DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.004

焦痂毒性提取物对线粒体膜电位的作用*

楼淑芬 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 文中报告了焦痂毒性提取物 D_1 对大鼠肝线粒体内膜膜电位的影响。在线粒体悬液中加入 D_1 后,内膜膜电位有明显下降,D_1 亦可使内膜通透性增加。由电子传递链产生的质子可能渗透逆流,以致造成质子供应不足,不能维持正常的膜电位,影响线粒体氧化磷酸化脱偶联。

关键词 焦痂;线粒体;跨膜电位;灼伤
中图法分类号 Q244-3

烧伤焦痂粗提取液及其有机溶剂提取物 D_1 对线粒体呼吸有抑制作用,可造成氧化及磷酸化作用脱偶联[1],氧化所产生的能量不能转化为 ATP,不能提供细胞进行各种功能所需的能量,导致细胞损伤及死亡。根据 Mitchell 的化学渗透学说[2],ATP 的合成要靠呼吸电子链不断供给质子,维持一个强大的电化学质子梯度,并经线粒体的另一个质子泵-ATP 合成酶的作用将能量转换用于合成 ATP。若是电子传递链不能不断地提供质子,或 ATP 酶的活性受抑,则 ATP 合成就会发生障碍。根据以前研究的结果,已知 D_1 可抑制电子传递链[3,4],本研究着重 D_1 是否能改变线粒体两侧电化学质子梯度,并初步探讨其机理。

1 材料和方法

1.1 线粒体悬液制备

成年 Wistar 大鼠体重 220~250 g,由本校动物所提供。活杀后取肝脏按文献[1]制备线粒体悬液。用 0.25 mol/L 蔗糖溶液(含 1 mmol/L EDTA)分离线粒体,末次离心用不含 EDTA 之分离液。用同一分离液配成 20 mg/ml 蛋白之悬液。

1.2 D_1 的提取

按前述方法自焦痂内提取其可溶于有机溶剂的组分 D_1[1]。

1.3 线粒体呼吸功能测定

反应介质为 0.25 mol/L 蔗糖,1 mmol/L EDTA,5 mmol/L $MgCl_2$,1.5 mmol/L KCl,15 mmol/L 磷酸钾缓冲液,50 mmol/L Tris-HCl pH7.5。反应体积 2.2 mol。温度 25℃,加入线粒体(40 mg/ml)0.1 ml,加入底物琥珀酸钠(1.25 mol/L)10μl,待曲线平稳后,加入 ADP(0.088 mol/L) 4μl,计算第 3 态及第 4 态呼吸耗氧值,二者之比即为呼吸控制率(Respiratory control rate,RCR)。

1.4 膜电位标准曲线

用 K^+ 扩散电位测定膜电位($\Delta\psi$),其方法如下:

按 Nernst 公式计算应向反应介质中加入的 KCl 量:$\Delta\psi = 60\times\log(K^+in/K^+out)$(约定 K^+in 之值为 120 mmol/L)

依次用 $\Delta\psi$=50~170 mV 之值代入上式,得出相对应之 K^+out 之值,即为反应介质中应含有的[KCl]值。

反应介质:反应介质含 0.2 mol/L 蔗糖,20 mmol/L HEPES,pH7.2,6 μmol/L 鱼藤酮,0.38 mmol/L EDTA,0.38 μg/ml 寡霉素。加入已计算好的 KCl。

波长对 511~533 nm,温度 25℃,体积 3 ml。

线粒体浓度 0.8 mg/ml。

步骤:①加入 38.5 ng/ml valinomycin(缬安霉素)吸光值上升,表示光谱移位,记录为 ΔA;②加入 0.48 μmol/L Fccp,吸光值下降,表示光谱移位减少,记录为 ΔB;③加入 KCl 至 20 mmol/L 以此时的吸光值为 0;修正 ΔA 及 ΔB 值;④以修正过的 ΔA 及 ΔB 相减得 ΔC;⑤重复 1~4 项操作,换用不同值的 KCl,得到不同值的 ΔC;⑥按 Nernst 公式将 KCl(out)的各值代入,求得相应 $\Delta\psi$;⑦以 ΔC 值为纵轴,以 $\Delta\psi$ 值为横轴作图即得标准曲线。

1.5 D_1 对膜电位的影响

将 D_1(2 mg/ml)100,75,50,25,12.5 μl 分别与 0.1 ml 线粒体悬液(20 mg/ml)于 0℃孵育 10 min 后,按上述方法测定膜电位的变化。

1.6 D_1 对线粒体肿胀的影响[5]

反应介质为 0.2 mol/L 蔗糖,KCl 20 mmol/L,$MgCl_2$ 3 mmol/L,醋酸钾缓冲液 10 mmol/L,Tris-HCl 5 mmol/L,pH 7.4,antipyrylazo Ⅲ 150 μmol/L,$CaCl_2$ 150 μmol/L,ruthenium red (RR)1 μmol/L,线粒体 1 mg/ml。反应体积 3 ml。加入 RR 后,在波长 540 nm 读取吸光值,加入 D_1 100 μl (2 mg/ml),观察吸光值变化。

