DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.002
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2086 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)23-2086-03

烧伤早期大鼠心肌线粒体 DNA 4.8 kb 大片段缺失的检测及其意义

张东霞[1],黄跃生[1],董明刚[2],李晓东[1],党永明[1],赵颂涛[3] ([1]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]河北北方学院医学检验系生物化学教研室,张家口 075000;[3]河北省宁晋县中西医结合医院,邢台市 055550)

提 要:目的 观察严重烧伤早期大鼠心肌组织线粒体 DNA(mtDNA)4.8 kb 大片段缺失的规律,探讨线粒体参与烧伤后"休克心"形成的基本机制。方法 Sprague Dawley(SD)大鼠36只随机分为假烫伤组、30%TBSA Ⅲ度烫伤1、3、6、12、24 h组,半定量PCR法检测烧伤前后心肌线粒体DNA缺失率,并测定各组大鼠心肌线粒体中ATP、ADP、AMP以及血清中肌钙蛋白I(Tn I)含量变化。结果 ①大鼠烧伤后1、3、24 h分别发生了线粒体DNA(mtDNA)的部分或全部4.8 kb大片段缺失。②大鼠烧伤后1、3、6、24 h时心肌线粒体中ATP含量下降,结果有显著性意义($P<0.05$, $P<0.01$)。③大鼠烫伤后血清中Tn I含量急剧上升,至伤后6 h达最高峰,变化有显著性意义($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 烧伤早期心肌mtDNA发生了严重缺失,可能诱发线粒体氧化磷酸化障碍,促进了烧伤早期心肌损伤。

关键词:烧伤;心肌;线粒体DNA(mtDNA);ATP;Tn I
中图法分类号:R322.11;R394.2;R644.02 文献标识码:A

Myocardial injury in rats induced by 4.8 kb deletion of mtDNA at the early stage of severe burn

ZHANG Dong-xia[1], HUANG Yue-sheng[1], DONG Ming-gang[2], LI Xiao-dong[1], DANG Yong-ming[1], ZHAO Song-tao[3] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Biochemistry, Hebei Northern College, Zhangjiakou 075000; [3]Hospital of Integrated Traditional chinese Medicine and Western Medicine, Ningjin 055550, Hebei Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the 4.8 kb deletion of mtDNA in rat myocardial tissues at the early stage of severe burn and identify the roles of mitochondria in the occurrence of "cardiac shock". **Methods** A total of 36 Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into sham scald group and 30% TBSA full-thickness scald injury group. The 4.8 kb deletion of mtDNA, the contents of ATP, ADP, and AMP in mitochondria, and Tn I in serum were determined at 1, 3, 6, 12, and 24 h after burn. **Results** ① Partial or full 4.8-kb deletion of mitochondrial DNA (mtDNA) was found in some rats at 1, 3, and 24 h after scald. ② Level of ATP in myocardial mithochondia decreased obviously at 1, 3, 6, and 24 h after severe burn ($P<0.05$ or $P<0.01$). ③ The content of Tn I in serum was elevated dramatically at 1 h after burn and peaked at 6 h. The changes were significant ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The 4.8 kb deletion of mtDNA may induce the disturbance of energy metabolism in rat myocardial mitochondria at the early stage of severe burn, which may accelerate the occurrence of "cardiac shock".

Key words: burn; myocardium; mitochondrial DNA; ATP; Tn I

近期的研究证明,缺血缺氧是严重烧伤后多种因素造成组织细胞损伤的交汇点[1],线粒体是细胞缺血缺氧损害的核心靶细胞器,在烧伤早期即有细胞色素C氧化酶、F0,F1-ATPase、NADH还原酶等氧化磷酸化关键酶活性显著降低[2],而对于这三者的活性为何在同一时期内共同降低尚缺乏充分的证据。线粒体DNA(mtDNA)可通过自我复制、表达而参与氧化磷酸化酶复合体的合成,包含13个多肽亚单位[3],因此mtDNA在氧化磷酸化中具有举足轻重的作用。本研究通过观察30% TBSA Ⅲ度烫伤大鼠心肌组织mtDNA 4.8 kb大片段缺失规律及其对线粒体氧化磷酸化水平的影响,来探讨线粒体参与烧伤后"休克心"形成的基

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);全军医学科学技术研究"十五"计划指令性课题(01L066);高等学校骨干教师资助计划项目(2000);军队首批临床高新技术重大项目(2002)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054202), the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040), the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA, the Fund for Outstanding Teachers in Higher Educational Institutes of Education Ministry of China (2000), and the Fund for the First Major Clinical High-tech Projects of PLA (2002)
作者简介:张东霞(1978—),女,河北省宁晋县人,硕士研究生,医师,主要从事烧伤后早期脏器损害方面的研究。电话:(023)68754148-8064;E-mail:dxzhang78@yahoo.com.cn
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173;E-mail:yshuang@public.cta.cq.cn
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本机制。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　　PCR 试剂盒(日本 TAKARA 公司), 线粒体分离介质(0.25 mol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4), TE 液(10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 8.0), RTE(40 μg/ml RNase A、10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 8.0), Tn I 检测试剂盒(美国 Lifekey 公司)。

