29	2.34 ± 0.59
B 组	6	57.52 ± 6.71 [△]	201.63 ± 10.97 [△]	1.98 ± 0.29 [△]
C 组	6	70.15 ± 5.67 [*]	123.56 ± 19.76 [*]	1.52 ± 0.14 [*]
D 组	6	78.63 ± 5.05 [*]	110.24 ± 18.36 [*]	1.22 ± 0.15 [*]

注:与 A、B 两组相应数据比较,^{*}P < 0.05;与 A 组比较,[△]P > 0.05

讨 论

自由基在动物机体内通过酶系统与非酶系统产生,其攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物及其分解产物,如:醛基 MDA、脂氧基和脂过氧基等。在哺乳类动物体内同样有两种自由基清除系统,即酶促系统与非酶促系统。对寿命较长的超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)、过氧化氢

(H_2O_2) 等自由基和活性氧的清除主要由 SOD、过氧化氢酶(catalase, CAT)、含硒谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GSH-Px)、谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)还原酶和谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)等酶促系统的活性增强来完成细胞的抗氧化作用;同时其对寿命较短的羟自由基($\cdot\text{OH}$)和单线态氧($^1\text{O}_2$)等活性氧的清除则主要由 VA、VE、VC、 β -胡萝卜素、血浆铜蓝蛋白和黄酮类等非酶促系统的协同作用来发挥抗氧化性。多年研究发现 MDA、SOD 及 T-AOC 是膈肌自由基损伤和酶促、非酶促系统清除作用的敏感指标^[2-4],而 Stofan 等^[5]在大鼠对比实验中发现,普通的生理改变(膈肌长度、电刺激频率、二氧化碳浓度的改变)即会显著改变膈肌自由基产生。

DP 参数的选择多年来为各国学者所不断探索。以往研究发现^[6],DP 时随脉冲幅度增高,电流强度增大,增加了膈肌运动单位的募集,但也增加了膈肌疲劳的发生。故在本实验设计中,我们选择了动物 DP 时适宜的脉冲幅度,既满足通气的需要,又不致过早发生膈肌疲劳,使 DP 动物的通气更接近生理条件。实验終了,观察各组膈肌组织超微结构未见病理改变,说明此种 DP 参数设计合理,未致膈肌损伤。

本试验发现 DP 组(B、C、D 组)较 A 组 MDA 的含量高,而较 SOD 和 T-AOC 的活性低,这同 Jackson 等^[7]在应用电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)技术进行自由基研究时所发现的骨骼肌电刺激后较休息状态自由基增多的结果一致。表明 DP 导致了膈肌自由基及其清除力明显的改变,提示行 DP 时需尽可能地减少其带来的此种不利影响。而 B 组与 C、D 两组比较,膈肌的 MDA 含量低, SOD 活性高, T-AOC 亦增强($P < 0.05$)。我们认为发生上述差异的原因是起搏开始瞬间较强电流刺激导致单位时间内膈肌运动单位增多,从而产生过多自由基;同时在起搏开始瞬间 C 组和 D 组均较 B 组激发了更多的快肌纤维(Ⅱ型)收缩,而陈英杰等^[8]的研究认为,在快肌纤维(Ⅱ型)收缩时易产生更多地自由基;另外,起搏开始瞬间即出现的较强电流脉冲,可能导致对补体、吞噬细胞更强的激活,创伤性炎症更强。这些因素最终导致短期内自由基产生增多、膜脂质损害和增加 MDA 的产生,同时这种叠加的过强负荷最终亦导致短期内即

发生了自由基清除系统的破坏,并且可能以酶促系统的破坏为主。而 B 组通过减少自由基的产生,减少对抗氧化能力的干扰,可能会较 C 组和 D 组减缓膈肌疲劳的发生。但 Marzocchi 等^[9]则在一组 DP 的研究中发现,Ⅱ型肌纤维具有向高线粒体酶和低促糖分解酶活力的Ⅰ型肌纤维转化的能力,而这可能导致其抗疲劳性增强。故长期 DP 时是否会因这种转化减少肌肉自由基产生、且增强其清除能力尚待进一步深入研究。

实验同时发现 B 组与 A 组的 MDA 含量、SOD 和 T-AOC 活性相比,差异无显著性意义($P > 0.05$)。故我们认为匀速增加脉冲幅度是一种较好的 DP 方式,可能接近正常呼吸中枢对膈肌的驱动,其早期膜脂质的损害及自由基清除力的下降亦说明此种起搏方式尚不能完全模拟动物正常呼吸。对不同幅度脉冲增加的方式作进一步深入的研究将为减缓 DF 提供更充分理论依据。

参 考 文 献

- 1 蔡武城,赵志安.蛋白质的定量分析.见:蔡武城,袁厚积,主编.生物物质常用化学分析法.北京:科学出版社,1982.62.
- 2 Queiroz RN, Alves-Do-Prado W. Effects of L-arginine on the diaphragm muscle twitches elicited at different frequencies of nerve stimulation. *Braz J Med Biol Res*, 2001, 34:825-828.
- 3 Mohanraj P, Merola AJ, Wright VP, et al. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. *J Appl Physiol*, 1998, 84:1960-1966.
- 4 曹文峰,陈钢,蔡瑞君.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. *第一军医大学学报*, 2001, 21:837-838.
- 5 Stofan DA, Callahan LA, DIMARCO AF, et al. Modulation of release of reactive oxygen species by the contracting diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161:891-898.
- 6 Mador MJ. Respiratory muscle fatigue and breathing pattern. *Chest*, 1991, 100:1430-1435.
- 7 Jackson MJ, Edwards RH, Symons MC. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta*, 1985, 847:185-190.
- 8 陈英杰,郭庆芳,赵保路,等. ESR 研究大鼠疲劳时不同类型肌纤维的自由基变化. *中国运动医学杂志*, 1991, 10:135-139.
- 9 Marzocchi M, Brouillette RT, Klemka-Walden LM, et al. Effects of continuous low-frequency pacing on immature canine diaphragm. *J Appl Physiol*, 1990, 69:892-898.

(收稿日期:2003-12-14)

(本文编辑:阮仕衡)