2 结果

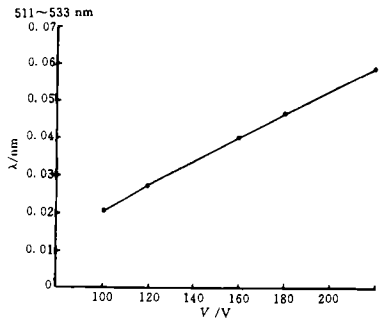
2.1 线粒体功能测定

在测定膜电位之前先测其 RCR。7 个样本的 RCR 分别为 4.2,4.5,4.4,4.2,4.4,4.4 和 4.3;各样本的 RCR 均在 4.0 以上,表明线粒体的质量良好,可以用于实验。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39170743

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

2.2 膜电位标准曲线(见附图)



附图 膜电位的标准曲线

Fig Standard curve for membrane potential

2.3 D_1 对线粒体膜电位的影响

共作了7次实验,均可见膜电位随 D_1 剂量的增加而下降(表1)。

表1 D_1 对线粒体膜电位的作用

Tab 1 Effect of D_1 on mitochondrial membrane potential

No	Normal mitochondria	D_1(mg)				
		0.025	0.05	0.1	0.15	0.2
1	195.14	187.59	167.05	162.62	157.31	147.80
2	197.88	187.59	161.40	164.52	160.14	140.80
3	195.33	177.52	163.59	162.87	167.37	144.41
4	203.14	182.37	183.46	176.53	161.02	142.94
5	197.95	184.20	178.87	159.99	162.94	143.56
6	199.37	182.20	168.72	167.78	156.09	149.12
7	198.34	183.01	167.96	160.28	161.35	141.39
$\bar{x}\pm s$	198.16 ±2.69	183.50 ±3.23*	170.13 ±7.44*	164.94 ±5.32*	160.89 ±3.72*	144.30 ±3.13*

*: $P<0.01$ *vs* normal mitochondria

2.4 D_1 对线粒体肿胀的影响

加入100 μl(2 mg/ml)的 D_1,可使线粒体悬液在 $E_{540\,nm}$ 处吸光值下降,提示线粒体发生了肿胀(表2)。

表2 D_1 对线粒体肿胀的影响

Tab 2 Effect of D_1 on swelling of mitochondria

No	Change of optic density ($E_{540\,nm}$)		
	without D_1	+D_1	difference
1	0.1237	0.1047	0.0190
2	0.0860	0.0441	0.0419
3	0.1178	0.0297	0.0881
4	0.1651	0.0685	0.0966
5	0.2005	0.1431	0.0574
6	0.2682	0.2524	0.0158

3 讨论

氧化磷酸化的化学渗透学中心要点,即在线粒体内膜两侧存在着一个巨大的电化学质子梯度(electrochemical proton gradient, electromotive force, pmf),这个梯度是线粒体呼吸与磷酸化之间的专性的联系。它由两部分组成:膜电位和 ΔpH(pH differential)。在大多数情况下,膜电位在电化学质子梯度中起主要作用。因此,研究膜电位的变化对了解氧化磷酸化机理有着重要意义。

测量膜电位的方法很多,其中 Akerman 提出的方法较为简便。在有 valinomycin 时引入一个 K^+ 或 H^+ 扩散电位(diffusion potential),可引起 safranine O 光谱左移,其现象与内膜能化作用极为相似。所产生的膜电位与光谱左移的程度有线性关系。用 safranine O 在不同呼吸态所测得的膜电位与用离子扩散法所得结果极为相似。故 safranine O 完全可以用于测定膜电位。

本实验发现用 D_1 处理后,线粒体膜电位降低,这是 D_1 抑制线粒体呼吸的重要机理。膜电位为什么会降低?必须先考虑质子电化学偶联的基本条件。

Mitchell 以为质子电化学偶联必须具备以下几个条件:①呼吸电子传递链能够传递质子;②ATP 合成酶应具有双向质子移位 ATP 酶的功能;③能量转换膜应具有低效率的质子传导性;④能量转换膜应具有特异的交换载体以允许代谢物通过膜,而且在高膜电位下仍保持渗透稳定性。

在我们过去所报道的有关 D_1 对线粒体呼吸功能影响的实验结果中,已知 D_1 抑制并损伤呼吸电子传递链[3,4],从而减弱了质子对质子回路的补充;在本实验中从表2的数据看,在 D_1 的作用下,线粒体发生肿胀,表现在 $E_{540\,nm}$ 处吸光值下降,说明线粒体内膜通透性增高。线粒体内膜的通透性增高,有可能造成质子渗透逆流,形成短路,不能建立一个强大的电化学质子梯度,也就不能有效地驱动 ATP 合成酶合成 ATP,这就是氧化和磷酸化作用的脱偶联。

