DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.01.011

军事医学

烧伤大鼠脂质过氧化物含量的研究

I. 血浆、焦痂、肝组织脂质过氧化物及维生素E含量的动态变化

陈宗荣 孟小明 冯 江 王松保 董 燕（卫防系 复合伤研究室）

提 要 以5KW溴钨灯照射大鼠背部造成20%TBSAⅡ度烧伤。伤后1、2、3、5、7、9天活杀取血、焦痂及肝组织，以荧光分光光度计测定血浆、焦痂、肝匀浆、线粒体、微粒体、可溶部分中脂质过氧化物（MDA）以及维生素E。伤后血浆、焦痂、脂质过氧化物（LPO）含量升高。焦痂LPO含量有两个高峰：第一峰在伤后第二天（血浆LPO滞后--天），第二峰在伤后7～9天，与创面感染出现同时，在相当时相点可见肝匀浆、线粒体与微粒体亦出现类似的两个高峰，可溶部分LPO含量无明显改变。伤后见上述结构维生素E含量迅即下降，伤后3～5天达最低点，此后多维持在低水平。对烧伤后脂质过氧化的原因、对亚细胞结构的破坏作用作了简要讨论。

关键词 灼伤—血液；过氧化脂质类—分析；维生素E—血液；肝—分析

Nishigaki（1980）发现烫伤大鼠在伤后早期血清及焦痂中脂质过氧化物的含量都有所增加，随后血清GOT、GPT、LDH、AKP等酶值亦均增高，该作者认为脂质过氧化物对肝脾肾等脏器可能有毒性作用[1]。为了了解重度烧伤后脂质过氧化物是否对机体造成损害，本文研究了大鼠烧伤后血浆、焦痂、肝脏匀浆及亚细胞结构中脂质过氧化物含量并初步测定上述组织中维生素E的含量作为进一步研究的参考。

材料及方法

Wistar种雄性大白鼠，200～250g。背部剃毛，以5KW溴钨灯照射35 s，距离50cm，造成占体表面积20%Ⅱ度烧伤。伤后分笼饲养。伤后第一、二天各腹腔内注射等渗盐水10ml作为抗休克治疗。在伤后1、2、3、5、7、9天分别活杀取血，分离血浆，焦痂及肝脏按下法处理：修除焦痂皮下脂肪，置含0.1mmol/L EDTA的等渗盐水（每0.1g焦痂＋2ml盐水）。以内切式组织打碎机于0℃制成5%匀浆液。按同法制备正常大鼠背部皮肤匀浆、肝匀浆，以冰冷等渗盐水冲洗后，吸干水份，称重剪碎。加冰冷的0.1mol/L pH7.4PBS（含0.5 mmol/L EDTA）磨成匀浆配成10%（w/v）匀浆液。用密度梯度离心法制成线粒体、微粒体混悬液及分离微粒体后的可溶部分[2]。以Lowry法测定除血浆以外各项样本的蛋白含量[3]。以Yagi法测血浆中过氧化脂质量[4]。以Ohkawa法测其他样本中过氧化脂质量[5]。以荧光法测维生素E含量[6]。

以双侧t试验、Welchtt试验检验所得数据。

结 果

1. 血浆过氧化脂质（LPO下同）含量（表1）

2. 焦痂LPO含量（表2）

图1显示血浆、焦痂LPO含量变化的趋势，两者在伤后都升高。焦痂LPO含量升高有两个峰，第一峰在伤后第二天，伤后第五天稍降低，伤后第七天再度升高，伤后第九天继续上升。血浆LPO含量

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

升高只一个峰（伤后第三天，较焦痂LPO上升滞后一天）。

3. 肝组织匀浆及亚细胞结构LPO含量(表3)

表1 血浆LPO含量

组 别	动物数	LPOnmols/ml 血浆 $\bar{X}$±SEM	
正常组	17	3.15±0.65	
一天组	11	4.23±1.02**	(P<0.005)
二天组	8	5.46±1.47**	(P<0.001)
三天组	16	8.19±2.41**	(P<0.001)
五天组	10	5.19±1.01**	(P<0.001)
七天组	14	4.11±1.48*	(P<0.05)
九天组	12	3.89±1.38	(P<0.10)

