DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.008
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0135-03

论著

Ca^{2+} 在严重烧伤早期心肌线粒体呼吸功能损害中的作用及其机制研究

梁晚益[1],唐立新[2],杨宗城[1],黄跃生[1] ([1]第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038;[2]深圳三九医院烧伤整形科,深圳 518000)

提 要:目的 探讨 Ca^{2+} 在严重烧伤早期心肌线粒体呼吸功能损害中的作用及其机制。方法 复制30% TBSA Ⅲ度烧伤大鼠模型,取正常及伤后1、3、6、12、24 h大鼠心肌分离线粒体,测其 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}] m)、线粒体 PLA_2(mtPLA_2)、一氧化氮合酶(mtNOS)、F_0F_1-ATPase和细胞色素c氧化酶活性,同时观察心肌线粒体呼吸功能变化。结果 ①伤后1 h[Ca^{2+}] m与线粒体呼吸控制率(RCR)均明显升高,且RCR与[Ca^{2+}] m呈显著正相关;伤后3、6、12、24 h心肌[Ca^{2+}] m、mtPLA_2及mtNOS活性均显著高于正常组,但线粒体呼吸功能反而下降,RCR与[Ca^{2+}] m呈明显负相关,mtNOS、mtPLA_2活性与[Ca^{2+}] m呈明显正相关。②伤后1 h线粒体 F_0F_1-ATPase合成活性明显升高,但3、6、12、24 h其合成活性与细胞色素c氧化酶活性均显著低于正常组;F_0F_1-ATPase水解活性除伤后3 h显著升高外,其余各时相点均明显低于正常对照组。结论 [Ca^{2+}] m改变是烧伤后心肌线粒体呼吸功能变化的重要原因,烧伤初始[Ca^{2+}] m适度升高,促进线粒体呼吸功能加强;烧伤后续阶段 Ca^{2+} 严重超载激活 mtPLA_2、mtNOS在线粒体呼吸功能损害中起重要作用。

关键词:烧伤;线粒体;钙;心肌
中图法分类号:R322.11;R345.82;R644.02 文献标识码:A

Role of Ca^{2+} in the damage of myocardial mitochondrial respiratory function in the early stage after severe burns

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

Abstract **Objective** To explore the role of Ca^{2+} in the damage of myocardial mitochondrial respiratory function in the early stage after severe burns. **Methods** An experimental model of 30% TBSA full-thickness skin scalding was established in rats. Myocardial mitochondria were isolated from control rats and burned rats at the 1, 3, 6, 12 and 24 h postburn. Changes of mitochondrial respiratory function were observed. Contents of mitochondrial calcium([Ca^{2+}] m), activities of mtPLA_2, mtNOS, F_0F_1-ATPase, and cytochrome coxidase were determined. **Results** ① At 1 h postburn, [Ca^{2+}] m and mitochondrial respiratory control rate (RCR) were both elevated significantly, and RCR was postively correlated with [Ca^{2+}] m. At 3, 6, 12, and 24 h postburn, [Ca^{2+}] m and the activities of mtNOS and mtPLA_2 were significantly higher than those of the controls, but the mitochondrial respiratory function of burned rats decreased, and RCR was negatively correlated with [Ca^{2+}] m, while mtNOS and mtPLA_2 activities were both positively correlated with [Ca^{2+}] m. ②The F_0F_1-ATPase synthetic activity increased at the 1st hour postburn, but it and the cytochrome coxidase activity both decreased at 3, 6, 12 and 24 h postburn. Except for elevation at 3 h postburn, the F_0F_1-ATPase hydrolytic activity decreased at all other time points. **Conclusions** The changes of [Ca^{2+}] m were involved in the damage or regulation of mitochondrial respiratory function after severe burns. Appropriate increase of [Ca^{2+}] m reinforced the mitochondrial respiration fumctionin the beginning statge after severe burns, but activation of mtPLA_2 and mtNOS by severe overloading of Ca^{2+} might play an important role in the damages of myocardial mitochondria respiratory function in the following stage after severe burns.

