DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.002

烧伤焦痂毒性物质提取物 D_1 诱发大鼠肝脏亚线粒体颗粒化学发光作用*

舒崇湘 陈宗荣 楼淑芬 刘晓宏 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室) 630038

提 要 烧伤焦痂脂溶性毒性物质提取物(D_1)诱发大鼠肝脏亚线粒体颗粒化学发光作用。结果:正常大鼠皮肤脂溶性提取物(D'_1)和 D_1 均能诱导鼠肝亚线粒体颗粒产生化学发光作用,其化学发光积分值随 D_1 和 D'_1 的剂量增大而增高,但在剂量相同时 D_1 的作用显著大于 D'_1。超氧化物歧化酶(SOD)和β胡萝卜素对 D_1 诱导的化学发光均有显著的抑制作用,在一定的剂量范围内(SOD<10 μg/ml,β胡萝卜素<3.2 mmol/L),随SOD和β胡萝卜素的剂量增加其抑制化学发光的作用显著增强。提示 D_1 与亚线粒体作用时发生了自由基反应,且在此过程中有超氧阴离子和单线态氧的产生。

关键词 灼伤;焦痂;化学发光

中图法分类号 R644

本室以前的实验研究资料证明烧伤焦痂脂溶性提取物 D_1 对正常鼠肝线粒体呼吸功能产生明显的抑制作用[1],进一步研究又发现 D_1 能使鼠肝线粒体不饱和脂肪酸含量显著下降和饱和脂肪酸含量上升[2]。然而对 D_1 抑制线粒体呼吸功能和使线粒体不饱和脂肪含量降低的机理尚不完全清楚。本文主要用大鼠肝亚线粒体颗粒作为脂质过氧化模型,用化学发光法分析了 D_1 对亚线粒体颗粒脂质过氧化作用,以便初步了解 D_1 的毒性作用的机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物、致伤条件及 D_1 及 D'_1 的制备

用Wistar大白鼠,雌雄不拘,体重为180~220 g,由本校动物所提供。动物致伤条件、D_1 和 D'_1 的制备见文献[1]。

1.2 实验方法

按Aprille[3]法分离鼠肝线粒体,再按Cadenas[4]法制备亚线粒体颗粒。按Lowry[5]氏法测定蛋白含量。按文献[1]方法测定线粒体呼吸功能。在SHG-Ⅰ型生物化学发光测量仪上选用Hand连续测量程序测定 D_1 诱发光的化学发光。反应体系由亚线粒体颗粒悬液,50 mmol/L PBS(pH7.35)液和 D_1 或 D'_1 所组成;总反应体积为1 ml。反应温度30℃;方法是先在测量管内加入亚线粒体悬液和PBS,并测定本底值,然后再加入诱导物 D'_1 或 D_1 启动化学发光反应并进行连续测定;测定时间为30 s×10。

1.3 统计学处理

采用本校数理统计教研室提供的医学统计程序包中单因素方差分析(PDA-2)程序在IBM-PC计算机上处理分析数据资料。

2 结果

2.1 D_1 和 D'_1 诱发鼠肝亚线粒体颗粒化学发光的动力学曲线(见图1)

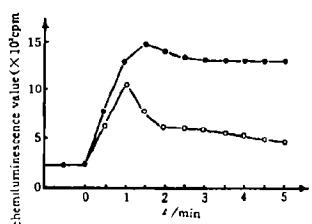


图1 D_1 和 D'_1 诱发亚线粒体颗粒化学发光

Fig 1 Chemiluminescence of D_1 and D'_1 - supplement submitochondrial particles

—·— D_1 5 mg/ml, —∘— D'_1 5 mg/ml

2.2 D_1 和 D'_1 的浓度与所诱发化学发光强度的关系(见表1)

表1 不同浓度的 D_1 和 D'_1 诱发的化学发光值($n=7$)

Tab 1 D_1 and D'_1 induced CL of submitochondrial particles ($n=7$)

Dose (mg/ml)	D'_1 $\bar{x}\pm s$ ($\times10^3$ min^{-1})	D_1 $\bar{x}\pm s$ ($\times10^3$ min^{-1})
0.25	7.0±0.6	8.7±0.5*
0.50	8.1±0.3	10.8±0.6**
1.00	9.2±0.6	13.8±1.4**
1.50	11.6±0.5	20.8±1.6**
2.00	14.2±1.5	25.7±2.6**
3.00	16.4±0.7	39.0±2.4**
4.00	17.7±1.1	55.8±1.9**
5.00	18.2±0.8	59.1±2.9**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* D'_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

2.3　SOD 对 D_1 诱发鼠亚线粒体颗粒化学发光的抑制作用结果(见表2)

表2　SOD 对 D_1 诱发亚线粒体化学发光作用($n=6$)

Tab 2　Effect of SOD on D_1 induced CL of submitochondrial particles ($n=6$)

Dose ($\mu g/ml$)	CL Value $\bar{x}\pm s$ ($10\times10^3\ min^{-1}$)	inhibitory rate $\bar{x}\pm s$ (%)
0.0	24.1±1.1	0.0
0.5	17.7±0.9*	26.5±3.8
1.0	15.7±0.6*	35.1±2.8
2.0	14.2±0.4*	41.0±2.0
4.0	13.0±0.5*	46.1±3.0
8.0	10.3±0.6*	57.4±4.3
10.0	10.1±0.8*	58.0±3.1

*：$P<0.01$，*vs* control

2.4　β胡萝卜素对 D_1 诱导的鼠肝亚线粒体颗粒化学发光的抑制作用结果(见表3)

表3　β胡萝卜素对D_1诱发亚线粒体化学发光的作用($n=6$)

Tab 3　Effect of β−carotene on D_1 induced CL of submitochondrial partioles ($n=6$)

Dose ($\mu g/ml$)	CL Value $\bar{x}\pm s$ ($10\times10^3\ min^{-1}$)	inhibitory rate $\bar{x}\pm s$ (%)
0.00	24.1±1.2	0.0
0.05	22.3±2.0*	7.4±0.6
0.10	21.1±1.1*	12.4±4.7
0.20	18.4±1.2*	23.8±4.2
0.40	15.9±0.4*	34.0±2.0
0.80	14.1±0.9*	41.5±3.6
1.60	11.2±0.6*	53.5±2.3
3.20	10.4±1.3*	57.1±5.6

*：$P<0.01$，*vs* control

2.5　不同剂量 D_1 和 D'_1 对大鼠肝脏粒体呼吸控制率 RCR 的抑制作用结果(见图2)

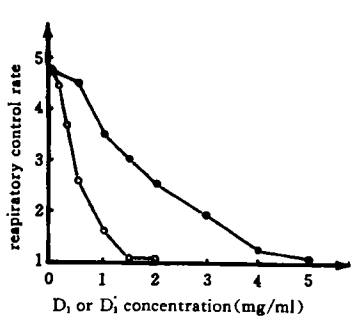


图2　D_1和 D'_1对 RCR 的作用

Fig 2　Effect of D_1 and D'_1 on RCR

—·— D'_1，—·— D_1

3　讨论

化学发光是自由基反应过程中的伴随现象，其强度可以反映自由基反应的强弱；因而用化学发光法可以判断脂质过氧化的程度及衡量自由基的浓度。亚线粒体颗粒中含有大量的多聚不饱和脂肪酸，而多聚不饱和脂肪酸的存在是脂质过氧化及其相伴随的化学发光的物质基础。因而亚线粒体颗粒是用化学发光法研究脂质过氧化的理想材料。

D_1和 D'_1是烧伤焦痂或正常皮肤提取物中含有的可溶于有机溶剂的组份即脂质。经硅酸柱层析分析测定和红外光谱分析表明：D_1的主要成份是磷脂、胆固醇、甘油三脂、脂肪酸及过氧化物，其中的毒性成份是脂肪酸和过氧化物[6]。文献报道用脂质过氧化物如氢过氧化枯烯可诱导牛心亚线粒体颗粒产生化学发光[4]。D_1和 D'_1能诱导鼠肝亚线粒体产生化学发光，可能是 D_1和 D'_1中的毒性脂肪酸和过氧化物的作用。

图1显示 D_1和 D'_1所诱发亚线粒体颗粒化学发光动力学反应曲线的上升斜率和峰值时间较接近，提示 D_1和 D'_1中所含的脂质过氧化物诱导剂成份的性质是相似的；但与 D'_1诱导的化学发光曲线相关比较，D_1诱发的化学发光峰值较高；峰值后曲线下降平坦；至5 min 时所诱导的化学发光值是 D'_1所诱发的化学发光值的3倍多；提示 D_1中过氧化物诱导剂含量大于 D'_1或含有 D'_1中所不具有的过氧化物诱导剂成份；或提示其过氧化物诱导剂种类和含量均超过 D'_1。有关二者所含过氧化物诱导剂的具体种类和含量尚待研究。

本文结果显示：当 D_1和 D'_1剂量相等时，D_1诱导化学发光作用显著大于 D'_1。5 mg D'_1/ml 的作用接近于 1.5 mg D_1/ml 的作用。说明 D_1的毒性作用显著大于 D'_1。正常机体内存在有很多抗氧化酶和抗氧化剂，由于 D'_1的毒性作用较小，它虽能引起脂质过氧化反应，但不至于对机体造成多大危害。然而，D_1的作用很强，若存在于机体内会引起较强的过氧化反应，从而造成机体组织或器官的脂质过氧化损伤。所以烧伤患者皮肤焦痂若不被及时切除，其毒性成份被机体吸收后，随血流运行至远隔的组织器官，会引起相应组织器官的继发性脂质过氧化损伤。

SOD 是一种高效抗氧化酶，它能催化超氧阴离子生成过氧化氢，从而有效地清除超氧阴离子自由基。本文结果显示 SOD 能有效地抑制 D_1诱发鼠肝亚线粒体颗粒产生的化学发光，说明 D_1诱发鼠肝亚线粒体颗粒产生化学发光过程中有超氧阴离子产生。SOD 抑制 D_1

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

诱发亚线粒体产生的化学发光是随 D_1 的浓度增加其抑制作用逐渐增强，但其最大抑制率均为58%（见表2）。其原因可能是：虽然 SOD 催化超氧阴离子生成 H_2O_2，可以抑制自由基反应，但所生成的 H_2O_2 仍然是一种自由基，仍能引起脂质发生过氧化反应。另一方面的原因可能是 D_1 诱发的亚线粒体产生化学发光的过程中，除了有超氧阴离子产生外，可能还有其它种类的自由基产生。

β 胡萝卜素是自由基的最有效的淬灭剂之一，其淬灭反应是通过能量的传递形成稳定的三线形态胡萝卜素[7]。其反应式为：

$^1O_2 + {}^1\beta$ 胡萝卜素 $\longrightarrow {}^3O_2 + {}^3\beta$ 胡萝卜素

${}^3\beta$ 胡萝卜素 $\longrightarrow \beta$ 胡萝卜素 + 热量

因而 β 胡萝卜素能有效地清除单线态氧。本文结果显示 β 胡萝卜素能有效地抑制 D_1 诱发鼠肝亚线粒体产生的化学发光反应，证实 D_1 诱发鼠肝亚线粒体颗粒产生化学发光的过程中有单线态氧的产生。

本实验虽证实 D_1 与鼠肝亚线粒体颗粒相互作用过程中有超氧阴离子和单线态氧的产生，但在此反应过程中是否还有其它种类的自由基产生尚待进一步深入研究。

图2表明 D_1 和 D'_1 对线粒体 RCR 均有抑制作用，但 D'_1 的抑制作用显著大于 D_1；RCR 完全抑制时 D'_1 的浓度为5 mg/ml；而 D_1 的浓度为1.5 mg/ml；结合5 mg D'_1/ml 诱发化学发光值接近于1.5 mg D_1/ml 所诱导的化学发光值的结果进行分析，推测 D_1 和 D'_1 对线粒体 RCR 的抑制作用可能与其诱发化学发光的强度有关。D_1 抑制线粒体呼吸功能可能是 D_1 与线粒体相互作用的过程中产生超氧阴离子和单线态氧等自由基，作用于线粒体的膜脂质成份并使之发生过氧化反应，造成线粒体呼吸键的细胞色素 c_1 和细胞色素 b 两个还原点受损所致[8]。

参考文献

1 Chen Zongrong, Xiong Ye, Lou SHufen et al. Inhibition of mitochondrial respiratory function by an organic solvent extractable component from the extract ofburn eschar. Burns, 1991;17(4):282～287

2 熊 业，陈宗荣，苟 俊等. 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

3 Aprille JR, Hom JR, Ruffs J. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. J Trauma, 1977;17:279～283

4 Cadenas E, Boveris A, Chance B. Low level chemiluminescence of bovine heart submitochondrial particles. Biochem J, 1980;186:659～667

5 Lowry CH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951;193:265～268

6 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):50～52

7 陈 瑗，周 玫. 活性氧自由基在机体内的生成及化学反应. 见：陈 瑗，周 玫，主编. 自由基与医学. 北京：人民军医出版社，1991:13～29

8 Chen Zongrong, Lou Shufen. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by D_1, an organic solvent extractable component from burn eschar. Burns, 1994;20(4):311～315

（收稿：1994-05-06；修回：1995-03-16）

Study of effects of burn eschar extract to induce fluorescence in hepatic submitochonrial paraticles in rats

Shu Chongxiang, Chen Zongrong, Lou Shufen, Liu Xiaohong (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of substances D_1, an extract of burn eschars, and D'_1, an extract from normal rat skin, to induce fluorescence in the hepatic submitochondrial particles were compared. It was found that when D_1 and D'_1 were in the same dosage, D_1 was able to induce stronger fluorescence than D'_1 and their effects were in a dosage－dependent manner. Superoxide dismutase (SOD) and beta－carotene could suppress D_1 to induce fluorescence in hepatic submitochondrial particles also in a dosage－dependent manner when the dosage of SOD was smaller than 10 μg/ml and that of beta－carotene samller than 3.2 mmol/L. These findings suggest that there is the occurrence of free radicles in the interactions between D_1 and submitochondrial particles and superoxide anions and singlet oxygen seem involved in the process.

Key words burns; eschar; fluorescence

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