维普资讯 http://www.cqvip.com

97～100

内毒素对大鼠肝线粒体损害的生化机制研究 膜——结构损害及脂质过氧化

检验系临床生化教研室 高爱国* 康格非 Q545

提 要 本文观察了大鼠腹腔注射较低剂量E.Col;内毒素纯制剂(LPS,2mg/kg 体重)后不同时间肝线粒体膜结构损害、自由基代谢,以及脂质过氧化物(LPO)水平的变化。琥珀酸脱氢酶(SDH)活性在注射内毒素后14小时下降至对照组酶活性的76.2%($P<0.01$),24小时后酶活性趋于回升。LPO4小时增高,24小时达对照组的173.2%($P<0.01$),48小时明显恢复。SOD和GSH—Px活性分别于4小时和24小时下降,此后趋于增高并超过对照组水平。电镜观察肝细胞线粒体在14和24小时损害较严重。上述结果提示:实验选用剂量的内毒素引起肝细胞可逆性损害并出现膜的脂质过氧化,SOD和GSH—Px活性可于降低后出现诱导性增高。本文结合前期工作讨论了磷脂酶A的激活与膜脂质过氧化是导致膜磷脂组分改变的两个主要起始点,它们在肝细胞损害发展中具有重要作用。

关键词 内毒素; 线粒体; 过氧化脂质; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶
中图分类号 Q545; Q244

内毒素引起的肝细胞损害日益受到人们的关注,但这种损害的生化机制尚未澄清。体内外实验结果表明,内毒素作用后各种膜性结构、尤其是质膜磷脂组分的改变可能是细胞损害过程中一个十分重要的环节[1,2,3]。线粒体是细胞的动力站,其膜结构的损害必将影响整个细胞的需能代谢以及各种离子泵的功能,因此线粒体在肝细胞损害中的作用的确不容忽视。前期的工作已经证实了内毒素激活质膜和线粒体膜磷脂酶A引起膜磷脂降解[2,4],但是内毒素作用后肝线粒体自由基代谢及膜脂质过氧化方面的改变迄今未见报道。以往对内毒素性肝细胞损害的研究大多建立在大剂量内毒素(10～40mg/kg体重)严重休克的动物模型基础上,不宜反应内毒素引起细胞损害效应的起始毒理机制。本文旨在观察较低剂量内毒素(2mg/kg体重)作用下线粒体琥珀酸脱氢酶活性变化以及自由基代谢酶类和膜脂质过氧化改变并结合电镜观察结果及有关文献探讨内毒素对线粒体损害的可能起始机制及损害程序,为采取阻断损害的早期手段探索和提供理论依据。

本研究为四川省教委资助项目。本研究系与美国St. Louis 大学医学院合作课题 *本系临床生化硕士研究生。现在Dept.Biochemistry, Washington Univ.Sch of Medicine.St.Louis, Mo,63110 U.S.A

维普资讯 http://www.cqvip.com

材料及方法

1.动物

Wistar雄性大白鼠，体重150～200克(本校实验动物中心提供)。大鼠于实验前实验室饲养一周，定量饮食，被处死前禁食14小时，自由饮水。

2.实验方法

(1)动物处理，将实验动物随机分为5组。按0.2mg/100g体重计算将内毒素纯制剂溶于0.5ml消毒生理盐水中，腹腔注射，分别于注射后4、14、24和48小时乙醚麻醉动物，2～4℃生理盐水经左心室灌流3分钟，再经门静脉灌流10ml预冷生理盐水后迅速取出肝脏，置预冷生理盐水中。对照组为腹腔注射等量消毒生理盐水后，14小时麻醉动物，处理方法同上。