Key words burns; mitochondria; Ca^{2+}; myocardium

我所既往研究发现,线粒体呼吸功能下降导致能量不足是严重烧伤早期心功能障碍的重要原因[1]。但长期以来,有关烧伤后线粒体损伤的具体环节和机制一直不甚清楚。我们在新近的研究中发现严重烧伤后心肌线粒体存在明显的 Ca^{2+} 超载[2]。Ca^{2+} 是普遍存在的细胞内第二信使,参与细胞生命活动的调节;但病理条件下,钙稳态紊乱又是许多原因所致细胞损伤的重要原因。线粒体具有 Ca^{2+} 依赖性激活的一氧化氮合酶和 PLA_2,Ca^{2+} 超载可能导致其激活。本研究拟探讨 Ca^{2+} 在严重烧伤早期心肌线粒体损害中的作用及其机制。

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),体重(220±20)g,领回后喂养4~5 d以适应环境,采用简单随机法分为正常对照组(n=8)和烧伤组(n=40)。动物用2%戊巴比妥钠麻醉(30 mg/kg)后,背部脱毛,烧伤组置脱毛区92 ℃水浴18 s,造成30% TBSA Ⅲ度烫(烧)伤(病理切片证实),分别于烧伤

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054202)
作者简介:梁晚益(1967-),男,湖南省涟源市人,博士,主治医师,讲师,主要从事烧创伤脏器损害机制方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754148-8019
收稿日期:2001-04-20;修回日期:2001-10-15

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

后 30 min、9 h 经腹腔注射乳酸林格氏液，每次每 1% 烧伤面积 2 ml/kg。正常对照组置脱毛区 25 ℃水浴 18 s 假烫伤、不补液 1 h 活杀取心，烧伤组动物分别于伤后 1、3、6、12、24 h 活杀取心。

1.2 线粒体分离及指标检测

1.2.1 线粒体分离 采用蔗糖梯度离心法。分离介质：0.25 mol/L蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4（去离子水配制）。4 ℃条件下分离心肌线粒体，1 h 内完成。

1.2.2 线粒体呼吸功能测定 以苹果酸钠和谷氨酸钠为底物，用 BOM_3 型耗氧测量仪（北京 304 医院研制）测定心肌线粒体呼吸功能并计算呼吸控制率（RCR）和 ST_3、ST_4 氧耗速率（单位：nanoatom $O \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$）。

1.2.3 线粒体 Ca^{2+} 浓度（[Ca^{2+}] m）测定 线粒体悬浮于 1% HCl 中，150 W×10 s 超声 3 次后，30 000× g 离心 60 min，取上清，邻甲酚酞络合酮显色，575 nm 波长比色。

1.2.4 mtNOS 及 $mtPLA_2$ 活性测定 将分离后的线粒体一部分悬浮于 mtNOS 提取介质（1 mol/L KCl、10% 甘油、10 mmol/L Hepes、100 μg/ml PMSF、100 μg/ml 亮肽素、10 μg/ml 胰蛋白酶抑制剂、2 μg/ml 抑肽酶，pH 7.5，去离子水配制）中，－70 ℃反复冻融 3 次，然后 150 W×10 s×2 次超声破碎（4 ℃），再于 4 ℃条件下振摇 30 min，最后 30 000× g 4 ℃离心 60 min，取上清，用 NOS 检测试剂盒测定。另取线粒体悬浮于 $mtPLA_2$ 提取介质（仅含 1 mol/L KCl）中，同法冻融、超声、孵育、振摇，最后 30 000× g 离心 60 min，取上清，用合成底物 2-硫代十六酰乙基磷酸胆碱测定 $mtPLA_2$ 活性[3]。

1.2.5 细胞色素 c 氧化酶及 F_0F_1-ATPase 活性测定 线粒体分离后用介质：4% 体积比 Triton X-100、0.25 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl（pH 7.4）悬浮，－70 ℃冻融 3 次，细胞色素 c 氧化酶活性参照 Zaidan 等[4] 的方法比色测定。F_0F_1-ATPase 活性按 Yamada 等[5] 的方法进行。

