DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.013
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
780 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0780-03

大鼠严重烧伤早期心肌线粒体 F_0F_1-ATPase 活性变化及其对能量代谢的影响

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 探讨严重烧伤早期心肌线粒体 F_0F_1-ATPase 活性变化及其对能量代谢的影响。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,测定 F_0F_1-ATPase 活性、线粒体膜电位及 ATP、ADP、AMP 含量。结果 ①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;②大鼠烧伤后1 h心肌线粒体 ATP 含量及膜电位均无明显变化,但3、6、12、24 h线粒体 ATP 含量及膜电位均显著降低,同时 ADP 含量升高。结论 烧伤后1 h线粒体 F_0F_1-ATPase 合成活性明显升高,加速 ATP 合成以满足细胞对能量的需求;伤后3 h F_0F_1-ATPase 水解活性明显升高,水解 ATP 以维持线粒体膜电位;6 h F_0F_1-ATPase 功能紊乱,合成与水解活性均显著降低,失去其对能量代谢的调节作用。12、24 h F_0F_1-ATPase 合成与水解活性均有所恢复,线粒体 ATP 含量及膜电位也呈恢复趋势。

关键词:烧伤;线粒体;F_0F_1-ATPase;能量代谢
中图法分类号:R322.11;R329.25;R644 文献标识码:A

Changes of myocardial mitochondrial F_0F_1-ATPase activity and its effects on energy metabolism in early stage of severe burns

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

Abstract: Objective To explore the changes of myocardial mitochondrial F_0F_1-ATPase activity and its effects on energy metabolism in early stage of severe burns. Methods Myocardial mitochondria were isolated from normal control and burned rats(30%TBSA Ⅲ) at the 1st, 3rd, 6th, 12th and 24th hour postburn. The mitochondrial F_0F_1-ATPase activity, transmembrane potential and content of ATP, ADP and AMP were determined. Results ①The F_0F_1-ATPase synthetic activity increased at the 1st hour postburn, and decreased to 51.4%, 44.9%, 77.6% and 87.4% of that of the control at the 3rd, 6th, 12th and 24th hour postburn respectivly. The F_0F_1-ATPase hydrolytic activity decreased at the 1st hour postburn and was higher at the 3rd when compare with the normal control, it decreased again at the 6th, 12th and 24th hour postburn. ②No significant changes were found in the mitochondrial ATP content and transmembrane potential at the 1st hour postburn, however both of them decreased at the 3rd, 6th, 12th and 24th hour postburn, only the ADP content increasedo. Conclusions At the 1st hour postburn, myocardial mitochondrial F_0F_1-ATPase reinforces ATP production with higher synthetic activity, at the 3rd hour, it reinforces ATP hydrolysis with higher hydrolytic activity to maintain the mitochondrial transmembrane potential, at the 6th hour, F_0F_1-ATPase loses its ability in regulation of energy metabolism with lower synthetic and hydrolytic activity, and at 12th, 24th hour postburn, its synthetic and hydrolytic activity, mitochondrial ATP content and transmembrane potential all show a tendency to recover.

Key words: burns; mitochondria; F_0F_1-ATPase; energy metabolism

我们前期研究证实大鼠严重烧伤后脏器实质细胞线粒体呼吸功能损害,心、肝、肾等主要脏器组织能量代谢障碍[1]。但迄今为止,有关烧伤后线粒体损害的具体途径和机制尚不完全清楚。F_0F_1-ATPase 是线粒体氧化磷酸化产能和水解 ATP 的关键酶,在线粒体能量代谢中起重要作用。本实验检测烧伤后 F_0F_1-ATPase 合成及水解活性变化,并分析其与线粒体能量状况的关系,从而探讨严重烧伤早期心肌线粒体功能损害的发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

戊巴比妥钠、细胞色素 C、鱼滕酮、ADP、ATP 、Triton X-100、Hepes、Ap5A[P1, P5-di(adenosine-5′)pentaphosphate] 及 Rhodamine 123购自 Sigma 公司,硫化钠为国产化学纯,余为国产分析纯。