*与正常组相比P<0.05，

**与正常组相比P<0.01

表 2 大鼠焦痂LPO含量

组 别	动物数	LPOnmols/mg 蛋白$\bar{X}$±SEM	
正常组(皮肤)	10	3.16±0.99	
一天组	7	6.045±3.20*	P<0.05
二天组	6	9.015±3.626**	P<0.001
三天组	8	7.844±4.198**	P<0.01
五天组	6	6.875±3.386**	P<0.001
七天组	7	9.383±3.465**	P<0.001
九天组	7	10.168±8.026**	P<0.002

*与正常组相比P<0.05，

**与正常组相比P<0.01

表 3 肝匀浆及亚细胞结构LPO含量

组 别	MDA nmols/mg 蛋白	MDA nmols/100mg 蛋白		
	肝匀浆	线粒体	微粒体	可溶部分
正常组	0.24±0.061 (n=9)	51.44±18.44 (n=11)	48.80±18.04 (n=9)	13.43±5.41 (n=11)
一天组	0.406±0.14** (n=7)	71.2±18.62* (n=7)	97.60±54.6* (n=9)	13.1±4.1 (n=10)
二天组	0.316±0.121 (n=6)	60.74±22.21 (n=6)	60.0±26.44 (n=6)	10.77±1.72 (n=6)
三天组	0.387±0.18 (n=8)	53.6±18.6 (n=9)	44.66±17.58 (n=8)	12.4±6.0 (n=10)
五天组	0.201±0.069 (n=6)	50.00±18.4 (n=10)	48.6±25.22 (n=10)	9.42±3.42 (n=10)
七天组	0.297±0.12 (n=8)	93.14±45.96* (n=18)	87.48±52.0* (n=17)	13.82±6.77 (n=16)
九天组	0.148±0.06* (n=7)	37.8±18.87 (n=7)	33.74±16.22 (n=7)	9.57±1.94 (n=7)

X±SEM

* 与正常组相比P<0.05，相差有显著意义

**与正常组相比P<0.01，相差有非常显著意义

伤后肝匀浆、线粒体、微粒体LPO含量均明显升高。在伤后第一天及第七天分别出现两个高峰（图2）。伤后第一天肝匀浆、线粒体、微粒体LPO值分别为正常组值的169.17%（P<0.01）、138.41%（P<0.05）及200%（P<0.05），伤后第七天分别为正常组值的123.75%(NS)、181.06%及179.26%（P<0.05）。伤后第九天LPO值皆下降至正常组值以下（NS）。可溶部分LPO含量稍有波动，但均无统计学意义。

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

4. 伤后血浆、肝匀浆、线粒体及微粒体维生素E含量变化（表4） 各值均明显下降。血浆维生素E含量于伤后第五天下降至最低值，为正常组值的52%（P<0.01），并维持在此低水平直到伤后第九天。肝匀浆值于伤后第一天即下降至正常组值的63.89%（P<0.01），第三天下降至50%（P<0.01），然后波动于低水平，无回升趋势。线粒体值于伤后第五天下降至48.74%（P<0.01），此后缓慢回升，于伤后第九天达68.29%（P<0.01）。微粒体值于伤后第三天下降至48.39%（P<0.01），然后微有回升，于伤后第九天达正常组值的56.45%（P<0.01）。伤后血浆及亚细胞结构维生素E变化趋势基本一致。

