DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.005

烧伤焦痂脂类引起大鼠肝线粒体脂质过氧化的实验研究*

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 用烧伤焦痂脂类提取物(D_1)与大鼠肝线粒体在体外直接作用,测定大鼠肝线粒体内丙二醛(MDA)含量及脂氢过氧化物(RooH)含量在D_1作用前后的变化。结果:与D_1作用后的鼠肝线粒体MDA含量是正常对照组的226%($P<0.01$)。与D_1作用后的鼠肝线粒体ROOH含量是作用前的200%($P<0.01$),实验结果表明D_1可引起大鼠肝线粒体脂类过氧化损伤。

关键词 灼烧;焦痂;线粒体;丙二醛;脂氢过氧化物
中图法分类号 R644;R329.24

本室以往的实验研究资料证明烧伤后大鼠肝线粒脂质过氧化物含量增加,大鼠肝线粒体呼吸控制率下降[1],及大鼠肝线粒体不饱和脂肪的含量下降[2],这些结果提示烧伤后肝线粒体功能障碍可能与烧伤焦痂毒性物质吸收引起线粒体膜脂的过氧化有关。本文用烧伤焦痂脂类提取物(D_1)与大鼠肝线粒体在体外直接作用,同时测定大鼠肝线粒体与D_1作用前后的丙二醛(MDA)含量及脂氢过氧化物(ROOH)含量,以探讨D_1对线粒体脂质过氧化的影响作用。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar大白鼠30只,雌雄不拘,体重200±20 g,由本校动物所提供。

1.2 试剂

1.1.3.3—Tetraethoxy propane为Fluka产品,NADPH,GSH为Sigma产品,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)粗制品由本室按Heach[3]法制备,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

肝线粒体按Aprille[4]法制备。

D_1的制备见文献[5]。

MDA测定按Ohdawa[6] 孵育体系:将0.1 ml正常大鼠肝线粒体悬液(蛋白浓度4mg/ml)与0.1ml D_1悬液(2mg/ml)pH7.4 0.1mol/L PBS配制)混匀,在0℃分别孵育2 h,1 h、30 min、20 min、10 min,荧光测试条件:日立MPF-4型荧光分光光度计,激发波长515 nm,发射波长553nm,狭缝6 nm,灵敏度3.6,量程电压5mV,结果以nmol MDA·mg^{-1}线粒体蛋白(或D^1)表示。

按Heath[3]法测定ROOH 孵育体系:0.1 ml正常大鼠肝线粒体悬液(蛋白浓度5 mg/ml)与0.1 ml D_1悬液(2 mg/ml pH7.4 0.1 mol/L PBS配制)混匀,33℃水浴10 min。测试条件:美国Beckman DU-7紫外/可见分光光度计,波长340 nm连续观察10 min。结果以μmol ROOH·min^{-1}·mg^{-1}线粒体蛋白(或D_1)表示。

1.4 统计分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析判断数据各组均数差别的显著性。

2 结果

2.1 D_1对不同浓度的大鼠肝线粒体MDA含量变化的影响(见表1)

表1 D_1对不同浓度的大鼠肝线粒体MDA含量变化的影响

Tab 1 Effects of D_1 MDA contents of mitochondrial suspension of different concetrations

Group	n	MDA $\bar{x}\pm s$ nmol·mg^{-1}≠
Control	11	0.280±0.039
D_1+Mito 0.6 mg·ml^{-1}	5	0.633±0.005**
D_1+Mito 0.8 mg·ml^{-1}	5	0.667±0.062**
D_1+Mito 1.0 mg·ml^{-1}	5	0.680±0.052**
D_1+Mito 1.2 mg·ml^{-1}	5	0.695±0.076**
D_1	7	2.650±0.370

**:$P<0.01$ *vs* control, ≠: MDA conteml of D_1 has been substracted from all mitochondrial MDA contents

2.2 肝线粒体与D_1孵育不同时间时MDA含量变化(见表2)

表2 肝线粒体与D_1孵育不同时间MDA含量变化

Tab 2 Change of MDA contents of mitochondrial incubated with D_1 of different length of time