1.1.2　主要仪器　　PCR 仪(Gene Amp PCR system 9600), 凝胶成像扫描仪(美国 Bio-rad), 可见—紫外分光光度仪(德国 Beckman), 高效液相色谱仪(法国 Gilson), 酶标仪(美国 bio-rad)。

1.1.3　动物　　清洁级健康成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 36 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供), 雌雄各半, 体质量(250±20)g。

1.2　方法

1.2.1　动物分组与致伤模型制备　　SD 大鼠 36 只按随机数字表法随机分为假烫伤组(n=6)和 30% Ⅲ度烫伤 1、3、6、12、24 h 组(n=6), 伤前禁食 12 h, 1%戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔麻醉, 背部电推剃毛, 置剃毛区于 92 ℃水浴中 18 s, 造成 30% Ⅲ度烫伤(病理切片证实, 本研究统称为烧伤), 伤后按 Parkland 公式补液, 假烫伤组大鼠置脱毛区于 37 ℃水浴 18 s, 不补液, 1 h 后处死。

1.2.2　心肌组织线粒体提取　　参照 Liang 等[2] 的方法, 略作改动。制成的心肌组织匀浆经 700× g 离心 6 min, 取上清 10 000× g 离心 10 min, 所得沉淀再用分离介质再洗涤 1 次, 即得线粒体。以上操作均于 0~4 ℃进行。

1.2.3　心肌组织线粒体 DNA 的提取　　参照 Suliman 等[4] 的方法, 略作改动, 向上述所得线粒体中加入 0.5 ml TE 液, 吹打悬浮, 再加入 55 μl 10% SDS 和 60 μl 10 mg/ml 的蛋白酶 k, 55 ℃孵育 3 h; 孵育产物用 Tris 饱和酚抽提 2 次、酚/氯仿抽提 1 次, 最后5 000× g 离心 5 min 使其分相, 分离上清, 向其中加入 60 μl 3 mol/L 乙酸钠和 1.25 ml 的无水乙醇, −75 ℃冰浴 30 min, 再 4 ℃ 5 000× g 离心 20 min, 所得微量沉淀即为 mtDNA; 将所得 mtDNA 沉淀用 75% 乙醇漂洗 1 次, 风干, 溶于 RTE 液中, −20 ℃保存备用。

1.2.4　大鼠血清的制备　　于各时相点麻醉大鼠后自腹主动脉抽血, 置入干净 EP 管中, 4 ℃冰箱放置凝固后, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清, −20 ℃保存备用。

1.3　指标检测

1.3.1　半定量 PCR 法检测 mtDNA 大片段缺失

1.3.1.1　引物的准备　　该实验设计了两对引物, 一对跨过 mtDNA 的 4 395~5 164 bp 区域, 此区域位于轻链复制起始区附近, 不易受氧化损伤, 几乎不易发生缺失, 称为野生型区域, 扩增量代表总 mtDNA 的含量, 相当于内参, 扩增产物长度为 770 bp, 序列为[5]: L4395: AGGACTTAACCAGACCCAAACAGG; H5164: CCTCTTTTCTGATAGGCGGG。另一对跨越 mtDNA 的 7 387~13 667区域, 在该区域中, 有一段长度为 4 818 bp 的基因序列, 其两端有 16 个碱基的直接重复, 在氧化应激等刺激下, 容易发生断裂, 在修复时, 由于两端均为直接重复序列, 容易导致"误认"而发生 4.8 kb 的大片段缺失, 称为缺失型区域, 在未发生 4.8 kb 缺失时扩增产物为 5.2 kb, 发生缺失后, 扩增产物长度为 440 bp, 序列为[6]: L7687: GCTTAGAGCGTTAACCTTTTAAG; H12981: CAGCAGTTATGGATGTGGCG。

1.3.1.2　半定量 PCR　　50 μl PCR 反应体系中含模板 DNA 200 ng, 1.25 单位 *Taq* DNA 聚合酶, 4 种 dNTP 各 200 μmol/L, $MgCl_2$ 2.5 mmol/L, 一对引物各 20 pmol, 1× PCR 缓冲液。PCR 扩增条件: 95 ℃预变性 2 min; 94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 50 s, 72 ℃延伸 50 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃延伸 5 min。取扩增产物 3.5 μl 跑 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后行凝胶成像扫描, Quantity-one 对各条带进行光密度定量, 以缺失型条带光密度值与野生型条带光密度值的比值(D 缺失型/D 野生型)来表示缺失率的大小, 比值越大, 表明缺失率越高, 平均缺失率即缺失率的平均值。

