DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.003

论著

文章编号:1000-5404(2000)03-0210-03

$mtPLA_2$在严重烧伤早期心肌线粒体损害中的作用

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:探讨线粒体PLA_2(Mitochondrial PLA_2, $mtPLA_2$)在严重烧伤早期心肌线粒体损害中的作用。方法:取正常及伤后1、3、6、12、24 h大鼠心肌分离线粒体,测其呼吸功能及Ca^{2+}浓度($[Ca^{2+}]_m$)、$mtPLA_2$活性。结果:①心肌线粒体呼吸控制率(RCR)伤后1 h升高,3、6、12、24 h明显低于正常组,Ⅲ态呼吸速率(ST_3)变化与RCR平行,ST_4仅于伤后3 h有明显升高;②伤后各时相点$[Ca^{2+}]_m$均明显升高,而$mtPLA_2$活性于伤后3、6、12、24 h显著高于正常组;③伤后3、6 h RCR与$mtPLA_2$活性呈明显负相关($r=-0.6835$, $P<0.01$; $r=-0.5419$, $P<0.01$)。结论:伤后$[Ca^{2+}]_m$升高可激活$mtPLA_2$,后者在严重烧伤早期心肌线粒体损害中起重要作用。

关键词 烧伤;线粒体;磷脂酶A_2;Ca^{2+};大鼠

中图法分类号 R329.24;R644 文献标识码 A

Role of mitochondrial PLA_2 in myocardial mitochondria damage in the early stage of severe burns in rats

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

Abstract Objective: To study the role of mitochondrial PLA_2 ($mtPLA_2$) in the damages of myocardial mitochondria in the early stage of severe burns. Methods: Myocardial mitochondria were isolated from the rats of the normal control and burned groups in the 1st, 3rd, 6th, 12th and 24th hour after burn injury. The mitochondrial respiratory function, content of mitochondrial calcium ($mtCa^{2+}$) and activity of $mtPLA_2$ were determined. Results: ① Respiatory control rate (RCR) of myocardial mitochondria was increased in the 1st hour and then significantly decreased in the 3rd, 6th, 12th and 24th hour postburn. The changes of ST_3 which was similar to those of PCR and SR_4 was significantly increased only in the 3rd hour postburn. ②$mtCa^{2+}$ was increased at all the time points postburn and the activity of $mtPLA_2$ was increased only in the 3rd, 6th, 12th and 24th hour postburn. ③PCR was negatively correlated with $mtPLA_2$ activity in the 3rd, 6th, 12th and 24th hour postburn ($r=-0.6835$, $P<0.01$, $r=-0.5419$, $P<0.01$). Conclusion: After the injury of severe burns, the elevation of the content of mitochondrial calcium can significantly activate mitochondrial PLA_2 which plays an important role in the damages of myocardial mitochondria in the early stage after burn injury.

Key words burns; mitochondrion; PLA_2; calciumion; rat

严重烧伤早期心肌线粒体结构与功能受损,导致细胞能量代谢障碍,后者在心功能损害中起重要作用[1]。目前认为钙分布异常是线粒体损伤的主要原因之一,但钙分布异常损伤线粒体的具体途径和机制尚不清楚。线粒体是富含磷脂的细胞器,同时含有自身的磷脂酶A_2—线粒体PLA_2,它具有Ca^{2+}依赖性激活的特点,可能在烧伤后线粒体损害中起一定作用。

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(本校动物中心提供),体重(220±20)g,领回后喂养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(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1%烧伤面积按每公斤体重2 ml注射。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。

作者简介:梁晚益(1967.10),男,湖南省涟源市人,博士,主要从事烧、创伤脏器损害方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65426343

收稿日期:1999-08-05;修回日期:2000-01-19

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 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, pH7.4(去离子水配制), 4℃ 条件下分离心肌线粒体, 1 h 内完成。

1.3 线粒体呼吸功能测定

参照 Poderoso 等[3] 的方法, 以苹果酸钠和谷氨酸钠为底物, 用 BoM_3 耗氧测量仪测定心肌线粒体呼吸功能并计算 RCR 和 ST_3、ST_4 氧耗速率。

1.4 线粒体 Ca^{2+} 测定

按 Elizabeth 等[4] 的方法略作改进。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 mm 波长比色。

1.5 $mtPLA_2$ 活性测定

先用 1 mol/L KCl 悬浮线粒体, 然后冻融 3 次, 150 W× 15 s 超声破碎, 再于 4℃ 孵育 1 h, 并不时振摇, 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[5]。

1.6 统计学处理

所有数据经华西医科大学 PEMS 统计软件处理, 作方差分析及 t 检验, 部分指标作相关分析。

2 结果

2.1 烧伤后线粒体呼吸功能的变化

烧伤后 1 h 心肌线粒体 RCR、ST_3 明显升高, 3、6、12、24 h 显著低于正常对照组; ST_4 除烧伤后 3 h 明显升高外, 其余各时相点与正常组比无明显变化, 见表 1。

