DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.022
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0045-03

论著

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

梁晚益,杨宗城,黄跃生 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨严重烧伤早期心肌线粒体 Ca^{2+} 转运变化及其发生机制。方法 复制30% III度烫伤大鼠模型,测定伤后1、3、6、12、24 h大鼠心肌线粒体 Ca^{2+} 转运速率,同时检测影响 Ca^{2+} 转运的相关指标——心肌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}] c)、线粒体膜电位及ATP含量。结果 伤后1 h心肌线粒体 Ca^{2+} 摄取速率明显升高,而 Ca^{2+} 释放速率无明显改变,但3、6、12、24 h心肌线粒体 Ca^{2+} 摄取与释放速率、线粒体膜电位、ATP含量均显著降低,且烧伤后线粒体 Ca^{2+} 摄取速率与膜电位呈明显正相关,Ca^{2+} 释放速率与线粒体ATP含量呈显著正相关。而伤后3、6、12、24 h心肌[Ca^{2+}] c均明显高于正常对照组。结论 ①烧伤初始心肌线粒体 Ca^{2+} 摄取加强,伤后续阶段线粒体 Ca^{2+} 转运紊乱;②线粒体膜电位下降、ATP含量降低是烧伤后续阶段心肌线粒体 Ca^{2+} 转运紊乱的主要原因,伤后[Ca^{2+}] c升高或有升高趋势也参与严重烧伤早期心肌线粒体 Ca^{2+} 转运变化的发生。

关键词:烧伤;线粒体;钙;心肌;膜电位
中图法分类号:R644;R329.25 文献标识码:A

Changes of myocardial mitochondrial Ca^{2+} transport and its mechanism in rats in the early stage after severe burns

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

Abstract: Objctive To investigate the changes of myocardial mitochondrial Ca^{2+} transport and its mechanism in the early stage after severe burns. Methods An experimental model of 30%TBSA full-thickness skin scalding was prepared in rats. Mitochondrial Ca^{2+} transport velocity were measured 1, 3, 6, 12 and 24 h after burns. The other 3 parameters which affecting the velocity were determined, i.e. membrane potential, ATP content and cytosolic Ca^{2+} concentration ([Ca^{2+}] c). Results ①Mitochondrial Ca^{2+} uptake velocity of the 1st hour postburn was higher than that of the control, and Ca^{2+} release velocity didn't change obviously, but both of them were decreased at the 3rd, 6th, 12th, 24th hour postburn. ②Mitochondial membrane potential and ATP content descened at the 3rd, 6th, 12th, 24th hour postburn. ③Mitochondrial Ca^{2+} uptake velocity was positive related with membrane potential after burns, and Ca^{2+} release velocity was positive related with mitochondrial ATP content too. ④[Ca^{2+}] c was increased at the 3rd, 6th, 12th, 24th hour postburn. Conclusion ①There was an increase of mitochondrial Ca^{2+} uptake at the beginning of burns, and obvious Ca^{2+} transport disorder in myocardial mitochondria in the following stages. ②decline of ATP and membrane potential cause the disorder of myocardial mitochondrial Ca^{2+} transport in the following stage after burns. The increase of [Ca^{2+}] c or the tendency is involved in the changes of myocardial mitochondrial Ca^{2+} transport postburn.

Key words: burn; mitochondria; calcium; myocardium; membrane potential

线粒体是心肌细胞至为重要的细胞器之一,它除了合成ATP供给细胞所需能量外,在细胞pH调节、钙稳态维持以及细胞信号转导中起重要作用。我所既往研究表明,严重烧伤早期心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,且分布异常[1]。而线粒体具有完整的 Ca^{2+} 转运系统,可参与细胞 Ca^{2+} 浓度的调节。本研究探讨严重烧伤早期心肌线粒体 Ca^{2+} 转运的动态变化,同时检测影响线粒体 Ca^{2+} 转运的相关因素,以阐明烧伤后心肌线粒体 Ca^{2+} 转运变化的发生机制。

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),雌雄各半,体重(210±20) g,领回后分笼喂养4~5 d以适应环境,分为正常对照组(n=8)和烧伤组(n=40)。动物麻醉脱毛后,烧伤组置脱毛区于92 ℃水浴18 s,造成30%TBSA III度烫(烧)伤(经病理切片证实),分别于烧伤后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。正常对照组不烧伤、不补液,动物脱毛后1 h活杀取心脏;烧伤组动物分别于伤后1、3、6、12、24 h活杀取心脏。

