DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.01.001

烧伤焦痂毒性物质提取物 D_1 对大鼠肝线粒体呼吸链的损害*

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

提 要 本文报告烧伤焦痂提取物中可溶于有机溶剂组分 D_1 对大鼠肝线粒体功能及呼吸链的损害作用。结果表明第3态呼吸受 D_1 抑制,第4态受 D_1 刺激而增高,耗氧率变化与 D_1 用量之间存在着显著的量效关系。低剂量时耗氧率的改变缓慢,高剂量时耗氧率的变化急剧。这个转折点在 D_1 浓度为1 mg/ml处。氰化羰酰-3-氟苯腙(FCCP)/第4态耗氧率比值随 D_1 浓度增加而下降,磷酸化位点1底物与位点2底物的实验结果相似,在 D_1 浓度为1 mg/ml处也存在一个比值下降坡度变化的转折点。FCCP/第4态耗氧率比值下降表示复合物Ⅰ~Ⅲ及Ⅰ~Ⅳ节段有损伤。与此相反,位点3底物实验中未见FCCP/第4态耗氧率比值变化,说明复合物Ⅳ无损伤。有关酶活力测定进一步证实上述呼吸链损伤的定位结果。受 D_1 作用后,还原型辅酶Ⅰ(NADH):细胞色素c还原酶与琥珀酸:细胞色素c还原酶活力均明显下降,但复合物Ⅰ中的NADH脱氢酶与复合物Ⅱ中的琥珀酸脱氢酶活力却无改变,说明损伤的部位很可能在复合物Ⅲ即 bc_1 complex处,有关的功能实验正在进行中。

关键词 灼伤;焦痂*;线粒体;呼吸链*;磷酸化位点*;脱偶联*
中图法分类号 R644,R329.24

我室过去的实验表明烧伤焦痂提取物中含有的可溶于有机溶剂的组分 D_1 具有抑制线粒体呼吸第3态耗氧率(QO_2S_3)及刺激第4态耗氧率(QO_2S_4)的作用,并初步认为 D_1 的毒性作用与线粒体呼吸链受损有关[1]。本文目的旨在进一步证实这种损害并探索呼吸链受损部位。

1 材料与方法

1.1 动物

采用成年Wistar大白鼠,体重200~250 g,雌雄不拘。

1.2 仪器

DU-7紫外可见光分光光度计(Beckman美国),JA-21高速低温离心机(Beckman美国),SP-2测氧仪(植物生理研究所,上海)。

1.3 试剂

谷氨酸钠,苹果酸钠,琥珀酸钠,抗坏血酸钠,四甲基对苯二胺(TMPD),鱼藤酮,抗霉素A,氰化羰酰-3-氟苯腙(FCCP),ADP等皆为Sigma产品,其他试剂为AR级。

1.4 D_1 提取

按以前报告方法进行[1,2]。取烧伤后7 d大鼠背部焦痂,除去脂肪组织,以氯仿除去附着的脂性物,切碎后与pH7.4 0.9%氯化钠液按1∶9(W/V)比例用内切式匀浆机打碎成匀浆,在4℃离心10 min(10 000×g),取中间淡黄色混浊液过滤,滤液称为焦痂粗提取液(CEBE)。用乙酸乙酯提取,在40℃水浴中挥发至干,以新鲜乙酸乙酯溶解之,在氮气流下挥发至干,为黄色油性物称为 D_1,充氮后0℃保存。

1.5 线粒体悬液制备

参阅Aprille法[3]进行,用0.25 mol·L^{-1}蔗糖溶液配成40 mg·ml^{-1}悬液。

1.6 线粒体耗氧量测定

反应系统含225 mmol·L^{-1}蔗糖,150 mmol·L^{-1} KCl,50 mmol·L^{-1} $MgCl_2$,150 mmol·L^{-1} KH_2PO_4,100 mmol·L^{-1} Tris-HCl pH7.4,温度25℃,反应体积2.2 ml。底物:位点1底物为谷氨酸钠+苹果酸钠各5 mmol·L^{-1}(皆为最终浓度,下同)。位点2底物为琥珀酸钠(5 mmol·L^{-1}),先加鱼藤酮4 μg以阻滞来自位点1的电子。位点3底物为抗坏血酸钠(1 mmol·L^{-1}+TMPD(0.1 mmol·L^{-1}),先加入鱼藤酮4 μg,抗霉素A 1 μg以阻滞位点3以前传来的电子,所用的阻滞剂皆为1 mg·ml^{-1}的乙醇溶液。经测试,如此微量的乙醇加入到反应体系内不致影响耗氧量测定。