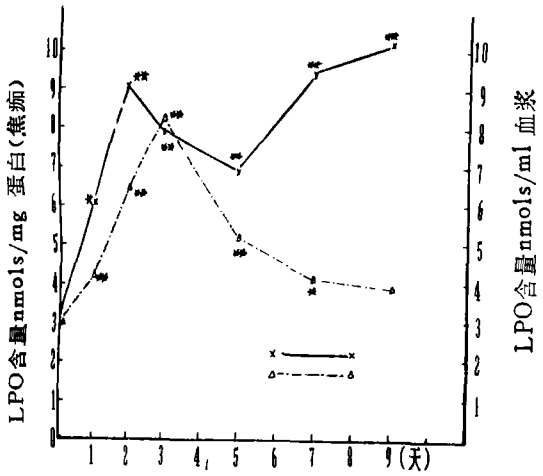


图1 伤后血浆、焦痂LPO含量

×——× 皮焦痂LPO 含量
△-·-·-△ 血浆LPO含量
* 与正常组相比P<0.05
** 与正常组相比P<0.01

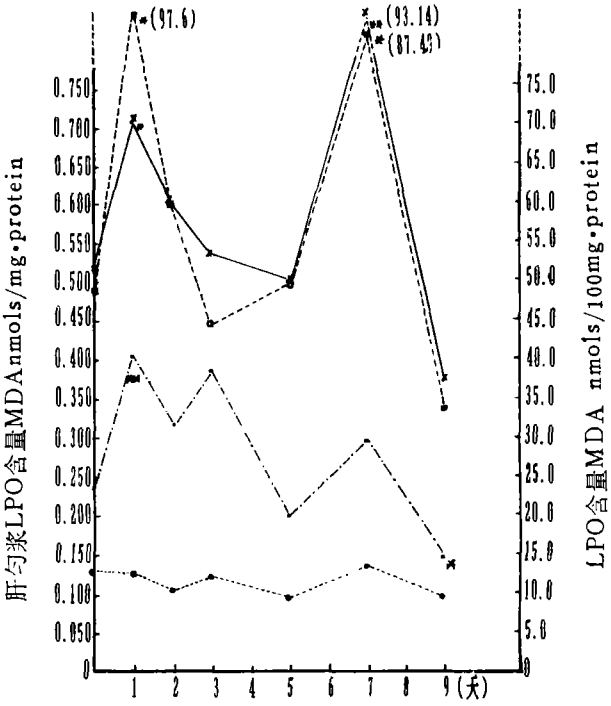


图2 伤后肝亚细胞结构LPO含量

·—·—·—· 肝匀浆
×————× 线粒体
□--------□ 微粒体
○……○ 可溶部分
* 与正常组相比P<0.05
** 与正常组相比P<0.01

讨 论

体内组织脂质过氧化作用是许多病理过程中细胞损害的基本机制。这个损害从有破坏性的分子水平的反应开始。分子破坏作用不断扩大延伸，导致亚细胞膜破坏及细胞损害。致伤因素所产生的自由基作用于膜上的多不饱和脂肪酸（PUFA）产生脂过氧化自由基LOO·。LOO·性质活泼，迅即开始一系列链式反应，造成多种亚细胞膜损害。线粒体及微粒体膜含大量的PUFA，因此为脂质过氧化的主要场所[7]。大量的有关自由基及脂质过氧化损害的实验来自放射损伤的研究[2][7]。关于烧伤方面的研究不多。烧伤和其他因素如电离辐射、氧中毒、药物中毒等也可直接在体内产生自由基从而引起脂质过氧化链式反应，并可通过热力作用直接在焦痂中产生脂质过氧化反应。本文报道伤后血浆及焦痂内脂质过氧化物（以代谢产物丙二醛MDA为代表）含量立即升高，但血浆LPO峰值比焦痂峰值滞后一天。这可能是因为焦

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

表 4 伤后血浆、肝匀浆、亚细胞结构 Vit E 含量

组 别	VE μg/ml 血 浆	VE μg/mg 肝匀浆	VE μg/100mg蛋白 线粒体	VE μg/100mg蛋白 微粒体
正常组	2.5±0.7 (n=20)	3.6±0.9 (n=12)	16.4±4.4 (n=12)	6.2±2.0 (n=12)
一天组	2.4±0.8 (n±13)	2.3±0.6** (n=10)	11.2±4.2* (n=10)	4.8±0.8* (n=10)
二天组	1.9±0.6* (n=10)	2.2±0.1** (n=6)	11.6±4.6 (n=6)	4.3±1.6* (n=6)
三天组	1.6±0.4** (n=18)	1.8±0.3** (n=10)	9.2±2.0** (n=10)	3.0±0.5** (n=9)
五天组	1.3±0.2** (n=13)	1.9±0.6 (n=11)	8.0±2.3** (n=11)	3.3±1.2** (n=11)
七天组	1.4±0.2** (n=15)	2.1±0.6** (n=14)	9.2±3.0** (n=14)	3.6±0.8** (n=10)
九天组	1.3±0.2** (n=10)	1.8±0.5** (n=10)	11.2±2.4** (n=10)	3.5±0.7** (n=10)