(2)制备肝匀浆及线粒体待测样品　滤纸吸干后取3克肝组织，剪碎，同预冷线粒体分离介质液(甘露醇220mmol/L，蔗糖70mmol/L，2mmol HEPES，0.5mg/ml BSA和0.1mmol EDTA，PH7.4)浸洗三次，以1：10(W：V)比例加入上述介质液并在玻璃匀浆管内匀浆化。按Schnaitman[5]方法分离线粒体后再经0.15mol Tris—HCL，PH7.4缓冲液于7,000xg离心10分钟洗涤两次。留部分线粒体悬液供测定LPO，其余线粒体制备物按Katki[6]介绍的方法用1%Triton X—100溶解破坏线粒体膜，2,000xg离心5分钟，取上清液测定三种酶学指标及蛋白含量。

(3)观测指标　1)琥珀酸脱氢酶活力测定采用速率法[7]，测定时利用岛津UV—265型双光路紫外—可见分光光度计的速度测定及数据处理程序连续监测2.5分钟并求出每分钟光密度下降值；2)过氧化脂质测定选用大石诚子[8]介绍的组织中LPO测定法(TBA法)；3)Mn—SOD测定按亚硝酸盐形成法进行[9]。取线粒体样品0.2ml加8.8mMOL KCN2.8ml(新鲜配制的4℃水溶液)，4℃，20,000xg离心30分钟，取上清液测定SOD活力；4)GSH—PX活力测定见夏奕明报道的血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法(DTNB直接法)[10]；5)蛋白质含量以改良的Lowry法测定，牛血清白蛋白(BSA)为标准计算蛋白质含量；6)电镜观察*，取1mm³肝右叶组织常规制备电镜切片并观察。

3.主要试剂

内毒素纯制剂(Lipopolysaccharide B from E. Coli.026：B6，　美国Difco实验室提供)，Triton X—100，黄嘌呤(均属Sigma产品)，琥珀酸钠　(Merck公司)，1.1.3.3—四乙氧基丙烷　(TEP，Aldrich公司)还原性谷胱甘肽，黄嘌呤氧化酶，BSA(上海生物化学研究所产品)。其它试剂均为分析纯试剂。

4.主要仪器

电动匀浆器(Potter—Elvehjem型)，日立PR—52D高速冷冻离心机(转头为RPR20—2—2751和RPR　20—3—1396)，岛津UV—265型双光路紫外—可见分光光度计。

测定结果系用F检验和Duncan's检验进行统计学处理。

表1　对照及内毒素注射后不同时间组各观察指标水平

	对照组 ($n=9$)	4小时 ($n=6$)	14小时 ($n=9$)	24小时 ($n=8$)	48小时 ($n=8$)
SDH	69.53±5.71	67.05±3.04	52.97±5.03**	53.25±3.16**	58.68±6.56**
SOD	12.11±1.77	10.75±0.56*	11.13±0.91	14.61±1.09**	12.94±0.93
GSH—Px	9.75±1.54	8.87±1.21	6.63±1.31**	9.15±1.31	10.43±0.72
MDA	1.90±0.45	2.49±0.55*	3.07±0.30**	3.29±0.54**	2.46±0.58*

* $P<0.05$、** $P<0.01$(Significant diference from Control rats)
SDH: Succinate dehydrogenase, (n mol/min/mg Protein)
MDA: Malonadehyde, (n mol/mg Protein)
SOD: Superoxide dimutase, (unit/mg Protein)
GSH—PX: Glutathione peroxidase activity (unit/mg Protein)