将 D_1 用0.1 mmol·L^{-1}磷酸钾缓冲液(pH7.4)配成50,100,500,666,832 μg·ml^{-1}及1,1.5,2,3 mg·ml^{-1}的系列稀释液保存于4℃备用。

D_1 与线粒体悬液各50 μl先于25℃水浴中保温3 min,然后加入底物10 μl,1 min后加入ADP(0.088 mol·L^{-1})2 μl,待ADP用完后再加入ADP 4 μl,记录 QO_2S_3 及 QO_2S_4,加入脱偶联剂FCCP(1 μg·μl^{-1})2 μl,记录脱偶联呼吸耗氧量(QO_2Fc),计算 QO_2S_3/QO_2S_4 及 QO_2Fc/QO_2S_4 比值。

1.7 酶活力测定

按Beaufay法[4]测NADH:细胞色素c还原酶活力,Galante及Hatefi法[5]测NADH脱氢酶活力,King[6]法测琥珀酸:细胞色素c还原酶活力,Acrell法[7]测琥珀酸脱氢酶活力,以牛血清白蛋白为标准,按Lowry法[8]测线粒体蛋白含量。

1.8 统计学处理

用第三军医大学数学教研室医用统计软件包中PDA-2分别对数据加以单因素方差分析,显著性测定结果以 $*P<0.05$,$**P<0.01$,$***P<0.001$ 三档表示。

* 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

2 结果

2.1 线粒体耗氧量

除 QO_2Fc/QO_2S_4 比值实验系用3种位点底物外，皆以琥珀酸钠为底物。以琥珀酸钠为底物时线粒体呼吸耗氧率正常值为 QO_2S_3 188.7±61.2 ng atoms O $min^{-1}\cdot mg^{-1}$ ($n=9$)，QO_2S_4 45.2±15.1 ng atoms O $\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$ ($n=9$)，QO_2Fc 227.2±68.2 ng atoms O $min^{-1}\cdot mg^{-1}$ ($n=9$)，QO_2S_3/QO_2S_4 4.7±0.7 ($n=9$)，QO_2Fc/QO_2S_4 5.4±0.8 ($n=9$)，以上皆为 $\bar{x}\pm s$。

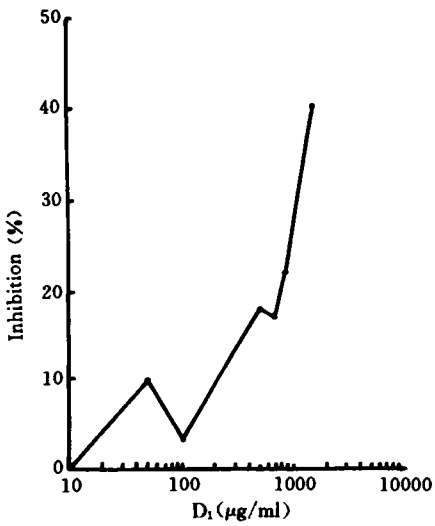


图 1 D_1对线粒体第3态呼吸的作用

Fig 1 Effect of D_1 on QO_2S_3

2.2 D_1对第3态呼吸的抑制作用

以琥珀酸钠为底物，在与不同浓度 D_1 温育后 QO_2S_3 逐渐下降，当 D_1 浓度达到1.5 mg·ml^{-1}时，QO_2S_3 为对照值的59.9%，约下降了40%(图1)。

2.3 D_1对 QO_2S_4 的刺激作用

以琥珀酸钠为底物，受不同剂量 D_1 作用后 QO_2S_4 增加。在低剂量时增加缓慢，当 D_1 的浓度增加到1.5 mg·ml^{-1}时，QO_2S_4 迅速增加，达对照值的2倍(图2)。

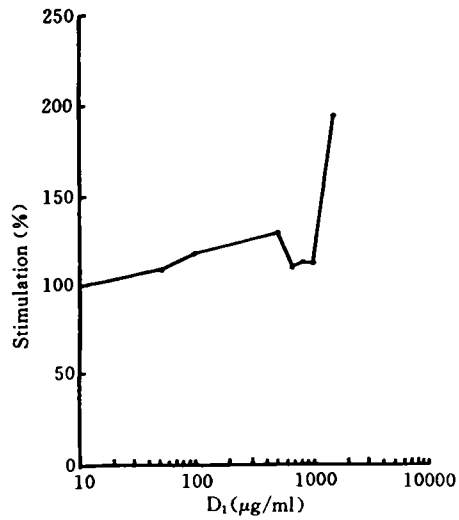


图 2 D_1对线粒体第4态呼吸的作用

Fig 2 Effect of D_1 on QO_2S_4

2.4 D_1对 FCCP 脱偶联呼吸及 QO_2Fc/QO_2S_4 比值变化

加入 FCCP 后，耗氧率增加，在大剂量 D_1 作用下，QO_2Fc 所引起的耗氧量增加的幅度较未加 D_1 时增加的幅度为小，但用位点3底物时，则与对照组值差异不大。用位点1，2，3底物测试，计算 QO_2Fc/QO_2S_4 之比值的结果，如图3所示(图3)。

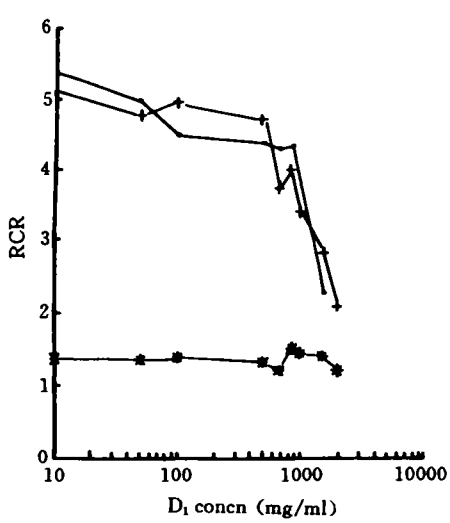


图 3 D_1对 FCCP 刺激呼吸值与第4态呼吸的比值

Fig 3 Effect of D_1 on QO_2Fc/QO_2S_4 ratio

2.5 D_1对线粒体呼吸链复合物酶活力的影响

分别用 D_1 及按同样方法制备的正常皮提取物 D_1'(皆为1 mg·ml^{-1})作用于正常肝线粒体(40 mg·ml^{-1}，0℃，10 min)后测复合物 Ⅰ～Ⅱ(NADH：细胞色素 c 还原酶)及复合物 Ⅱ～Ⅲ(琥珀酸：细胞色素 c 还原酶)活力。

图4中可见 NADH：细胞色素 c 还原酶活力有明显降低，琥

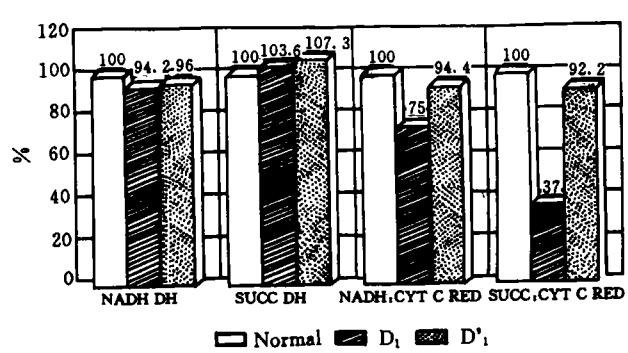


图 4 D_1(D_1')对有关酶活力的作用

Fig 4 Effect of D_1(D_1') on enzymes

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

珀酸：细胞色素 c 还原酶活力的下降尤为明显。同样剂量 D_1' 处理后，这两种酶活力与正常组值相比无明显差异（$P>0.05$）。

复合物 I 中的 NADH 脱氢酶和复合物 II 中的琥珀酸脱氢酶活力无明显变化（$P>0.05$）。

3 讨论

D_1 作用于线粒体后，可抑制线粒体第3态呼吸，刺激第4态呼吸，抑制及刺激过程皆可分为2个相：在低剂量 D_1 作用时变化较为缓慢，当 D_1 剂量达1 $mg \cdot ml^{-1}$ 时，作用突然变强，曲线斜度加大，有呈 S 形曲线之趋势。

用脱偶联剂 FCCP 刺激后，耗氧率增加。其耗氧值与第4态耗氧值之比值随 D_1 剂量增加而下降，其曲线可分为缓慢下降与迅速下降2个阶段，其转折点与第3态及第4态耗氧率的变化点相同，磷酸化位点1与位点2底物实验结果相同。

在位点3底物实验中，脱偶联呼吸（QO_2Fc）与第4态呼吸耗氧率之比值始终保持恒定。前文[3]中提及用脱偶联剂二硝基酚（DNP）处理后，线粒体呼吸耗氧率增高，可被 D_1 所抑制。这种抑制表明呼吸链受了损害。本文中用另一种脱偶联剂 FCCP 得到同样结果，位点1与位点2底物实验中 FCCP 刺激呼吸与第4态耗氧值比值的下降与 D_1 剂量呈量效关系，且存在一个明显的转折点，表明复合物 I～III 及 I～III 节段有损伤。与此相反，在位点3底物实验中，在 D_1 作用后，不出现脱偶联呼吸耗氧值与第4态呼吸耗氧值之比的变化，表明呼吸链最末端的复合物 IV——细胞色素 c 氧化酶未受损害。我室以前观察过烧伤后7 d 大鼠肝线粒体细胞色素 c 氧化酶活力无变化[2]，在此得到进一步证实。

损伤很可能是在复合物 I～III 和复合物 I～III 节段内。既然复合物 I 中 NADH 脱氢酶与复合物 II 中的琥珀酸脱氢酶活力均不受 D_1 处理的影响，则损害的部位很可能在复合物 III 节段中即 bc_1 complex，有关的定位实验将另文报告。

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 of burn eschar. Burns, 1991,17(4):282～287

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

3 Chen Zongrong. Effect of lipid peroxidation on mitochondrial functions in rats after burn injury. In: "Advances in Free Radical Biology and Medicine". 方允中，主编. 北京：原子能出版社，1991. 271～288

4 Beaufay H, Amar－Costecsec A, Feytmans E, et al. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membrane from rat liver. J Cell Biol, 1974, 61:188

5 Galante YM, Hatefi Y. Resolution of complex I and NADH dehydrogenase and an iron-sulfur protein. In: "Methods in Enzymology". Vol. 53 Fleisher S and Packer L. (eds). New York: Aeademic Press, 1978. 15

6 King TE. Preparation of succinate－cytochrome c reductase and cytochrome bc_1 complex particle and reconstitution of succinate－cytochrome c reductase. In: "Methods in Enzymology". New York: Academic Press, 1967. 216

7 Acrell BAO. Mammalian succinate dehydrogenase. In: "Methods in Enzymology". Vol. 53. Fleisher S and Packer L. (eds). New York: Academic Press, 1978:18

8 Lowry CH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193:265

（收稿：1993-08-26；修回：1993-12-20）

A study on the damages of a burn eschar extract to mitochondrial respiratory chain in the rat

Chen Zongrong, Lou Shufen, Shu Chongxiang, Liu Xiaohong (Lab of Combined Injury Research, Department of Radiation Medicine, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of substance D_1, an extract from burn eschars, on hepatic mitochondrial respiratory function and the damages to the respiratory chain were studied in the rat. The rate of state 3 and state 4 respiration, the FCCP-stimulated respiratory rate, the respiratory control ratio, and the ratio between FCCP rate and state 4 rate were determined and the activities of NADH: cytochrome c reductase, succinate: cytochrome c reductase, NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase were measured.

It was found that D_1 inhibited state 3 respiratory but stimulated state 4 respiration. There was a dosage-effect relationship between the dosage of D_1 and the changes of the rate of oxygen consumption. The turning point was at the D_1 concentration of 1 mg/ml.

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

The ratio of FCCP-stimulated rate with state 4 rate was decreased when the dosage of D_1 increased. The experimental results were similar if glutamate, malate or succinate was used. The turning point of the ratio-decreasing gradient was at the D_1 concentration of 1 mg/ml. The decrease of FCCP-stimulated rate and state 4 rate indicates that there are damages to the respiratory chain. Cytochrome oxidase, the terminal segment of the chain, was intact. Therefore, the damage might occur somewhere in complexes Ⅰ～Ⅲ and Ⅲ～Ⅳ.

The activities of NADH: cytochrome c reductase and succinate: cytochrome c reductase were both markedly inhibited while those of NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase remained intact. These findings suggest further that the damage might occur in complex Ⅲ, the bc_1 complex.

Key words burns; eschar; mitochondria, liver; respiratory chain; phosphrylation site; uncoupling

实验性胆源性脓毒症时肝脏代谢反应及其调控机制的改变

董家鸿 黄志强 王敖川 韩本立 蔡景修 （第三军医大学西南医院肝胆中心）630038

胆源性脓毒症是各种胆道病的常见并发症和首要致死原因之一。胆源性脓毒症时，肝脏功能早期损害可能是此症恶性发展并导致多器官衰竭的病理基础。肝脏在维持脓毒症状态下宿主代谢稳态中起着十分重要的作用。但是，胆源性脓毒症时肝脏代谢反应及肝损害的代谢病理过程尚不清楚。本实验设计了一种新的胆源性脓毒症动物模型，并借助这一模型对胆源性脓毒症期间肝脏能量代谢、糖异生功能及与之相关的肝细胞膜腺苷酸环化酶系统信息转导功能的动态变化进行了一系列研究，主要结果如下：

（1）在兔右侧叶肝管开口近侧结扎总肝管并注入2×10^8 E. Coli 可诱发类似临床病人的胆源性脓毒症；此模型具有病程进展迅速、胆道高压、胆血屏障破坏、持续菌血症、血压降低、外周血白细胞减少、代谢性酸中毒、低血糖、高乳酸血症、肝内显著炎症反应和早期肝损害等临床病理特征，其48 h 内病死率为60.0%。此模型具有复制方法简单、重复性好和易于标准化等特点，适用于胆源性脓毒症的发病机制及治疗方法的实验研究；尚可籍此模型同时观察和比较胆源性脓毒症和腹腔脓毒症在肝脏产生的不同病理效应。在这一胆源性脓毒症模型上，始于感染肝叶而波及非感染肝叶的全身性炎症反应可能是肝脏功能损害发生发展的病理机制之一。

（2）兔胆源性脓毒症早期（12 h）感染肝叶线粒体Ⅲ态呼吸速率、呼吸控制比（RCR）及磷氧比即显著降低，而非感染肝叶RCR 却显著升高；随病程进展，感染肝叶线粒体呼吸功能损害加重，而非感染肝叶线粒体呼吸功能也由代偿增强转为持续抑制。肝组织内 ATP 含量与其线粒体呼吸功能改变呈同步降低。动脉血酮体比值（KBR）自病程早期即随感染肝叶线粒体功能抑制而进行性降低。这一结果表明，实验性胆源性脓毒症时肝线粒体能量代谢功能早期受累且持续抑制，动脉血 KBR 是反映早期肝损害的灵敏指标。

（3）在本实验条件下，胆源性脓毒症时血糖水平呈双相变化，即早期高血糖继之以持续低血糖。在病程早期的高血糖相、感染和非感染肝叶肝细胞糖异生功能即已降低，表现为在胰高糖素和肾上腺素刺激下肝细胞糖异生速率增加的幅度呈不同程度地减低；在病程后期低血糖相，感染肝叶和非感染肝叶肝细胞糖异生功能及对糖异生激素的低反应性更形显著；此时体内高水平分解代谢激素和糖异生底物的代谢环境也不能维持肝脏糖异生功能，这可能是低血糖相的主要成因。地塞米松对胆源性脓毒症所致肝细胞糖异生功能损害和低血糖具有一定的保护作用。

（4）在胆源性脓毒症状态下，动物感染肝叶和非感染肝叶细胞膜腺苷酸环化酶系统的功能完整性先后受损；感染肝叶内这一系统的各功能组分呈一致性显著抑制；而在非感染肝叶内，这一系统的信息转导功能障碍首先发生在受体与环化酶之间的偶联环节上，β－肾上腺素受体密度降低只见于病程晚期，而环化酶本身的活性在所观察的48 h 内尚未显抑制。无论感染肝叶或非感染肝叶，其膜腺苷酸环化酶系统信息转导机能障碍均与相同肝叶内肝细胞对糖异生激素的反应性低下及糖异生功能抑制相同步，这提示肝细胞对胰高糖素和肾上腺素的抵抗与膜环化酶系统功能损害有关。

综合本系列实验研究结果，可以看出，胆源性脓毒症期间感染肝叶与非感染肝叶的代谢功能及其调控机制相继受损；与非感染肝叶相比，感染肝叶损害早而重，这表明胆源性脓毒症时肝脏代谢功能损害较一般腹腔脓毒症者更早更重。由严重胆道感染始动的全身脓毒性反应可介导自身损害加重并累及肝外器官。胆源性脓毒症早期发生的肝脏代谢障碍将会导致宿主代谢危机以至发生多器官衰竭，这可能是临床上胆源性脓毒症常呈现出以急性肝损害为先导的多器官衰竭的高危病程的病理基础。

关键词 线粒体，肝/代谢；腺苷三磷酸；受体，肾上腺素能，β；地塞米松；胆源性脓毒症*；兔

中图法分类号 R575；R363.21

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