2.2 烧伤后 $[Ca^{2+}]_m$ 与 $mtPLA_2$ 变化

烧伤后各时相点 $[Ca^{2+}]_m$ 显著高于对照组, 而 $mtPLA_2$ 活性于伤后 3、6、12、24 h 明显升高, 尤以 3、6 h 为甚, 见表 2。

表 1　烧伤后心肌线粒体呼吸功能变化($n=8$)

Tab 1　Changes of myocardial mitochondrial respiratory function after burn($n=8$)

	Control	Postburn (h)				
		1	3	6	12	24
RCR	3.12±0.27	3.58±0.43#	2.35±0.28*	2.04±0.35*	2.62±0.31#	2.71±0.25#
ST_3	132.9±27.6	166.7±35.7*	80.0±11.8#	67.3±15.7*	93.9±23.2*	105.1±24.4#
ST_4	30.6±8.9	32.4±5.1	44.7±7.9*	34.5±5.3	31.0±5.5	33.5±6.5

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

表 2　烧伤后线粒体 Ca^{2+} 与 PLA_2 变化($n=8$)

Tab 2　Changes of $[Ca^{2+}]_m$ and $mtPLA_2$ activity after burn ($n=8$)

	Control	Postburn (h)				
		1	3	6	12	24
$[Ca^{2+}]_m$(nmol/mg)	10.4±1.62	13.1±2.6#	24.1±3.1*	21.9±2.0*	13.7±1.8#	13.4±2.0#
$mtPLA_2$(U/g)	17.2±4.1	18.5±4.5	70.7±9.0*	77.4±7.3*	30.9±5.0*	25.4±5.9#

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

2.3 线粒体 RCR 与 $mtPLA_2$ 相关分析

伤后 3、6 h 线粒体 RCR 与 $mtPLA_2$ 活性呈明显负相关, 相关系数分别为 $r=-0.6835$, $P<0.01$; $r=-0.5419$, $P<0.01$。

3 讨论

我们所曾经报道烧伤后线粒体功能损害与 MODS 相关[1]。本实验进一步探讨烧伤后心肌线粒体功能损害的发生机制, 结果表明大鼠烧伤后心肌线粒体 RCR 于伤后 1h 升高, 伤后 3、6、12、24 h 显著降低, ST_3 变化与 RCR 基本平行, 而 ST_4 仅于伤后 3 h 有明显升高, 说明烧伤可致心肌线粒体损害, 证实了我们以前的研究结果, 且进一步提示 ST_3 变化是 RCR 降低的主要原因。伤后 1h RCR、ST_3 升高, 表明此时线粒体可能尚未受到明显损害, 反而由于烧伤后强烈的应激反应和某些激素水平升高, 刺激线粒体呼吸加强。

烧伤早期的细胞损害主要由缺血缺氧引起, 后者导致细胞 Ca^{2+} 一定程度的升高。胞浆升高的 Ca^{2+} 通过完善的 Ca^{2+} 转运体系进入线粒体, 首先导致线粒体 Ca^{2+} 升高或超载[6]。本实验结果表明烧伤后各时相点 $[Ca^{2+}]_m$ 显著升高, 伤后 3、6、12、24 h $mtPLA_2$ 活性明显高于对照组; 同时, 烧伤后 3、6 h RCR 与 $mtPLA_2$ 活性呈明显负相关($r=-0.6835$, $P<0.01$, $r=-0.5419$, $P<0.01$)。提示 $[Ca^{2+}]_m$ 升高可激活 $mtPLA_2$, 后者降解线粒体膜磷脂, 使某些呼吸酶及 F0F1—ATPase 活性下降, RCR 降低[7]。可见, 线粒体 Ca^{2+} 对 $mtPLA_2$ 的激活, 以及 $mtPLA_2$ 对线粒体膜磷脂的降解, 在严重烧伤后心肌线粒体损害中起重要作用[8]。烧伤后 1 h Ca^{2+} 有明显升高, 而 PLA_2 活性变化不显著, 这可能是烧伤应激使儿茶酚胺升高, 线粒体摄取 Ca^{2+} 上调细胞代谢的表现, 但这一程度的 Ca^{2+} 升高可能不足以激活 $mtPLA_2$。

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

线粒体作为重要的细胞器之一，在细胞能量代谢和钙稳态维持中起重要作用[9]。有研究表明线粒体 Ca^{2+} 紊乱是缺血缺氧性细胞死亡的根本原因，防治线粒体 Ca^{2+} 超载，阻断其对 mtPLA$_2$ 的激活，可能有助于这些病理条件下维持线粒体、细胞乃至器官的正常功能[10]。

参考文献

[1] Huang Y S, Yang Z C, Liu X S, *et al*. Serial experiment and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome in severe burn[J]. Burns, 1998, 24(8): 706—716.

