

失血性休克时肠上皮细胞线粒体形态与功能变化研究

李伟文¹, 陆松敏¹, 武凡², 柏千荣¹, 刘建仓¹, 李萍¹, 郭素清¹, 程凤¹, 王正国¹

【摘要】 目的：定量分析大鼠失血性休克肠上皮细胞线粒体形态与功能的改变，探讨失血性休克缺血缺氧时肠上皮细胞线粒体结构和功能的改变。方法：Wistar 大鼠随机分为对照组、失血性休克 2h 和 5h 组，采用电镜观察、生物体视学测量线粒体形态，用 Clark 氧电极测线粒体呼吸功能。结果：失血性休克 2h 组线粒体平均截面周长、长径、平均直径及其面密度、体密度分别较对照组增加 24%、27%、25%、26%、44%，失血性休克 5h 组则分别较对照组增加 45%、45%、45%、47%、122%。休克 5h 组与对照组比较，平均截面面积增加 100%，比表面和数密度分别下降 32%、24%，嵴和基质破坏明显。休克 2h 线粒体呼吸控制率（RCR）已下降，休克 5h 组线粒体呼吸控制率与对照组比较减少 26.9%。P/O 值三组无改变。结论：失血性休克时大鼠肠上皮细胞线粒体形态发生显著改变：表现为肿胀，嵴和基质破坏，数量减少。RCR 值失血性休克 2h 开始降低。P/O 值变化不明显。

【关键词】 失血性休克；肠上皮细胞；线粒体；RCR；P/O 比值

【中图分类号】 Q244；R574 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726(2004)01-0009-04

Change of mitochondria morphometry and function of small intestinal epithelia in rats during hemorrhagic shock LI Wei-wen¹, LU Song-ming², WU Fan¹, et al. 1. Research Institute of Surgery, The 3rd Military Medical University, Chongqing, 400042, China; 2. Dept. of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi City, Shanxi Province, 046000, China

【Abstract】Objective: To study the change of mitochondria morphometry and function of intestinal epithelia in rats with hemorrhagic shock. **Method:** Healthy Wistar rats (n=12 and 21) were randomly divided into hemorrhagic shock 2 h, 5 h, and control groups. The mitochondria parameter of morphometry and function were measured by electron microscope and by biogenetics stereology and with Clark oxygen electrode respectively. **Result:** In hemorrhagic shock 2 h group, the mean boundary length (B), long pathway, average diameter, surface density (Sv), volume density (Vv) of mitochondrial profile increased by 24% (P<0.05), 27% (P<0.01), 26% (P<0.05), 44% (P<0.05) respectively. In hemorrhagic shock 5 h group, these parameters increased by 45% (P<0.01), 45% (P<0.01), 45% (P<0.01), 47% (P<0.01), 122% (P<0.01) respectively and the mean profile area (A) increased by 100%. Meanwhile, the specific surface (δ), numeral density (Nv) and the mitochondrial respiratory control ratio (RCR) decreased by 32% (P<0.01), 24% (P<0.05) and 26.9% (P<0.01) respectively. The P/O value kept unchanged in three groups. **Conclusion:** The primary changes of mitochondrial morphometry of intestinal epithelia in rats after hemorrhagic shock were swelling and disorganization of crystal matrix. The RCR decreased significantly but P/O value kept unchanged.

【Key words】 Hemorrhagic shock; intestinal epithelia; mitochondria; RCR; P/O

失血性休克（以下简称休克）是临床较常见的危重症之一。能量代谢障碍，线粒体损伤是休克的重要成因。本实验通过计量电镜观察大鼠休克时肠上皮细胞线粒体形态，进行生物体视学定量分析和测定线粒体呼吸功能，探讨能量代谢障碍的形态学基础及其在休克发生发展时的作用。

一、材料与方法

健康 Wistar 大鼠 12 只，随机分为三组（1）对照组；（2）休克 2h 组；（3）休克 5h 组；动物禁食过夜，3% 戊巴比妥钠 1ml/kg 腹腔麻醉，行右股动脉插管，供观察动脉血压和放血处理。休克 2h 组