1.2 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,随机分为正常对照组(n=8)和烧伤组(n=40)。动物用2%戊巴比妥钠腹腔注射(30 mg/kg)麻醉后,10%硫化钠背部脱毛。烧伤组大鼠置脱毛区92 ℃水浴18 s,造成30%TBSA Ⅲ度烫(烧)伤(病理切片证实),分别于烧伤后30 min、9 h经腹腔注射乳酸林格氏液,每1%烧伤面积每次2 ml/kg。正常对照组不烧伤,不补液,动物脱毛后1 h活

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目基金资助("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:2000-10-10;修回日期:2000-12-11

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

杀取心, 烧伤组动物分别于伤后 1、3、6、12、24 h 活杀取心。

1.3 检测指标

1.3.1 线粒体分离　参照 Zydowo 等[2] 的方法。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。

1.3.2 F_0F_1-ATPase 合成与水解活力测定　参照 Yamada 等[3]的方法略作改进。合成反应介质含 0.25 mmol/L 蔗糖、8 mmol/L $MgSO_4$、1 mmol/L EDTA、120 μmol/L Ap5A、50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L 细胞色素 C、5 mmol/L 琥珀酸钠、6.25 μmol/L 鱼滕酮、20 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.5); 水解反应介质含 0.25 mmol/L 蔗糖、8 mmol/L $MgSO_4$、1 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)。线粒体与合成反应介质及 3.6 mmol/L ADP 或水解反应介质及 5 mmol/L ATP 孵育后用终止液(含 0.1% Triton X-100、2 mmol/L EDTA 和 0.1 mol/L Tris-醋酸缓冲液, pH 7.75)终止反应。20 000× g, 10 min 4 ℃离心, 取上清, 分别用高压液相色谱法测 ATP 含量或用 Lanzetta 法定磷。F_0F_1-ATPase 合成、水解活性分别用 $nmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$、$\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$表示。

1.3.3 线粒体 ATP、ADP、AMP 含量测定　①线粒体样品处理: 于 100 μl 线粒体悬液中加入 200 μl 冰冷的 1.6 mol/L $HClO_4$, 静置 5 min 破膜, 30 000× g, 离心 10 min, 上清液用 2.5 mol/L K_2CO_3 中和, 调 pH 至 6.5(6.0~7.0), 再次离心, 取上清即为测定样品。以上操作均于 0~4 ℃进行。②高压液相色谱法测定样品 ATP、ADP、AMP 含量, 以 ng/mg 蛋白表示。线粒体蛋白用改良 Lowry 法测定。

1.3.4 线粒体膜电位测定　按文献[4] 的方法进行。反应介质: 150 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L 氯化镁、5 mmol/L 琥珀酸钠、2.5 μmol/L 鱼滕酮、5 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)、1 μmol/L Rhodamine123、20 mmol/L Hepes。取线粒体悬液 100 μl, 加反应介质 1 ml, 室温下反应 5 min, 5 000× g, 5 min 离心, 取上清于 500 nm 处比色测线粒体外 Rhodamine123 浓度($[X]_{out}$)。设定线粒体基质体积 1 μl/mg, 线粒体内 Rhodamine123 浓度 $[X]_{in} = (1 - 1.1 \times [X]_{out}) \times 10\,000$/蛋白浓度。线粒体膜电位按下式计算:

$$线粒体膜电位(MP) = 59 \log \frac{[X]_{in}}{[X]_{out}}$$

1.4 统计学处理

用华西医科大学 Pems 医用统计软件对实验数据进行统计处理, 结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 线粒体 F_0F_1-ATPase 合成与水解活性的变化

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 1。

表 1　烧伤后大鼠心肌线粒体 F_0F_1-ATPase 水解与合成活性变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Changes of myocardial mitochondrial F_0F_1-ATPase activity in rats after burn($\bar{x} \pm s$)

	Control (n=8)	Burned group (n=8)				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
ATPase hydrolytic activity ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$)	3.26±0.44	2.52±0.50 ##	4.28±0.46 ##	2.08±0.41 ##	2.72±0.30 #	2.80±0.35 #
ATP synthase activity ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$)	676±83	790±56 ##	348±43 ##	304±50 ##	525±42 ##	591±77 ##

