

基础研究

止血带性肢体缺血再灌注损伤后血小板线粒体的变化

张建杏, 李红英, 周国斌, 王庆, 李真

广东省人民医院麻醉科//广东省医学科学院, 广东 广州 510080

摘要:目的 探讨止血带性缺血再灌注损伤后血小板线粒体的变化,为临床止血带的应用提供指导依据。方法 30只SD大鼠随机分为对照组(6只),缺血再灌注组(24只,再随机均分为4组,分别在再灌注后2、6、12、24 h取血检测)。采用自制止血带环绕白兔大腿根部(压力280 mmHg)模拟止血带性缺血,4h后松开止血带。相应时间点取血分离血小板。采用全自动血球计数仪测定血小板数量;荧光素—荧光素酶试剂盒测定血小板ATP含量;JC-1线粒体膜电位试剂盒探测线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)变化;细胞色素C凋亡试剂盒检测血小板胞质细胞色素C含量;过氧化脂质试剂盒检测血小板中过氧化脂质。结果 与对照组比较,缺血再灌注损伤组血小板内ATP含量在2、6 h显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而低线粒体膜电位的血小板含量、胞质细胞色素C含量、过氧化脂质含量均在2、6 h逐渐增加并具有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);在12 h时,以上改变有所恢复但仍有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);24 h时基本恢复正常($P>0.05$)。血小板计数在两组间无统计学差异($P>0.05$)。结论 止血带性缺血再灌注损伤可以导致血小板线粒体功能的受损,且主要发生在缺血再灌注早期(6 h),在后期逐渐恢复,而对血小板数量无明显影响。
关键词:止血带;缺血再灌注损伤;线粒体;血小板

Changes of platelet mitochondria in rats with tourniquet-induced limb ischemia-reperfusion injury

ZHANG Jianxing, LI Hongying, ZHOU Guobin, WANG Qing, LI Zhen

Department of Anesthesiology, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To investigate the changes of platelet mitochondria in rats with tourniquet-induced limb ischemia-reperfusion (IR) injury. **Methods** Thirty SD rats were randomized equally into 5 groups including a control group and 4 limb IR injury groups for blood sampling at 2, 6, 12, or 24 h following IR injury induced by tourniquet on the thighs for 4 h. Platelet was separated from the blood samples for measurement of ATP content, mitochondrial membrane potentials, plasma cytochrome C level, and hydroperoxides. **Results** Compared with the control group, the rats with tourniquet-induced limb IR injury showed significantly decreased ATP content, lowered mitochondrial membrane potential, and increased plasma cytochrome C and hydroperoxide levels in the platelets at 2 and 6 h following the injury ($P<0.05$ or 0.01). These alterations recovered partially but remained significantly different from the control levels at 12 h ($P<0.05$ or 0.01) until full recovery at 24 h. Limb IR injury did not cause significant variations of the platelet counts. **Conclusion** Tourniquet-induced limb IR injury can cause mitochondrial damage in the platelets, which occurs mainly in the early stage (6 h) and recovers gradually afterwards without significant impact on platelet counts.

Key words: tourniquet; ischemia-reperfusion injury; mitochondria; platelets

止血带广泛应用于肢体外科手术中,但是在减少术中出血的同时,却也可造成肢体缺血再灌注损伤(limb ischemia reperfusion, LIR),引起机体内的氧化应激及氧自由基的产生,不但对肢体局部造成损伤,还可导致远隔器官损伤^[1-3]。研究表明,在脓毒症以及失血性休克中均存在血小板线粒体功能的损害,且与预后密切相关^[4-6]。那么,在肢体缺血再灌注损伤中,血小板数量及线粒体的变化是怎样,国内外鲜见报道。本研究旨在探讨在止血带性缺血再灌注模型中是否存在血小板

线粒体损伤,并其变化与时间的关系,为临床手术中止血带应用提供指导证据。

1 方法与材料

1.1 试剂

细胞色素C细胞凋亡试剂盒(biovision);JC-1线粒体膜电位试剂盒(Invitrogen);Percoll(美国通用电气公司);荧光素—荧光素酶试剂盒(Promega);过氧化酶脂质试剂盒(Cayman Chemical)。