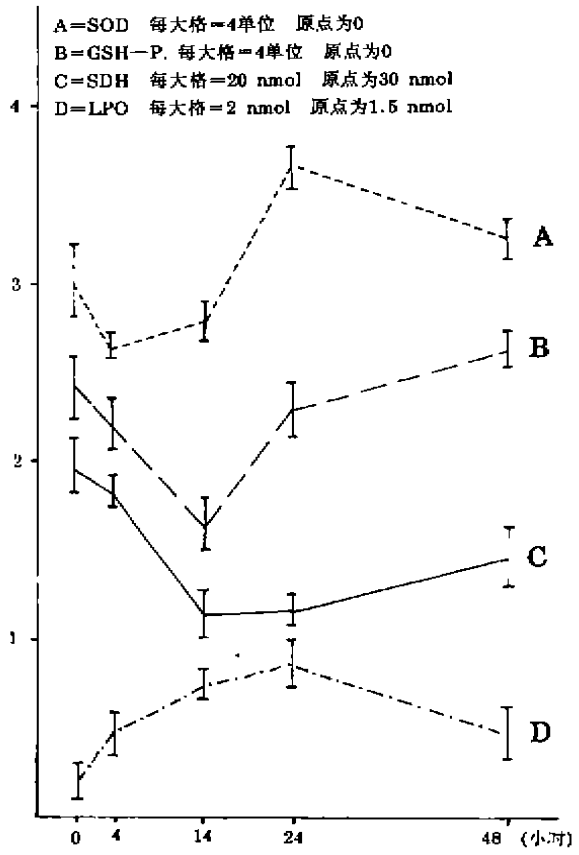
结　果

附表列示内毒素作用后不同时间进程线粒体三种酶活性水平及MDA类脂质过氧化

*此部分工作由本校病理教研室易永芬协助完成。

维普资讯 http://www.cqvip.com

物含量。附图则显示了四种生化指标的改变及时间变化规律。大鼠腹腔注射内毒素后SDH活性于14小时至24小时显著下降，分别为对照组酶活性的76.2%($P<0.01$)，76.6%($P<0.01$)，48小时与14和24小时相比酶活性回升($P<0.05$)，但仍低于对照组。SOD活性于4小时明显下降，为对照组的88.8%($P<0.05$)，但24小时酶活性却显著高于对照组($P<0.01$)，48小时后酶活性恢复到对照组水平。其酶活性时间进程呈一种倒置的S型。GSH—Px活性在14小时最低，为对照组的68.0%($P<0.01$)，48小时酶活性略高于对照组，但尚无统计学意义。内毒素增加线粒体MDA类脂质过氧化物含量，其4、14、24、48、小时的含量分别为对照组的131.1%，161.6%，173.2%，和129.5%



LPS Fig 1.Effect of Lps on Liver Mitochondrial SDH、GSH—Px、SOD Activities and LPO Concentration (Time course)

电镜观察肝细胞超微结构改变以线粒体最为突出，14小时和24小时损害最严重；线粒体高度肿胀，脊变短或消失，部分线粒体膜破裂，少数内质网扩张，肝细胞核均质化，48小时肝细胞形态学改变明显恢复。

讨 论

Ogawa 等[3]认为，内毒素可以活化自由基产生系统，损害自由基清除系统，使自由基含量增高。本实验结果显示内毒素作用后的早期自由基代谢酶类，尤其是SOD活性明显下降提示肝线粒体对O_2^-清除能力减低，加之可能存在的自由基生成增加启动了自由基损害的连锁反应。自由基至少可以通过三种方式引起生物膜损害:(1)自由基的直接损害作用;(2)自由基诱导膜组分中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化而损害膜结构;(3)由脂质过氧化的降解产物所产生的毒性作用。LPO4小时增加并持续升高的结果间接证实了这种自由基损害的连锁反应。SDH是位于线粒体内膜上的代谢酶，线粒体SDH活性下降可以反映线粒体膜的损害及其程度。附图显示了腹腔注射内毒素后4小时SOD活性和LPO含量都有了显著性改变，GSH—Px活性也有一定程度下降，但SDH的活性在14小时才显著降低，因此自由基损害及膜的脂质过氧化可能是内毒素引起的线粒体损害的起始环节之一，而不单纯是损害的结果。在内毒素引起的肝损害过程中线粒体的脂质过氧化作用于14～24小时最强，而SDH活性则下降最显著反映了此时膜结构受到严重损害，与此同时，SOD的活性于4小时下降后逐渐升高并超过对照组水平，GSH—Px活性也趋向于逐渐增加反映了此时线粒体氧自由基清除作用出现代偿性增加，这一点支持Shiki等[11]提出的内毒素可引起细胞抗氧毒性效应的观点。本实验结果的另一特点是内毒素处理的动物经48小时后各生化观测指标都趋于恢复正常。电镜观察结果则进一步从形态学上证实了内毒素引起的肝线粒体损害及损害的时间进程规律。