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

2.2 烧伤后大鼠心肌线粒体能量代谢的变化

大鼠烧伤后 1 h 心肌线粒体 ATP 含量下降不明显, 但 3、6、12、24 h 显著降低, 分别为对照组的 61.5%、52.1%、72.6% 和 76.9%, 同时线粒体 ADP 含量升高; AMP 含量于伤后 6、12 h 明显升高, 见表 2。

表 2　烧伤后大鼠心肌线粒体能量代谢变化(ng/mg $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Changes of myocardial mitochondrial energy metabolism in rats after burn(ng/mg, $\bar{x} \pm s$)

	Control (n=8)	Burned group (n=8)				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
ATP	351±71	325±59	216±54 ##	183±32 ##	255±43 ##	270±47 #
ADP	385±55	417±41	509±88 ##	662±57 ##	574±64 ##	478±76 #
AMP	472±75	520±68	558±80	590±72 ##	575±62 #	550±74

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

2.3 烧伤后大鼠心肌线粒体膜电位变化

大鼠烧伤后 1h 心肌线粒体膜电位无明显变化, 3、6、12、24 h 均明显低于正常对照组, 分别下降 20.3%、24.6%、17.2% 和 11.5%, 见图 1。

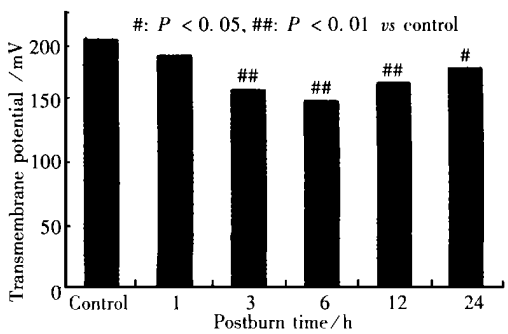


图 1　烧伤后大鼠心肌线粒体膜电位变化

Fig 1　Changes of myocardial mitochondrial membrane potential in rats postburn

3 讨论

烧伤后线粒体功能降低主要由参与氧化磷酸化的呼吸酶活性下降引起[5]。F_0F_1-ATPase 是线粒体进行氧化磷酸化合成和水解 ATP 的关键酶, 在能量代谢中

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

具有至关重要的作用。F_0F_1-ATPase 的合成和水解活性分别代表同一酶促反应向两个可逆方向进行反应的能力大小[6]。利用线粒体电子传递复合体产生的跨膜质子梯度(膜电位)催化质子磷酸化生成 ATP 是其通常的反应方向;但当线粒体缺氧或出现电子漏,使得膜电位下降或呈下降趋势时,F_0F_1-ATPase 水解 ATP 释放质子以维持其膜电位的稳定,表现为水解活性增强[7]。线粒体膜电位是线粒体乃至细胞保持其活力的必要条件。可见,F_0F_1-ATPase 与线粒体能量状况及膜电位关系密切。我们的实验结果表明,大鼠烧伤后 1 h 心肌线粒体 ATP 含量及膜电位均无明显下降,但 3、6、12、24 h 线粒体 ATP 含量及膜电位均显著降低,同时 ADP 含量升高。这一结果与烧伤后 F_0F_1-ATPase 的活性变化相符,也符合烧伤后机体的病理生理变化规律。烧伤后 1 h 组织尚无严重缺血缺氧,线粒体的结构也无明显损害,但由于烧伤刺激机体产生强烈的应激反应,释放大量儿茶酚胺类激素,一方面使心率加快,心肌工作量加大,对能量的需求增加;另一方面,为了满足心肌对能量的需要,线粒体 F_0F_1-ATPase 的合成活性升高,以合成更多的 ATP,维持心肌能量的供需平衡。此时线粒体膜电位尚无明显下降,不需要水解 ATP 维持膜电位。而烧伤后 1 h F_0F_1-ATPase 的水解活力下降,主要是为了尽可能的保存能量,防止能量浪费,这一结果与有关的文献报道一致[8]。伤后 3 h 由于线粒体膜电位下降,F_0F_1-ATPase 的水解活力加强,水解主要由糖酵解产生的能量以尽量维持线粒体膜电位[9]。同时,由于组织开始缺血缺氧,线粒体功能已经受到损害,F_0F_1-ATPase 合成活性下降,使得线粒体 ATP 含量降低。伤后 6 h 由于氧自由基、内毒素等的攻击,以及线粒体内损害性酶类的激活,导致线粒体严重损害[10]。F_0F_1-ATPase 合成与水解活性均明显下降,ATP 含量及膜电位进一步降低。12、24 h 随着血液循环开始改善和应激反应减弱,F_0F_1-ATPase 合成与水解活性均开始逐步恢复,使得线粒体 ATP 含量及膜电位也呈恢复趋势。

