DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.006
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1606 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1606-03

大鼠严重烧伤早期心肌线粒体通透性转换孔状态改变及其机制

梁晚益,黄跃生,杨宗城 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠严重烧伤早期心肌线粒体通透性转换孔(PTP)状态改变及其机制。方法 Wistar大鼠48只随机分为正常对照组、烧伤1、3、6、12、24 h组(30% Ⅲ度烫伤)。所有大鼠处死前5 min均从颈外静脉推注0.5 mmol/L 2-[^{3}H]去氧葡糖([^{3}H] DOG),测定伤后各组大鼠心肌线粒体[^{3}H] DOG、cyt c、MDA含量及[Ca^{2+}]$_m$。结果 ①大鼠烧伤后1 h心肌线粒体[^{3}H] DOG及cyt c含量与正常对照组无明显差异,但3、6、12、24 h心肌线粒体[^{3}H] DOG含量明显高于正常对照组,cyt c含量明显低于对照组,分别是对照组的68.8%、50.0%、77.1%、72.9%。②大鼠烧伤后3、6、12、24 h心肌线粒体MDA含量及[Ca^{2+}]$_m$显著高于正常对照组。③伤后心肌线粒体[^{3}H] DOG含量与[Ca^{2+}]$_m$、MDA均呈显著正相关,相关系数分别为0.854 7、0.911 7($P<0.01$)。结论 烧伤后1 h心肌线粒体PTP状态无明显改变,但伤后3、6、12、24 h PTP开放明显增加,线粒体Ca^{2+}超载及自由基增加可能是烧伤后PTP开放的重要原因。

关键词:烧伤;线粒体;通透性转换孔;心肌
中图法分类号:R322.1$^+$1;R329.2$^+$7;R644 文献标识码:A

Changes of myocardial mitochondrial permeability transition pore and its mechanism in the early stage after severe burns

LIANG Wan-yi, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of myocardial mitochondrial permeability transition pore (PTP) and its mechanism in the early stage after severe burns. **Methods** An experimental model of 30% TBSA full-thickness skin scalding was established in rats. All rats were injected with [^{3}H]-deoxyglucose ([^{3}H] DOG) before sacrifice. Myocardial mitochondrial [^{3}H] DOG and cytochrome c content, Ca^{2+} concentration ([Ca^{2+}]$_m$) and MDA content were determined. **Results** ① There were no obvious changes of mitochondrial [^{3}H] DOG and cytochrome c content at 1 h after burns, but mitochondrial [^{3}H] DOG increased evidently at 3, 6, 12 and 24 h after burns. Meanwhile, cytochrome c content was significantly lower than that of the control, being 68.8%, 50.0%, 77.1% and 72.9% of that in the control, respectively. ② [Ca^{2+}]$_m$ and MDA content were significantly higher than those of the control at 3, 6, 12 and 24 h after burns. ③ Mitochondrial [^{3}H] DOG content was positively correlated with [Ca^{2+}]$_m$ and MDA content, respectively, after burns. **Conclusion** There is no obvious change in myocardial mitochondrial permeability transition pore, but PTP opening increases markedly at 3, 6, 12 and 24 h after burns. Mitochondrial Ca^{2+} overloading and increase in free radicals may be the cause leading to PTP opening.

Key words: burns; mitochondria; permeability transition pore; myocardium

严重烧伤患者早期常伴发心功能损害,目前研究提示其与缺血缺氧有关,但具体机制尚不完全清楚[1]。心肌细胞具有高能耗与高氧耗的特点,线粒体作为氧利用的重要场所与细胞的"能量工厂",对于心肌细胞维持其正常功能具有十分重要的作用。但近年来的研究表明,线粒体功能异常同时也是细胞损害的关键环节[2]。线粒体膜上具有通透性转换孔(Permeability transition pore, PTP),在缺血缺氧等病理情况下PTP开放使线粒体氧化磷酸化出现障碍并释放细胞色素c进入胞浆,导致细胞坏死与凋亡[3]。本研究先观测严重烧伤早期心肌线粒体PTP的开闭情况,同时检测影响线粒体PTP开闭的相关因素,以期阐明烧伤后心肌线粒体通透性变化的发生机制。

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"十五"指令性课题(01L066),教育部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)

