DOI:10.16046/j.1000-5404.1994.06.017
第16卷第6期 第三军医大学学报 Vol, 16, No. 6
430 1994年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 1994

放射损伤、烧伤和放烧复合伤心肌线粒体脂质过氧化的加强效应

邹仲敏 陈宗荣 (第三军医大学预防医学系防原教研室) 630038

提 要 Wistar大鼠经6 Gy ^{60}Co γ线和/或30%总体表面积(TBSA)Ⅱ度烧伤致放射损伤(RI)、烧伤(BI)和放烧复合伤(RBI)。观测伤后1、3、8、16和24 h大鼠心肌线粒体脂质过氧化和抗氧化酶活力的改变,发现三种伤类均表现为脂质过氧化代谢产物丙二醛(MDA)含量伤后1 h即明显升高,24 h降至对照组(C)水平;超氧化物歧化酶(SOD)活力在整个实验过程中维持在明显低于C组的水平;BI组和RBI组还可见谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力在伤后16和24 h明显降低。结果表明,伤后心肌线粒体抗氧化酶活力降低,脂质过氧化加强,提示线粒体内有自由基堆积。结合此前同样改变条件下所见的心功能下降,认为自由基的有害作用可能是心功能降低的重要原因之一。

关键词 灼伤;辐射损伤,实验性;放烧复合伤;过氧化脂质类;线粒体,心脏;大鼠

中图法分类号 R818.82

业已证实,烧伤和放射损伤均可导致体内自由基异常产生和堆积,组织脂质过氧化加强。线粒体因其有大量多不饱和脂肪酸,而成为脂质过氧化易发部位。心脏作为一个贮能少、耗能高的器官,其能量主要来源于心肌线粒体,故线粒体的损伤必然会影响心脏功能的正常发挥。本实验观测放射损伤、烧伤和放烧复合伤早期心肌线粒体脂质过氧化物含量和抗氧化酶活力的改变,从自由基的损害作用的角度探讨先前同样致伤条件下所见的心功能降低[1]的原因。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

本校动物中心提供的健康雄性Wistar大鼠,体重200~220 g,随机分为对照组(C)(n=10)、放射损伤组(RI)(n=30)、烧伤组(BI)(n=35)和放烧复合伤组(RBI)(n=30)。

1.2 致伤方法

用6 Gy ^{60}Co γ线单剂量全身照射和/或30%总体表面积(TBSA)Ⅱ度光辐射烧伤致伤,详见先前报告[1]。动物致伤后不予救治、饮食如常。

1.3 主要试剂和仪器

超氧化物歧化酶(SOD,Sigma),黄嘌呤氧化酶(XO,Sigma),还原型谷胱甘肽(GSH,Sigma),1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP,Fluka),盐酸羟胺(E·MERCK),次黄嘌呤(HX)等分析纯试剂。

Beckman DU-7HS型紫外/可见光分光光度计,Beckman J2-21M型低温高速离心机。

1.4 测定指标

于伤后1、3、8、16和24 h活杀动物、4℃条件下分离制备心肌线粒体、测定其丙二醛(MDA)含量[2],超氧化物歧化酶(SOD)[3]、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)[4]和过氧化氢酶(CAT)[5]的活力。结果用线粒体蛋白含量进行修正。

1.5 统计处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,用PDA-2程序进行单因素方差分析,以$P\leqslant 0.05$为统计学意义显著。

2 结果

2.1 线粒体MDA含量的变化

如表1所示,除各组24 h和RI组16 h外,其它各组各时相点MDA含量明显高于C组($P<0.05$)。各组MDA含量在伤后1 h即明显升高,8 h达最高点,BI组、RI组和RBI组分别是C组值的166.4%、174.1%和202.1%。总体上看,MDA含量升高程度的大小顺序为RBI组>BI组>RI组,但组间无统计学差异($P>0.05$)。

表1 致伤后心肌线粒体MDA含量(nmol·mg^{-1} prot)的变化

Tab 1 The changes of content of MDA (nmol·mg^{-1} prot) after injury

Time (h)	1	3	8	16	24
BI	2.24±0.52*	2.30±0.18*	2.38±0.20*	2.11±0.22*	1.45±0.24
RI	1.98±0.50*	2.20±0.40*	2.49±0.94*	1.79±0.77	1.45±0.24
RBI	2.35±0.16*	2.53±0.42*	2.89±0.42*	1.93±0.17*	1.43±0.59

