DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.01.022

烧伤焦痂毒性组分 D_1 的进一步分离和毒性测定*

楼淑芬 陈宗荣 舒崇湘 (第三军医大学预防医学系复合伤研究室) 630038

我室过去报道了烧伤焦痂提取液对大鼠肝线粒体呼吸的抑制作用[1]和焦痂提取物中可溶于乙酸乙酯的毒性组分 D_1 的抑制作用[2]。本文拟就 D_1 组分的进一步分离及其亚组分的毒性作一初步报道。

1 材料与方法

Wistar 大鼠,雌雄不拘,体重 200～250 g。背部剃毛,以 5 kw 溴钨灯照射 12 s(距离 70 cm),产生占体表面积 15%的Ⅲ度烧伤。以 3%碘酊涂搽伤面。腹腔注射生理盐水 5 ml,每天 1 次,连续 2 d,分笼饲养。

伤后 7 d 取焦痂,剔去皮下脂肪组织后,以氯仿除去焦痂上附着脂性物。投入液氮迅速冷冻 2 h。取出后在 4℃冷室解冻过夜。剪成碎片。用 0.9% NaCl(pH7.4)按 1∶9(W/V)混合。以内切式组织打碎机打成匀浆,于 4℃离心 10 min(10000×g)。此液分为 3 层。弃去上层脂质物及下层组织碎片,取中间混浊液经四层纱布过滤。所得液为焦痂粗提液(CEBE)。(Crude extract of burn eschar)

1.1 焦痂粗提液中可溶于有机溶剂组分 D_1 的制备

在 250 ml 量筒中放入一定量的 CEBE,取一段透析袋(截留分子量 8 000～10 000)。以丝线结扎一端,在透析袋内放 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.4),其量为 CEBE 的 1/4。于冷室透析 16 h,弃去透析液,以等量乙酸乙酯提取透析后的 CEBE 3 次,合并提取液用旋转蒸发仪于 40℃水浴减压蒸干。加少许乙酸乙酯溶解,移入称好重量的具塞试管内,以氮气流在室温中吹干,放入干燥器中,负压下干燥过夜。取出再称重。此为 D_1。

1.2 D_1 组分硅酸柱层析分离

按 Dittmer 法[3]用硅酸柱层析进一步分离 D_1。硅酸(120 目)110℃活化 2h。冷却至室温即装柱便用。层析柱 7×160 mm。装硅酸 2 g,氯仿平衡。

1.2.1 第 1 次过柱:将 D_1 若干毫克溶于 1 ml 氯仿中。上样后以 0.5ml 氯仿洗残留于柱顶的 D_1。洗脱液:氯仿 20ml 流速 10 ml/h。收集流下的氯仿。此组合为简单脂。继用甲醇 20 ml 洗脱。流速 10 ml/h。收集洗脱液。此组分为复合脂。将收集的两个组分分别在氮气流下吹干,称重。按 Bartlett 法[4]测磷。

1.2.2 第 2 次过柱(简单脂的分析):从预实验中得知毒性物质主要存在于简单脂组分内,故再作第 2 次过柱。取已活化硅酸 2 g 加己烷 4 ml 装柱。将第 1 次过柱所得氯仿洗出的组分溶于 0.5 ml 己烷上柱。用己烷 10 ml,15%苯－己烷 20 ml、5%乙醚－己烷 40 ml、5%乙醚－己烷 40 ml、30%乙醚－己烷 20 ml 及乙醚 20 ml 顺序洗脱,流速 20 ml/h、依次得 1－6 号亚组分样品。分别测其对线粒体呼吸的抑制作用[2];甘油三酯含量测定[5];胆固醇含量测定[6];红外光谱分析(由西安 104 所协助进行)。脂肪酸测定利用气相色谱法分析[7]。气相色谱分析条件:岛津 GC－7A 气相色谱仪。使用氢焰检测器。填充柱:4×160 mm 玻璃柱,10% DEGS＋10% OV－225,60～80 目 Gaschromosorb WAW－DMCS,柱温:196℃。汽化室及检测器温度:270℃。载气:N_2 40 ml/min。空气及氢气流速:0.5 kg/cm² 进样量 1 μl。