D_1 怎样使内膜通透性增高?已知 D_1 可以诱发线粒体膜脂脂质过氧化,是否脂质过氧化改变了内膜的结构,以致影响其通透性,现在还不清楚,有待进一步研究。

参考文献

1 Chen ZR, Feng J, Dong Y *et al*. Inhibitory effect of crude extract of burn eschar on mitochondrial function in rats. J Med Coll PLA, 1987; 2(1): 40

2 尼古拉斯, DG. 生物力能学. 张玉中, 阎一林译. 化学渗透理论介绍. 北京: 科学出版社, 1987: 4~6

3 Chen ZR, Lou SF, Shu CX. Damages to hepatic mitochondrial respiratory chain by a toxic substance D_1 extracted from

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

burn eschar. J Med Coll PLA,1994;9(3):170
4 Chen ZR, Lou SF. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by D_1, an organic solvent extractable component from burn eschar. Burns,1994;20(4):311
5 Nishihara Y, Utsumi K. 2,5,2',5'－tetrachlorobiphenyl impairs bioenergetic functions of isolated rat liver mitochondria. Bionchem Pharmacol,1986;35(19):3335

(收稿:1995-09-20;修回:1996-03-11)
(编辑 仇玉福)

Effects of the toxic extract of burn eschars on mitochondrial transmembrane potential

Lou Shufen, Chen Zongrong (Department of radiation Medicine, Third Military Medical University. Chongqing, 630038)

Abstract The effects of the toxic extract, D_1, of burn eschars on the mitochondrial transmembrane potential were observed in rats. It was found that the addition of D_1 to the mitochondrial suspension resulted in a continuous decrease of the transmembrane potential and an increase of the non-specific permeability of the inner membrane. Since the protons produced by the electron mediation chain can be reversely permeated the supply of protons is insuffiecient and the normal transmembrane potential can not be maintained and consequently the decoupling of oxidative phosphorylation occurs.

Key words burn eschar; mitochondrion; transmembrane potential; rat

用股薄肌肌皮瓣修复会阴部深度电烧伤一例报告

Repair of a perineal severe electrical burn with gracilis musculocutaneous flap

彭毅志 宋 波* 彭正进** 杨建中** 罗高兴 康绍禹 汪仕良 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,630038

应用股薄肌肌皮瓣修复1例会阴部严重电烧伤,获得满意效果。现报道如下。

1 临床资料

病例,男,23岁,工人。1994年1月24日工作中被1万V高压电烧伤,伤后43 h入院。会阴部、下腹部、左大腿根部、双手及前臂严重烧伤,皮肤焦化坏死,阴囊皮肤和左侧睾丸烧毁,右侧睾丸缩至右腹股沟,尿道海绵体前段坏死外露,耻骨联合、耻骨左下支骨质和阴茎海绵体部分坏死。

2 手术方法

先行会阴部清创,将右睾丸及残留阴茎海绵体埋置于右腹股沟皮下;用左阔筋膜张肌肌皮瓣修复左大腿根部前侧创面,保护股动脉及股静脉;下腹部及左大腿内侧创面用游离皮片覆盖;最后会阴部遗留创面大小为130 mm×70 mm。于右大腿内侧设计并切取股薄肌肌皮瓣,梭形,长200 mm,宽100 mm,于上1/3处找到血管蒂,游离血管蒂约50 mm,切断股薄肌近端内侧1/2后,将肌皮瓣向上内旋覆盖会阴部创面,缝线固定,供瓣区植中厚皮。术后第2天肌皮瓣稍红肿,第4天开始逐渐消退,肌皮瓣血运和感觉均良好,创面封闭。

3 讨论

本例为严重的会阴部电烧伤,临床上较罕见,其损伤范围大,除会阴部外,还包括左大腿侧段前侧、内侧及下腹部,加之为了保存残留的阴茎海绵体及右睾丸,需将其埋置于右腹股沟皮下,所以要修复会阴部(130 mm×70 mm)创面有一定难度。尽管股薄肌肌皮瓣在修复会阴部创面中较为常用,但是本病例只能利用右侧股薄肌肌皮瓣,按常规设计宽度仅为60 mm[1],尚不能封闭其创面。我们根据Giordano[2]的研究,认为股薄肌筋膜及皮肤具有良好的血供,设计了右股薄肌肌皮瓣宽度为100 mm,未发现血运障碍,成功地封闭了会阴部创面,取得了满意的预期结果。这种超宽度的股薄肌肌皮瓣的应用,可为严重会阴部或其他邻近部位损伤及肿瘤切除后大块缺损的早期修复提供新的途径。

关键词 电烧伤;股薄肌皮瓣;会阴部
中图法分类号 R644

参考文献

1 汪良能,高学书主编.整形外科学.北京:人民卫生出版社,1989:193～194
2 Giordano PA, Abbes M, Pequignot JP. Gracilis blood supply:anatomical and clinical re-evaluation. Br J Plast Surg, 1990;43:266

(收稿:1995-09-02;修回:1995-12-19)
(编辑 刘 鹏)

* 泌尿科 ** 进修生

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