10 分钟内快速放血使血压降至 5.32kp (40mmHg), 维持低血压 2h; 休克 5h 组同上, 维持低血压 2h 后观察 3h。对照组除不放血其余处理相同。

1. 电镜标本制备^[1]: 分别于休克前, 休克 2h 及 5h 后活杀, 取回肠 (距回盲部 12cm) 5cm, 纵行剪开肠管, 迅速置于 4℃ 等渗盐水中漂洗, 切成 $7 \times 3 \times 2\text{mm}^3$ 小条, 用 3% 戊二醛固修块, 0.1M PBS 漂洗, 1% 饿酸后固定, 饱和醋酸铀过夜, 系列酒精丙酮脱水, 环氧丙烷置换, 环氧树脂 618 包埋, LKB Nora 型超薄切片机切片, H-500 型电镜观察。切片标本在放大 2 万倍时按一定顺序随机拍摄小肠上皮细胞微绒毛以下, 核以上区域的底片, 每张切片摄片 5 张。

2. 形态特征参数及分析方法^[2]: 使用北京航空航天大学图像中心研制的 CM 2000B 病理图像分析系统显示如下参数: 线粒体面积、周长、长径、短径、平均直径、体密度 (V_v)、面密度 (S_v)、数密度, 再利用推导公式算出比表面 ($\delta = S_x/V_x$)。 (其中比例尺 0.006、单位 μm 、统计场面积 $14.22\mu\text{m}^2$ 、组织切片厚度 $0.05\mu\text{m}$ 、组织收缩系数 1.00)

3. 线粒体制备: 另 21 只 Wistar 大鼠分组同上, 动物分别于休克前, 休克 2h, 休克 5h 活杀制备线粒体。线粒体制备按 Bubuya 方法改进^[3]。取 60cm 小肠, 用 30ml 冷 0.01MPBS 冲洗肠内容物, 翻转, 暴露肠粘膜, 刮取肠上皮细胞, 置于冷 0.01M PBS、10mM EDTA 中轻吹分散, 稀释到

50ml, 3500rpm 2.5min, 弃上清液, 沉淀用分离介质 (介质组成: 0.25M 蔗糖, 0.01M Tris 缓冲液, 2mMEGTA, pH7.4) 3500rpm 2.5min 洗两次。放入带冰渣的分离介质匀浆 (5 下 5 上) 后, 稀释到 50ml。1700rpm 10min 收集上清液 10500rpm 8min, 弃上清液, 沉淀于 0.25M 蔗糖液 (0.25M 蔗糖, 10mM Tris, pH 7.4, 与最初体积相同) 中悬浮, 10000rpm 8min; 沉淀悬浮在 1.5ml 分离介质中, Follin—酚法定线粒体蛋白浓度为 6mg/ml。以上离心和操作温度均为 0-4℃, 电镜鉴定为结构完整的线粒体。

4. Clark 电极测线粒体呼吸功能^[3]: 反应介质组成: 25mM 蔗糖, 75mM 甘露醇, 100mM KCl, 10mM K_2HPO_4 , 10mM Tris, 1mM EGTA, 0.1% BEA (小牛血清白蛋白), pH7.5 反应体积 1.6ml 测定温度 30℃, 加入 1.2mg 线粒体蛋白, 以琥珀酸钠 (终浓度 10mM) 为底物, 反应 1 分钟后, 加入 400nmolADP, 在 3066 型水平台式记录仪上记录线粒体的氧化还原反应曲线, 测定 RCR (呼吸控制率) 和 P/O 值。

5. 统计学处理: 数据均以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析及 t 检验。

二、结果

1. 休克不同时相肠上皮细胞线粒体形态的定量分析 (见表 1)

表 1 失血性休克不同时相线粒体形态特征参数 ($\bar{x} \pm s$ n=20)