2 结果

2.1 第 1 次硅酸柱层析

上样量 35.5mg,氯仿洗脱组分重 29.1mg,占总重 81.97%。甲醇洗脱组分重 6.3 mg,占总重 17.5%。两者共重 35.4 mg。回收率 99.72%。(该实验共做 5 次,回收率分别为 97.2%,99.7%,92.3%,92.7%平均 95.64%)。

无机磷测定结果:氯仿洗脱组分无机磷浓度为 33.65 μmol/L,甲醇洗脱组分无机磷浓度为 350 μmol/L,二者之比为 1∶10.3。

用上述两组分与正常鼠肝线粒体在 0℃孵育 10 min,分别测其对线粒体呼吸控制率的影响。发现毒性部分主要在氯仿洗脱组分,2 mg/ml 即可达到完全抑制(7 次实验结果)。甲醇洗脱组分对线粒体呼吸几无影响。

2.2 第 2 次硅酸柱层析

取第 1 次过柱后氯仿洗脱组分 15.6 mg 上柱。经 6 种不同组合的洗脱液顺序洗脱后,分别得 0.5、0.1、8.5、2.3、1.8 及 0.9 mg。6 个亚组分共重 14.1 mg。回收率为 90.38%。(该实验共作 3 次,回收率分别为 92.7%,93.2%,90.38%平均 92.09%)各组分占总重之百分数依次为 3.55%,0.71%,60.38%,16.31%,12.77%,6.38%。

分别用上述 6 个亚组分测试对大鼠肝线粒体呼吸的抑制作用。结果见表 1。

从以上结果看,2"及 3"亚组分无抑制作用,1"及 5"亚组分有轻度抑制作用,4"及 6"亚组分抑制作用较强,尤其是 4"亚组分,在 3 mg/ml 之剂量已可产生完全抑制。将 4"亚且分置 100℃沸水浴中 10 min 再行测试,其毒性丝毫未减弱,该组分有较高耐热性。

对 6 个亚组分别进行了甘油三酯及胆固醇含量的定性及定量测定。甘油三酯定性试验显示除了 3"及 4"为阳性,其余均为阴性。甘油三酯定量:3" 0.87 mmol/L,4" 1.64 mmol/L。胆固醇含量定性试验 4"及 5"为阳性,余者皆为为阴性。胆固醇定量:4" 1.6 mmol/L,5" 0.6 mmol/L。

* 国家自然科学基金资助项目

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

表 1　D_1 亚组分对线粒体呼吸的抑制作用

亚组分	RCR	抑制率%
正常线粒体	4.85	
1	4.42	8.87
2	4.60	5.16
3	4.65	4.12
4	完全抑制	100.00
5	3.83	11.04
6	3.42	29.48

线粒体蛋白浓度 40 mg/ml；D_1 浓度 5 mg/ml；* D_1 浓度 3 mg/ml

脂肪酸测定结果见表 2。

表 2　D_1 亚组分脂肪酸组成

亚组分	14∶0(%)	16∶0(%)	18∶0(%)	18∶1(%)	18∶2(%)
1	41.8	41.2	17.0		
2		100.0			
3	36.0	27.5	14.0		22.5
4	8.2	39.3		19.5	33.0
5	15.1	50.9		34.0	
6	9.3	42.8		29.9	18.0