1.3.2　心肌线粒体中 ATP、ADP、AMP 含量检测　　在线粒体沉淀中加入适量线粒体分离介质, 吹打悬浮, 并检测其蛋白含量, 冰浴中取 200 μl 线粒体悬液, 于 250 mA 下超声破膜 15 s× 2 次, 4 ℃ 12 000× g 离心 10 min, 分离上清用蛋白滤器过滤, 用所得滤液进行高效液相色谱检测能荷, 平行测定 ATP、ADP、AMP 标准品, 由样品峰与标准峰面积比计算 ATP、ADP 及 AMP 含量, 以 ng/mg 蛋白表示。

1.3.3　血清中 Tn I 含量检测　　按试剂盒说明书操作。

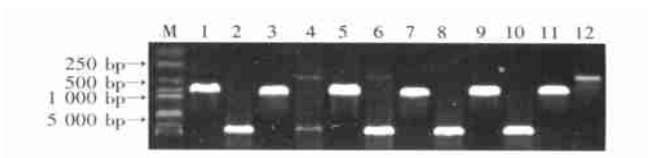
1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件分别进行析因分析和单因素方差分析。

2　结果

2.1　心肌线粒体 DNA 4.8 kb 大片段缺失规律

半定量 PCR 扩增后, 假烫伤组组大鼠心肌 mtDNA 缺失型区域, 无一发生 4.8 kb 大片段缺失, 烧伤后 1 h 6 只大鼠中有 4 只的心肌 mtDNA 缺失型区域发生部分 4.8 kb 大片段缺失, 表现为异质性, 以 Quantity-one 对各条带进行光密度定量后计算出平均缺失率为 63.5%; 烧伤后 3 h 有 3 只大鼠发生缺失, 平均缺失率为 42.7%; 烧伤后 6 h 与 12 h 野生型区域的缺失完全修复; 至烧伤后 24 h, 2 只标本的 mtDNA 发生完全缺失, 表现为同质性, 平均缺失率为 93.1%, 见图 1。



M: Marker; 1, 3, 5, 7, 9, and 11: Electrophoretic results of myocardial mtDNA wild-type region in sham scald and 1, 3, 6, 12, and 24 h post-burn groups; 2, 4, 6, 8, 10, and 12: Electrophoretic results of myocardial mtDNA of myocardial mtDNA deletion-type region

图 1　心肌 **mtDNA** 半定量 **PCR** 结果

Fig 1　Quantitative PCR results of myocardial mtDNA

2.2　心肌线粒体中 ATP、ADP、AMP 含量改变

自烧伤后 1 h 起, 大鼠心肌线粒体中 ATP 含量开始下降, 至伤后 6 h 达到最低值, 12 h 有所恢复, 24 h 又下降; ADP 含量在伤后 3 h 起开始显著升高, 12 h 达到最高峰, 24 h 仍很高; AMP 含量的变化趋势同 ADP, 见表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 心肌线粒体中ATP、ADP、AMP含量的变化(μg/mg, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of ATP, ADP, and AMP in myocardial mitochondria (μg/mg, $\bar{x}\pm s$)

Group	ATP	ADP	AMP
Sham scald	0.98±0.29	0.21±0.01	0.11±0.01
1 h post-burn	0.74±0.18 *	0.29±0.02	0.15±0.01
3 h post-burn	0.64±0.24 *	0.36±0.06 *	0.19±0.03 *
6 h post-burn	0.46±0.21 **	0.37±0.05 *	0.20±0.03 *
12 h post-burn	0.91±0.60	0.43±0.16 **	0.29±0.08 **
24 h post-burn	0.72±0.38 *	0.41±0.05 *	0.20±0.03 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* sham scald

2.3 血清中Tn I含量改变

与假烫伤组相比,烧伤后1 h起大鼠血清中Tn I含量即显著升高,至伤后6 h达高峰,12 h基本恢复正常,24 h又升高,见表2。

表2 大鼠血清中Tn I含量改变(ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of Tn I in rat serum (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	Tn I
Sham scald	1.46±0.44
1 h post-burn	2.94±0.36 *
3 h post-burn	3.03±0.45 *
6 h post-burn	3.69±0.73 **
12 h post-burn	2.21±0.29
24 h post-burn	2.89±0.49 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* sham scald

