DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.027

焦痂毒性提取物 D_I 对大鼠肝线粒体膜流动性的作用*

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
丛建波 吴 可 孙存普 (军事医学科学院放射医学研究所)北京,100850

提 要 用电子自旋共振(ESR)技术和荧光偏振技术,对烧伤焦痂脂类提取物(D_I)直接作用于大鼠肝线粒体前后的膜脂流动性作了测定。结果:D_I 引起马来酰亚胺(MAL-)标记的线粒体膜蛋白的 S/W 值下降;D_I 使 5-Doxyl标记的线粒体膜脂 S值降低;并使肝线粒体的荧光强度(F)升高,荧光偏振度(P)与各向异性(r)下降。提示 D_I 与大鼠肝线粒体作用时使肝线粒体的膜流动性发生了改变。

关键词 灼伤;焦痂;膜流动性
中图法分类号 R329.24

本实验采用电子自旋共振(ESR)技术和荧光偏振技术,对烧伤焦痂脂类提取物 D_I 直接作用大鼠肝线粒体前后的膜脂流动性作了测定,以探讨 D_I 对肝线粒体膜脂损伤的影响作用。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar大鼠,雌雄不拘,体重 180 g~220 g,分别由本校动物中心与北京军事医学科学院动物所提供。

1.2 试剂

马来酰亚胺(3-Maleimido-proxyl,MAL-);硬脂酸(5-Doxyl stearic acid, 5-Doxyl)系 Sigma 产品,DPH(1,6-Diphenyl-1,3-5-hexdtriene)为 Flukd产品,余者均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器

美国 Beckman J2-21M低温高速离心机。Beckman DU-7紫外-可见光光度计。日本 Mitachi MPF-4荧光光度计。ESR波谱仪为 Bruker ESP-300型。

1.4 D_I 的制备

D_I 的制备方法参见文献[1]。

1.5 大鼠肝线粒体的制备[2]

大鼠断头处死,取肝脏。将肝脏置于小烧杯中,在预冷的分离介质(0.25 mol/L pH 7.4蔗糖)中剪成碎块,用分离介质洗涤碎组织块数次,将碎组织块移至玻璃匀浆器中研磨数次,取匀浆 500× g离心 5 min,取上清 10 000× g离心 10 min,弃上清,用分离介质悬浮沉淀,再 10 000× g离心 10 min,弃上清。将沉淀用分离介质悬浮,该悬浮液为线粒体悬液。用 Lowry法测该悬液的蛋白含量。

1.6 MAL-标记线粒体[3]

MAL-先溶于微量乙醇中,再溶于 PBS(0.01 mol/L pH 7.4),其浓度为 1×10^{-2} mol/L。标记时,1 ml线粒体悬液(4 mg/ml),加 D_I(2 mg/ml)200μl,对照管不加 D_I 用 PBS补充体积。每管分别加入 10μl MAL-溶液,再加 2 ml PBS于 37℃水浴中标记 2.5 h。取出后 10 000 r/min离心 10 min用 PBS反复洗涤,直至上清液测不出 ESR信号。ESP-300 ESR波谱仪测试条件:X波段;动率 10 mV;调制频率 25 KHz;调制幅度 1×10^{-4} T;扫描时间 41.94 s;中心磁场 3 470×10^{-4} T;扫描宽度 200×10^{-4} T。

1.7 5-Doxyl标记线粒体[4]

将 5-Doxyl溶于 PBS中配成 4×10^{-3} mol/L溶液。取线粒体悬液 1 ml(4 mg/ml)加入 200μl D_I 液(2 mg/ml),对照管以 200μl PBS补充体积。每管分别加入 25μl 5-Doxyl,再加 2 ml PBS摇匀后 37℃水浴标记 15 min。标记后用 PBS洗涤数次,条件同 1.6,至上清液测不出 ESR信号为止,测试条件同 1.6。

1.8 线粒体膜脂流动性实验[5]

将制备好的线粒体 15 mg加入 2 ml 2×10^{-5} mol/L pH 7.4的 DPH溶液中,25℃水浴温育 30 min。取出后 10 000× g离心 10 min,弃上清沉淀用 PBS洗涤 1次,10 000× g离心 10 min,用 4 ml PBS悬浮沉淀,于 MPE-4荧光光度计测荧光偏振度。激发波长 357 nm,发射波长 431 nm,狭缝 7.4 nm。计算:

荧光强度(F) $F=I_{VV}+2I_{VH}$

荧光偏振度(P) $P=\frac{I_{VV}-GI_{VH}}{I_{VV}+GI_{VH}}$

各向异性(r) $r=\frac{2P}{3-P}$

校正因子(G) $G=\frac{I_{HV}}{I_{HH}}$

I_{VV}: 起偏器和检偏器光轴均为垂直方向时所测得的荧光强度。

I_{VH}: 起偏器光轴为垂直方向,检偏器光轴为水平方向时所测得的荧光强度。

I_{HV}: 起偏器光轴为水平方向,检偏器光轴为垂直方向时所测得的荧光强度。

I_{HH}: 起偏器与检偏器光轴均呈水平方向时测得的荧光强度。

2 结果

2.1 D_I 对 MAL-标记线粒体膜蛋白的影响

D_I 对 MAL-标记线粒体膜蛋白强固定化(S)与弱固定化(W)比值的变化见表 1。

* 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

表 1　D_1对 MAL-I 标记线粒体膜蛋白 S/W比值的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of D_1 on the S/W ratio of MAL-I labelled mitochondrial membrane protein ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	S/W ($\bar{x}\pm s$)
Control	8	0.045± 0.003
D_1	8	0.039± 0.004**

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

2.2　D_1对 5-Doxyl标记线粒体膜脂的影响

D_1对 5-Doxyl标记线粒体膜脂 S值的改变见表 2

表 2　D_1对 5-Doxyl标记线粒体膜脂 S值的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of D_1 on 5-Doxyl labelled mitochendrial membrane protein($\bar{x}\pm s$)

Group	n	S ($\bar{x}\pm s$)
Control	8	0.642± 0.006
D_1	8	0.618± 0.012**

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

2.3　D_1对肝线粒体荧光强度和偏振度的影响见表 3

表 3　D_1对肝线粒体 P、r、F的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of D_1 on P, r, F values of liver mitochondria($\bar{x}\pm s$)

Group	n	P	r	F
Control	4	0.1010± 0.006	0.069± 0.004	53.875± 5.452
D_1	4	0.080± 0.002**	0.055± 0.002**	76.375± 3.966**

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

3　讨论

强固定化(S)表示马来酰亚胺氮氧自由基与处于膜三维结构深部的巯基结合,其运动受限制;弱固定化(W)表示马来酰亚胺氮氧自由基与处于表面结构的巯基形成特异结合,具有较大自由度。ESR波谱的强弱固定化波峰高度之比 S/W值,可以表明马来酰亚胺氮氧自由基与膜巯基结合的状况,进而提供膜蛋白构象的信息[6]。S/W值降低,说明膜蛋白构象趋于松散,S/W值升高则反之。

波谱的序参数 S按文献[7]计算。S值反映了氮氧自由基附近膜脂的有序度高低或流动性大小,序参数升高表明膜脂排列更加有序,即其流动性降低,序参数降低则反之。

DPH嵌入到膜脂双层中的烃链区以后和磷脂分子平行排列,烃链不活动则 DPH排列整齐。用一种偏振光激发后,它所发生的荧光为偏振光,当烃链活动性很大时,则 DPH分子从吸收到发射的这段时间内将随着磷脂分子的活动而有程度不同的转动,以致发射的荧光其偏振度减少。用 P表示偏振度时,P值越大,r值越大,则膜脂的流动性越小;P值越小,r值越小,则膜脂的流动性越大。用 DPH作为荧光探剂采用荧光偏振法,实质上是反映了肝线粒体膜脂的总体行为。

以上三项实验结果表明,大鼠肝线粒体在 D_1的直接作用下,线粒体膜脂质过氧化程度增加[8],膜脂流动性增加,膜蛋白三级结构趋于松散。这三者呈相关性变化。事实上,膜脂膜蛋白是相互作用相互影响的,膜脂质过氧化程度增加会造成膜结构的紊乱,使膜有序性下降,这影响到膜蛋白构象的变化,使其三级结构趋于松散,而膜蛋白构象的变化也会对膜的流动性产生影响。

本实验采用不同的实验技术对大鼠肝线粒体在 D_1的直接作用下的变化进行了测定,结果一致表明:D_1可使肝线粒体膜蛋白的构象发生改变,膜的有序性下降,使线粒体膜的流动性增大。

参考文献

1 Chen Z Y, Xiong Y, Lon S F *et al*. Inhibition of mitochondrial respiratory function by an organic solvent extractable component from the extract of burn eschar. Burns, 1991; 17(4): 282

2 Aprille J R, Hom J R, Ruffs J. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. J Trauma, 1977; 17: 279

3 Grzelinska E, Bartowiak A, Bartosz G *et al*. Effect of OH scavengers on radiation damage to the erythrocyte membrane. Int J Radiat Biol, 1982; 41(5): 473

