DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.02.001

论 著

焦痂提取液中丙二醛含量对线粒体呼吸及内膜能化作用的影响

陈宗荣 王松保 董 燕 （卫防系 复合伤研究室）

摘 要 大鼠背部20%光辐射Ⅲ度烧伤7天后的焦痂提取液及1:4、1:8稀释液能对正常大鼠肝线粒体呼吸产生明显的抑制作用，相同方法制成的正常皮提取液只呈轻度抑制，1:4稀释液已无抑制作用，两者丙二醛含量相差悬殊，丙二醛含量与抑制率呈相关，但进一步分析表明这种相关为共存现象。丙二醛含量增高不是呼吸率下降的直接原因。丙二醛增高与膜脂双层的破坏有关，内膜能化作用实验表明，当膜脂受到一定程度破坏时，能化作用受到抑制。然而在能化作用未表现异常时，呼吸率已呈一定程度抑制，故呼吸率抑制还受到提取液其他组分的影响。

关键词 线粒体，肝；丙二醛；抑制；呼吸控制率；内膜能化作用；焦痂提取液

我室前已报道了重度烧伤晚期线粒体功能及ATP合成受到明显抑制[1]，焦痂提取液中含有抑制线粒体呼吸功能及内膜能化作用的物质[2]以及烧伤后血浆、焦痂、肝线粒体和微粒体中脂质过氧化物（以丙二醛为代表）值升高[3]。本文目的在研究在体外系统中丙二醛（MDA）浓度与线粒体呼吸功能及内膜能化作用之间的关系，并观察外源性MDA能否产生类似的抑制作用。

材 料 与 方 法

雄性Wistar种大白鼠，体重200～250g，剃去背部毛，以5KW溴钨灯造成占体表面积20%的Ⅲ度烧伤。7天后切下焦痂，按前文所述方法制备焦痂粗提取液及正常大鼠皮提取液[2]各分装50份，每份1ml。于小瓶内充满氮气后塞紧，以防脂质过氧化作用进一步进行。4℃冰箱保存。按前文方法制备肝线粒体，测定其功能及内膜能化作用[1]。按Ohkawa法测定提取液中MDA浓度[4]。按Kwon法制备MDA[5]，加入到反应体系中，以观察是否产生抑制作用。

所有数据均经Student's t单侧检验，用回归方法检验线粒体呼吸抑制率与MDA浓度的关系。

结 果

1. 正常皮肤与焦痂提取液MDA含量与正常线粒体呼吸功能的关系 用不同稀释度正常皮与焦痂提取液分别与取自同一份肝脏的线粒体悬液作用10 min（0℃）后，测线粒体MDA含量及呼吸控制率（RCR）的抑制百分率。结果见表1。

表1 正常皮与焦痂提取液对线粒体呼吸功能的影响

实验组别	MDA最终浓度 nmols dm^{-3} $\bar{X}\pm SEM$	呼吸控制率（$\bar{X}\pm SEM$） 处理前	处理后	抑制率%	P
正常皮提取液（1:2）	20.22 ± 3.41	4.69±0.24	3.61±0.24**	22.76±6.49	<0.001
正常皮提取液（1:4）	10.11 ± 1.71	4.69±0.24	4.38±0.17**	6.33 ±3.63	<0.02
焦痂提取液 （1:4）	256.33±35.27	4.69±0.24	2.94±0.33**	37.54±4.83	<0.001
焦痂提取液 （1:8）	128.16±17.64	4.69±0.24	3.61±0.27**	23.08±4.41	<0.001
焦痂提取液 （1:16）	64.08 ± 8.82	4.69±0.24	4.47±0.24NS	5.12 ±6.40	<0.2

各组实验次数 n=8，p值为各组处理前后RCR相差的机率；* 处理后与处理前值相比较差异有显著意义（P<0.05）；** 处理后与处理前值相比较差异有非常显著意义（P<0.01）；NS处理前后相差无统计学意义

