

[文章编号] 1000-2200(2009)09-0759-03

· 基础医学 ·

限制性体位对大鼠膈肌功能改变的影响

马 丽,李桂军,方迎艳,关宿东

[摘要] **目的:**研究限制性体位大鼠膈肌功能的变化。**方法:**SD 大鼠 20 只随机分成对照组和限制性体位组,每组 10 只。限制性体位组大鼠双前肢固定悬挂 12 h 后,应用体外灌流大鼠膈肌条的方法,分别测量其单收缩力(Pt)、最大强直张力(Po)、峰值收缩时间(CT)、半舒张时间(1/2RT),并测量刺激频率在 10、20、40、60、100 Hz 的张力,绘制张力-频率曲线。同时测定膈肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)、琥珀酸脱氢酶(SDH)活性及丙二醛(MDA)含量,电镜观察膈肌组织超微结构的变化。**结果:**限制性体位组大鼠 Pt、Po 均低于对照组($P < 0.01$);CT、1/2RT 均高于对照组($P < 0.01$)。给予 10、20、40、60、100 Hz 的电压刺激膈肌时,限制性体位组大鼠膈肌张力均低于对照组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。其组织 SOD、SDH 活性均明显低于对照组($P < 0.01$),而 MDA 含量显著高于对照组($P < 0.01$)。限制性体位大鼠膈肌肌丝紊乱、断裂,线粒体空泡化或囊泡化,有髓板样物形成;肌浆网明显扩张。**结论:**限制性体位大鼠膈肌肌纤维结构受到破坏,收缩功能下降,可能与 SOD、SDH 活性降低,MDA 含量增高有关。

[关键词] 膈/生理学;显微镜检查,电子;限制性体位;大鼠,近交系

[中国图书资料分类法分类号] R 332.1 [文献标识码] A

Restrictive position affects the diaphragm function of rats

MA Li, LI Gui-jun, FANG Ying-yan, GUAN Su-dong

(Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the changes of diaphragm function of rats when in restrictive position. **Methods:** Twenty SD rats were randomly divided into two groups: control group and restrictive position group. The rats in restrictive position group were hung with their upper limbs bound for 12 hours. The maximal twitch force (Pt), maximal tetanic force (Po), contraction time (CT), half-relaxation time (1/2 RT), and the force frequency curve at 10, 20, 40, 60 and 100 Hz were recorded. The superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), succinic dehydrogenase (SDH) in the diaphragm were detected. The ultrastructures of the diaphragm were examined by electron microscope. **Results:** The Pt and Po in the restrictive position group were lower than those in the control group ($P < 0.01$), but the CT and 1/2RT were longer ($P < 0.01$); When 10, 20, 40, 60 and 100 Hz square-wave voltage was given to stimulate the diaphragm, the tension of the diaphragm in the restrictive position group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). The SOD and SDH in the restrictive position group were significantly lower than those of control group ($P < 0.01$), and the MDA were higher ($P < 0.01$). The electron microscopic morphometry of the diaphragm in the restrictive position group revealed that the diaphragm myoneme was confused and broken; the mitochondria was in a state of vacuolization and expanded; Myelin figures could be seen, and the sarcoplasmic reticulum was distended. **Conclusions:** The diaphragm systolic function of the rats in the restrictive position group is damaged, which may be related to the decreased activity of SOD and SDH, as well as the increase of MDA content.

[Key words] diaphragm/physiology; microscopy, electron; restrictive position; rats, inbred strains

限制性体位窒息是指长时间被限制于能影响自主呼吸的某种异常被动体位,导致呼吸功能发生障碍而引起窒息;若致死亡,则称之为限制性体位窒息死亡。Busuttill 等^[1]提出关于死亡机制的观点,认为限制性体位改变呼吸动力学,造成呼吸肌疲劳引起死亡。目前国内外学者主要从膈肌的形态学、酶学、膈肌肌电变化的研究,证实膈肌在限制性体位下发生功能衰竭,导致肺通气功能障碍,并最终发生呼吸功能衰竭;但膈肌力学特性的变化尚未见有完整报