作者简介:梁晚益(1967—),男,湖南省涟源市人,主要从事烧伤后脏器功能损害及瘢痕增生防治方面的研究。电话:(023)68754148—8064

收稿日期:2003-07-18;修回日期:2003-08-24

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

1　材料与方法

1.1　动物致伤模型及分组

健康成年 Wistar 大鼠 48 只(本校实验动物中心提供), 雌雄各半, 体质量(210±20)g, 领回后分笼喂养 4~5 d 以适应环境, 随机分为正常对照组(n=8)和烧伤 1、3、6、12、24 h 组(n=8)。以 2%戊巴比妥钠腹腔注射(30 mg/kg)麻醉大鼠, 10%硫化钠脱毛。烧伤组大鼠置脱毛区于 92 ℃水浴 18 s, 造成 30%TBSA Ⅲ度烫(烧)伤(经病理切片证实), 分别于伤后 30 min、9 h 经腹腔注射乳酸林格液(每 1%烧伤面积 2 ml/kg)。正常对照组大鼠置脱毛区于 37 ℃水浴 18 s(假烫伤), 不补液, 1 h 后处死。烧伤组大鼠分别于伤后 1、3、6、12、24 h 处死。所有大鼠处死前 5 min 均从颈外静脉推注 0.5 mmol/L 2-[^{3}H]去氧葡糖(^{3}[H]-deoxyglucose, [^{3}H]DOG, 0.01 mmol/kg)。

1.2　线粒体分离及指标检测

1.2.1　线粒体分离　　参照 Zydowo 等[4]的方法进行。分离介质: 0.25 mol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4(去离子水配制)。大鼠同前法麻醉后, 迅速开胸取心, 置预冷分离介质中, 洗去残血, 剪碎心肌, 用内切式匀浆机匀浆 10 s(5 s×2 次)。再用预冷的玻璃匀浆器匀浆, 制成约 10%心肌匀浆液, 经 600× g 离心 7 min, 取上清 10 000× g 再次离心 11 min, 所得沉淀即为线粒体, 用分离介质再洗涤 1 次, 最后以 0.6 ml 分离介质悬浮。以上操作均于 0~4 ℃进行, 线粒体分离于 1 h 内完成。

1.2.2　线粒体[^{3}H]DOG 含量测定[5]　　取线粒体悬液 0.2 ml 加入 0.2 ml 5% $HClO_4$, 振摇混匀后, 8 000× g 离心 5 min 沉淀蛋白, 吸上清液闪计数(cpm)。另以改良 Lowry 法测线粒体蛋白浓度。线粒体[^{3}H]DOG 含量以 $10^3\times$ cpm·mg^{-1} 表示。

1.2.3　线粒体细胞色素 c(cyt c)检测　　按夏腊梅等[6]的方法测定。

1.2.4　线粒体 Ca^{2+} 浓度测定　　按 Elizabeth 等[7]的方法略作改动。线粒体悬浮于 1% HCl(去离子水配制)中, 150 W× 10 s 超声 3 次(冰浴)后, 30 000× g 离心 60 min, 上清液即为线粒体基质。将线粒体基质及 Ca^{2+} 标准与邻-甲酚酞络合铜溶液反应显色后, 于 575 nm 波长处比色测定。

1.2.5　线粒体 MDA 测定　　采用南京建成生物工程研究所提供的检测试剂盒进行。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用华西医科大学 Pems 医用统计软件对实验数据进行方差分析和 t 检验, 部分指标作相关分析。

2　结果

2.1　烧伤后心肌线粒体[^{3}H]DOG 及 cyt c 含量变化

大鼠烧伤后 1 h 心肌线粒体[^{3}H]DOG 及 cyt c 含量与正常对照组无明显差异, 但 3、6、12、24 h 心肌线粒体[^{3}H]DOG 含量明显高于正常对照组, 分别为对照组的 2.64、3.23、2.86、2.49 倍; 而 3、6、12、24 h 心肌线粒体 cyt c 含量明显低于对照组, 分别是对照组的 68.8%、50.0%、77.1%、72.9%, 见表 1。

表 1　心肌线粒体[^{3}H]DOG 与 cyt c 的变化($\bar{x}\pm s$, n=8)

Tab 1　Changes of myocardial mitochondrial [^{3}H]DOG ($10^3\times$ cpm·mg^{-1}) and cyt c content (nmol·mg^{-1}) after burn ($\bar{x}\pm s$, n=8)

	Control	Time after burn (h)				
		1	3	6	12	24
[^{3}H]DOG	18.30±2.50	21.40±3.20	48.30±4.70**	59.20±4.50**	52.40±5.30**	45.50±5.80**
Cyt c	0.48±0.08	0.45±0.06	0.33±0.06**	0.24±0.05**	0.37±0.04*	0.35±0.04*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.2　大鼠烧伤后心肌线粒体 Ca^{2+} 浓度与 MDA 含量变化