[2] Zydowo M M, Swierczynskki J, Nagel G, *et al*. The respiration and calcium content of heart mitochondria from rats with vitamin D induced carionecrosis[J]. Biochem J, 1985, 226(1): 155— 161.

[3] Poderoso J J, Fernadez S, Carreras M C, *et al*. Liver oxygen uptake dependence and mitochondrial function in septic rats[J]. Circ Shock, 1994, 44(4): 175—182.

[4] Elizabeth A F, James D M, Takuro T, *et al*. Myocardial mitochondrial Calcium accumulation modulates nuclear calcium accumulation and DNA fragmentation[J]. Ann Thorac Surg, 1995, 60: 338—344.

[5] 沈 红，李玉书. 用合线底物测定磷脂酶 A$_2$ 的方法研究[J]. 军事医学科学院院刊, 1992, 16(1): 71—74.

[6] Roberto F. The role of mitochondria in ischemic heart disease[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1996, 28(Suppl 1): S1—S10.

[7] Nakahara I, Kikuchi H, Taki W, *et al*. Changes of major phos-pholipids of mitochondria during post-ischemic reperfusion in rat brain[J]. J Neurosurg, 1992, 76(2): 244—250.

[8] Elimadi A, Morin D, Sapena R, *et al*. Comparison of the effects of cyclosporine A and trimetazidine on Ca^{2+}-dependent mitochondrial swelling[J]. Fundam Clin Pharmacol, 1997, 11(5): 440—447.

[9] Wallace K B, Eells J T, Madeira V M, *et al*. Mitochondria-mediated cell injury[J]. Fundam Appl Toxicol, 1997, 38(1): 23—37.

[10] 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]. BBA, 1998, 1366(1~2): 69—78.

（编辑 陈聪连）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)03-0212-01

LASIK 术后角膜瓣移位的预防与护理

Prevention and nursing of corneal flap displacement after LASIK operation

曾登芬，李 珊，鲜小华，喻 红 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所眼科，重庆 400042）

准分子激光原位角膜磨镶术（LASIK），一般不易发生角膜瓣移位。角膜瓣一旦发生移位，须立即处理，否则后果严重。我们在工作中曾遇到 2 例角膜瓣移位患者，现报道如下。

1 临床资料

我院自 1996 年 10 月至 1999 年 2 月，共行 LASIK 手术 2068 眼，其中发生角膜瓣移位 2 例，男女各 1 例（术后第 1 天和第 30 天发生）伴有少许层间异物，经及时处理，无并发症发生。

处理方法：① 首先用 0.25% 氯霉素行结膜囊冲洗。② 以 0.4% 表麻滴瞳表面麻醉 2~3 次。③ 碘伏消毒眼睑及周围皮肤，无菌操作下铺巾、开睑，以林格氏液 5~10 ml（100 万 u 庆大霉素/500 ml）行角膜瓣复位加层间冲洗。根据角膜、结膜反应情况用萧莱威、点必舒点眼，连续复诊 2 d。

2 讨论

2.1 角膜瓣愈合机制及移位发生时间

角膜伤口的愈合包括上皮和基质细胞的移行、细胞有丝分裂和分化以及细胞外基质的再生等。角膜瓣完全与基质愈合究竟需要多长时间，目前尚未见报道，估计角膜瓣完全愈合会有一个漫长的时间，在完全愈合前均有发生移位的可能。本组病例角膜瓣移位发生在术后第 1 天和第 30 天。于雅范等[11]报道 2 例角膜瓣移位，1 例术后 1.5 个月发生，1 例术后 5 个月发生。因此，防止角膜瓣移位的工作应当持续 6 个月左右。

2.2 角膜瓣移位的表现及危害

发生角膜瓣移位时，立即有眼痛、畏光、流泪、异物感、视物模糊等症状，无法进行正常工作和生活。因外力而产生的移位多数伴有层间异物沉积，如不及时处理，易发生角膜感染、角膜瓣皱折变形、角膜肿胀、混浊等。

2.3 角膜瓣移位发生的原因

角膜瓣移位原因多属外力作用：用力挤眼、揉眼、结膜囊异物等。本组病例 1 例因他人手指挫伤，另 1 例自己揉伤。LASIK 手术未伤及角膜上皮，多数患者无特殊不适，少数仅有轻度畏光、流泪症状。术后视力恢复快，患者无病人角色行为，容易放松警惕，不注意自我防护。如不按规定配戴防护眼罩，睡眠中容易发生不自主揉眼或碰伤。轻度睑内翻的患者，术后常有睫毛触及角膜瓣现象，同时由于 LASIK 术后病人角膜知觉度降低[2]，这类病人较容易发生术后角膜上皮损伤及角膜瓣移

（下转 215 页）

作者简介：曾登芬（1968.9），女，重庆市人，主管护师，主要从事眼科护理方面的研究，发表论文 6 篇。电话：（023）68757198

收稿日期：1999-07-09；修回日期：2000-01-05

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