Group	n	MDA $\bar{x}\pm s$ nmol·mg^{-1}
Control	11	0.280±0.039
incubated for		
10 min	9	0.632±0.105**
20 min	4	0.709±0.128**
30 min	4	0.714±0.069**
60 min	4	0.687±0.108**
120 min	4	0.705±0.084**

**:$P<0.01$ *vs* control

* 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

2.3 D_1对肝线粒体 ROOH 含量的影响(见表3)

表 3 D_1对肝线粒体 ROOH 含量的影响

Tab 3 Effect of D_1 on ROOH contents of mitochondrial

Group	n	ROOH $\bar{x}\pm s$ $\mu mol\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$ ≠	P
Normal mito	12	0.37±0.06	
D^1+Mito	12	0.74±0.10**	<0.01
D^1	5	3.27±0.23	

≠: ROOH content of D_1 has been substracted from mitochondrial ROOH contents

3 讨论

本实验结果表明 D_1直接作用于大鼠肝线粒体可使肝粒体的 MDA 和 ROOH 含量显著升高,且少量的 D_1即可在短时间内使肝线粒体脂质过氧化程度有明显的升高 D_1对肝线粒体脂质过氧损伤的作用是显而易见的,而线粒体的脂质过氧化损伤对细胞则有严重影响。

生物膜和亚细胞器是脂质过氧化作用损伤的主要部位,线粒体膜的磷脂中含有较大量的不饱和脂肪酸,可含2～6个双键,随着双键的增加,过氧化作用的速度也随之增加,脂质过氧化产物 MDA 易使生物大生分子产生交联作用,从而导致酶的失活或 RNA 的突变。

脂类中不饱和脂肪酸(PH)可以发生过氧化。在脂类过氧化的过程中产生 R·、RO·、ROO·等自由基与 ROOH。在脂类过氧化过程中所产生的 ROOH 虽不能使脂质过氧化过程继续进展,但在 Fe^{2+}—复合物或 Fe^{3+}—复合物的存在下可分别转为能使脂质过氧化继续进展的 RO·与 ROO·自由基。因此 ROOH 虽不能直接启动脂类过氧化反应,但可通过 RO·或 ROO·间接起到类似作用。

D_1直接与鼠肝线粒体作用后脂质过氧化产物含量增加的实验结果提示:烧伤后鼠肝线粒体呼吸控制率下降,鼠肝线粒体不饱和脂肪酸含量下降,线粒体膜脂环境变化可导致呼吸酶受到抑制,均与烧伤焦痂毒性物质引起肝线粒体脂质过氧化有关。

参考文献

1 Chen ZR, Xong Y, Wang SB et al. Inhibition of mitochndrial respiratory function by an organic solvent extractable component from and extract of burn exchar. Burns, 1991; 17(4): 282

2 熊 业,陈宗荣.烧伤及烧伤焦痂脂类对大鼠肝线粒体脂肪酸含量的影响.第三军医大学学报,1992;14(4):340

3 Heath RL, Tappel AL. A new sensitive, assay for the measuremunt of hydroperoxides. Anal Biochem, 1976; 76: 184

4 Aprille JR, Hom JA, Rulfus J. Liver and skeletal muscle mitochondrial funtion following burn injury. J Trauma, 1977; 17: 279

5 楼淑芬,陈宗荣,舒崇湘.烧伤焦痂毒性组分 D_1的进一步分离和毒性测定.第三军医大学学报,1994;16(1):50

6 Ohdawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal biochem, 1979; 95: 351

(收稿:1994-11-19;修回:1995-10-11)

Experimental stud of lipid peroxidation in liver mitochondria induced with lipids extracted from burn eschars in vitro

Lou Shueng, Chen Zongrong (Department of Radiation Medicine, Third Militar Medical Universit, Chongqing, 630038)

Abstract Lipids extracted from burn eschars were incubated with normal liver mitochondria of frats. It was found that small amounts of extracted lipids could increase the malondiadehyde (MDA) level of the mitochondria b 226.07% ($P<0.01$) and ROOH content b 200% ($P<0.01$) as compared with the normal. The findings suggest that extracted lipids rom burn eschars can induce lipid peroxidation o the lipids on the mitochondrial membrane.

Key words burns; eschar; mitochondrion; malodialdehyyde; lipid peroxidation

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