1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用华西医科大学 Pems 医用统计软件对实验数据进行统计学处理，依不同情况行方差分析和 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 Ca^{2+} 浓度及呼吸功能变化

[Ca^{2+}] m（nmol/mg）于伤后 1 h（13.1±2.5）即有明显升高（$P<0.05$），3、6 h 升高更加显著（22.0±1.9，24.1±3.1，$P<0.01$），分别是对照组的 2.1 倍和 2.3 倍，12、24 h [Ca^{2+}] m 有降低趋势（13.7±1.8，$P<0.01$；13.4±2.0，$P<0.05$），但仍明显高于对照组（10.4±1.6）。烧伤后 1 h 大鼠心肌线粒体呼吸功能增强，RCR 明显升高，且与[Ca^{2+}] m 呈显著正相关（$r=0.8415$，$P<0.01$）。但伤后 3、6、12、24 h RCR 均明显低于正常对照组，且 RCR 与[Ca^{2+}] m 呈显著负相关，相关系数分别为 －0.7842、－0.9057、－0.7491（$P<0.01$），－0.6883（$P<0.05$）。ST_3 变化与 RCR 平行；ST_4 仅于伤后 6 h 有明显升高，其余各时相点与对照组相比无明显差异，见表 1。

2.2 烧伤后 mtNOS 及 $mtPLA_2$ 活性变化

烧伤后 3、6、12、24 h mtNOS 及 $mtPLA_2$ 活性均明显高于对照组，且伤后 mtNOS、$mtPLA_2$ 活性均与[Ca^{2+}] m 呈明显正相关，相关系数分别为 0.8945（$P<0.05$），0.9271（$P<0.01$），见表 2。

2.3 线粒体细胞色素 c 氧化酶及 F_0F_1-ATPase 活性的变化

线粒体细胞色素 c 氧化酶活性从伤后 3 h 开始明显低于对照组，3、6、12、24 h 分别下降 42.5%、36.2%、32.3% 和 18.9%。烧伤后 1 h 线粒体 F_0F_1-ATPase 合成活性明显升高，但 3、6、12、24 h 显著降低，分别为对照组的 51.4%、44.9%、77.6% 和 87.4%。F_0F_1-ATPase 水解活性于伤后 1 h 明显降低，但 3 h 显著高于对照组，6、12、24 h 下降，明显低于正常对照组，见表 3。

表 1 烧伤后心肌线粒体呼吸功能变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1 Changes of myocardial mitochondrial respiratory function after burns（$\bar{x} \pm s$）

	Control (n=8)	Time after burn(h) 1 (n=8)	3 (n=8)	6 (n=8)	12 (n=8)	24 (n=8)
RCR	4.34±0.27	5.15±0.43 ##	2.84±0.28 ##	2.04±0.35 ##	2.62±0.31 ##▲	3.41±0.25 ##▲*
ST_3	132.9±27.6	166.7±35.7 ##	98.0±11.8 #	91.1±15.7 ##	93.9±18.2 ##	105.1±14.4 #
ST_4	30.6±8.9	32.4±5.1	34.5±5.3	44.7±7.9 ##	35.8±5.5	30.6±6.5

#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* control；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* 6 h；ST_3 and ST_4 were expressed as nanoatom $O \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$

表 2 烧伤后心肌线粒体 $mtPLA_2$ 与 mtNOS 活性变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2 Changes of myocardial $mtPLA_2$ and mtNOS activities after burns（$\bar{x} \pm s$）

	Control (n=8)	Time after burn(h) 1 (n=8)	3 (n=8)	6 (n=8)	12 (n=8)	24 (n=8)
$mtPLA_2$ ($U \cdot g^{-1}$)	17.2±4.1	18.5±4.5	70.7±9.0 ##	77.4±7.3 ##	30.9±5.0 ##	25.4±5.9 #
mtNOS ($U \cdot mg^{-1}$)	0.99±0.18	0.95±0.21	1.65±0.26 ##	1.77±0.36 ##	1.43±0.31 #	1.30±0.17 #