3 讨论

线粒体DNA(mtDNA)是位于线粒体基质中,独立于细胞核染色体外的基因组,人mtDNA为16.5 kb,双链闭环分子,缺乏内含子,具有自我复制、转录和编码的功能。由于mtDNA处于高氧化还原环境中,且缺少组蛋白的保护[7],易受过氧化损伤而发生点突变或大片段缺失。本研究显示,烧伤后1 h起,大鼠的心肌mtDNA即发生4.8 kb大片段的部分缺失,当一个细胞内所有的DNA分子都是一致的时候,为同质性,而当mtDNA突变时,就会导致细胞内同时存在野生型和突变型,这两种mtDNA为异质性,此时心肌中mtDNA的表现即为异质性。这种缺失在伤后3 h和24 h持续存在,且在24 h点发生完全缺失,表现为异质性,经统计学分析说明烧伤诱发并促进心肌mtDNA发生大片段缺失。

mtDNA缺失的4.8 kb大片段中包含有氧化磷酸化关键酶F0,F1-ATPase亚单位6(F0, F1-ATPase6),细胞色素C氧化酶亚单位Ⅲ(COXⅢ),NADH还原酶3、4L、4基因,Silva等[8]的研究推测这些基因的缺失必定会影响其转录、翻译并进一步影响相应氧化磷酸化关键酶的活性,以往研究表明的烧伤后F0,F1-ATPase、COX、NADH还原酶的活性变化基本与本实验的结果一致也验证了该推测,这些酶活性的降低导致烧伤后大鼠的心肌组织中ATP生成减少,而线粒体为了维持其自身结构和功能的完整性需分解大量ATP,导致烧伤后1 h起心肌线粒体中ATP含量下降,酶活性的变化对ATP的含量的影响是一个累积过程,因此到烧伤后6 h ATP的含量降至最低。ATP分解的增多使线粒体内ADP含量上升,ADP在线粒体内的累积导致在伤后12 h其含量达最高峰,AMP变化的意义同ADP。

分子量为24×10^3的肌钙蛋白I是存在于心肌中的特有物质,当心肌受损时,肌钙蛋白I从心肌细胞中释放出,游离于血液,其血中浓度变化可特异性地反应心肌结构蛋白的破坏情况,且与心肌损伤程度呈密切的平行关系,被视为目前判断心肌损伤最特异和敏感的指标[9]。由该实验结果知,烧伤后1 h血清中TnI含量即显著上升,说明心肌发生明显损伤,随着TnI含量的上升,损伤逐渐加重,至伤后6 h心肌损伤最为严重,这种变化趋势与心肌线粒体中ATP含量的变化趋势基本一致,充分验证了烧伤后由mtDNA大片段缺失所引起的线粒体能量代谢障碍促进了烧伤早期心肌损害。

综上所述,我们认为在烧伤早期线粒体参与烧伤后"休克心"形成的基本机制为mtDNA 4.8 kb大片段缺失的发生。由于缺失的片段包含了一些氧化磷酸化关键酶基因,这些基因的缺失进一步影响了相应氧化磷酸化关键酶的活性,导致线粒体能量代谢障碍,ATP生成减少,能量供应的不足诱发了烧伤早期心肌损害。

参考文献:

[1] 黄跃生. 烧伤早期损害防治研究近况[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(18): 1593-1595.

[2] Liang W Y, Tang L X, Yang Z C, *et al*. Calcium induced the damage of myocardial mitochondrial respiratory function in the early stage after severe burns[J]. Burns, 2002, 28(2): 143-146.

[3] Shadel G S, Clayton D A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates [J]. Annu Rev Biochem, 1997, 66: 409-435.

[4] Suliman H B, Carraway M S, Velsor L W, *et al*. Rapid mtDNA deletion by oxidants in rat liver mitochondria after hemin exposure[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(3): 246-256.

[5] Filser N, Margue C, Richter C. Quantification of wild-type mitochondrial DNA and its 4.8-kb deletion in rat organs[J]. Biochem Biophs Res Commun, 1997, 233(1): 102-107.

[6] Yowe D L, Ames B N. Quantitation of age-related mitochondrial DNA deletions in rat tissues shows that their pattern of accumulation differs from that of humans[J]. Gene, 1998, 209(1-2): 23-30.

[7] Fosslien E. Mitochondrial medicine-molecular pathology of defective oxidative phosphorylation[J]. Ann Clin Lab Sci, 2001, 31(1): 25-67.

[8] Silva J P, Larsson N G. Manipulation of mitochondrial DNA gene expression in the mouse[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1555(1-3): 106-110.

[9] Murphy J T, Horton J W, Purdue G F, *et al*. Evaluation of troponin-I as an indicator of cardiac dysfunction after thermal injury[J]. J Trauma, 1998, 45(4): 700-704.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net