1.2 线粒体分离及指标检测

1.2.1 线粒体分离 参照Zydowo等[2]的方法进行。分离介质:0.25 mol/L蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl,pH7.4(去离子水配制)。大鼠麻醉后,迅速开胸取心肌组织,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%(W/V)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,线粒体最后用分离介质悬浮。将10 000× g,离心11 min所得上清液再经100 000× g,离心60 min,所得上清即为心肌细胞胞浆基质。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 Ca^{2+} 转运测定[3] 反应介质:0.2 mol/L蔗糖、10 mmol/L醋酸钾、5 mmol/L琥珀酸钠、50 mmol/L antipyrylazo III,5 mmol/L Tris-HCl,pH7.4(去离子水配制)。向2.3 ml反应介质中加入200 μl线粒体悬液,25 ℃水浴10 min,测定波长对720~

基金项目:国家"973"重点基础研究发展规划项目基金资助(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,主要从事烧伤脏器损害机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754148-8019
收稿日期:2000-03-30;修回日期:2000-07-19

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

790 nm 处吸光度($A_{空}$)，然后加入 25 mmol/L $CaCl_2$ 10 μl，立即测其吸光度($A_{总}$)，2 min 后再测其吸光度($A_{摄}$)，最后加入 250 μmol/L 钌红(终浓度 1 μmol/L)阻断线粒体单向转运体再摄取 Ca^{2+}，2 min 后测其吸光度($A_{释}$)。线粒体 Ca^{2+} 转运速率按以下公式计算：

$$Ca^{2+}\text{ 摄取速率}(nmol\cdot mg^{-1}\cdot min^{-1})=\frac{\triangle A_{总}-\triangle A_{摄}}{\triangle A_{总}-\triangle A_{空}}\times\frac{250}{\text{时间}\times\text{蛋白含量}}$$

$$Ca^{2+}\text{ 释放速率}(nmol\cdot mg^{-1}\cdot min^{-1})=\frac{\triangle A_{释}-\triangle A_{摄}}{\triangle A_{总}-\triangle A_{空}}\times\frac{250}{\text{时间}\times\text{蛋白含量}}$$

1.2.3 线粒体 ATP 含量测定

1.2.3.1 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。

1.2.3.2 高压液相色谱法测定样品 ATP 含量，以 $nmol\cdot mg^{-1}$ 蛋白表示。线粒体蛋白用改良 Lowry 法测定。

1.2.4 胞浆 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_c$)测定 按 Elizabeth 等[4] 的方法略作改进。将心肌细胞胞浆基质及 Ca^{2+} 标准与邻-甲酚酞络合酮溶液反应显色后，于 575 nm 波长处比色测定。

1.2.5 线粒体膜电位测定 按 Ronald[5] 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(pH7.4)、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，然后 5 000× g，离心 5 min，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 蛋白，线粒体内 Rhodamine123 浓度($[X]_{in}$)=(1−1.1×$[X]_{out}$)×10 000/蛋白浓度。

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

1.3 统计学处理

结果数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用华西医科大学 Pems 医用统计软件对实验数据进行统计处理，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+} 转运速率的改变

大鼠烧伤后 1 h 心肌线粒体 Ca^{2+} 摄取速率明显升高，但 3、6、12、24 h 心肌线粒体 Ca^{2+} 摄取速率显著降低，分别下降了 29.1%、36.4%、17.6%、15.4%；烧伤后 1 h 心肌线粒体 Ca^{2+} 释放速率无明显改变，但伤后 3、6、12、24 h 均明显下降，分别下降了对照组的 44.1%、60.5%、35.3%、19.7%，见表 1。

2.2 烧伤后大鼠心肌线粒体膜电位及能量代谢的变化

大鼠烧伤后 1 h 心肌线粒体膜电位、ATP 含量无明显变化，但 3、6、12、24 h 均明显低于正常对照组，见表 2。

表 1 烧伤后心肌线粒体 Ca^{2+} 转运速率的变化($nmol\cdot mg^{-1}\cdot min^{-1}$，$\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 1 Changes of myocardial mitochondrial Ca^{2+} transport velocity after burn($nmol\cdot mg^{-1}\cdot min^{-1}$，$\bar{x}\pm s$，$n=8$)

	Control	Time after burn(h)				
		1	3	6	12	24
V_{uptake}	96.3 ±17.5	119.2 ±14.6#	68.3 ±14.7##	61.2 ±8.5##	79.4 ±11.5#	81.5 ±6.8#
$V_{release}$	2.38±0.34	2.10±0.25	1.33±0.19##	0.94±0.21##	1.54±0.14##	1.91±0.16#

#: $P<0.05$，##: $P<0.01$ *vs* control

表 2 烧伤后大鼠心肌线粒体膜电位及 ATP 含量变化($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 2 Changes of myocardial mitochondrial membrane potential and ATP content after burn ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