	对照组	休克 2 小时	休克 5 小时
面积 (μm^2)	0.19 \pm 0.10	0.25 \pm 0.09	0.38 \pm 0.17* * Δ
周长 (μm)	1.69 \pm 0.33	2.1 \pm 0.43*	2.45 \pm 0.53* * Δ
长径 (μm)	0.64 \pm 0.12	0.81 \pm 0.18* *	0.93 \pm 0.21* *
短径 (μm)	0.34 \pm 0.10	0.41 \pm 0.11	0.51 \pm 0.11* * Δ
平均直径 (μm)	0.51 \pm 0.10	0.64 \pm 0.12* *	0.74 \pm 0.16* * Δ
面密度 (μm^1)	1.11 \pm 0.23	1.40 \pm 0.30*	1.63 \pm 0.39* * $\Delta\Delta$
体密度 (%)	0.09 \pm 0.04	0.13 \pm 0.05*	0.20 \pm 0.10* * Δ
比表面 (μm^1)	13.13 \pm 2.65	11.29 \pm 2.26*	8.98 \pm 1.78* * Δ
数密度 (μm^3)	1.77 \pm 0.41	1.57 \pm 0.43	1.35 \pm 0.43*

注: * $p < 0.05$, ** < 0.01 与正常组比较; $\Delta p < 0.05$, $\Delta\Delta p < 0.01$ 与休克 2 小时组比较

电镜观察可见休克 2 小时后, 线粒体肿胀, 外膜尚完整, 部分线粒体嵴紊乱, 有髓样小体、小空泡形成。休克 5 小时后, 线粒体显著肿胀, 体积增大, 个别线粒体呈球形。线粒体嵴不规则、溶解、断裂和消失, 在有嵴存在的线粒体, 嵴内腔扩大较 2 小时重, 可见较大空泡形成。此时线粒体数量也明显减少。

运用线粒体形态定量分析(如表 1), 结果表明, 休克 2h, 5h 不同时相组肠上皮细胞线粒体平均截面周长、长径、短径、平均直径及其面密度、体密度与对照组比较均有显著性改变。休克两小时, 平均截面周长、长径、平均直径及其面密度、体密度分别较对照组增加 24%、27%、25%、26%、44%, 休克 5 小时, 平均截面面积、周长、

长径、短径、平均直径及其面密度、体密度分别较对照组增加 100%、45%、45%、50%、45%、47%、122%, 其中平均截面面积、周长、短径、平均直径及其面密度、体密度与休克两小时组比较也有显著性改变。休克 2 小时组线粒体数密度与正常组比较无显著性差异, 但比表面差异显著, 即下降 14%。休克 5 小时组线粒体比表面和数密度与对照组比较显著减少, 即分别下降 32%、24%, 比表面与休克 2 小时组比较也有显著性改变。结果说明随着缺血缺氧休克时间的延长, 肠上皮细胞线粒体损伤加重, 线粒体数量减少, 比表面下降, 线粒体体积增大, 线粒体肿胀。

2. 不同休克时相线粒体呼吸功能改变(见表 2)

表 2 失血性休克不同时相相对线粒体呼吸功能影响($\bar{x} \pm s$ n=8)

	对照组	休克 2 小时组	休克 5 小时组
RCR	4.54±0.5	3.73±0.11**	3.32±0.41**△
P/O	3.36±0.66	3.37±0.31	3.31±0.84

** p<0.01 与对照组比。△ p<0.05 与休克 2 小时组比较

从表 2 可以看出, 休克 2h、5h 组线粒体呼吸控制比率(RCR)与对照组比较均有显著性改变, 休克 2h、5h 组线粒体呼吸控制比与对照组比较分别下降 17.8%、26.9%, 休克 5h 组较休克 2h 组下降 11%。P/O 比值无显著变化。

三、讨论

休克时, 肠道严重缺血缺氧, 屏障功能降低, 内毒素及肠道细菌转位入血, 作用于 CD₁₄ + 细胞, 引起全身炎症反应综合症, 并最终使休克进入难治期。线粒体结构功能的改变是休克时缺血缺氧性细胞损伤的重要原因。

本实验定量说明了休克缺血缺氧时肠上皮细胞线粒体肿胀发展较快, 嵴和基质破坏明显, 数量有所减少。这是线粒体功能障碍的形态学基础。呼吸控制率是表达线粒体功能最灵敏的指标^[4]。休克 2 小时后, 线粒体呼吸控制率已开始下降, 至休克 5 小时已下降 32%, 说明线粒体状态已明显改变, 合成 ATP 能力下降。

