DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.001

外源性钙对放烧复合伤早期心肌线粒体呼吸功能的影响*

论著

熊 业 程天民 陈宗荣 (第三军医大学预防医学系复合伤研究室) 重庆,630038

提 要 目的:了解外源性钙离子对放烧复合伤心肌线粒呼吸功能的影响。方法:Wistar大鼠分为正常对照组,6Gy照射复合 30% TBSAIII度烧伤组、放烧复合伤预防用药组和放烧复合伤治疗用药组。于伤后 1、12、24和 48 h测定不同浓度钙对各组线粒体呼吸功能的影响。结果:低浓度外源性钙(10μmol/L)对正常对照组心肌线粒体呼吸有刺激作用,但对放烧复合伤组、放烧复合伤预防用药组和治疗用药组线粒体呼吸无显著刺激作用;高浓度外源性钙(50μmol/L)对正常组、放烧复合伤预防用药组和治疗用药组心肌线粒体呼吸功能有显著抑制作用,但使复合伤组心肌线粒体呼吸完全脱偶联。187.5μmol/L维拉帕米可显著减轻 50μmol/L钙离子对呼吸的抑制。结论:放烧复合伤心肌线粒体对外源性钙的耐受性降低,维拉帕米预防或治疗用药均能提高复合伤后线粒体对外源性钙的耐受性。

关键词 线粒体,心脏;放烧复合伤;钙;线粒体呼吸功能
中图法分类号 R329.24

放烧复合伤早期心肌线粒体呼吸功能严重受损,维拉帕米(Verapamil)及抗休克补液可以减轻损害[1]。Ca^{2+} 与心肌功能有密切关系,正常心功能有赖于心肌细胞内的钙稳态。正常心肌细胞中钙大部分储于线粒体,肌浆网及肌纤维膜上。胞浆游离钙浓度异常增高可导致细胞钙超载(Calcium overload)。线粒体是维持细胞内钙稳态的重要细胞器,细胞内钙超载实质上是线粒体的钙超载[2]。因为细胞内钙的变化会引起线粒体钙运转体系对其调控,从而导致线粒体钙浓度变化[3]。本实验的目的是了解外源性钙对放烧复合伤早期心肌线粒体呼吸的作用,并联系前文所述补液抗休克或钙通道阻滞剂的应用对线粒体呼吸功能的影响[1],探讨放烧复合伤早期心肌线粒体呼吸功能障碍的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及致伤方法

Wistar成年大鼠,体重(220±20)g 雌雄不拘。背部剃毛。^{60}Coγ射线全身照射,总剂量 6 Gy;在 30 min内用溴钨灯照射产生背部皮肤占体表面积 30%的全层烧伤[1]。

1.2 动物分组

动物分正常对照组(N)、6 Gy照射合并 30% III度烧伤的放烧组(C30%)、放烧复合伤预防用药组(Ver+ C30%)、放烧复合伤治疗用药组(C30% + Ver)。Ver+ C30%组:腹腔注射维拉帕米共 5 d(4 mg/kg,1次/日,无菌生理盐水配制),照射前 1 h追加一次注射。C30% + Ver组:烧伤后立即腹腔注射一次维拉帕米(4 mg/kg)

1.3 观察指标

按文献[1]所述方法检测肝线粒体呼吸指标。取心脏剪碎置冰冷的分离介质中(0.25 mol/L蔗糖,0.01 mol/L Tris-HCl,pH 7.4),充分洗去血液,以内切式匀浆机打碎后,600× g离心 6.5 min(2℃)。上清液经 11000× g离心 11 min,弃去上清,以分离介质悬浮沉淀物。重复高速离心一次。以分离介质悬浮沉淀。Lowry法测蛋白。以上操作均于 2℃~4℃下进行。