大鼠心肌[Ca^{2+}]$_m$ 于烧伤后 1、3、6、12、24 h 均明显高于正常对照组。伤后 1 h 线粒体 MDA 含量与对照组无明显差异, 但伤后 3、6、12、24 h MDA 含量显著高于正常对照组, 见表 2。

表 2　烧伤后心肌线粒体 Ca^{2+} 浓度与 MDA 含量变化($\bar{x}\pm s$, n=8)

Tab 2　Changes of myocardial mitochondrial [Ca^{2+}] (nmol·mg^{-1}) and MDA content (nmol·mg^{-1}) ($\bar{x}\pm s$, n=8)

	Control	Postburn hour				
		1	3	6	12	24
[Ca^{2+}]$_m$	8.70±1.30	11.40±1.50*	18.50±2.50**	23.30±3.10**	14.10±2.40**	13.50±1.80**
MDA	0.25±0.06	0.27±0.04	0.36±0.06*	0.61±0.08**	0.56±0.09**	0.44±0.05**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.3　相关分析

烧伤后心肌线粒体[^{3}H]DOG 含量与[Ca^{2+}]$_m$、MDA 均呈明显正相关, 相关系数分别为 0.854 7($P<0.01$)、0.911 7($P<0.01$)。

3　讨论

"休克心"是常见的烧伤后脏器损害并发症, 其实质是烧伤后心肌细胞损害, 与缺血缺氧密切相关[1]。目前研究表明, 线粒体通透性转换孔(PTP)开放是缺血缺氧性心肌细胞损害的关键环节[8]。基于 DOG 具有的以下两个特点: ①可通过心肌细胞膜进入胞浆, 但不能渗透正常线粒体膜, 只有当 PTP 开放时方可进入线粒体; ②细胞对 DOG 无任何代谢作用[5]。本研究以[^{3}H]DOG 直接检测烧伤后心肌细胞线粒体 PTP 开闭特性。结果表明, 大鼠烧伤后 1 h 心肌线粒体[^{3}H]DOG 含量与正常对照组无明显差异, 但 3、6、12、24 h 心肌线粒体[^{3}H]DOG 含量明显高于正常对照组, 提示烧伤后 1 h 心肌线粒体 PTP 状态无明显改变, 但 3~24 h PTP 开放明显增加。

PTP 的实质是一种通道复合体, 由线粒体内膜上的腺苷酸转运酶(ANT)和外膜的电压依赖性离子通道(VDAC)蛋白以及基质中的亲环素 D(Cyclophilin D, CyP-D)构成[9]。生理条件下, PTP 处于关闭或亚通透状态, 只允许分子质量$<3\times10^5$ 的物质自由进出, 不导致线粒体肿胀, 可能与线粒体内外离子转运有关。在某些病理条件下, PTP 开放转变为高通透状态, 允许某些大分子物质从线粒体漏出[10]。本研究结果烧伤后 3、6、12、24 h 心肌线粒体 cyt c 含量明显低于对照组, 从另一个侧面说明烧伤后心肌线粒体 PTP 开放增加。线粒体 cyt c 减少正是其通过开放的 PTP 漏出的缘故。

既往研究表明, 烧伤后心肌细胞损害与线粒体

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

Ca^{2+}超载及自由基有关[11]。本研究结果大鼠心肌线粒体MDA含量及$[Ca^{2+}]_m$于烧伤后3、6、12、24 h均显著高于正常对照组，也证实了烧伤后心肌细胞存在线粒体Ca^{2+}超载及自由基增加的事实。但此两者损害心肌细胞的具体机制一直未有定论。分析本实验结果显示，烧伤后心肌线粒体[^{3}H] DOG含量与$[Ca^{2+}]_m$、MDA均呈明显正相关，提示线粒体Ca^{2+}超载及自由基增加可能是烧伤后心肌线粒体PTP开放的重要原因。在PTP由关闭或亚通透状态转换为开放状态的过程中，线粒体基质亲环素D与位于膜上的腺苷酸转运酶结合是其关键环节。Ca^{2+}超载与自由基可能在此环节中起重要作用。Woodfield等[12]的体外研究表明，高浓度Ca^{2+}可导致重组CyP-D与ANT结合。烧伤后心肌线粒体Ca^{2+}超载可能通过促进CyP-D发生结构改变并与ANT结合，诱发PTP开放。但目前还不清楚自由基如何导致线粒体PTP开放。由于自由基具有强烈的氧化活性，推测其可能通过作用于CyP-D所含的巯基，引发CyP-D与ANT结合，最终导致线粒体PTP开放[13]。

烧伤后心肌细胞线粒体PTP开放可产生以下两个后果[14]：①线粒体氧化磷酸化出现障碍；②线粒体cyt c释放进入胞浆。前者使心肌细胞不能获得足够的能量；后者cyt c激活胞浆capase-3，诱发心肌细胞凋亡。它们可能是导致烧伤后心肌细胞损害和心功能下降的的重要原因。烧伤后及早应用抗氧化药物并设法减轻线粒体Ca^{2+}超载，抑制心肌细胞线粒体PTP开放，可能是防治烧伤“休克心”的有效手段。

参考文献：

[1] 黄跃生，杨宗城，迟路湘，等. 烧伤后“休克心”的研究[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(5)：275－278.

