DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.04.008

烧伤及烧伤焦痂脂类对大鼠肝线粒体脂肪酸含量的影响

熊 业 陈宗荣 (第三军医大学卫防系防原教研室) 630038
苟 俊 李才安 (第三军医大学训练部中心实验室) 630038

提 要 我们用气相色谱法分析了 15% Ⅱ度烧伤、烧伤焦痂脂类(D1)和正常皮肤脂类(D'1)对大鼠肝线粒体脂肪酸含量的影响。结果表明烧伤后第 7 天大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。D1 和 D'1 能使孵育体系中离体肝线粒体不饱和脂肪酸含量下降和饱和脂肪酸含量上升,但 D1 的作用大于 D'1,使不饱和脂肪酸含量下降更明显。本文讨论了烧伤后和 D1 及 D'1 使线粒体不饱和脂肪酸含量下降的可能机理。

关键词 灼伤;脂类;线粒体;脂肪酸类;色谱法,气相

本室以前的研究证明烧伤后肝线粒体呼吸功能障碍可能与脂质过氧化作用有关[1]。又发现烧伤焦痂脂类组分(D1)对正常鼠肝线粒体呼吸功能产生明显的抑制[2]。但是烧伤及 D1 对线粒体呼吸功能抑制的机理尚不完全清楚。本文用气相色谱法分析了烧伤及 D1 对线粒体脂肪酸含量的影响,以便初步了解烧伤时线粒体呼吸功能障碍的部分机理。

1 材料和方法

1.1 试剂

脂肪酸标准品:十七烷酸(C17:0)为 Sigma 产品,豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)和花生四烯酸(C20:4)由本校生化教研室许霖水教授馈赠。三氟化硼-乙醚液(46.8%~47.8%)为化学纯。其它试剂为分析纯。

1.2 动物

Wistar 系大鼠,雌雄不拘,体重 200±20g,购自四川省中药研究所。

1.3 方法

1.3.1 烧伤条件、烧伤焦痂脂类(D1)和正常皮肤脂类(D'1)的制备见前文[2]。丙二醛测定见前文[1]。

1.3.2 肝线粒体按 Aprille 法制备[3]。

1.3.3 孵育体系:将 0.1ml 正常肝线粒体悬液(蛋白浓度为 40mg/ml)与 0.1ml 不同浓度的 D1 或 D'1 悬液(用 pH7.4 的 0.1mol/L PBS 配制)混合,在 0℃孵育 10min。

1.3.4 脂肪酸分析:用氯仿/甲醇提取线粒体总脂[4]。甲酯化试剂为 14%三氟化硼-乙醚/甲醇液。气相色谱条件:岛津 GC-7A 气相色谱仪带 HP3940 型积分记录仪,氢焰检测器。填充柱:4mm×1.6m 玻璃柱,10%DEGS+10%OV-225,60~80 目 Gas chromosorb WAW-DMCS。柱温:196℃。汽化室及检测器温度:270℃。载气:N_2,40ml/min。空气及氢气流速:0.5kg/cm²。进样量 1μl。根据标准品甲酯和样品甲酯的保留时间来确定样品各脂肪酸的性质[5]。定量所用内标物为十七烷酸。

1.4 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析判断各组均数间差别的显著性。

2 结果

2.1 烧伤后大鼠肝线粒体脂肪酸含量变化

正常大鼠肝线粒体 6 种脂肪酸总量为 222.05±25.55μg/mg 蛋白($n=13$),烧伤后第 7 天肝线粒体 6 种脂肪酸总量为 205.38±33.58μg/mg 蛋白($n=13$)。脂肪酸总量变化不明显,但烧伤后肝线粒体不饱和脂肪含量显著下降。从正常值 128.14±10.66μg/mg 蛋白降至 93.77±18.57μg/mg 蛋白。各脂肪酸含量见表 1。

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

表 1 烧伤后第 7 天大鼠肝线粒体脂肪酸含量变化（$n = 13$）

脂肪酸	对照组（$\bar{x} \pm s$）	烧伤组（$\bar{x} \pm s$）
14:0	2.13±0.47	2.73±0.31
16:0	60.95±8.26	73.43±11.69*
18:0	30.83±6.16	35.45±3.01
18:1	17.23±2.62	10.18±3.21*
18:2	40.76±4.96	30.11±4.69*
20:4	70.15±3.08	53.48±10.67**

注：数据单位为 μg/mg 蛋白

与对照值比，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$

2.2 D1 和 D'1 对正常大鼠肝线粒体脂肪酸含量的影响

D1 和 D'1 中除含有 C14:0、C16:0、C18:0、C18:1、C18:2 和 C20:4 外，还含有尚未鉴定的低碳脂肪酸。D1 和 D'1 中上述 6 种脂肪酸总量分别为 378.63±18.30 和 678.22±49.77μg/mg D1（或 D'1）（$n = 5$），其中不饱和脂肪酸的含量分别为 158.92±9.19 和 321.15±20.52μg/mg D1（或 D'1）。由于 D1 和 D'1 为脂类，在计算孵育体系中线粒体各脂肪酸含量时要减去 D1 和 D'1 中所含的各脂肪酸含量。在相同浓度时，D1 使线粒体不饱和脂肪酸含量下降的程度明显大于 D'1（见表 2）。