Control=1.43±0.28, * $P<0.05$ *vs* C

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

2.2 线粒体SOD活力的改变

除BI组24 h外，其他各组各时相点SOD活力显著低于对照水平（$P<0.05$）。致伤后1 h SOD活力即显著降低，24 h内一直维持在低水平上，无明显恢复。

表2 致伤后心肌线粒体SOD活力（UN·mg^{-1} prot）的变化

Tab 2 The changes of SOD acivity (UN·mg^{-1} prot) after injury

Time (h)	1	3	8	16	24
BI	17.58±5.49*	17.60±1.77*	18.42±3.08*	18.47±2.77*	22.17±0.27
RI	13.34±1.62*	17.18±1.63*	16.25±3.01*	18.14±2.99*	15.75±1.28*
RBI	18.23±2.19*	17.06±7.18*	17.94±2.99*	15.24±1.70*	21.26±8.19*

Control=28.42±8.09，* $P<0.05$ *vs* C

2.3 线粒体GSH-Px活力的变化

BI组和RBI组在16和24 h表现出GSH-Px活力的明显降低（$P<0.05$），且16 h点RBI组的降低程度显著大于BI组（$P<0.05$），仅为C组的32.5%。RI组与C组无显著差异（$P>0.05$）。

表3 致伤后心肌线粒体GSH-Px活力（unit·mg^{-1}prot）的变化

Tab 3 The changes of GSH-Px activity (unit·mg^{-1} prot) after injury

Time (h)	1	3	8	18	24
BI	18.47±7.78	17.86±5.64	23.93±3.74	12.79±3.19*	13.32±4.30*
RI	16.23±3.51	17.92±5.69	18.32±4.89	16.43±3.89	17.47±3.67
RBI	21.80±2.22	21.14±3.22	21.58±4.63	6.39±3.75*+	15.07±3.16

Control=19.66±5.15，* $P<0.05$ *vs* C；+ $P<0.05$ *vs* BI

2.4 线粒体CAT活力的改变

如表4所示，各组各时相点CAT活力无明显变化（$P>0.05$）。

表4 致伤后心肌线粒体CAT活力（unit·mg^{-1} prot）的变化

Tab 4 The changes of CAT activity (unit·mg^{-1} prot) after injury

Time (h)	1	3	8	18	24
BI	1.47±0.51	2.25±0.42	1.88±0.36	2.06±0.43	2.11±0.55
RI	1.71±0.20	1.56±0.61	1.38±0.29	1.51±0.43	1.06±0.31
RBI	1.70±0.20	1.60±0.29	1.81±0.29	1.93±0.12	2.04±0.66

Control=1.58±0.52

3 讨论

放射损伤、烧伤和放烧复合伤可以造成组织中自由基的异常产生和堆积，脂质过氧化加强，导致组织的结构和功能上的损害。线粒体是细胞的能量发生器，同时又是易受自由基攻击的细胞器。熊业等[6]的研究表明，放烧复合伤时，肝线粒体功能障碍，脂质过氧化加强，目前尚未见对放烧复合伤心肌线粒体的研究报告。

心肌线粒体的主要抗氧化酶是SOD和GSH-Px，CAT因含量低而作用甚小[7]。本实验发现伤后SOD和GSH-Px均处于低活力状态。三种伤类SOD活力自伤后1 h即显著降低，且24 h内一直维持在低水平上。BI组和RBI组GSH-Px活力则在16 h才明显降低，明显地晚于SOD活力下降的时间。究其原因，可能是：(1)SOD歧化超氧阴离子的作用是机体清除自由基的第一步反应，故首先受到消耗；(2)自由基本身，以及SOD歧化超氧阴离子的过程，对SOD的活力均有抑制作用[8]，而GSH-Px则不然[9]。心肌线粒体中的GSH-Px可以催化H_2O_2和脂质过氧化物的还原反应，对脂质过氧化的连锁反应有多层次的阻断作用。我们注意到，GSH-Px的活力在RI组无明显变化，RBI组在16 h的降低程度明显大于BI组，这是否因伤类不同