线粒体呼吸功能测定:反应体积为 2.20 ml。反应介质为 0.25 mol/L蔗糖,3 mmol/L KH_2PO_4,0.4 mmol/L EDTA,pH7.4。反应底物为谷胺酸钠及苹果酸钠(各 1.25 mol/L)。在 30℃下保温 5 min后,加入 352 nmol/L ADP,用氧电极测定线粒体呼吸第 3态(ST3)、第 4态(ST4)耗氧率,计算呼吸控制率(RCR)、磷氧比值(ADP/O)和氧化磷酸化速率。

1.4 统计处理

实验数据经 SPLM医学统计软件作统计处理,作 t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 维拉帕米对放烧复合伤后心肌线粒体呼吸功能的影响

放烧复合伤(C30%)后,线粒体呼吸控制率明显下降。用维拉帕米伤前预防或作伤后治疗均能使呼吸控制率上升或恢复正常,见表 1。

表 1 维拉帕米对复合伤后心肌线粒体 RCR的影响 (n= 4, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of verapamil on RCR of myocardial mitochondria after combined radiation-burn injury (n= 4, $\bar{x}\pm s$)

Groups	Time post-injury (t/h)			
	1	12	24	48
C30%	2.13±0.03*	2.45±0.11*	2.40±0.18*	2.36±0.43*
Ver+ C30%	3.43±0.23*△	3.95±0.22*△	2.9±0.91*△	4.40±0.69*△
C30% + Ver	3.7±0.48*△	4.09±1.07*△	4.66±0.26*△	5.08±1.25*△

Normal value: 4.89±1.06 (n = 10); *: P < 0.05 *vs* normal value; △: P < 0.05 *vs* C30% group

* 国家自然科学基金资助项目 No. 39370692;全军"八五"攻关项目

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

2.2 外源性钙对正常心肌线粒体呼吸功能的作用

低浓度外源性钙对正常心肌线粒体呼吸功能有刺激作用,而高浓度外源性钙则抑制呼吸,维拉帕米可减轻高浓度钙对心肌线粒体呼吸的抑制作用,见表 2。但 100μmol/L钙可使线粒体呼吸完全脱偶联,且维拉帕米无保护作用。

表 2 外源性钙对正常心肌线粒体呼吸功能的影响及维拉帕米的作用 (n= 5, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of exogenous Ca^{2+} on mitochondrial respiratory function of normal myocardium and action of verapamil (n= 5, $\bar{x}\pm s$)

	ST3 (natoms $C_{[O]}$/· min^{-1}· mg^{-1} pro)	ST4 (natoms $C_{[O]}$/· min^{-1}· mg^{-1} pro)	RCR	ADP/O	ATP production rate (C_B/nmol· min^{-1}· mg^{-1} pro)
N	241.33± 41.74	75.03± 8.97	3.19± 0.45	2.23± 0.32	552.36± 185.35
Ca10	314.29± 46.56*	75.14± 6.87	4.18± 0.45*	2.81± 0.19*	888.77± 178.20*
Ca50	103.81± 27.13*	76.58± 14.35	1.36± 0.29*	1.06± 0.23*	110.04± 13.01*
Ver+ Ca50	216.90± 47.50△	81.55± 9.29	2.62± 0.27△	1.62± 0.26△	363.04± 139.03*△

Ca10, Ca50: Mitochondria incubated with 10μmol or 50μmol Ca^{2+} for 2 min (30℃); *: P < 0.05 *vs* normal value; △: P < 0.05 *vs* Ca10

2.3 外源性钙对放烧复合伤心肌线粒体呼吸功能的作用

复合伤时,10μmol/L外源性钙对呼吸无显著刺激作用,见表 3。但 50μmol/L钙则使呼吸完全脱偶联。

表 3 外源性钙对放烧复合伤 C30%心肌线粒体呼吸功能的影响 (n= 4, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of exogenous Ca^{2+} on myocardial mitochondrial respiratory function in group C30% of combined radiation-burn injury (n= 4, $\bar{x}\pm s$)