1.2 分组与模型

选择体质量 300 ± 50 kg的SD大鼠30只,雌雄不限,随机等分为对照组(6只)、缺血再灌注组(24只,再分为缺血再灌注2、6、12、24 h组分别在缺血再灌注后2、6、

收稿日期:2014-03-15

基金项目:广东省科技计划项目(2011B031800149,2010B031600252)

作者简介:张建杏,本科,主治医师,E-mail: jianxingzhang_edu@163.com

通信作者:李红英,硕士,副主任医师,E-mail: hongyingli_edu@163.com

12、24 h取血检测)。3%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射,双后肢脱毛,在大腿根部环绕自制气囊止血带,迅速阻断血流,可见下肢远端皮肤变白变冷,止血带压力约为280 mmHg,缺血4 h后松开止血带,可见皮肤变红变暖。分别在松止血带后2、6、12、24 h动脉抽血,分离血小板并检测相关指标。

1.3 方法

1.3.1 血小板数量计数 动脉抽血,50 UI/ml肝素化,并颠倒混匀,全自动血球计数仪测定血小板数量。

1.3.2 血小板分离 参照文献[4],腹主动脉置管取血,50 UI/ml肝素化。所取血液用生理盐水稀释1倍后,1.06 g/ml的Percoll液于20 °C,1 018 r/min,离心7 min后取Percoll液上层细胞。再用PBS洗3次(4 °C,2086 r/min,离心5 min),即可得到大量的血小板。

1.3.3 血小板内ATP含量测定 荧光素—荧光素酶检测血小板线粒体ATP水平。各组血小板悬液加入96孔白板,每孔100 μl(2000个血小板)。再用PBS不含细胞的作为对照孔,测得背景荧光值。于室温下加入等体积的ATP检测试剂,混匀细胞,并孵育10 min,酶标仪检测荧光。

1.3.4 血小板线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)检测 参照Salvioli S法^[7],采用JC-1检测细胞线粒体跨膜电位($\Delta\psi_m$)的变化。各组血小板用JC-1终浓度为5 μmol/L染色。37 °C水浴振荡孵育15 min后,用PBS洗涤细胞3次,PBS重悬后用流式细胞仪检测。每个样本获取10 000个细胞,并应用Guava EasyCyte软件平台获取数据并分析。并用JC-1单体发射的绿色荧光(低 $\Delta\psi_m$ 细胞)的细胞百分数(%)来评估线粒体去极化的血小板百分含量。

1.3.5 血小板胞质内细胞色素C含量测定 参照细胞色素C细胞凋亡试剂盒步骤提取各组血小板包浆蛋白(除线粒体),BCA法蛋白浓度测定,各组蛋白上样量为100 μg,电泳后转PVDF膜,细胞色素C—抗4 °C孵育过夜,二抗(GAPDH)室温孵育2 h,ECL化学发光法,凝胶成像仪曝光成像。

1.3.6 血小板中过氧化脂质的检测 LPO试剂盒检测血小板中的过氧化脂质含量。氯仿萃取各组血小板过氧化脂质,参照试剂盒的说明书进行试验操作,酶标仪检测500 nm处的吸光值,再参照试剂盒说明书方法分析。

1.4 统计学处理

数据均以均数±标准差形式表示,应用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析,多本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法,两样本均数比较用t检验。 $P<0.05$ 为差异为有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板数量

对照组、缺血再灌注6、24 h组血小板数量(单位×

10^9)分别为 366.2 ± 48.4 , 315.5 ± 66.8 , 343.9 ± 71.5 ,各组间均无统计学差异($P>0.05$),提示止血带应用对血小板数量无明显影响。

2.2 血小板内ATP含量

以荧光素酶活性表示细胞内ATP含量,值越高代表ATP含量越多。对照组的相对荧光素酶活性单位为 2133 ± 239.5 ,与对照组相比,在缺血再灌注后2、6 h逐渐降低,分别为 1651 ± 285.6 ($P<0.05$), 1472 ± 285.8 ($P<0.01$),而在12、24 h呈现降低的趋势,分别为 1744 ± 257.1 ($P<0.05$), 2065 ± 266.2 ($P>0.05$,图1)。

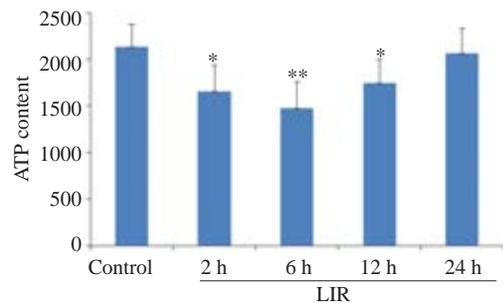


图1 血小板细胞内ATP含量

Fig.1 Platelet ATP content in the rats. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control.