[2] Newmeyer D D，Ferguson M S. Mitochondria：releasing power for life and unleashing the machineries of death[J]. Cell，2003，112(4)：481－490.

[3] La Piana G，Marzulli D，Consalvo M I，*et al*. Cytochrome c-induced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide oxidation，mitochondrial permeability transition，and apoptosis[J]. Arch Biochem Biophys，2003，410(2)：201－211.

[4] Zydocvo M M，Swierczynski J，Nagel G，*et al*. The respiration and calcium content of heart mitochondria from rats with vitamin D-induced cardionecrosis[J]. Biochem J，1985，226(1)：155－161.

[5] Halestrap A P，Kerr P M，Javadov S，*et al*. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart[J]. Biochim Biophys Acta，1998，1366(1－2)：79-94.

[6] 夏腊梅，伍杰雄. 川芎嗪对大鼠心肌线粒体损伤的保护作用[J]. 中国药房，2002，13(7)：400－401.

[7] Elizabeth A F，James D M，Takuro T，*et al*. Myocardial mitochondrial calcium accumulation and DNA fragmentation[J]. Ann Thorac Surg，1995，60(2)：338－344.

[8] Kim J S，Qian T，Lemasters J J. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes[J]. Gastroenterology，2003，124(2)：494－503.

[9] Halestrap A P. The mitochondrial permeability transition：its molecular mechanism and role in reperfusion injury[J]. Biochem Soc Symp，1999，66：181－203.

[10] Xue L Z，Borutaite V，Tolkovsky A M. Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues[J]. Biochem Pharmacol，2002，64(3)：441－449.

[11] Sener G，Sehirli A O，Satiroglu H，*et al*. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury[J]. Burns，2002，28(5)：419－425.

[12] Woodfield K，Ruck A，Brdiczka D，*et al*. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition[J]. Biochem J，1998，336(Pt 2)：287－290.

[13] Kim T O，Jeong D W，Yun B Y，*et al*. Dysfunction of rat liver mitochondria by selenite：induction of mitochondrial permeability transition through thiol-oxidation[J]. Biochem Biophys Res Commun，2002，294(5)：1130－1137.

[14] Lemasters J J，Qian T，Bradham C A，*et al*. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death[J]. J Bioenerg Biomembr，1999，31(4)：305－319.

（编辑 刘洪娥）

（上接1605页）

术前护理：①做好术前准备，询问过敏史，剪除术眼睫毛。防止受凉，以免术中、术后咳嗽引起出血，影响伤口愈合。嘱患儿卧床休息，头部少活动，不挤眼、揉眼。②做好术前宣教，对患儿及家长说明手术目的，介绍同类病人术后康复情况、安装义眼后的效果等，全麻者术前交代需禁食禁水的目的及意义。检查和护理时动作轻柔，尽量做到无痛注射。

术后护理：①术毕密切观察生命体征变化，注意眼部及全身情况，敷料有无渗血及脱落，加强生活护理和基础护理，注意头面部清洁。如出现严重的眼痛、头痛、恶心、呕吐，应及时报告医师。按医嘱合理使用抗生素控制及预防感染。②做好出院指导，出院后仍应注意眼部卫生，教会家长如何继续滴抗生素眼药水。术后1～2周可考虑安装义眼，安装义眼时间不宜太迟，以防结膜囊挛缩，嘱家长出院后定期复查，教会其安装、清洗义眼。

3 讨论

肿瘤和外伤是导致小儿眼球摘除的主要因素，通过预防和早期正确的诊断治疗可以减少和避免眼球摘除。儿童眼球摘除术前完整的护理为手术创造有利的条件，术后护理得当可预防并发症的发生，使伤口如期愈合。我们对患儿进行全程护理，使其不仅在住院期间，而且在今后的生活中也具有一定的自我保健能力，在最大限度上改善患儿的生活质量。

关键词：儿童眼球摘除；病因；护理
中图法分类号：R473.77 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李素芬，刘建宗，郭秀瑾，等. 儿童眼球摘除临床分析：附118例报告[J]. 河北医科大学学报，1997，18(1)：21－22.

（编辑 薛国文）

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