	$C_{[Ca^{2+}]}$/μmol· L^{-1}	Time post-injury (t/h)			
		1	12	24	48
ST3	0	166.57± 15.50	184.86± 38.98	184.47± 36.98	228.69± 11.25
	10	219.36± 16.99	185.41± 23.96	204.79± 64.50	223.71± 40.55
ST4	0	78.08± 0.34	75.45± 15.91	76.86± 15.41	96.90± 4.77
	10	98.33± 3.69	81.32± 10.51	90.22± 28.22	90.21± 16.35
RCR	0	2.13± 0.03	2.45± 0.11	2.40± 0.18	2.36± 0.43
	10	2.37± 0.33	2.28± 0.13	2.27± 0.32	2.48± 0.23
ADP/O	0	1.93± 0.06	2.06± 0.07	1.82± 0.13	1.42± 0.29
	10	1.96± 0.18	2.05± 0.05	1.78± 0.13	1.53± 0.11
ATP production	0	320.96± 11.18	380.82± 80.30	335.73± 67.31	324.14± 59.79
Rate	10	442.17± 70.85	381.94± 49.39	372.72± 116.57	317.67± 57.58

2.4 用维拉帕米预防组中外源性钙对复合伤线粒体呼吸功能的作用

在用维拉帕米预防的放烧复合伤组中,低浓度外源性钙所起的作用已不再是刺激性的;相反,对呼吸的各项指标均有抑制作用,高浓度钙则完全起抑制作用,见表 4。200μmol/L钙则使线粒体呼吸完全脱偶联。

2.5 伤后用维拉帕米治疗组中外源性钙对复合伤心肌线粒体呼吸功能的作用

在伤后用维拉帕米治疗的复合伤组中,外源性钙抑制线粒体呼吸。剂量越大,抑制性越强,见表 5。

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

表 4　外源性钙对 Ver+ C30% 组心肌线粒体呼吸功能的影响 (n= 4, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effects of exogenous Ca^{2+} on myocardial mitochondrial respiratory function in Ver+ C30% group of combined radiation-burn injury (n= 4, $\bar{x}\pm s$)

	$C_{[Ca^{2+}]}$/μmol·L^{-1}	Time post-burn (t/h)			
		1	12	24	48
ST3	0	103.39± 16.70	140.48± 22.46	132.21± 34.90	202.05± 6.30
	10	87.48± 13.76	123.51± 30.13	109.66± 19.21	152.18± 48.88
	50	64.44± 9.10△	106.22± 30.85	102.28± 24.34	123.57± 11.49△
	100	73.40± 8.88△	93.65± 16.37△	92.19± 14.61△	105.25± 19.85△
ST4	0	30.14± 2.72	35.88± 8.09	46.55± 9.49	46.62± 6.66
	10	33.76± 2.52	36.30± 5.34	41.95± 6.34	42.24± 10.51
	50	34.50± 6.81	46.51± 9.39	36.36± 6.90	39.09± 9.36
	100	32.73± 6.11	41.05± 7.33	37.89± 7.69	31.94± 7.11
RCR	0	3.43± 0.18	3.95± 0.22	2.91± 0.91	4.40± 0.69
	10	2.59± 0.21	3.56± 0.51	2.68± 0.24	3.63± 0.77
	50	1.87± 0.25△	2.93± 0.27△	2.84± 0.34	3.26± 0.67△
	100	2.23± 0.16△	2.58± 0.23△	2.40± 0.53	3.38± 0.78△
ADP/O	0	2.22± 0.25	2.72± 0.12	2.07± 0.67	2.86± 0.07
	10	2.44± 0.23	2.53± 0.31	1.92± 0.09	2.46± 0.49
	50	2.22± 0.20	2.21± 0.19△	1.83± 0.48	2.33± 0.52
	100	2.23± 0.43	1.84± 0.09△	2.33± 0.38	2.34± 0.57
ATP production Rate	0	248.19± 48.24	382.17± 66.16	286.84± 157.83	578.42± 17.72
	10	209.03± 43.29	317.96± 108.96	210.82± 40.90	381.46± 179.58
	50	157.81± 26.75△	228.81± 81.55△	205.79± 62.55	288.32± 72.81△
	100	126.23± 27.90△	173.19± 36.12△	212.08± 20.94△	250.09± 95.90△