道。本实验通过观察大鼠双前肢悬挂 12 h 后膈肌力学、酶学和超微结构的变化,以期进一步探讨限制性体位窒息死亡的机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器 Kreb's 液,超氧化物歧化酶(SOD)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);95% O₂ + 5% CO₂(合肥巨网工业气体有限公司);生物信号采集处理系统(Medlab-u/4c,南京美易科技有限公司)。

1.2 动物分组及标本制备 SD 大鼠 20 只(蚌埠医学院实验动物中心提供),体重(300 ± 20)g。分对照组($n = 10$)和限制性体位组($n = 10$)。限制性体位组大鼠双前肢固定悬 12 h 后麻醉、断头,开胸速

[收稿日期] 2008-10-24

[作者单位] 蚌埠医学院 生理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 马 丽(1983-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 关宿东,研究生导师,教授。

取膈肌置于 Krebs's 液 (135 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L NaH₂PO₄, 15 mmol/L NaHCO₃, 11 mmol/L C₆H₁₂O₆) 的玻璃平皿中, 持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 每块膈肌沿中心腱分成两半, 右半侧膈肌 -80 °C 冰箱保存, 以备生化测定使用; 左半侧膈肌作力学检测。一块用 2.5% 戊二醛固定, 制备电镜标本。

1.3 离体膈肌张力测定 将制备好的膈肌条垂直悬挂于 37 °C Krebs's 液的麦氏浴槽中, 通入 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体, 膈肌条肋骨端用蛙肌夹固定在通气钩上, 中心腱端用线结扎并接于张力换能器, 电子刺激器通过两根直接插入肌条两侧的铂金电极刺激膈肌。张力换能器固定在微调节器上, 调节肌条至最适初长度 (L₀), 静置平衡 20 min, 各力学检测均在 L₀ 下进行。测定参数: (1) 收缩特性: 测定每个肌条在 L₀ 时的单收缩力 (Pt)、最大强直张力 (Po)、峰值收缩时间 (CT) 及半舒张时间 (1/2RT)。 (2) 最大强直张力: 在单刺激后静置 10 min 以超最大电压, 串长 400 ms, 100 Hz 刺激, 获得一个清晰的坪。 (3) 张力 - 频率曲线测定: 刺激参数参照最大强直收缩力的参数, 以 10、20、40、60、100 Hz 刺激绘出张力 - 频率曲线, 以上各值均以横截面积 (CSA) 标准化。 (4) 计算 CSA: 每次肌条张力实验后用电子分析天平测量膈肌重量计算 CSA。公式为: CSA = 肌条重量 (g) / (肌条长度 (cm) × 膈肌肌

肉密度)。膈肌肌肉密度 = 1.056 g/cm³。

1.4 生化指标检测 肌肉蛋白定量采用考马斯亮蓝法。SOD、SDH 活性检测采用化学比色法; MDA 含量检测采用比色法。

1.5 膈肌超微结构观察 将膈肌切成 1 mm³ 组织块, 置于 2.5% 戊二醛前固定。1% 锇酸后固定, 梯度脱水包埋后, 超薄切片, 透射电镜观察。

1.6 统计学方法 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 收缩特性的变化 限制性体位组 Pt 和 Po 均低于对照组 ($P < 0.01$), CT 和 1/2RT 均高于对照组 ($P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 限制性体位对大鼠离体膈肌力学特性的影响 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	Pt (g/cm ²)	CT (ms)	1/2RT (ms)	Po (g/cm ²)
对照组	192.73 ± 48.66	39.30 ± 11.13	32.50 ± 4.81	835.42 ± 190.56
限制性体位组	106.63 ± 30.35	63.70 ± 23.78	40.70 ± 4.03	506.61 ± 124.46
<i>t</i>	4.75	2.94	4.13	4.57
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 膈肌收缩的张力 - 频率关系 在给予大鼠膈肌条 10、20、40、60、100 Hz 刺激时, 限制性体位组的大鼠膈肌各频率下的收缩张力均低于对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 2)。