4 吴泽志,陈槐卿,薛振南等.用脂肪酸自旋标记研究库存血红细胞膜的活动性.生物物理学报, 1993; 9(1): 59

5 范崇竹,曹志民,于维汉等.大鼠心肌线粒体膜脂流动性的荧光分析研究.中华物理医学杂志, 1988; 10(1): 32

6 张保林,卢景　,王文清等.金属硫蛋白抗自由基损伤研究.生物物理学报, 1992; 8(3): 539

7 张建中,赵保终,张清刚.自旋标记 ESR波谱的基本原理和应用.北京:科学出版社, 1987: 109~140

8 楼淑芬,陈宗荣.烧伤焦痂脂类引起大鼠肝线粒体脂质过氧化的实验研究.第三军医大学学报, 1995; 17(5): 387

(收稿: 1995-12-26;修回: 1996-06-20)

(编辑　冷怀明)

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

Effects of D_1, a toxic substance isolated from burn eschar on mitochondrial membrane fluidity*

Lou Shufen, Chen Zongrong (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)
Cong Jianbo, Wu Ke, Sun Cunpu (Institute of Radiation Research, Academy of Military Medical Science, Beijing, 100850)

Abstract The effects of D_1, a toxic substance isolated from burn eschar, on mitochondrial membrane fluidity were studied using the techniques of ESR spin label and fluorescence polarography in the rats. It was found that D_1 caused decrease of S/W ratio in 5-Doxyl labeling experiment. It also caused the lowering of degree of polarization fluorescence P on anisotrophy r. Both of these findings suggest increase of mitodrondrial membrane fluidity.

Key words Burn; eschar; membrane fluidity; ESR; polarization fluorecence

* This project was supported by the National Natural Science Fundation of China, No. 39170734

海洛因依赖患者脱瘾过程中的治疗及护理

The treatment and nursing during heroin detoxication

李祯英 (第三军医大学附属西南医院中医科) 重庆, 630038

海洛因成瘾性强,戒断症状严重,戒毒后复发率高。我科从1993年6月至1995年2月,共收海洛因脱瘾者200例,现将有关资料及护理体会介绍如下:

1 临床资料

1.1 一般资料

本组200例中,男110例,女90例,年龄最小17岁,最大43岁,平均年龄26.7岁。文化程度:大专5例(2.5%),中专10例(5%);高中2例(1%);初中50例(25%);小学133例(66.5%)。其中未婚120例(60%),已婚60例(30%),离婚20例(10%)。职业状况:个体经商160例(80%),工人2例(1%),其它38例(19%),吸毒期多为1年~2年,吸毒方法分别为烫吸和静脉注射两处;吸毒量最多每天3 g,最少每天0.5 g

1.2 成瘾时的症状及心理特征

1.2.1 生理依赖 成瘾后一旦中断用药(或突然减少用量),8 h~12 h即出现戒断症状,若不继续用药,一系列戒断症状于24 h~36 h达到高峰,经脱瘾治疗,一周后主要症状缓解消除。失眠,焦虑,烦燥和不适感有时会迁延一段时期,见表1

表1 主要戒断症状及百分比

	流鼻涕	流泪	打哈欠	全身酸痛	蚁行感	瞳孔散大	失眠	焦虑
例 数	182	130	142	156	96	116	190	170
百分数(%)	91	65	71	78	48	58	95	85

1.2.2 心理依赖 成瘾者对毒品产生异常强烈的渴求感,需连续不间断地滥用毒品来重复体验心理快感并避免断药时的身心折磨。

1.2.3 耐受性 成瘾者对阿片类药物易产生耐受性,需不断提高剂量来维持原先的药效。

1.3 治疗

对海洛因成瘾者的脱瘾治疗,宜在全封闭的病房中进行,治疗原则均采用美沙酮,丁丙诺啡替代递减法加氯丙嗪辅助治疗;给药方法为先频后疏,剂量只减不加,停药坚决。前3天用美沙酮,每日3次,每次10 mg口服,后4天改为丁丙诺啡每日2次,每次0.15 mg肌肉注射;氯丙嗪前3天每天4次,每次100 mg口服,后4天改为每天1次50 mg口服,7 d后停药戒断症状会有反复,给予针灸治疗,如针刺足三里,合谷穴,每日2次,每次20 min,2 d~3d后戒断症状逐渐消失,此时要多作鼓励解释工作,叮嘱患者切不可重复吸毒。

1.4 疗效观察

一般住院10 d出院,效果显著,躯体症状消失或大部份减退,见表2

(下转462页)

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