△: P < 0.05 *vs* without Ca^{2+}

表 5　外源性钙对 C30% + Ver组心肌线粒体呼吸功能的影响 (n= 4, $\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Effects of exogenous Ca^{2+} on myocardial mitochondrial respiratory function in C30% + Ver group of combined radiation-burn injury (n= 4, $\bar{x}\pm s$)

	$C_{[Ca^{2+}]}$/μmol·L^{-1}	Time post-burn (t/h)			
		1	12	24	48
ST3	0	139.48± 29.37	147.76± 34.60	209.54± 25.80	198.83± 53.29
	10	115.81± 17.17	122.71± 10.15	164.35± 19.88	145.76± 33.56
	50	88.04± 8.22△	99.76± 27.78	130.92± 23.44△	129.61± 40.67
	100	75.32± 7.24	85.03± 15.57△	113.86± 36.13△	99.32± 33.10△
ST4	0	37.60± 6.54	52.51± 34.54	45.08± 5.76	39.97± 10.16
	10	30.44± 2.31	33.93± 5.83	36.48± 5.46	36.22± 9.60
	50	28.96± 2.51	31.83± 5.16	41.52± 8.21	35.89± 9.60
	100	26.03± 2.51△	28.14± 2.49	39.63± 9.57	29.06± 9.25
PCR	0	3.71± 0.48	4.09± 1.07	4.66± 0.26	5.08± 1.25
	10	3.83± 0.71	3.74± 1.00	4.53± 0.33	4.15± 0.90
	50	3.05± 0.31	3.12± 0.20	3.17± 0.19△	3.59± 0.33
	100	2.93± 0.50	3.03± 0.57	2.84± 0.30△	3.44± 0.25△
ADP/O	0	2.62± 0.25	2.58± 0.54	2.90± 0.05	2.93± 0.23
	10	2.61± 0.30	2.43± 0.50	2.89± 0.10	2.71± 0.29
	50	2.71± 0.29	2.12± 0.17	2.21± 0.19△	2.55± 0.31
	100	2.03± 0.41	2.14± 0.29	1.86± 0.25△	2.46± 0.31
ATP production Rate	0	267.96± 103.44	551.53± 204.37	606.63± 81.55	575.84± 211.95
	10	304.83± 79.95	284.78± 89.51	474.57± 50.91	398.36± 105.70
	50	195.25± 43.52△	212.97± 62.33	289.73± 53.22△	335.16± 127.53
	100	154.93± 46.01△	184.65± 57.02△	241.72± 97.33△	245.99± 96.68△

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

3 讨论

维拉帕米可防止复合伤后心肌线粒体呼吸功能下降。结合前文所述复合伤时心肌线粒体游离钙增高,提示维拉帕米的保护作用可能与阻止钙的增高有关。本实验发现外源性钙对正常心肌线粒体呼吸有双向作用:低浓度外源性钙有刺激作用;高浓度时,外源性钙抑制线粒体呼吸。在放烧复合伤时,这种双向作用已不复可见,无论浓度高低,对线粒体呼吸都呈抑制作用,说明在复合伤时,钙对线粒体呼吸的毒性增高,或者说,在复合伤时线粒体对钙的耐受力下降。

本实验已证明根据外源性钙加入量多少,对正常线粒体功能的影响有所不同。低浓度的钙(10μmol/L)刺激正常心肌线粒体呼吸功能,这可能是钙离子进入线粒体激活了钙敏感的脱氢活力引起[4]。较高浓度的钙(50μmol/L)抑制正常心肌线粒体呼吸功能。更大浓度钙就完全使线粒体氧化磷酸化脱偶联。钙通道阻滞剂维拉帕米可能显著减轻 50μmol/L钙对呼吸功能的抑制,这说明维拉帕米减少了钙进入线粒体,可能是抑制单向运输体的活性所致。文献报道维拉帕米抑制大鼠心肌线粒体钙摄取 50%时浓度(IC_{50})为 763μmol/L(134μmol/L~ 4268μmol/L)[6]。