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

从表1可见各组处理前后RCR值有所变化。正常皮1:2、焦痂1:4、1:8稀释液处理后的抑制作用非常显著，正常皮1:4稀释液的抑制作用虽有统计学意义，但其变化幅度太小，焦痂1:16稀释液处理后未出现抑制现象，在产生RCR抑制的组内，正常皮1:2稀释度与焦痂1:2稀释度所产生的抑制程度相差甚远，因焦痂1:2液使线粒体呼吸脱偶联(RCR<1，数据未列出)；与焦痂1:4稀释液相比，仅为焦痂(1:4)液抑制程度的60.63%($P<0.0005$)，与焦痂1:8液的抑制程度相比，无显著差异。稀释度相同(1:4)的两种提取液作用相比，正常皮提取液的抑制度仅为焦痂提取液的16.86%($P<0.0005$)。

以抑制百分率为y，MDA最终浓度(nmols dm^{-3})为x，取x的自然对数ln x为横坐标作相关分析，得$y=2.9303+0.0545x'$ ($x'=\ln x$)，$r=0.601$。查表在$\alpha=0.05$水平时r应大于0.312，在$\alpha=0.01$水平时r应大于0.403。现实验结果$r=0.601$，故RCR抑制率与反应系统中MDA最终浓度密切相关，且相关非常显著。然而进一步分析表明MDA最终浓度并不是产生抑制的主要因素。除前述的分析外，焦痂(1:16)稀释液对RCR已不呈抑制作用，但其MDA最终浓度却为正常皮(1:2)稀释液(抑制率22.76%)中MDA最终浓度的3.17倍。因此，可以认为MDA含量的升高是一个并存现象，不存在MDA浓度与抑制率大小的因果关系。

2.外源性*MDA*对正常线粒体呼吸的影响

表2显示MDA对线粒体呼吸的作用。在2次实验中，MDA最终浓度为800 nmols dm^{-3}，最高为2000 nmols dm^{-3}，作用的时间分别为10～90 min，作用前与作用后的RCR之间无差异。

表2 外源性MDA对正常线粒体呼吸的影响

实验号	MDA最终浓度 nmols dm^{-3}	在0℃孵育时间 (min)	RCR 孵育前	RCR 孵育后
1	800	10	4.66	4.83
	800	40		4.77
	800	60		4.77
	800	90		4.83
	2000	10		4.76
2	1600	10	4.00	4.07
	1600	30		4.00
3	1600	10	4.83	4.53
	1600	30		4.47

3.外源性*MDA*与正常皮提取液作用后对线粒体呼吸的影响　从表3可看出加入MDA后，单加入的MDA最终浓度已达800 nmols dm^{-3}(不计正常皮提取液中MDA含量)，在0℃与线粒体孵育10～45 min，亦未对线粒体呼吸产生抑制作用。

表3 外源性MDA加正常皮稀释液后对线粒体呼吸的影响

实验号	正常皮稀释度	外源性MDA最终浓度 nmols dm^{-3}	0℃孵育时间 (min)	RCR 孵育前	RCR 孵育后
1	(0.5 nmol dm^{-3} EDTA 0.9% NaCl对照)	0	10	4.83	4.53
	1:2	0	10		3.33
	1:4	0	10		4.51
	1:4	800	10		4.51
	1:4	800	45		4.70
	1:4	800	60		4.68
2	EDTA盐水对照合上	0	10	4.63	4.15
	1:4	0	10		3.68
3	1:8	0	10	3.68	3.55
	1:4	1000	10	3.68	2.95
	1:8	500	10		3.59
4	EDTA盐水对照	0	10	3.88	3.95
	1:2	0	10		3.95
	1:2	0	10		4.00
	1:2	0	10		3.55
	1:2	800	10		3.28
	1:4	0	10		3.86
	1:4	800	10		3.93