表 2 D1 和 D'1 对线粒体脂肪酸含量的影响（$n = 5$）

组别	脂肪酸（$\bar{x} \pm s$） 14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	20:4
对照组	1.58±0.43	60.26±4.09	28.39±2.21	16.55±1.05	40.48±1.86	71.04±1.33
D'1(2mg/ml)	2.60±0.25*	69.91±2.66*	37.07±2.83**	13.56±0.72	24.95±1.90**	52.73±3.55*
D1(2mg/ml)	2.79±0.41*	75.33±3.59**	49.10±5.04**△△	11.75±0.58*	19.15±1.52**△	43.75±2.51**△△
D'1(1mg/ml)	2.11±0.15	63.03±2.22	32.62±1.34	14.09±0.73	29.84±1.05*	60.82±2.52
D1(1mg/ml)	2.51±0.11*	69.46±2.69*△	39.31±2.13**△	13.14±0.61	26.65±1.99*	54.29±1.42*△

注：数据单位：μg/mg 蛋白

与对照比：*$P < 0.05$，**$P < 0.01$；与相同浓度 D'1 比：△$P < 0.05$，△△$P < 0.01$

3 讨论

本实验结果表明 15% Ⅲ度烧伤后第 7 天大鼠肝线粒体不饱和脂肪酸的含量从正常的 128.14μg/mg 蛋白降至 93.77μg/mg 蛋白，其中花生四烯酸从正常的 70.15μg/mg 蛋白降为 53.48μg/mg 蛋白，下降了 24%。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化偶联能力和 Pi/ATP 交换能力[6]。以前的实验发现 15% Ⅲ度烧伤后鼠肝线粒体呼吸功能下降[1]。提示在此伤情下线粒体中不饱和脂肪酸减少可能是线粒体呼吸功能异常的原因之一。

烧伤后大鼠肝线粒体不饱和脂肪酸含量下降的机理不完全清楚，可能与烧伤后线粒体膜脂的过氧化损害有关，后者是烧伤后自由基产生增多和抗氧化剂含量下降的结果[1]。

已经证明烧伤和烫伤皮肤中毒物可明显抑制离体线粒体呼吸功能[2,7]，其抑制作用的机理尚不明了。经硫代巴比妥酸法测定 D1 中含有较多的脂质过氧化物终产物丙二醛（3.63±0.54nmol MDA/mg D1，$n = 5$），D'1 中丙二醛含量较少（1.85±0.32nmol MDA/mg D'1，$n = 5$），提示 D1 及 D'1 中可能存在一定量的脂质过氧化物（LPO）。LPO 易被过渡金属离子作用生成脂氧自由基，引起自由基链式反应。D1 及 D'1 中的 LPO 可被线粒体中过渡金属离子（如 Fe）均裂产生自由基引起过氧化

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

损害，这可能是 D1 及 D'1 使线粒体不饱和脂肪酸含量下降的部分原因。由于 D1 中 LPO 含量高于 D'1 中 LPO 含量，故 D1 使线粒体不饱和脂肪酸含量下降的程度大于 D'1(表 2)。Sevanian 等[8]发现氢过氧化枯烯与脂质体在 37℃温育时可引起脂质体中脂质过氧化物增加，脂质体中多不饱和脂肪酸含量下降，而饱和脂肪酸含量上升。这说明脂质发生过氧化后容易被降解。

烧伤焦痂中毒性脂类可能是正常皮肤中脂类受热损伤后产生的或/和增加的，吸收后可引起线粒体呼吸功能异常[7]。结合文献资料[1,2,7]，我们认为烧伤后及时切痂，适当补充抗氧化剂，有利于减轻严重烧伤时线粒体功能损害，保护细胞功能。

(本文经本校生化教研室许霖水教授审阅，本室舒崇湘讲师协助数据统计处理，特此致谢。)

参考文献

1. 熊业 陈宗荣。放烧复合伤时小鼠肝线粒体呼吸功能障碍与脂质过氧化作用。第三军医大学学报，1991；13(5)：439
2. Chen ZR，Xiong Y，Wang SB，et al. Inhibition of mitochondrial respiratoryfunction by an organic solvent extractable component from an extract of burn eschar. Burns，1991；17(4)：282
3. Aprille JR，Hom JA，Rulfs J. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. J Trauma，1977；17：279
4. Bligh EG，Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Biophys，1959；37：911
5. 孙传经著。气相色谱分析原理与技术。北京：化学工业出版社，1979：233
6. Daun G. Lipids of mitochondria. Biochim Biophys Acta，1985；822：1
7. Suzuki K，Aoyama H，Izawa Y. Isolation of a substance toxic to mitochondrial function from the burned skin of rats. Burns，1981；8：110
8. Sevania A，Wratten ML，McLeod LL，et al. Lipid peroxidation and phospholipase A_2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids. Biochim Biophys Acta，1988；961：316

(收稿：1991-11-22；修回：1992-01-23)

Effects of burn injury and eschar lipids on hepatic mitochondrial content of fatty acid in rats

Xiong Ye，Chen Zongrong et al (Department of Radiation Medicine，Third Military Medical College，Gaotanyan Chongqing，630038)

Abstract The fatty acid content of liver mitochondria was quantitatively determinde with gas chromatography in rats after they were inflicted with 15% TBSA full thickness burns or after the liver mitochondria were incubated with lipids extracted from eschar tissue (D1) or from normal skin of rats (D'1). It was found that after burn injury，the content of unsaturated fatty acid of liver mitochondria decreased and that of saturated fatty acid increased significantly. Both D1 and D'1 decreased the content of unsaturated fatty acid and the decrease would be more significant when the concentration of eschar lipids or skin lipids was increased. D1 reduced the unsaturated fatty acid content more significant than D'1 when the two were in same concentration.

The possible mechanism of the decrease of unsaturated fatty acid in the liver mitochondria induced with burn injury，eschar lipids or normal skin lipids was discussed briefly.

Key words burns；lipids；mitochondrion；fatty acids；chromatography，gas

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