表 2 限制性体位对大鼠膈肌收缩张力 - 频率的影响 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s; g/cm^2$)

分组	刺激频率 (Hz)				
	10	20	40	60	100
对照组	185.34 ± 49.90	355.25 ± 131.88	658.34 ± 157.70	790.76 ± 167.34	847.56 ± 167.49
限制性体位组	103.39 ± 35.66	225.48 ± 80.62	400.33 ± 113.45	489.57 ± 136.41	504.38 ± 114.94
<i>t</i>	4.23	2.65	4.20	4.41	5.34
<i>P</i>	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 膈肌组织生化指标测定 与对照组比较, 限制性体位组的大鼠膈肌组织的 SOD、SDH 活力均明显降低 ($P < 0.01$), MDA 含量升高 ($P < 0.01$) (见表 3)。

表 3 限制性体位对大鼠膈肌组织生化指标的影响 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	SOD (u/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)	SDH (u/mg prot)
对照组	215.07 ± 17.68	4.09 ± 1.91	10.17 ± 1.78
限制性体位组	109.21 ± 13.65	9.76 ± 1.17	3.73 ± 1.03
<i>t</i>	14.99	8.01	9.90
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 膈肌细胞超微结构的变化 正常大鼠膈肌肌纤维密集, 排列整齐, 肌节清晰, 线粒体呈圆形或椭圆形整齐排列, 数量密集, 无肿胀 (见图 1)。限制性体位大鼠膈肌肌纤维肿胀, 肌丝部分断裂, 肌小节消失; 线粒体数量减少, 水肿扩张, 嵴模糊断裂, 大量线粒体空泡化或囊泡化, 有髓样物形成; 肌浆网明显扩张, 肿胀; 有的可见脂滴 (见图 2)。

3 讨论

对于限制性体位窒息死亡的机制, 国内研究者倾向于呼吸肌疲劳导致呼吸衰竭而死亡, 但也有学

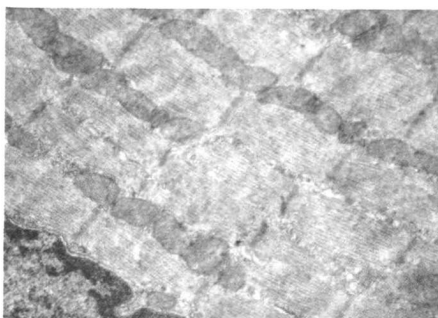


图 1 对照组,大鼠膈肌肌纤维和线粒体排列整齐、无肿胀

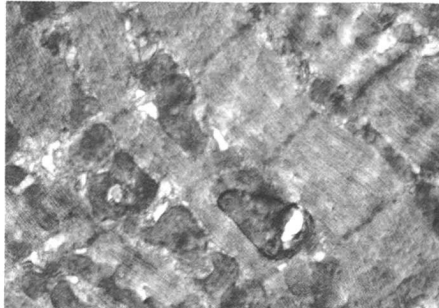


图 2 限制性体位组,大鼠膈肌肌纤维肿胀,肌丝部分断裂,线粒体水肿扩张空泡化,肌浆网明显扩张

者提出悬挂体位可造成体位性神经中枢缺血而引起呼吸功能障碍;国外的研究者们除认同上述观点外,也在药物、创伤、饥饿等死亡的因素上作了补充^[2,3]。

膈肌除具有骨骼肌的一般生化、生理和结构功能外,尚具有终生持续收缩和参与呼吸特性,对于维持机体的呼吸功能具有极其重要的作用。Pt 和 Po 作为评价离体膈肌收缩功能的常用指标,反映肌细胞收缩蛋白对 Ca^{2+} 的反应性。CT 反映肌细胞横桥的作用效率,1/2RT 反映肌浆网对 Ca^{2+} 再摄取的速度。本实验结果显示,限制性体位导致大鼠膈肌 Pt 和 Po 明显下降,单收缩的 CT 明显延长,膈肌收缩能力降低,同时导致大鼠膈肌 1/2RT 明显延长,表明膈肌的舒张功能降低。