	Control	Time after burn(h)				
		1	3	6	12	24
MP	197.8±14.5	185.0±18.7	157.6±16.9##	149.2±13.5##	163.7±16.4##	175.1±12.5#
ATP	351 ±71	325±59	216±54##	183 ±32##	255±43##	270±47#

#: $P<0.05$，##: $P<0.01$ *vs* control; ATP and MP is respectively expressed as $ng\cdot mg^{-1}$ and mV

2.3 心肌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度变化

烧伤后 3、6、12、24 h 胞浆 Ca^{2+} 浓度明显升高，以 6 h 为最高，而伤后 1 h 胞浆 Ca^{2+} 浓度与对照组比无明显差异，见图 1。

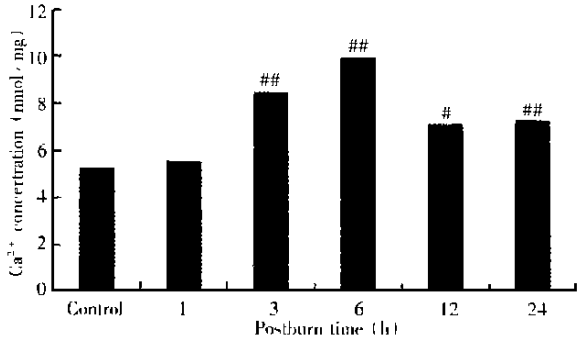


图 1 大鼠烧伤后心肌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度变化($n=8$)

Fig 1 Changes of myocyte cytosolic Ca^{2+} concentration in rats postburn ($n=8$)

#: $P<0.05$，##: $P<0.01$ *vs* control

2.4 相关分析

烧伤后线粒体 Ca^{2+} 摄取速率与其膜电位呈明显正相关，相关系数为 0.923 6($P<0.05$)；同时 Ca^{2+} 释放速率与线粒体 ATP 含量呈显著正相关，相关系数为 0.969 5($P<0.005$)。

3 讨论

我们的实验结果表明，烧伤后 1 h 心肌线粒体 Ca^{2+} 摄取速率明显升高，但伤后 3、6、12、24 h Ca^{2+} 摄取速率显著低于正常对照组。说明烧伤初始心肌线粒体 Ca^{2+} 摄取有一个加强的过程，而烧伤后续阶段 Ca^{2+} 摄取功能下降。实验结果还表明，烧伤后线粒体 Ca^{2+} 摄取速率与膜电位呈明显正相关。线粒体通过单向转运体摄取胞浆 Ca^{2+}，它是一个具有高度膜电位依赖性的过程，同时需要较高浓度胞浆 Ca^{2+} 的激活[6]。烧伤初始机体处于剧烈应激状态，心肌细胞胞外 Ca^{2+} 内流，肌浆网钙通道开放，胞浆 Ca^{2+} 浓度有升高的趋势，使线粒体周围形成高 Ca^{2+} 浓度环境；而此时线粒体膜电位并无明显下降，为线粒体 Ca^{2+} 摄取加强提供了动力

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

保证。它们共同刺激线粒体加速对胞浆 Ca^{2+} 的摄取[7]。烧伤后续阶段尽管[Ca^{2+}]c 明显升高，但线粒体膜电位显著降低，线粒体 Ca^{2+} 摄取失去动力保障，其速率随之下降。

线粒体释放 Ca^{2+} 是一个逆浓度梯度进行的主动转运过程，共同转运的 Na^+、H^+ 等离子的浓度梯度或 ATP 水解是其主要能量来源[8]。我们的实验结果表明：烧伤后 3、6、12、24 h 心肌线粒体 ATP 含量与 Ca^{2+} 释放速率均明显低于正常对照组，且线粒体 Ca^{2+} 释放速率与 ATP 含量呈明显正相关。说明烧伤后续阶段由于线粒体 ATP 含量下降导致 Ca^{2+} 释放障碍。严重烧伤后心肌能耗增加，同时组织缺血缺氧，能量产生不足，使心肌细胞胞浆 ATP 含量很快降低。而缺血情况下，线粒体 ATP 含量较胞浆下降更快[9]。线粒体 ATP 含量下降，导致需要消耗能量的 Ca^{2+} 释放不能正常进行。烧伤后续阶段[Ca^{2+}]c 明显升高，线粒体内外 Ca^{2+} 浓度差增大，使得线粒体释放 Ca^{2+} 所需要消耗的能量增加，可能也是烧伤后线粒体 Ca^{2+} 释放障碍的一个原因。