2.3 血小板线粒体膜电位

对照组中低 $\Delta\psi_m$ 血小板含量为 $10.2\pm 2.69\%$,缺血再灌注后2、6 h低 $\Delta\psi_m$ 血小板含量分别增加为 18.6 ± 4.80 和 25.5 ± 4.36 ($P<0.01$),缺血再灌注12、24 h又下降为 15.3 ± 4.28 ($P<0.05$), 14.6 ± 4.07 ($P>0.05$,图2)。

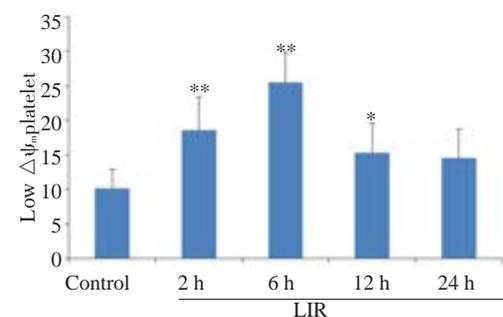


图2 血小板线粒体膜电位的变化

Fig.2 Change of platelet mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in the rats following limb ischemia-reperfusion injury. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control.

2.4 血小板内胞质细胞色素C含量

对照组中血小板胞质内细胞色素C含量较低且定为1,与对照组相比,缺血再灌注后2、6 h血小板内胞质细胞色素C含量分别增高为 1.71 ± 0.19 ($P<0.05$), 2.35 ± 0.31 ($P<0.01$);在12、24 h分别降低为 1.51 ± 0.19 ($P<0.05$), 1.24 ± 0.15 ($P>0.05$,图3)。

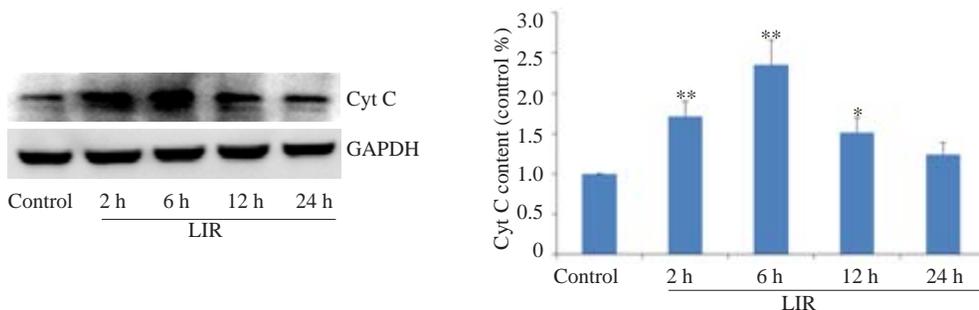


图3 血小板胞质内细胞色素C含量

Fig.3 Platelet cytoplasmic cytochrome C content in the rats (n=3). *P<0.05, **P<0.01 vs control.

2.5 血小板内过氧化脂质含量

以对照组血小板内过氧化脂质含量为100%，缺血再灌注后2、6 h，血小板内过氧化脂质含量增高，分别为137.4%±18.6% (P<0.05)，180.6%±35.9% (P<0.01)，在12、24 h逐渐下降，分别为165.3%±27.5% (P<0.01)，144.0%±36.7% (P>0.05，图4)。

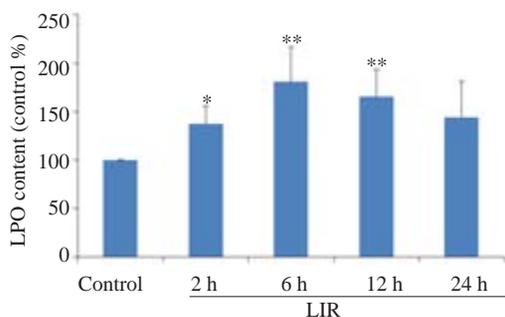


图4 血小板内过氧化脂质含量

Fig.4 Changes of lipid peroxide content in the platelets following the injury. *P<0.05, **P<0.01 vs control.