限制性体位组大鼠膈肌在给予 10、20、40、60、100 Hz 频率刺激时,各频率下张力均低于对照组,张力-频率曲线较对照组右移。由于高频疲劳(即在 >60 Hz 电刺激下肌力特别低)主要与神经-肌肉接头传递障碍有关,低频疲劳(即在 <25 Hz 电刺激下肌力特别低)主要与肌浆网释放 Ca^{2+} 减少,导致肌肉兴奋-收缩耦联障碍有关^[4]。由此推测限制性体位可导致神经-肌肉接头兴奋传递障碍;引起膈肌肌肉兴奋-收缩耦联障碍,最终导致膈肌收

缩力与抗疲劳性下降。

有研究提示,自由基生成增多、能量代谢障碍、电解质紊乱等可诱发膈肌疲劳^[5,6]。本实验中限制性体位大鼠膈肌中 SOD 含量显著下降,而 MDA 含量显著上升,说明膈肌有明显的脂质过氧化作用^[7]。膈肌缺血缺氧时生成的自由基可直接损伤膈肌组织,干扰呼吸链,可造成细胞膜损伤,并可影响肌浆网对钙的摄取和释放,从而进一步损伤细胞,甚至可引起细胞死亡^[8]。SDH 为有氧代谢——三羧酸循环的限速酶,其含量可反映三羧酸循环的强弱^[9],而膈肌抗疲劳能力主要取决于组织的氧化代谢能力,本实验限制性体位组 SDH 含量显著下降,说明有氧代谢能力下降,影响 ATP 的生成,当 ATP 不足时,膈肌发生 ATP 耗竭,膈肌易疲劳。

电镜观察膈肌超微结构结果显示,限制性体位导致大鼠膈肌肌纤维肿胀,肌丝部分断裂,肌小节消失;线粒体数量减少,水肿扩张,嵴模糊断裂,大量线粒体空泡化或囊泡化,有髓板样物形成;肌浆网明显扩张,肿胀;有的可见脂滴。由此说明,限制性体位造成膈肌超微结构的损伤,导致膈肌收缩能力下降。

本实验通过离体膈肌张力的测定证实,在限制性体位过程中膈肌功能受到限制,导致其收缩舒张功能下降,长时间的呼吸衰竭可以导致机体死亡。本实验的结果有望为限制性体位窒息死亡的机制解释和法医学鉴定提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Busuttill A, Obafunwa JO. Recreational abdominal suspension: a fatal practice [J]. *Am J Med Pathology*, 1993, 14(2): 141-145.
- [2] 卢祖能, 曾庆杏, 李承晏, 等. 实验肌电图学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 89-95.
- [3] Bell MD, Rao VJ, Wetli CV, et al. Positional asphyxiation in adults. A series of 30 cases from the Dade and Broward County Florida Medical Examiner Offices from 1982 to 1990 [J]. *Am J Forensic Med Pathol*, 1992, 13(2): 101-107.
- [4] 徐旋里, 杨秋火, 谢强敏, 等. 咖啡对低氧高碳酸性大鼠膈肌疲劳的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(3): 377-378.
- [5] Rousso CS, Macklem PT. Diaphragmatic fatigue in man [J]. *Appl Physiol*, 1977, 43(2): 189-197.
- [6] Nan Smith-Blair RN. Mechanisms diaphragm fatigue [J]. *AAAClincal Issues*, 2002, 13(2): 309-319.
- [7] Danjo W, Fujimura N, Ujike Y. Effect of entoxifylline on diaphragmatic contractility in septic rats [J]. *Acta Med Okayama*, 2008, 62(2): 101-107.
- [8] Fengsheng HE. Intermediate myasthenia syndrome with actue roganophosphorus desticide poisoning [J]. *Chin J Indus Hygdccup Dis*, 1996, 14(1): 257-258.
- [9] 贾克, 张立丰. 氯化锰对大鼠纹状体和大脑皮层谷氨酸含量的影响 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2008, 33(4): 389-391.