烧伤初始机体强烈应激,且无明显缺血缺氧,而对能量需求增加,线粒体通过 F_0F_1-ATPase 催化质子磷酸化生成 ATP,是细胞的产能机构;当烧伤后机体缺血缺氧时,F_0F_1-ATPase 逆向作用加强,催化 ATP 水解以维持线粒体膜电位,线粒体成为细胞的耗能机构。可见,F_0F_1-ATPase 在烧伤后线粒体能量代谢和膜电位维持中起重要作用。但随着缺血时间的延长,F_0F_1-ATPase 功能紊乱,合成与水解活性均下降,失去其对能量代谢的调节作用,可能与线粒体结构损害有关[11]。而当组织缺血缺氧状况改善后,线粒体 F_0F_1-ATPase 功能及能量代谢呈恢复趋势。

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] Zydowo 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.

[3] Yamada E W, Norman J H. 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.

[4] Emaus R K, Grunwald R, Lemasters J J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties[J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 850(3): 436-448.

[5] Sammut I A, Burton K, Balogun E, *et al*. Time-dependent impairment of mitochondrial function after storage and transplantation of rabbit kidneys [J]. Transplantation, 2000, 69(7): 1 265-1 275.

[6] Das A M. Regulation of mitochondrial ATP synthase activity in human myocardium[J]. Clin Sci Colch, 1998, 94(5): 499-504.

[7] Di-Lisa F, Menabo R, Canton M, *et al*. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1 366(1-2): 69-78.

[8] Scholz T D, Robert S B. Mitochondrial F1-ATPase activity of canine myocardium: effects of hypoxia and stimulation[J]. Am J Physiol, 1994, 266(6 pt 2): 2 396-2 403.

[9] Weinberg J M, Venkatachalam M A, Roeser N F, *et al*. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(6): 2 826-2 831.

[10] 梁晚益, 杨宗城, 黄跃生. MtPLA2 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, 22(3): 210-212.

[11] Nakahara I, Haruhiko K, Taki W, *et al*. Changes in major phospholipids of mitochondria during postischemic reperfusion in rat brain[J]. J Neurosurg, 1992, 76(2): 244-250.

(编辑 陈聪连)

(上接 779 页)

显著性差异。提示:IVIG 在治疗 GBS 中,对缩短病程、减缓瘫痪进展、减少并发症等具有积极作用。两组疗效比较,IVIG 治疗组有效率明显高于对照组($\chi^2=54.67$, $P<0.001$),提示 IVIG 在治疗 GBS 中有明显的治疗价值。

在 IVIG 治疗观察中,偶见发热,头痛,恶心,低血压等副反应,经调整输液速度及对症处理,症状很快消失。故 IVIG 在治疗 GBS 时,具有见效快、疗效好、副作用少、安全可靠等优点,值得临床应用。

关键词:静脉免疫球蛋白;格林-巴利综合征

中图法分类号:R745.44 文献标识码:B

参考文献:

[1] 中华神经精神科杂志编委会. 格林-巴利综合征诊断标准[J]. 中华神经精神杂志, 1994, 27(6): 380.

[2] 侯熙德. 格林-巴利综合征的回顾与现状[J]. 临床神经病学杂志, 1994, 7(5): 307-314.

[3] 徐新献, 陈 平, 王兴勇 主编. 儿科急危重症手册[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2001. 349.

(编辑 汪勤俭)

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