#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* control

表 3 烧伤后心肌线粒体 F_0F_1-ATPase 及细胞色素 c 氧化酶活性变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 3 Changes of myocardial mitochondrial F_0F_1-ATPase and cytochrome coxidase activity in rats after burns（$\bar{x} \pm s$）

	Control (n=8)	Time after burn(h) 1 (n=8)	3 (n=8)	6 (n=8)	12 (n=8)	24 (n=8)
ATPase act ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$)	3.26±0.44	2.52±0.50 ##	4.28±0.46 ##	2.08±0.41 ##	2.72±0.30 #	2.80±0.35 #
ATPsynthase act ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$)	676±83	790±56 ##	348±43 ##	304±50 ##	525±42 ##	591±77 ##
Cytochrome coxidase act ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$)	1.27±0.19	1.16±0.20	0.73±0.10 ##	0.81±0.19 ##	0.86±0.23 ##	1.03±0.18 #

#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* control

3 讨论

严重烧伤后常并发心功能障碍。尽管其机制尚未能彻底揭示，但目前研究表明严重烧伤后心肌能量代谢异常在其中起重要作用[6]。线粒体氧化磷酸化是心肌细胞的主要能量来源。线粒体作为至关重要的细胞器，不仅合成 ATP，而且参与细胞 Ca^{2+} 维持和信号转导。烧伤后线粒体损害可能是心肌能量代谢异常的主

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

要原因。但既往有关烧伤后线粒体损伤机制的研究大多局限于自由基和脂质过氧化。本实验结果表明: 烧伤后 1 h 心肌[Ca^{2+}] m 即有明显升高, 同时线粒体呼吸功能加强, RCR 与[Ca^{2+}] m 呈显著正相关; 伤后 3、6、12、24 h 心肌[Ca^{2+}] m 升高更加明显, 但线粒体呼吸功能反而下降, RCR 与[Ca^{2+}] m 均呈显著负相关。这说明[Ca^{2+}] m 的变化与烧伤初始线粒体呼吸加强和后续阶段呼吸功能损害都有密切的关系。

生理条件下, Ca^{2+} 作为细胞内第二信使, 参与细胞能量代谢的调节; 但病理条件下, 线粒体 Ca^{2+} 超载将导致细胞和线粒体的严重损害。烧伤后 1 h [Ca^{2+}] m 适度升高, 可激活线粒体内的某些脱氢酶, 使线粒体呼吸加强[7]。烧伤后续阶段线粒体继续积聚 Ca^{2+} 并导致 Ca^{2+} 超载, 这是伤后线粒体损害的重要原因。Ca^{2+} 超载激活 mtPLA$_2$, 降解线粒体膜磷脂, 使膜磷脂构成发生改变[8]。而细胞色素 c 氧化酶与 F_0F_1-ATPase 活性的充分发挥依赖于一定的脂质环境, 线粒体膜磷脂构成改变势必导致细胞色素 c 氧化酶与 F_0F_1-ATPase 活性降低。本研究还表明烧伤后 mtNOS 活性与[Ca^{2+}] m 呈明显正相关, 说明烧伤后 [Ca^{2+}] m 升高导致了 mtNOS 激活。mtNOS 使线粒体 NO 生成增多, 一方面可逆性抑制细胞色素 c 氧化酶的活性, 并使呼吸复合体Ⅰ ~ Ⅲ之间氧自由基生成增加; 另一方面氧自由基与 NO 反应形成氮过氧化阴离子, 它与氧自由基均可导致线粒体呼吸复合体的不可逆损害[9, 10]。