红外光谱分析见图 1、图 2。

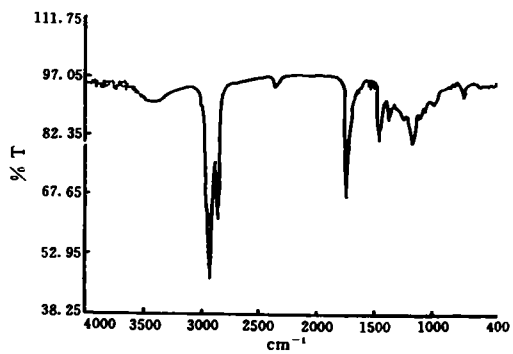


图 1　D_1 组分 4″红外光谱图

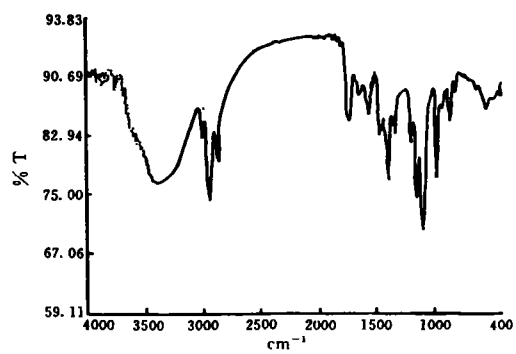


图 2　D_1 组分 6″红外光谱图

红外光谱分析结果表明 D_1 的 4″亚组分有酯的强吸收峰(V c=o)。4″光谱在 1 746 cm^{-1}，1 240 cm^{-1}处有强吸收峰，很可能是乙酸乙酯的谱带；在 2 927、2 854 cm^{-1}处有吸收峰，相当于甲基团谱带。6″亚组分在 1 181、1 134、1 082 cm^{-1}处皆出现多重线是 c－o 伸缩振动，与 o－o 振动有偶合现象，o－o 伸缩振动为 938、838 cm^{-1}。6″可能为过氧化物。

3　讨论

Suzuki[8]曾对烧伤焦痂盐水提取物可溶于乙醚的毒性组分进行研究。他发现这种物质具有抑制线粒体呼吸的作用。在硅胶 G 板上点样，以异丙醚-酯酸-水展开得 5 条带，其中第 3 条带有毒性。定性试验提示是脂肪酸。

本文采用硅酸柱层析法分离焦痂盐水提取物中可溶于乙酸乙酯的组分 D_1。发现占总重 81.97%的组分可被氯仿洗脱下来，即 D_1 的 4/5 是由简单脂构成的，其余 17.75%(约占总重 1/5)为复合脂，其中绝大部分为磷脂。

换用不同浓度的系列洗脱液，可将第 1 次洗脱下来可溶于氯仿的组分进一步析解为 6 个亚组分，其中 4″及 6″二个亚组分对线粒体呼吸抑制能力较强。气相色谱分析表明 6 个亚组分均含有脂肪酸。两个毒性最强的亚组分(4″及 6″)中饱和脂肪酸＋单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸之比分别为 82∶18 及 67∶33。其它几个亚组分中的脂肪酸也以饱和脂肪酸为主。实验证实 D_1 能使线粒体不饱和脂肪酸含量下降[9]。如果线粒体膜中不饱和脂肪酸少于 20%，线粒体将失去氧化磷酸偶联能力和 Pi/ATP 交换能力[10]。以前的实验多次证明烧伤后大鼠肝线粒体呼吸功能下降，提示 D_1 使线粒体中不饱和脂肪酸减少可能是引起线粒体呼吸功能异常的原因之一[10]。红外光谱分析也表明 4″主要内容为酯类，6″为过氧化物。

焦痂毒素能否进入循环？以什么形式存在于血液中？血浆中能否测得这种物质？这些都是尚未解决的问题。最近 Sparkes[11]用人皮焦痂毒素(Cutaneus burn toxin)(CBT)制得抗人 CBT 血清，以酶联法(ELISA)在重度烧伤患者血浆内测得有 CBT 存在。测得的 CBT 为脂蛋白的蛋白辅基部分。至于脂蛋白以什么形式吸收入血，又经过什么代谢过程，尚有待进一步的探索。

关键词　烧伤焦痂 ；毒物/分离和提纯

中图法分类号　R644

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

参考文献

1 Chen Zongrong, Feng Jiang, Dong Yan, et al. Inhibitory effect of crude extract of burn eschar on mitochondrial function in rats. J Med coll PLA, 1987, 2(1): 40～45

2 Chen Zongrong, Xiong Ye, Wang Songbao, et al. Inhibition of mitochondrial respiraory function by an organic solvent extraotable component from an extract of burn eschar. Burns, 1991, 17(4): 282～287

3 Dittmer JC, Well MA. Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. Methods in Eezymology, 1969, 14: 482～530

4 Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem, 1959, 234(3): 466～471

5 李健斋. 用酶试剂测定血清甘油三酯(一步终点法). 中华医学检验杂志, 1987, 10: 262～265

6 贾维龙. 血清胆固醇酶法测定的方法学研究. 中华医学检验杂志, 1983, 6(4): 196～201

7 孙传经. 气相色谱分析原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 1979. 233～249

8 Suzuki K, Aoyama H, Izawa Y. Isolation of substance toxic to mitochnodrial function from the burned skin of rats. Burns, 1980, 8: 110～116