4.正常皮与焦痂提取液中*MDA*含量与内膜能化作用间的关系　在内膜能化实验中仍按前述方法稀释提取液，并与等量线粒体(40 mg/ml)一起在0℃孵育10 min，将0.075 ml加入到反应系统中，最终体积为3ml。表4显示在各稀释度组实验中MDA在反应系统中最终浓度，内膜能化前后峰左移的幅度和峰值下降之差。

从表4可以看出正常线粒体内膜能化作用与放置6h后，在峰左移及峰值下降方面均无明显差异。正常皮提取液原液峰左移幅度为正常值的67.5%($P<0.05$)、1:2及1:4稀释液对峰左移幅度无影响。焦痂提取液原液、1:2、1:4稀释液分别使峰左移的幅度下降到正常值的0、2%及49.1%($P<0.01$)，1:8稀释液未产生峰左移幅度的变化。正常皮提取液与1:2、1:4稀释度均未产生峰值下降幅度减少的影响。焦痂原液可使峰值下降幅度减少为正常下降幅度的81.1%($P<0.05$)，其他稀释度未产生明显影响。

从表4还可以看出反应系统中MDA最终浓度

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

与能化后峰左移幅度有某种相关。正常皮提取液实验中，相关系数为−0.4341，无统计意义；焦痂提取液实验中，r=−0.7136，为负相关，在α=0.01水平有显著意义。在峰值下降幅度方面，正常皮和焦痂提取液组均与MDA最终浓度呈负相关，r值分别为−0.4616及−0.6721，分别在α=0.05水平及α=0.01水平有显著意义。

表4 正常皮提取液和焦痂提取液中MDA含量对线粒体内膜能化作用的抑制

组别	实验次数	最大峰位置 nm			最大峰值			MDA最终浓度 nmols dm^{-3}
		能化前	能化后	差量	能化前	能化后	ΔE	
正常线粒体	8	521.6±0.5	501.1±0.5	20.6±0.2	0.7199±0.0195	0.4072±0.0542	0.3146±0.0429	
正常线粒体0℃放置6h	8	521.8±0.8	501.1±1.0	20.9±1.4	0.8080±0.0559	0.4903±0.0380	0.3193±0.0364	
正常皮提取液（原液）	8	522.2±0.6	508.3±7.5	13.9±7.3	0.7833±0.0584	0.4644±0.0653	0.3196±0.0270	25.3±4.3
正常皮提取液（1:2）	8	522.4±1.0	501.8±1.4	20.7±1.8	0.7834±0.0359	0.4523±0.0467	0.3318±0.0320	19.0±7.2
正常皮提取液（1:4）	4	522.4±0.4	501.8±0.8	20.6±0.6	0.7860±0.0322	0.4458±0.0405	0.3402±0.0091	62 ±1.0
焦痂提取液（原液）	5	522.5±0.6	523.2±0.8	(−0.7)	0.7850±0.0182	0.5299±0.0378	0.2552±0.0238	618.5±77.2
焦痂提取液（1:2）	8	522.3±0.4	521.8±3.2	(0.5)	0.7897±0.0466	0.4824±0.0578	0.3072±0.0300	320.4±44.1
焦痂提取液（1:4）	8	522.6±0.6	512.4±8.5	10.1±8.6	0.8196±0.0407	0.5168±0.0480	0.3032±0.0184	160.2±22.0
焦痂提取液（1:8）	6	522.4±0.4	502.2±1.0	20.0±1.0	0.8007±0.0595	0.4708±0.0401	0.3315±0.0259	83.9±9.9

讨　论

正常线粒体与正常皮提取液或焦痂提取液在0℃孵育后，均可产生对呼吸控制率的抑制。但两者在开始产生抑制时的稀释度、产生抑制现象的稀释度范围、同一稀释度所产生的抑制程度及总的抑制程度均不相同。

呼吸控制率为呼吸激发态(第3态)与静息态(第4态)耗氧量之比，前者与底物氧化所需的酶活力及线粒体电子传递链的功能完整有关；后者与线粒体内膜脂双层结构完整及ATP合成酶活力有关，当跨膜电位压不能维持或/及ATP酶活力受到抑制则第4态耗氧量上升，RCR下降，甚至到氧化磷酸化脱偶联(RCR≤1)的程度。