维普资讯 http://www.cqvip.com

总结上述几点提示 (1)本实验选用剂量的内毒素引起肝细胞可逆性损害;(2)自由基损害与膜脂质过氧化是内毒素引起的线粒体损害的一个重要的起始环节;(3)而在这种自由基损害的时间进程中SOD清除超氧自由基的作用可能具有较突出的意义。

本实验主要从氧自由基和脂质过氧化角度探讨了肝线粒体膜结构损害，我们以往的工作及有关文献也强调了内源性磷脂酶A活化在内毒素引起的膜结构损害中的作用[2,4,12]。有资料提示，自由基及脂质过氧化物增加和磷脂酶A起始的膜磷脂分解代谢增强之间有着相互促进的作用。膜脂质过氧化和膜磷脂分解增加都可破坏膜结构导致线粒体和细胞的损害，但两者在内毒素性肝细胞损害中所起的作用及最初的起始环节尚待进一步探讨。此外，这两种损害因素与细胞内Ca^{2+}、GSH浓度等因素之间的关系也需进一步认识，这对于指导采取阻断损害的早期有效的措施和防治方案具有重要意义。

参 考 文 献

1 Popper H. Networks of interacting mecha nisms of hepatocellular degeneration and death.In Progress in Liver Diseases VIII New York 1986

2 Liu M.S, et al.J Surgical Res 45：472,1988

3 Ogawa R, et al.Circ Shock 9：369,1982

4 Conde G, et al.In Vitro and in Vivo effect of Escnerlchia coli endotoxin on mitochondri al phospholipase A activity.FEBS Letters 127：115,1981

5 Schnaitman C.et al.J Cell Biol 38：158 1968

6 Katki AG, et al.Biochem Biophys Res Com munr 96：85,1980

7 B.H奥列霍维奇，等编著.现代生物化学方法(袁厚积、赵邦悌合译) 人民教育出版社 1986;37

8 大石诚子.最新医学 1978;33：660

9 Elsner EF, et al.Inhibition of nitrite forma tion from Hydroxyl—ammonium—Chloride: A simple assay of superoxide

10 夏奕明，等.卫生研究 1987;16：29

11 Shiki Y, et al.Am J Physiol 252(4ptl)：C436;1987

12 康格非，等.全国第一届医学生化学术讨论会论文汇编1989;5 上海

(收稿日期 1994—01—20)

HEPATIC MITOCHONDRIA DAMAGE AND LIPID PEROXIDATION INDUCED BY ENDOTOXIN

Gao Aiguo, et al

Dept.of Clinical Biochemistry

Male Wistar Rats were treated with Endotoxin (Lipopolysacchride, LPS) by intraperitoneal injection (2mg/kg body welght).Liver mitochondria damage and lipid peroxidation were investigated at a time course of 4、14、24、48 hrs followed .Succinate dehydrogenase(SDH) activity decreased markedly at 14—24 hr after LPS administration, thereafter tending to recover.The mitocondria lipoperox oxide level (expressed by Malonaldehyde fromed) elevated at 4 hr to 173.2% of the control′s, but retruned to normal range after 48hrs.Superoxide dismutase (SOD)and glutathione peroxidase (GSH—PX) activities in liver mitochondrla decreased initially and tended to increase thereafter.In coincidence with biocnemlcal alteration, electronic micrographs showed a marked hepatocyte damage at 14—24hr after LPS administration.Biochemical results and detection micrographs suggest that;1)at the experimental LPS dose, hepatic injury was apparent but reversible, and mitochondria was one of the major organella attacked by LPS,2)SOD and GSH—PX activities change suggested to be an induced effect, and put out previous studies together, we considered 3)lipid peroxidation and PLA_2 activation are two initial key steps leading to membrane damage and they play an important role in the interacting mechanism of liver toxicity induced by LPS.

KEY WORDS Endotoxin; Mitochondria; Peroxilipid; Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase