DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.013
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0271-03

论著

烧伤大鼠血清对肠上皮细胞膜磷脂代谢及膜流动性的影响

陈 军,夏培元,常 山,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察烧伤大鼠血清对肠上皮细胞膜损害的影响。方法 制作烧伤大鼠模型,采集血清;肠上皮细胞株IEC-6经烧伤大鼠血清刺激后,细胞膜磷脂分析采用高效毛细管电泳法;膜流动性测定用荧光偏振法;并对膜丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性进行测定。结果 IEC-6经烧伤血清作用后,早期即出现细胞膜流动性下降;膜磷脂含量降低,组分改变;SOD活性持续降低;但MDA含量增加。结论 烧伤后血清中的有害物质可致肠上皮细胞膜磷脂降解、脂质过氧化增强,导致膜流动性降低,并可能是肠上皮细胞膜结构和功能损害的重要机制。

关键词:烧伤;肠上皮细胞;细胞膜流动性;膜磷脂
中图法分类号:R322.45;R329.24;R644 文献标识码:A

Effects of burned rat serum on the membranous phospholipid contents and membrane fluidity of intestinal epithelial cells

CHEN Jun, XIA Pei-yuan, CHANG Shan, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of burned rat serum on the intestinal epithelial cellular membrane damage. Methods The intestinal epithelial cell IEC-6 were stimulated with the serum collected from the 30% TBSA III degree model rats. The changes of the membranous phospholipid contents were analyzed by the high performance capillary electrophoresis. The fluidity of the cell membrane was dynamically measured with fluorescence polarization technique. The content of MDA and the level of SOD in the cell membrane were tested respectively by the biochemical kit. Results Membramous fluidity and the phospholipid contents decreased obviously in the early stage in IEC-6 stimulated by the serum of burned rat. Meantime, the level of SOD in the membrane decreased but the content of MDA significantly increased. Conclusion The lipid peroxidation and the degradation of the membranous phospholipid induced by the serum of burned rat might be one of the factors of the decrease of membrane fluidity, and this may be an important mechanism of the damage of membrane structure and function in IEC-6.

Key words: burn; intestinal epithelial cell; membrane fluidity; phospholipid

生物膜是维持细胞整体和功能完整性的物质基础,大量的研究表明,一旦生物膜损伤,势必导致细胞结构和功能的改变,生物膜的损伤已被认为是细胞损伤的早期特征和标志[1]。严重烧伤后早期肠粘膜上皮屏障功能即发生损害。本研究以烧伤血清刺激体外培养大鼠肠上皮细胞(Intestinal epithelial cell, IEC),动态观察了烧伤血清对肠上皮细胞膜流动性、磷脂成分和膜脂质过氧化的影响,以探讨烧伤后肠上皮细胞膜损伤在肠上皮损害中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 肠上皮细胞的培养

IEC-6细胞于实验前引自于中国科学院上海细胞研究所,呈贴壁生长。细胞常规培养于含10%小牛血清和双抗(青、链霉素)的DMEM培养液中,37 ℃,5% CO_2、95%湿度培养。1~2 d更换培养液,90%融合时用0.1%胰酶-EDTA消化传代。

1.2 烧伤大鼠血清的获得

Wistar大鼠(180±220)g,麻醉后背部剃毛,用(92±1)℃沸水烫伤18 s造成30%TBSA III度烫伤,6 h后无菌取血,离心获得血清,56 ℃、1 h灭活补体,用DMEM培养液配成20%的烫伤血清备用。

1.3 实验分组

细胞生长至单层融合后弃上清,加入含20%烫伤大鼠血清的DMEM培养液,分为对照组(20%小牛血清)和1、3、6 h 4组,每组3瓶细胞。

1.4 IEC中细胞膜流动性的测定

方法参见文献[2]。待测细胞按常规用胰酶消化成单细胞悬液,离心1 000 r/min × 10 min收集细胞,PBS(pH 7.0)洗涤1次;加入1.5 ml(2×10^{-6} mol/L) DPH溶液(Sigma公司),25 ℃标记1 h,PBS洗涤1次,悬浮于3 ml PBS溶液中。荧光分光光度计测定起偏器和检偏器光轴不同方向的荧光强度,激发光谱峰值(λex)为362 nm,发射光谱峰值(λem)为432 nm,狭缝10 nm。计算荧光偏振值(P)、膜脂微粘度(η)和分子排列有序性系数(γ)。P值越大,膜流动性越小;P值越小,膜流动性越大。

1.5 IEC-6细胞膜磷脂成分的的提取及测定

按文献[3,4]方法进行。IEC-6经胰酶消化单细胞,无血清培养液培养4 h,离心收集细胞,加入0.5 ml 80%的甲醇溶液悬浮肠上皮细胞,等体积膜脂提取液(甲醇:氯仿=1:2)萃取3次,离心后合并有机相,用99.99%氮气吹干后,将样品储存在-20 ℃冰箱中备用。采用高效毛细管电泳法(High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE)(PACE 5010全自动毛细管电泳仪及Gold软件控制仪器的操作和数据采集系统,均为美国

基金项目:军队"九五"指令性课题(96L042)
作者简介:陈 军(1970-),男,广东省电白县人,博士,主治医师,主要从事烧伤感染及其防治的研究,发表论文16篇,电话:(023)68754000-73081
收稿日期:2001-06-22;修回日期:2001-10-16

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

Beckman 公司产品)。取 100 μl 样本稀释液[5% 胆酸钠(116 mmol/L)溶于 50% 正丁醇中]重溶已抽提的磷脂,然后进行毛细管电泳分析。电泳条件:熔融石英毛细管为 470 mm×0.075 mm i.d(中国河北永年光纤厂产品)、分离缓冲液为 75 mmol/L 胆酸钠、10 mmol/L Na_2HPO_4、6 mmol/L 四硼酸钠、30% 正丁醇(pH 8.5)、分离电压 18 kV、检测波长为 200 nm,毛细管温度为 45 ℃。用不同磷脂的标准浓度进行同步检测,绘制标准曲线。每次进样前,先用 1.0 mol/L NaOH 冲洗 4 min,后用分离缓冲液冲洗 10 min。

1.6 膜丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

参照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行。单位分别用 nmol/mg 和 nU/mg 表示。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用华西医科大学 PEMS 医用统计软件包作 t 检验。

2 结果

2.1 烧伤血清对肠上皮细胞膜流动性的影响

烧伤血清作用细胞后 1 h 膜荧光偏振度即开始升高,膜流动性下降,膜脂微粘度和分子排列有序性系数增加,随时间延长变化加剧,6 h 达最高值,见表 1。

表 1 烧伤血清对 IEC 细胞膜荧光偏振度、膜脂微粘度和分子排列有序性系数的影响($n=10$)

Tab 1 Effects of burned rat serum on ρ、η and γ($n=10$)

	Control	Time (t/h)		
		1	3	6
P	0.135±0.045	0.152±0.048	0.206±0.053 *	0.246±0.042 **
η	0.911±0.186	0.963±0.124	1.671±0.138 *	2.329±0.189 **
γ	0.098±0.013	0.110±0.014	0.145±0.019 *	0.186±0.024 **

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

2.2 烧伤血清对肠上皮细胞膜磷脂成分的影响

烧伤血清作用细胞后 1 h 膜磷脂含量即开始减少,其中磷脂酰肌醇 PI、磷脂酰胆碱 PC 减少明显,且随作用时间的延长持续降低,而磷脂酰鞘磷脂 SM、磷脂酰乙醇胺 PE 及磷脂酰丝氨酸 PS 的变化不明显,见表 2。

表 2 烧伤血清对 IEC 细胞膜磷脂成份的影响($n=5$, μg/ml)

Tab 2 Effects of burned rat serm on membranous phospholid contents($n=5$ μg/ml)

Time(t/h)	SM	PC	PE	PI	PS
Control	38.4±4.3	52.1±5.4	35.9±5.2	60.3±7.4	57.7±8.1
1	40.2±4.6	48.3±4.6	33.2±4.6	52.1±6.3	59.2±7.7
3	43.6±5.1	41.3±3.9 **	29.6±3.8P	45.4±5.7 **	61.3±6.4
6	37.9±3.9	35.4±3.8 **	30.4±3.1	37.6±5.6 **	55.6±5.9

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

2.3 烧伤血清对膜丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

烧伤血清作用细胞后 1 h 膜丙二醛(MDA)含量即开始增加,至伤后 6 h 达到高峰;而细胞膜超氧化物歧化酶(SOD)活性呈持续性降低,伤后 6 h 达到最低值,见表 3。

表 3 烧伤血清对 IEC 膜丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

Tab 3 Effects of burned rat serum on IEC membranous MDA and SOD

Time(t/h)	MDA(nmol/mg)	SOD(nU/mg)
Control	8.92±1.22	1.43±0.53
1	11.01±1.41 *	1.08±0.44 *
3	14.36±1.98 **	0.67±0.31 **
6	16.23±2.37 **	0.43±0.29 **

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

3 讨论

生物膜是维持细胞整体性(Integrity)与内环境恒定的重要结构,其中膜脂在维持细胞的正常形态和生理功能上具有重要的作用。膜脂除构成细胞生存必须的疏水性屏障外,还使细胞膜具有良好的可变形性和流动性[5]。膜磷脂含量减少及其组成改变可导致膜流动性降低[6]。由于细胞膜的流动性和通透性是细胞的基本生物物理性质,膜流动性的改变可严重影响膜通透、膜上酶的活性、受体功能及能量传递,损害细胞的形态和功能[7]。

本研究发现 IEC-6 经烧伤大鼠血清作用后,细胞迅速出现膜流动性降低,并随作用时间的延长其降低愈趋明显;同时肠上皮细胞膜的磷脂含量表现减少,组成成分发生改变;膜磷脂酰肌醇 PI 和磷脂酰胆碱 PC 的含量呈进行性下降。此前的研究显示机体严重创伤后磷脂酶 A_2(PLA_2)活性可成倍增加[8],而 PLA_2 激活是膜磷脂减少的主要原因[9]。因此我们的研究结果提示,机体烧伤后被激活的 PLA_2 以及机体释放的其它有害物质可通过血液循环,导致肠上皮细胞膜磷脂的代谢异常,降低细胞膜的流动性,进而损伤肠粘膜屏障的正常结构和功能。

此外,本研究还显示烧伤大鼠血清作用 IEC-6 后,细胞膜 MDA 含量增高,SOD 活性降低,表明膜脂质过氧化显著增加。脂质过氧化物可与细胞膜的蛋白形成交联,使膜流动性进一步下降。

综上所述,我们认为烧伤后肠上皮细胞膜脂质过氧化增强和膜磷脂的降解导致的细胞膜流动性降低,是肠上皮细胞膜结构和功能损害的重要原因,并可能是烧伤后肠粘膜屏障功能损害的重要机制之一。

参考文献:

[1] Oghalai J S, Zhao H B, Kutz J W, *et al*. Voltage-and tension-dependent lipid mobility in the outer hair cell plasma membrane[J]. Science, 2000, 287(5453): 658-661.

[2] Stubbs C D, Kinosita K Jr, Munkonge F, *et al*. The dynamics of lipid motion in sarcoplasmic reticulum membranes determined by steady-state and time, resolved fluorescence measurements on 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene and related molecules[J]. Biochim Biophys Acta, 1984, 775(3): 374-380.

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

[3] Lisbeth I, Soren M, Hilmer S. Analysis of individual phospholipids by high-performance capillary electrophoresis[J]. JAOCS, 1994, 71(2): 183—188.
[4] 张抒峰, 常理文. 红细胞膜上各种磷脂中脂肪酸的测定[J]. 分析化学, 1994, 22(2): 346—350.
[5] Koga K, Ohyashiki T, Murakami M, *et al*. Modification of ceftibuten transport by the addition of non—ionic surfactants[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 49(1): 17—25.
[6] Petkova D H, Momchilova Pankova A B, Koumanov K S. Effect of liver plasma membrane fluidity on endogenous phospholipase A2 activity[J]. Biochimie, 1987, 69(11—12): 1 251—1 255.
[7] Ismaili A, Meddings J B, Ratnam S, *et al*. Modulation of host cell membrane fluidity: a novel mechanism for preventing bacterial adhesion[J]. Am J Physiol, 1999, 277(1 Pt 1): G201—208.
[8] Anderson B O, Moore E E, Banerjee A. Phospholipase A2 regulates critical inflammatory mediators of multiple organ failure[J]. J Surg Res, 1994, 56(2): 199—205.
[9] Chien K R, Han A, Sen A, *et al*. Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic canine myocardium. Relationship to a phosphatidylcholine deacylation-reacylation cycle and the depletion of membran phospholipids [J]. Circ Res, 1984, 54(3): 313—322.