钙含量升高抑制线粒体呼吸功能的机制仍不完全清楚。钙可能与其它因素协同作用造成线粒体功能损害。文献资料证明单纯 Ca^{2+} 或 O_2对线粒体 NADH辅酶 Q还原酶无抑制作用,而两者同时作用则可使该酶活力下降 65%[6]。我室以前工作表明放烧复合伤心肌线粒体丙二醛含量升高而抗氧化酶活力下降,提示氧自由基产生增加[7]。前文证实伤后线粒体游离钙含量升高,这两种因素可能是造成线粒体功能损害的重要原因。另有文献报道离体正常线粒体与 Ca^{2+} 单独孵育时,ST3为对照值的 89%、ST4为对照值的 141%,加入 Na^+ 后使 ST3降为对照值的 55%、ST4升高为对照值的 202%[8]。严重烧伤后早期心肌细胞能量代谢障碍[9]。ATP不足,细胞膜上钠泵活性下降,导致细胞内钠潴留及水肿。另外,心肌细胞内 pH很低,30% 烧伤时伤后 6 h可达 pH= 6.56[9]。由于细胞内 H^+ 增多,刺激了心肌细胞膜上 Na^+/H^+ 交换从而使细胞内 Na^+ 升高,Na^+ 升高又激活 Na^+/Ca^{2+} 交换体系[10],引起细胞内 Ca^{2+} 升高。前文已证明放烧复合伤心肌线粒体 Na^+ 依赖的钙释放和基础钙释放明显加速,提示线粒体钙保留能力下降也可能与细胞内 Na^+ 增高有关。

参考文献

1 熊 业,陈宗荣,程天民.维拉帕米对放烧复合伤大鼠心肌线粒体功能的保护功能.第三军医大学学报,1995;17(2):93

2 王孝铭.心肌缺血-再灌注损伤的新设想.中华心血管病杂志,1992;20(1):80

3 Nicholls D G. Mitochondrial calcium transport. Biochim Biophys Acta, 1982; 633(1): 57

4 McCormack J G. Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria. TIBS, 1986; 11(2): 258

5 Buss W C. Effect of calcium channel antagonists on calcium uptake and release by isolated rat cardiac mitochondria. Eur J Pharmacol, 1988; 152(2): 247

6 Malis C D. Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for postischemic and toxic mitochondrial damage. J Biol Chem, 1986; 261(286): 14021

7 邹仲敏,陈宗荣.放射损伤、烧伤和放烧复合伤心功能的早期改变.第三军医大学学报,1993;15(6):526

8 Harris E J. The stimulation of the release of Ca^{2+} from mitochondria by sodium ions and its inhibition. Arch Biochem Biophys, 1982; 213(3): 531

9 夏照帆.应用^{31}P核磁共振研究严重烧伤大鼠心肌能量代谢及 pH变化.中华整形烧伤外科杂志,1987;3(2):145

10 Meng H P. Protective effects of 5-(N, N-dimethyl) amiloride on ischemic reperfusion injury in heart. Am J Physiol, 1990; 257(375): H1616

(收稿:1995-12-22;修回:1996-08-26)

(编辑 刘 鹏)

Effects of exogenous calcium on myocardial mitochondrial respiratory function at the early stage after combined radiation-burn injury in rats*

Xiong Ye, Cheng Tianmin, Chen Zongrong (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To study the effects of exogenous calcium on myocardial mitochondrial respiratory