9 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): 340～342

10 Daun G. Lipids of mitochondria. Biochim Biophys Acta, 1985, 822: 1

11 Sparkes BG, Monge G, Marshall SL, et al. Plasma levels of cutaneous burn toxin and lipid peroxides in thermal injury. Burns, 1990, 16(2): 118～122

(收稿: 1993-05-22; 修回: 1993-12-15)

石蜡切片 ARF 免疫组化检测 P_{53} 蛋白的初步报告

王 东 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室) 630038

抗癌基因 P_{53} 定位于人类染色体 17p13[1]，其等位基因的缺失和突变在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用。该基因编码一个 53kd 的核磷蛋白，称为 P_{53} 蛋白。正常情况下 P_{53} 蛋白半衰期很短，且极不稳定，而当其突变时，则与其它蛋白成份形成复合物在细胞核内聚集，从而可以用免疫组化的方法进行检测。但是，目前的 P_{53} 抗体仅适用于冰冻切片，对常规固定、石蜡包埋的组织反应极弱，难以观察，从而限制了它的应用，亦很大程度上困扰了目前的研究。

本文着重介绍一种新的抗原复性液 ARF(Antigen Retrieval Fluid)介导的方法，使得 P_{53} 蛋白免疫组化染色完全适用于常规固定、石蜡包埋的组织。

1 材料与方法

1.1 组织来源

85 例人原发性肝细胞性肝癌和 5 例胆管细胞癌均来源于我校附属西南医院病理科 1987～1992 年存档的石蜡包埋组织。癌组织作常规石蜡连续切片，片厚 5μm，分别做 HE 和免疫组化染色。

1.2 P_{53} 抗体

1.2.1 Pab1801(英国 ICRF, Dr. L. Crawford 惠赠)是人特异的抗 P_{53} 单克隆抗体，能识别人 P_{53} 多肽中位于第 32～73 氨基酸残基之间的抗原决定簇，与野生型和突变型均起反应。工作滴度 1∶5。

1.2.2 CM-1(英国 Dundee 大学, Dr. D. P. Lane 惠赠)为一种抗人 P_{53} 的兔 IgG 多克隆抗体，与野生型 P_{53} 起反应。工作滴度 1∶1000。

1.2.3 免疫组化染色：应用 Vectastain ABC 试剂盒(Vector Laboratories, Inc)，参照 Shi[2] 和 Ven den Berg 等[3] 报道的提高免疫组化染色强度的方法，改良如下：①载玻片预涂粘贴剂。②石蜡切片 5 μm，室温干燥，常规脱蜡，逐级酒精水化入水。③将切片放入含有 ARF 的带盖玻璃缸中，置于微波炉内。④将微波炉温度调至 95℃，加热 10 min。整个过程也可分 2 次，每次 5 min，间隔 1 min。⑤玻璃缸移出微波炉，室温冷却 15 min。⑥切片用蒸馏水和 PBS 各洗 5 min。⑦0.3% H_2O_2 甲醇液孵育 10～30 min，PBS 振洗 5 min。⑧正常血清孵育 30 min。⑨加单克隆抗体 Pab1801 和多克隆抗体 CM-1，37℃ 1 h，4℃ 冰箱过夜，PBS 振洗 5 min。⑩生物素化兔抗鼠或羊抗兔孵育 40 min，PBS 振洗 5 min。⑪ABC 液孵育 40 min，PBS 振洗 5 min。⑫DAB 显色。

1.2.4 对照设计：①不用微波炉加热，切片用 0.5% Triton 和 0.1% 胰酶预处理。②用蒸馏水替代 ARF，按上述方法染色。③用 PBS 代替一抗做阴性对照。

2 结果与讨论

组织切片经 Triton 和胰酶预处理 ABC 法免疫组化染色，85 例肝细胞性肝癌中 22 例阳性(25.8%)，5 例胆管细胞癌中 1 例阳性(20%)，但阳性反应很弱(如图 1 和 3 所示)。用 ARF 方法可非常显著地提高染色强度(如图 2 和图 4 所示)。85 例肝细胞性肝癌中 30 例阳性(35%)，5 例胆管细胞癌中 2 例阳性(40%)。以蒸馏水替代 ARF，亦见部分病例染色增强，但远不及 ARF 明显。

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