3 讨论

尽管肢体的缺血再灌注损伤较心肺等脏器的缺血再灌注损伤轻，但由于该过程仍然是一个典型的缺血再灌注过程，其产生的大代谢产物及大量氧自由基仍然对机体产生极大的损害^[8-9]。有研究证实，在肢体止血带使用过程中，骨骼肌氧代谢障碍，氧自由基大量产生，止血带松开后释放入血，进而造成全身性的炎症反应，引起止血带性再灌注损伤(LIR)^[2, 10]。线粒体是细胞代谢的中心，主要为细胞活动提供ATP，此外线粒体还参与某些细胞分化、凋亡、Ca²⁺调节等^[11]。研究表明，线粒体的损伤在缺血再灌注损伤中扮演着重要作用^[12]，在本研究中，通过荧光素酶法检测血小板内ATP含量，结果可见在LIR 2 h即出现ATP含量的显著下降，并且在6 h最为明显，此后逐渐恢复，在24 h时与对照组无显著差异。提示在止血带缺血再灌注损伤中，血小板线粒体能出现一过性的功能障碍，导致在止血带应用早期出现明显的ATP含量降低，而在后期逐渐恢复。

在线粒体损伤过程中，各种损伤因子造成线粒体钙超载、线粒体膜电位下降，通透性转变孔开放，释放出各种凋亡因子包括细胞色素C，其通过一系列级联反应激活各种蛋白水解酶caspases，启动细胞凋亡信号，对组织细胞造成损害^[13-14]。实验采用JC-1探针技术检测血小板膜电位(Δψ_m)，通过流式细胞仪计数发现在LIR早期低Δψ_m血小板含量明显增加，在6 h最为明显，而后期则逐渐减少。而蛋白免疫印迹结果与线粒体膜电位检测结果相符，在LIR前6 h血小板胞质细胞色素C含量呈上升趋势，而后期逐步下降。说明在LIR早期线粒体通透性转变孔开放，导致线粒体细胞色素C释放，而线粒体膜电位降低，后期则逐渐恢复。线粒体是氧自由基产生的主要场所，在缺血再灌注损伤中，氧自由基的大量产生可以导致线粒体膜结构中脂质过氧化，也可直接损伤线粒体DNA，造成线粒体损伤^[15-16]。过氧化脂质(LPO)是活性氧与膜结构中不饱和脂肪酸反应的产物，在一定程度上反应了机体氧化应激水平，在对血小板过氧化脂质的检测中可见，缺血再灌注的早期氧化应激是逐渐加强，而在后期则逐渐减弱。另外有研究在肝缺血再灌注损伤中见到血小板数量的减少^[17]，而本实验在对血小板数量的检测中可见LIR中血小板数量未见明显变化，这可能与LIR较其他脏器的缺血再灌注损伤轻及损伤的器官不同有关。

综上所述，在LIR中存在血小板线粒体的一过性功能障碍。LIR早期，机体氧化应激明显，血小板线粒体功能受损，ATP合成减少，线粒体通透性转变孔开放引起细胞色素C释放及膜电位降低。而在后期可能由于机体的代偿、氧化应激的减弱，血小板线粒体功能逐渐恢复。本次研究结果提示在手术过程中止血带的应用时间不应过长，且在应用中注意血小板的保护。另外，血小板线粒体受损对于机体凝血或其他功能的影响，以及血小板线粒体功能的逐步恢复机制仍需要进一步探索。

参考文献:

[1] Walters TJ, Mase VJ, Roe JL, et al. Poloxamer-188 reduces muscular edema after tourniquet-induced ischemia-reperfusion