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

function at the early stage after combined radiation- burn injury. **Methods**: Adult male Wistar rats were randomized into four groups: 1) Normal control group (NCG); 2) Combined radiation- burn injury group (CRBIG); 3) Prevention group (PG); 4) treatment group (TG). The effects of exogenous calcium of various concentration on myocardial mitochondrial respiratory function were determined at the 1st, 12th, 24th and 48th hour after the injury in all the groups. **Results**: Exogenous calcium of low concentration (10μmol/L) exerted significant stimulative effects on myocardial mitochondrial respiratory function of the rats in NCG but did not do the same on that in CRBIG, PG and TG. However, exogenous calcium of high concentration (50 μmol/L) inhibited the myocardial mitochondrial respiratory function of rats in CG, PG and TG and completely uncoupled the oxidative phosphorylation of myocardial mitochondria in CRBIG, which could be markedly released with 187.5μmol/L Verapamil. **Conclusion**: The reduced myocardial mitochondrial tolerance in the rats inflicted with combined radiation- burn injury can be enhanced by the prophylactic or therapeutic administration of verapamil.

Key words mitochondrion; heart; combined radiation- burn injury; calcium; mitochondrial respiratory function; rat

* Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39370692; Supported by Military "8.5" Foundation

放烧复合伤对小鼠骨髓基质细胞动力学及其粘附功能

博士生论文摘要

The effects of combined radiation-burn injury on the dynamics and adhesion capacity of bone marrow stromal cells in mice

陈幸华 罗成基 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室) 重庆, 630038

关于放烧复合伤致造血功能障碍的研究,以往主要侧重于造血实质细胞损伤的观察,而对造血实质细胞赖以生存的造血微环境在放烧复合伤致造血功能障碍中的作用及其机理的研究很少。为此,本课题从以下 3方面进行研究。第一部分:通过检测 5 Gy放射损伤、15% Ⅲ度体表面积烧伤和放烧复合伤小鼠在伤后不同时间和不同培养时间的骨髓基质细胞集落形成能力、光镜和电镜下的形态学、细胞周期和骨髓基质细胞内 DNA含量等指标的变化,探讨放烧复合伤后骨髓基质细胞从量变到质变的特点和规律;第二部分:分别应用斑点杂交和原位杂交技术检测伤后骨髓基质细胞 VCAM-1 mRNA的表达并结合流式细胞仪测定各损伤组骨髓基质细胞 VCAM-1 Fn Lm 和 Col Ⅳ的表达情况,探讨放烧复合伤造血微环境损伤的分子基础;第三部分:检测骨髓基质细胞贴壁层对骨髓有核细胞的粘附率;分别或联合应用 VCAM-1 Fn Lm和 Col Ⅳ等单抗,观察其对骨髓有核细胞粘附的阻断作用和对骨髓基质细胞支持粒单系造血祖细胞 (CFU-GM)形成能力的影响,探讨放烧复合伤造血微环境的造血调控机理。主要实验结果:① 放烧复合伤对骨髓基质细胞损伤具有以伤后 3 d~ 7 d最重的时效特征和放射损伤> 放烧复合伤> 烧伤的特点;② 放烧复合伤对造血微环境的损伤具有持续较久和恢复缓慢的特点;③ 放烧复合伤导致骨髓基质细胞的形态学发生了病理性改变。④ 放烧复合伤后,反映基质细胞增殖状态的 G_2+ M期细胞比例和骨髓基质细胞 DNA含量发生改变,表明放烧复合伤导致骨髓基质细胞的损伤是具有其物质基础的;⑤ 骨髓基质细胞层对正常骨髓有核细胞粘附能力和支持粒单系造血祖细胞生长的粘附实验和粘附阻断的实验结果表明,放烧复合伤后骨髓基质细胞的粘附结构发生了量和质的改变,提示放烧复合伤对骨髓基质细胞粘附功能的损伤可能是放烧复合伤造血功能障碍发生的重要机理之一;骨髓基质细胞表达的 VCAM-1和纤维连接蛋白对造血干、祖细胞的粘附具有重要作用,进一步深化了放烧复合伤骨髓基质细胞在复合伤造血调控障碍中的作用及其机理的认识。

关键词 辐射损伤;灼伤;放烧复合伤;骨髓;造血微环境;基质细胞;细胞粘附分子;造血调控;小鼠

中图法分类号 R818.023

(收稿: 1996-12-04;修回: 1997-01-10)

(编辑 王 红、沈锡庚)

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