烧伤后线粒体呼吸功能损害主要由氧化磷酸化的某些关键酶活性下降引起。Ca^{2+} 除激活 mtNOS 与 mtPLA$_2$, 间接损害线粒体呼吸酶之外, 还可通过钙结合 ATP 酶抑制蛋白(Calcium-binding ATPase inhibitor protein, CaBI)调控 F_0F_1-ATPase 活性, 或抑制 ATP 的合成, 或促进 ATP 的水解。本实验结果中, 伤后 1 h F_0F_1-ATPase合成活性升高, 同时水解活性降低, 但伤后 3 h 两者正好相反, 这是 Ca^{2+} 通过钙结合 ATPase 抑制蛋白调控 F_0F_1-ATPase 活性的结果[5]。烧伤 6 h 后由于线粒体结构严重损害, F_0F_1-ATPase 合成与水解活性、细胞色素 c 氧化酶活性均明显下降。

综上所述, 烧伤初始[Ca^{2+}] m 适量升高, 促进心肌线粒体呼吸加强, 但后续阶段 Ca^{2+} 超载激活 mtNOS 与 mtPLA$_2$ 等损害性酶类, 并直接或间接影响呼吸酶的活性, 导致线粒体呼吸功能损害。

参考文献:

[1] Huang Y S, Yang Z C, Yan B G. Pathogenesis of early cardiac myocyte damage after severe burns[J]. J Trauma, 1999, 46(3): 428—432.

[2] 梁晚益, 杨宗城, 黄跃生. 大鼠严重烧伤早期心肌线粒体 Ca^{2+} 转运变化及其机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 23(1): 45—47.

[3] 梁晚益, 杨宗城, 黄跃生. mtPLA$_2$ 在严重烧伤早期心肌线粒体损害中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 23(3): 210—212.

[4] Zaidan E, Sims N R. Reduced activity of the pyruvate dehydrogenase complex but not cytochrome oxidase is associated with neuronal loss in the striatum following short-term forebrain ischemia[J]. Brain Res, 1997, 772(1—2): 23—28.

[5] Yamada E W, Huzel N J. Calcium-binding ATPase inhibitor protein of bovine heart mitochondria. Role in ATP synthesis and effect of Ca^{2+} [J]. Biochemistry, 1989, 28(25): 9 714—9 718.

[6] Horton J W, Garcia N M, White D J, *et al*. Postburn cardiac contractile function and biochemical markers of postburn cardiac injury[J]. J Am Coll Surg, 1995, 181(4): 289—298.

[7] Robb Gaspers L D, Rutter G A, Burnett P, *et al*. Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1 366(1—2): 17—32.

[8] Levrat C, Louisot P. Increase of mitochondrial PLA$_2$-released fatty acidsis an early event in tumor necrosis factor alpha-treated WEHI-164 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(3): 531-538.

[9] Liang W Y, Yang Z C, Huang Y S. Effects of nitric oxide on mitochondrial damage caused by exogenous calcium[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2000, 16(12): 1 292—1 294.

[10] Brookes P S, Bolanos J P, Heales S J. The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesisis correct[J]. FEBS Lett, 1999, 446(2—3): 261—263.

(编辑　薛国文)

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于 1984 年 2 月 27 月公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。法定计量单位是一个国家以法令的形式发布的, 全国必须统一采用的计量单位。

我国的法定计量单位包括: ①国际单位制的基本单位; ②国际单位制的辅助单位; ③国际单位制中具有专门名称的导出单位; ④国家选定的非国际单位制单位; ⑤由以上单位构成的组合形式单位; ⑥由词头和以上单位所构成的十进倍数和分数单位。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用汉字外, 均应使用符号。单位符号都是正体, 无复数形式, 符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位, 例如: Pa、Gy、W 等和 10^6 以上的词头, 例如: M、G、T 等的首字母大写以外均为小写, "升"的符号可用大写(L)也可用小写(l), 一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如: 化学元素符号)之间应留半个阿伯数字空隙, 词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用, 也不能重叠使用(例如: "mμm" 应为"nm")。

(本刊编辑部)

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