循环位于基质内, 电子传递链和氧化磷酸化的部位在内膜, 两者紧密相连。线粒体的这种结构与其呼吸功能及能量合成功能密切相关。嵴和基质的破坏, 引起线粒体三羧酸循环运转速度减慢, ATP 合成酶数量减少, 电子传递受阻, 氧摄取更困难, 加上基质内 pH 改变, 这些因素都影响了线粒体合成 ATP 的功能。

休克缺血缺氧线粒体结构与功能损害的原因可能与代谢异常, 氧化应激及 PLA₂ 激活有关。缺血缺氧时线粒体脂肪代谢受阻, 长链脂酰辅酶 A 与脂酰肉碱积聚, 可能通过抑制线粒体 KATP 通道降低其自我保护能力, 参与缺血性细胞损害^[5]。同时, 复合体 I 与辅酶 Q 两位点“电子漏”增加, 使氧自由基生成大量增加, 导致线粒体自身氧化应激。线粒体心磷脂的过氧化可导致细胞色素 C 氧化酶、F₀F₁-ATPase 的活性降低。氧自由基或长时间缺血缺氧直接激活线粒体 PLA₂, 降解膜脂质, 使线粒体结构受损, 一方面导致其渗透压调节能力下降, 另一方面导致细胞色素 C “漏出”, 降低呼吸功能, 甚至可激活凋亡级联使细胞发生凋

线粒体为细胞能量代谢的重要细胞器, 三羧酸

亡^[6]。肠上皮细胞凋亡在休克后期发展中起着重要作用。

线粒体对缺氧非常敏感,而且稍长时间缺血即可造成不可逆损伤^[7],是细胞损伤时最早累及的细胞器之一,因此是细胞保护的重点。保护线粒体,消除细胞内能量代谢障碍,可减轻细胞损伤。预防休克后肠屏障功能破坏及继发的脓毒血症、MODS 有重要意义。

参考文献

- [1] 彭毅志,肖光夏,等.大鼠严重烫伤后早期肠道营养对肠粘膜屏障的保护作用[J].第三军医大学学报,16(5),1994,316-317.
- [2] 郑富盛.细胞形态立体计量法[M].北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1990,38-42.
- [3] Bubuya MASOLA, Derek F. EVERED. Preparation of rat enterocyte mitochondria[J]. Biochem. J. (1984) 218, 441-447.
- [4] Baue AE, Sayeed MM. Alterations in the functional capacity of mitochondria in hemorrhagic shock[J]. Sur-

gery 1970, 68(1) 40-47.

- [5] Domoki F, Perciaccante JV, Veltkamp R, et al. Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal-vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs[J]. Stroke, 1999, 30(12): 2713-2718.
- [6] Krajewski-S; Krajewska-M; Ellerby-L-M, et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia[J]. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1999 May 11; 96(10): 5752-7.
- [7] Muniswamy Modesh, Lakshmi Bhaskar, et al. Enterocyte viability and mitochondrial function after graded intestinal ischemia and reperfusion in rats[J]. Mol Cell Biochem. 1997, 167: 81-87.

【作者简介】

李伟文(1971—),男(汉族),甘肃甘谷人,第三军医大学毕业,主要从事缺血缺氧线粒体基因改变的研究,博士、医师。

陆松敏(1942—),女(汉族),安徽淮南人,1966年毕业于北京医科大学,研究员、博士生导师。

武凡(1955—),女(汉族),北京人,2000年重庆医科大学毕业,博士、教授。

(收稿日期:2003-09-11;修回日期:2003-12-22)

国家发布《科学技术评价办法》(试行)

本刊讯:为加强科学技术评价工作、建立健全科学技术评价机制、正确引导科学技术工作健康发展,增强我国科学技术持续创新能力,提高我国科学技术的实力和水平,根据科学技术部、教育部、中国科学院、中国工程院、国家自然科学基金委员会联合发布的《关于改进科学技术评价工作的决定》和国家有关法律法规,制定了《科学技术评价办法》(试行)。

本《办法》共10章62条,对评价程序和要求、评价专家遴选、科学技术计划评价、科学技术项目评价、研究与发展机构评价、科学技术成果评价、法律责任等进行了说明和明确规定,是保证评价活动在公平、公正、公开的原则下,依据客观事实作出科学评价的法规性文件。