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

所致，尚不能确定。很有可能，不同伤类致伤后，自由基产生的时间和量上的差异决定了组织抗氧化酶活力变化的特殊性。

致伤情况下，一方面，自由基的产生增加；另一方面，由于抗氧化酶活力的降低，使组织清除自由基的能力大为下降，其结果是大量自由基在组织中堆积。自由基损伤组织的途径之一是使组织发生脂质过氧化，MDA 作为脂质过氧化物的代谢产物，其含量的变化可以反映自由基对组织造成的损害。实验所见伤后1 h 心肌线粒体 MDA 即有显著升高，且与抗氧化酶活力的变化相呼应，说明致伤后线粒体抗氧化酶活力降低，清除自由基的能力下降，使组织脂质过氧化加强。当然，脂质过氧化不是自由基损害组织的唯一途径，况且自由基的损害作用是全细胞的，而非线粒体特异性，故线粒体 MDA 含量的变化只能间接地在一定程度上反映组织损伤情况。

笔者以前在相同的致伤条件和观察时相点上，发现伤后心肌固有收缩能力降低，心功能下降，以8 h 最为严重，24 h 有不同程度的恢复[1]。该过程与心肌线粒体脂质过氧化的程度在一定范围内有相似之处，提示心功能下降和心肌线粒体脂质过氧化之间有联系。线粒体 MDA 含量在伤后1 h 即明显升高，且维持在高水平上，足以说明伤后自由基在体内堆积程度之高。自由基对心功能的抑制作用，已被 Prasad[10] 的实验充分证实。根据本实验的结果，我们有理由得出以下结论：放烧复合伤早期心肌线粒体抗氧化酶活力降低所导致的自由基对心肌线粒体的损害作用，在心功能抑制中起重要作用。

（娄淑芬和刘晓宏技师在实验中给予具体指导，特此致谢！）

参考文献

1 邹仲敏，陈宗荣，刘晓宏. 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)：528～531

2 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979, 95: 351～358

3 Elstner E, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumcholoride: a simple assay for superoxide dismutase. Anal Biochem, 1976, 70: 616～620

4 夏奕明，朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法. 卫生研究，1987，16(4)：29～33

5 Aebi HE. Catalase in vitro. In: Paker L, ed. Method in Enzymology, vol 105. New York: Academic Press, 1984: 121～126

6 熊 业，陈宗荣. 放射损伤、烧伤及复合伤时肝线粒体功能障碍与脂质过氧化作用. 第三军医大学学报，1991，13(5)：439～442

7 Doroshow JH, Locker OY, Myers EE. Enzymic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. J Clin Invest, 1980, 65: 128～135

8 Roberts PB, Fielden EM, Rotilio G, et al. Superoxide dismutase inactivation by radiation-induced radicals: evidence for histidien residues in the active site. Radiat Res, 1974, 60: 441～452

9 Searle AJ, Willson RL. Glutathione peroxidase: effect of superoxide, hydroxyl and bromine free radicals on enzyme activity. Int J Radiat Biol, 1980, 37: 213～217

10 Prasad K, Kalra J, Chan WP, et al. Effect of oxygen free radicals on cardiovascular function at organ and cellular levels. Am Heart J 1989, 117: 1196～1202

（收稿：1993-11-13；修回：1994-10-10）

Studies of intensification of lipid peroxidation of myocardial mitochondria after combined radiation—burn injury in rats

Zou Zhongmin, Chen Zongrong (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The content of malondialdehyde (MDA) and the activity of anti—oxidization enzymes of the myocardial mitochondria were observed in rats, which were randomized into the control (C), burn injury (BI), radiation injury (RI) and combined radiation—burn injury (CRBI) groups, in the 1st, 3rd, 8th, 16th and 24th hour after injury. The findings were as follows:

1. The MDA content was increased significantly in the 1st hour and returned gradually to the control level in the 24th hour. The activity of superoxide dismutase (SOD) was kept in an obviously lower level than that of the control throughout the observation period in BI, RI and CRBI groups.

2. The activity of GSH—Px was decreased in BI and CRB groups.

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

The fidings indicate that the capacity to scavenge free radicals is weakened and lipid peroxidation intensified in the myocardial mitochondria of the injured rats. Consequently, it is deduced that the harmful effects of free radicals might be one of the factors to induce cardiac dysfunction, injury under the same injurious in our previous report.

Key words burns; radiation injuries, experimental; combined radiation—burn injury*; lipid peroxides; mitochondria, heart; rat

将一新分离的人X染色体单拷贝DNA片段定位于Xq12-q13

A new sigle—copy DNA segment of human X chromosome cocalized to Xq12—q13

梁 红 谭 骏 纪贤文 王 燕 毛琼国 （第三军医大学基础部分子生物学教研室）630038

核酸原位杂交技术是利用放射性同位素标记的核酸探针及放射自显影技术在细胞、细胞核及染色体上测定特异的DNA或RNA序列的一种技术，一般称原位杂交。随重组DNA技术、染色体显带技术的发展，用原位杂交技术能将克隆的基因或特异的DNA序列直接并相当准确地定位到染色体的区或带[1,2]。本实验采用原位杂交技术，将新分离到的人X染色体单拷贝DNA片段(DXFD52)成功地定位在X染色体q12-q13上，为进一步的深入研究打下了基础[3]。

1 材料和方法

1.1 试剂

硅化剂。核酸酶A，甲酰胺华美公司产品。含水溶聚蔗糖，聚乙烯吡咯烷酮，牛白蛋白，鲑鱼精DNA均为Sigma公司产品。

1.2 染色体制片按常规方法

用2×SSC配制RNaseA工作液。每张片子加200 μl，37℃处理1 h。用2×SSC充分洗涤，乙醇中脱水。70℃的70%甲酰胺/2×SSC中变性2 min，迅速浸入预冷至－20℃的75%、85%、95%和100%乙醇中脱水至2 min，真空保存。用随机标记法标记探针，检测DNA探针比活力8～9×10^7 cpm/μg。标记的探针，加入至1 ml杂交液。每张片子加200 μl杂交液，覆经硅烷化的盖破片，42℃保温24 h。杂交后洗涤、脱水。覆核4乳胶，D－19显影、定影、洗涤干燥，用1 μg/ml Honechest 33258染色15 min，置紫外灯下，处理45 min，Giemsa染色15 min，镜检[4]。

2 结果

对克隆的人X染色体单拷贝DNA片段DXFD52的原位杂交分析结果表明，99个中期分裂相中，41个(41.41%)在X染色体的杂交点，银颗粒总数为19.03%(51/268)位于X染色体长臂，其中82.35%(42/51)的银颗粒位于Xq12-13之间，而其它染色体上杂交点子为散布的，没有富集区，因此我们将DXFD52定位于Xq12-13区域[5,6]。

3 心得体会

染色体制片，除具有分裂相多，清晰度好外，染色体分散良好，长短适中。本实验均采用2周片龄，杂交结果及显带良好。染色体DNA的变性有70%甲酰胺/2×SSC，70℃可获得良好结果，处理时间不超过2 min[4]。本实验除严格控制DNA探针的纯度外，还采用了随机引物标记法，大大提高了探针的标记效率，进而获得良好的杂交结果。

关键词 X染色体；脱氧核糖核酸复制
中图法分类号 R329.24

参考文献

1 Macgrger HC, Varly JM. Working with animal chromosomes. Chichester: John and Sons, 1983: 193
2 Mattei MG, Gedeon AK, While SJ, et al. DNA probe localization at 18p113 band by in situ hybridization and idendification of small supernumerary chromosome. Hum Genet, 1985, 69: 268
3 Harper ME, Haan EA, Richard RI, et al. Localization of a single copy DNA sequences on G－band human chromosomes by in situ hybridization chromosome. Chromosoma, 1981, 83: 431
4 徐 芸，薛京伦，邱信芳，等. 人体基因组随机单拷贝顺序的分离及其在染色体上的定位. 遗传学报，1990，17(6)：469～475
5 Mary BD, Spira J, Perryman MB, et al. Regional localization of carbonic anhydrase genes CAI and CA_3 on human chromosome 8. Somatic Cell Mol Genet, 1987, 13: 173～178
6 Naotoshi R, Mulley JC, Klein G, et al. Human gene coding for granulocyte－colony stimulation factor is assigned to the q21－q22 region of chromosome 17. Somatic Cell Mol Genet, 1987, 13: 679～684

（收稿：1994-06-08；修回：1994-09-10）

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