烧伤初始阶段，细胞和线粒体均处于一种烧伤后的应激状态，线粒体 Ca^{2+} 摄取加强是细胞对付应激反应的一种手段，但这种过分强烈的应激反应可能导致线粒体 Ca^{2+} 摄取过多。伤后 3、6、12、24 h，由于线粒体膜电位与 ATP 含量下降，导致 Ca^{2+} 摄取和释放速率均明显降低，说明后续阶段心肌线粒体 Ca^{2+} 转运存在严重紊乱。同时烧伤后心肌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度升高或有升高趋势。三者可能是烧伤后线粒体 Ca^{2+} 超载的重要原因。针对这一机制，烧伤后抑制胞浆 Ca^{2+} 升高，初始阶段应用 Ca^{2+} 摄取抑制剂，或后续阶段应用 Ca^{2+} 释放促进剂，将有利于减轻线粒体 Ca^{2+} 超载，保护心肌细胞和线粒体功能。

参考文献：

[1] 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.
[2] Zydocvo M M, Swierczy K 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)：155－162.
[3] Yoshimas N, Kozo U. 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl impairs the bioengergtic function of isolated rats liver mitochondria[J]. Biochem Pharmacol, 1986, 35(19)：3 335－3 339.
[4] 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.
[5] Ronald K E, Gruwald R, Lemassters J J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liner mitochondria：Spectral and metabolic properties[J]. BBA, 1986, 850(3)：436－448.
[6] Gunter T E, Buntinas L, Sparagna G C, *et al*. The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients[J]. BBA, 1998, 1 366(1－2)：5－17.
[7] Jouaville F, Mazat J P. Modulation of cell calcium signals by mitochondria[J]. Mol Cell Biochem, 1998, 184(1－2)：371－376.
[8] Gunter T E, Gunter K I, Sheu S S, *et al*. Mitochondril calcium transport：Physiological and pathological relevance[J]. Am J physiol, 1994, 267(2 Pt 1)：C313－339.
[9] Ranch U, Schulze K, Berhard W, *et al*. Alteration of the cytosolic-mitochondial distribution of high-energy phosphates during global myocardrial ischemia may contribute to early contractile failure[J]. Circ Res, 1994, 75(4)：760－793.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2001)01-0047-01

经验与短篇

微乳液火焰原子吸收法同时测定中华鳖甲中钙和镁

Determination of calcium and magnesium in *Carapax trionycis* by microemulsion FAAS

任建敏，杨　[illegible]，邹全明　（第三军医大学医学检验系临床检验学教研室，重庆 400038）

鳖甲为常用中药，具有增强免疫力、抗肿瘤等功效，内含丰富的生物活性物质和人体生命活动所必需的钙、镁等元素[1]。微乳液是热力学稳定体系，利用微乳液作为火焰原子吸收法的前处理方法[2,3]，同时测定鳖甲粉中钙、镁元素，省去了传统前处理高温灰化和消化法操作繁琐、污染环境和易产生误差等缺陷。该方法操作简便、结果满意。

1　实验方法

在用钙镁标准储备液配制的系列标准混合液中，依次加入 5mL 5%十二烷基二甲基苄基溴化铵，10 ml 0.025 mol/L 十二烷基硫酸钠，0.5 ml 20%壬基酚基聚氧乙烯醚和 1 ml 10% $LaCl_3$ 溶液，用稀盐酸定容至 50 ml，使 pH 值为 3。振荡、摇匀，形成标准混合微乳液。15 min 后，在选定的最佳工作参数下分别测定钙镁吸光度，作标准曲线。

中华鳖甲样品钙镁的测定方法为：称取适量经 120 目筛过目并于 110 ℃下烘干恒重的中华鳖甲粉，置入 100 ml 容量瓶中，后按制备标准微乳液的配比制备样品微乳液。

2　结果

2.1　工作曲线、检出限和精密度

混合微乳液法钙镁分别在 0～50 mg/L 及 0～2 mg/L 范围内，吸光度 A 和浓度 C 的线性回归方程为 A＝0.0161C＋0.3665 和 A＝0.1121C＋0.6823；相关系数分别为 0.9842 和 0.9916。用含钙镁分别为 0.50 和 0.05 mg/L 的混合微乳平行测定钙镁各 11 次，得到本法测定钙镁的相对标准偏差（RSD）分别为 2.12%和 1.31%；检出限分别为 2.12 和 0.131 ng/ml。

（下转 51 页）

作者简介：任建敏（1964－），男，四川省渠县人，博士，讲师，主要从事光谱分析与靶向制剂方面的研究。电话：（023）68752315

收稿日期：2000-01-15；修回日期：2000-05-11

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