Mela[6]等在内毒素休克实验中未发现底物氧化的障碍，但发现呼吸链中细胞色素b的氧化还原时间延长。关于烧伤方面的研究甚少，作者前曾报道烧伤5天后大鼠肝线粒体RCR受到抑制[1][2]，细胞色素c氧化酶活力无明显改变(细胞分光光度法—未发表资料)。呼吸链上其他酶复合物功能与膜磷脂有密切关系。鉴于烧伤后线粒体内MDA含量显著增加[3]，磷脂丧失后影响NADH及琥珀酸的氧化[7]，研究NADH－细胞色素c还原酶及琥珀酸－细胞色素c还原酶的活力变化将有利于阐明RCR抑制的机制。

许多作者报告MDA可与蛋白、酶交联使之失去活力[8][9][10][11]。MDA增加是否会使呼吸链上的酶失去活力是一个值得探讨的问题。本实验的结果表明反应体系内MDA浓度虽与RCR抑制率有密切相关，但经进一步分析，产生同样抑制程度的正常皮提取液与焦痂提取液中MDA含量之比为1:6，1:16焦痂提取液几无抑制力但其MDA含

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

量比有一定抑制力的 1:2 正常皮提取液 MDA 含量多 2 倍。外源性MDA 无抑制作用，预先与正常皮提取液(1:2、1:4)孵育后亦不能产生抑制作用。因此，可以说 MDA 不是产生 RCR 抑制的直接原因。从另一方面看来，MDA 可反映膜磷脂的过氧化程度，MDA 含量越高，膜脂双层的破坏越重，反映在内膜能化功能变化上，二者呈负相关；在内膜能化作用上，吸收峰左移现象是一个较敏感的指标，焦痂提取液原液及 1:2 稀释液均可使峰左移现象完全消失，1:4 稀释液可产生约 50% 抑制。其恢复则较 RCR 抑制消失为早，即当内膜能化作用已恢复正常后，RCR 尚受到一定抑制。因此，膜损伤是呼吸控制率下降的重要因素而不是唯一的因素。有关的研究正在进行中。

参 考 文 献

1. 滕宗荣，等．放烧复合伤时大鼠肝线粒体呼吸功能障碍．创伤杂志 1986; 2(1): 7
2. Chen ZR, et al. Inhibitory effect of crude extract of burn eschar on mitochondrial function in rats. J Med Coll PLA 1987; 2(1): 40
3. Chen ZR, et al. A study of lipid peroxide contents in tissues after burns in rats: Dynamic changes of lipid peroxide and vitamin E in plasma, eschar and liver tissue. J Med Coll PLA 1988; 3(3) 244
4. Ohkawa H, et al Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351
5. Kwon TW, and Watts BM Determination of malonaldehyde by ultraviolet spectrophotometry J Food Sci 1963; 28: 627
6. Mela A, et al. Effect of E coli endotoxin on mitochondrial energy-linked functions. Surgery 1970; 68(3): 541
7. Fleischer S, and Fleischer B. Removal and binding of polar lipids in mitochondria and other membrane systems. Methods in Enzymology Vol. 10 Ed by Ronald W Estabrook and Maynard E Pullman, Academic Press Inc., New York 1967. 406
8. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. Federation Proc 1973 32(8): 1870
9. Del Maestro RF An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol Scand 1980; Suppl. 492: 153
10. Nair V, et al The chemistry of lipid peroxidation metabolites Cross-linking reactions of malonaldehyde Lipids 1986; 21(1) 6
11. Nielsen H. Reaction between peroxidized phospholipid and protein: 1 Covalent binding of peroxidized cardiolipin to albumin. Lipids 1979, 13(4): 253

(收稿：1988.11.3，修回：1989.2.10)

Effects of Malonaldehyde Contents in Eschar Extract on Mitochondrial Respiratory Function and Energization of the Inner Membrane

Chen Zongrong, et al

(*Research Laboratory, Department of Radiation Medicine, Third Military Medical College*)

The extract of the eschar tissue from the full-thickness burnt rats inhibits the respiration of mitochondria and energization of the inner membrane of mitochondria from normal rat liver cells. 1:4 and 1:8 diluted extract solutions also have inhibitory function. The extract from the normal rat skin shows a weak inhibitory effect, and 1:4 dilution has no effect at all. There is a wide gap between the malondialdehyde (MDA) contents of these two kinds of extracts. An apparent positive correlation exists between MDA content and degree of inhibition. In fact, it is found that the MDA content is not the direct cause to decrease the respiratory control ratio (RCR). The MDA increase probably relates to the destruction of the lipid bilayer of mitochondria. The inner membrane experiment shows that the energization process is compromized when the destruction of the lipid bilayer proceedes to a certain degree.

(下转 91 页)

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

有可能更准确地描述冠状动脉的形态特征。

（本文承蒙重庆大学生物工程研究中心王公瑞教授指正，研究生卓曦协助部分数据处理，谨此致谢！）

参 考 文 献

1. 冯元桢. 生物动力学：血液循环. 戴克刚 译. 长沙：湖南科学技术出版社，1986
2. Schlesinger MJ. Relation of anatomic pattern to pathologic conditions of the coronary arteries. Arch Path 1940;30:403
3. James TN. Anatomy of the coronary arteries. New York: PB Hoeber, 1961
4. 遵义医学院，等. 冠状动脉解剖学. 北京：科学出版社，1977
5. 左焕琛，于彦铮. 国人左心室壁内的动脉构筑. 解剖学杂志 1985;8:85
6. Strahler AN. Quantitative analysis of watershed geomorpholgy. Trans Am Geophys Union 1957;38:913
7. Horsfield K. Are diameter, length and branching ratios meanigful in the lung? J Theor Biol 1980;87:733
8. Singhal S, et al. Morphometry of the human pulmonary arterial tree. Circ Res 1973;33:190
9. Horsfield K. Morphometry of the small pulmonary arteries in man. Circ Res 1978;42:593
10. Yen RT, et al. Morphometry of cat's pulmonary arterial tree. J Biomech Eng 1984;106:131
11. Yen RT, et al. Morphometry of cat's pulmonary venous tree. J Appl Physiol 1983;55:236
12. 姜宗来. T31环氧树脂固化剂在血管铸型中的应用. 解剖学杂志 1988;11:68
13. Ahmed, et al. A new conception of coronary artery preponderance. Acta Anat 1972 3:87
14. Kalbfleisch H, Hort W. Quantitative study on the size of coronary artery supplying areas postmortem. Am Heart J 1977;84:183

（收稿：1989.1.20；修回：1989.2.15）

Geometrical Morphology of the Human Coronary Arteries

Jiang Zonglai and He Guangchi

(*Department of Anatomy, Third Military Medical College*)

Five resin casts of the coronary arteries and the histological sections of three hesrts with the arteries injected Chinese ink were prepared in human adult autopsy subjec s. 3187 branches of the coronary arterial trees were counted and measured. By Strahler's system the branch pattern of the coronary arterial tree was described. According to the analysis of the geometrical morphology data, the relationships between the diameter, the length and the number of branches in each order and the branch order show the exponential function respectively, which have high correlation significance ($p<0.005$). The characteristics of the coronary vasculature have been discussed in a quantitative view. It suggests that the left coronary artery is the major one supplying the heart. The arterial diameter may be considered in describing the preponderance of the coronary distribution.

Key words: Coronary vessels/AH; Biomechanics

（上接84页）

The mitochondrial inhibitory respiratory funcyion becomes evident while the energization function is still normal. Therefore, the mechanism of inhibition of respiratory function by the eschar extract is not clear yet.

Key words: Mitochondria, Liver/UL; Malondialdehyde/PD; Inhibition; Respiratory control ratio; Energization of the inner membranc; Eschar extract

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