- injury in rats[J]. J Trauma, 2011, 70(5): 1192-7.
- [2] Koca K, Yurttas Y, Cayci T, et al. The role of preconditioning and N-acetylcysteine on oxidative stress resulting from tourniquet-induced ischemia-reperfusion in arthroscopic knee surgery [J]. J Trauma, 2011, 70(3): 717-23.
- [3] 王良荣,熊响清,金立达,等.止血带应用对下肢手术患者心、肝、肾功能的影响[J].医学研究杂志,2012,41(4):89-91.
- [4] 陈云燕,王兴民,宋瑞,等.重症失血性休克大鼠血小板线粒体变化及虎杖苷的干预作用[J].中华创伤杂志,2013,29(9):882-8.
- [5] Lorente L, Martín MM, López-Gallardo E, et al. Platelet cytochrome c oxidase activity and quantity in septic patients [J]. Crit Care Med, 2011, 39(6): 1289-94.
- [6] Sjövall F, Morota S, Hansson MJ, et al. Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis [J]. Crit Care, 2010, 14(6): R214.
- [7] Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, et al. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis [J]. FEBS Lett, 1997, 411(1): 77-82.
- [8] 李志坚,徐军美,邹定全,等.乌司他丁对下肢缺血-再灌注损伤的影响[J].临床麻醉学杂志,2005,21(6):374-6.
- [9] Lin LN, Wang LR, Wang WT, et al. Ischemic preconditioning attenuates pulmonary dysfunction after unilateral thigh tourniquet-induced ischemia-reperfusion [J]. Anesth Analg, 2010, 111(2): 539-43.
- [10] Wakai A, Winter DC, Street JT, et al. Inosine attenuates tourniquet-induced skeletal muscle reperfusion injury [J]. J Surg Res, 2001, 99(2): 311-5.
- [11] Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease [J]. Exp Mol Pathol, 2007, 83(1): 84-92.
- [12] Wang X, Song R, Chen Y, et al. Polydatin--a new mitochondria Protector for acute severe hemorrhagic shock treatment [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2013, 22(2): 169-79.
- [13] Whaley JG, Tharakan B, Smith B, et al. (-)-Deprenyl inhibits thermal injury-induced apoptotic signaling and hyperpermeability in microvascular endothelial cells [J]. J Burn Care Res, 2009, 30(6): 1018-27.
- [14] Sinha K, Das J, Pal PB, et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis [J]. Arch Toxicol, 2013, 87(7): 1157-80.
- [15] Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive Oxygen species (ROS) in apoptosis induction [J]. Apoptosis, 2000, 5(5): 415-8.
- [16] Park GB, Choi Y, Kim YS, et al. ROS-mediated JNK/p38-MAPK activation regulates Bax translocation in Sorafenib-induced apoptosis of EBV-transformed B cells [J]. Int J Oncol, 2014, 44(3): 977-85.
- [17] 曹忠平,陶国才,刘怀琼,等.血小板数量和功能在肝缺血-再灌注过程中的变化[J].临床麻醉学杂志,2004,20(6):356-8.

(编辑:吴锦雅)

流行病学调查

双向隔离法防治呼吸系统传染病在密集人群中的传播

陈霞¹,刘震东²¹浙江省舟山妇幼保健院,²92257部队,浙江舟山316000

摘要:目的 探讨人群密集区域呼吸系统传染病的防治手段。方法 连续3年在学校和舰艇采用双向隔离法防治传染性呼吸系统疾病。结果 应用双向隔离法防治呼吸道传染病的人群呼吸道传染病的发病率明显低于不应用该方法的人群,治疗效果优于空白组。结论 在人群密集区域采用双向隔离法防治呼吸道传染病效果显著。

关键词:双向隔离;呼吸道传染病;防范措施;人群密集

呼吸道感染主要由病毒和细菌感染引起^[1-2],我们选择了上呼吸道感染、水痘、麻疹3种常见病在人群中的发病情况作为研究对象,并采用双向隔离制度(首发呼吸道传染病患者及密切接触者均戴10层纱布口

罩)防治呼吸道传染病。

1 对象与方法

1.1 对象

选择对象为四所学校和若干艘舰艇上传染性呼吸
(下转封三页)

收稿日期:2014-05-22

作者简介:陈霞,学士,E-mail: 1778661137@qq.com