（编辑 王 红）

文章编号: 1000-5404(2002)03-0273-01

个案与短篇

下颌阻生智齿拔除中牙挺位置的改进

Modification for position of elevator in extracting mandibular impacted wisdom tooth

杨 军, 李慧增, 张从纪, 初颜兵, 胡 敏 （第三军医大学附属西南医院口腔科, 重庆 400038）

下颌阻生智齿的拔除是一项复杂的手术, 牙挺在完成拔牙术中起着重要的作用。1998 年 5 月以来, 我们对下颌阻生智齿拔除中牙挺支点位置作了改进, 与牙挺支点位置传统方法[1] 比较, 缩短了拔牙时间, 拔牙效果满意, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

年龄 19～35 岁, 需要拔除下颌阻生智齿且阻生类型相似(如近中倾斜阻生、颊向阻生)的门诊健康患者 200 例, 以抽签法随机分成 A、B 两组, 每组各 100 例。A 组为治疗改进组, 采用牙挺支点位置改进方法拔除下颌阻生智齿。B 组为对照组, 采用牙挺支点位置传统方法拔除下颌阻生智齿。

1.2 方法

B 组采用的传统方法是局部麻醉后, 在拔牙中牙挺放在阻生齿近中颈部和近中牙槽嵴之间, 以近中牙槽嵴为支点。A 组采用的改进方法是局部麻醉后的拔牙中牙挺放在下颌阻生齿颊侧牙槽骨与阻生齿之间, 以颊侧牙槽骨顶为支点, 使牙沿舌侧、远中向脱位而拔除之。A、B 两组拔牙后拔牙创均放置甲硝唑和明胶海绵[2], 常规给予抗菌素。

1.3 评估标准

拔牙所需时间; 拔牙后并发症的发生。

2 结果

A 组患者平均拔牙时间(10±1.5) min, B 组患者平均拔牙时间(16±2) min, 两组经 t 检验有显著性差异($P<0.05$)。A 组出现 1 例拔牙术后拔牙创感染并发症(1%), B 组术后出现 2 例拔牙创感染并发症(2%), 经 χ^2 检验两组间无显著差异($P>0.05$)。

收稿日期: 2001-09-10; 修回日期: 2002-01-22

3 讨论

下颌阻生智齿类型不同, 采用拔除方法也不同[3]。拔牙中牙挺常是以近中牙槽嵴顶为支点[1]。但是常常近中牙槽嵴骨壁吸收或缺失, 造成牙挺无支点或将支点放在下颌第二磨牙上, 撬动时可造成第二磨牙损伤或断根。下颌骨第三磨牙区的解剖特点[3] 是: ①下颌骨外斜线使颊侧骨壁增厚, 舌侧骨壁薄弱; ②远中有坚厚的下颌支。以近中牙槽嵴作为牙挺支点, 我们认为不足点有: ①对近中倾斜阻生、颊向阻生的阻生智齿, 近中牙槽嵴支点不明显, 牙挺放置时常有悬空导致牙挺放置过深而出现断根; ②远中下颌支坚厚, 阻力大, 导致困难拔牙。以上均可增加拔牙时间。以颊侧牙槽嵴骨壁作为牙挺支点, 其合理点为: ①下颌第三磨牙的颊侧牙槽嵴由下颌骨外斜嵴所组成, 骨板厚且形成一个阶台, 利用其作为支点非常有利; ②这个支点可以将牙齿向舌侧、上方及远中挺动。本研究表明采用改进方法较传统方法拔除下颌阻生智齿的时间缩短, 且拔牙效果满意。由此可见, 下颌阻生智齿拔除中以下颌骨颊侧牙槽嵴作为牙挺支点的改进, 节省了临床操作时间, 减轻了病人对手术的恐惧感, 值得推广。

关键词: 阻生齿; 拔牙术; 牙挺
中图法分类号: R782.11 文献标识码: B

参考文献:

[1] 张锡泽, 邱蔚六, 主编. 口腔颌面外科学[M]. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 1987. 107—110.
[2] 杨 军, 李慧增, 倪学珍, 等. 局部用甲硝唑和明胶海绵预防下颌阻生智齿拔除后干燥症[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(2): 163.
[3] 邱蔚六, 主编. 口腔颌面外科学[M]. 第 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 1997. 84—94.

（编辑 薛国文）

作者简介: 杨 军(1962—), 男, 江苏省淮安市人, 硕士, 副主任医师, 副教授, 主要从事口腔颌面外科及老年口腔方面的研究, 发表论文 12 篇。
电话: (023)68754406

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