X±SD

* 与正常组相比 P<0.05，差异有显著意义

**与正常组相比P<0.01，差异有非常显著意义

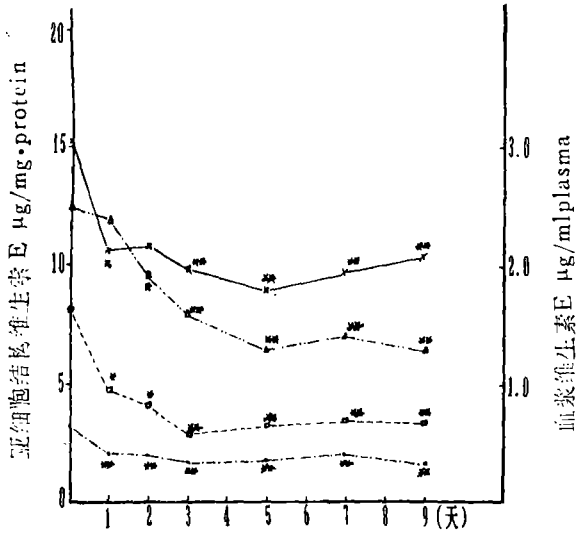


图 3 伤后血浆及肝亚细胞结构维生素E含量

△—·—·△ 血浆

×————× 线粒体

□ ------ □ 微粒体

·—·—·— 肝匀浆

* 与正常组相比P<0.05

** 与正常组相比P<0.01

痂下血管受损，管腔闭塞或堵塞因而吸收受阻的关系。伤后七天焦痂LPO含量再度上升，形成第二高峰。这时创面已发生感染，痂下可培养出大量细菌[8]。细菌内毒素亦可刺激创面积聚的中性粒细胞释放大量自由基引起脂质过氧化，可以解释第二峰出现的原因。血浆LPO未出现第二峰或因观察时间不足所致。

组织脏器亦受脂质过氧化作用的损害。伤后线粒体及微粒体LPO含量立即升高，伤后第七天又出现第二高峰，与焦痂LPO含量变化时相基本一致，二者关系非常密切。但在伤后第九天LPO含量急剧下降，与焦痂LPO含量继续上升现象呈鲜明对比。这与体内自由基清除剂超氧化物岐化酶、谷胱甘肽过氧化酶的作用及维生素E的抗氧化作用有关。

维生素E能与脂氢过氧化物LOOH的均裂产物LOO·结合，形成无活性的生育酚并终止链式反应，使各种亚细胞膜上的PUFA不再发生脂过氧化作用，免受破坏，其抗氧化

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

作用已经许多作者证实。伤后由于维生素E的摄入不足及消耗，体内维生素E水平迅即下降，亚细胞结构内维生素E的缺乏非常明显，不能对膜磷脂提供保护，导致膜结构及功能改变以至细胞破坏死亡。

脂过氧化作用对线粒体有严重破坏作用[7]。线粒体脂过氧化作用与线粒体肿胀、溶解及破坏密切相关。作者前曾报道烧伤后五天大鼠肝线粒体肿胀、内膜嵴断裂、空化，线粒体呼吸功能及合成腺三磷（ATP）的功能严重受损[8]。亚油酸氢过氧化物对大鼠肝氧化磷酸化作用有抑制作用。这可能是线粒体功能障碍的原因。

微粒体膜PUFA含量比线粒体多，因此更易受到脂过氧化作用损害。微粒体与蛋白合成及药物代谢功能有密切关系。线粒体与微粒体受损可以解释伤后许多内脏功能障碍。

Willson在讨论放射保护剂时曾列出一模式图[10]：

健康细胞
↓
自由基产生 ← 1. 防止自由基产生
↓
自由基损害 ← 2. 清除已生成的自由基
↓
分子水平损害 ← 3. 修复自由基所造成的损害
↓
细胞受损 ← 4. 生物化学角度上的修复

就烧伤所造成的脂过氧化损害而言，早期切痂植皮防止感染可减少生物膜脂过氧化的机会。给予治疗剂量的维生素E可中断脂过氧化的链式反应，降低对生物膜的破坏程度。经胃肠外途径给予含丰富必需脂肪酸的乳化脂肪制剂除可提供热量外，更提供为修复受损生物膜的多不饱和脂肪酸。

由上述讨论可看出烧伤后体内脂质过氧化作用的研究有很大理论与临床实用价值，值得进一步深入探讨。

（本文承第三军医大学中心实验室周成贵、孙玮、潘峰同志大力协助，谨致谢意）

参 考 文 献

1. Nishigoki I, et al. Effect of thermal injury on lipid peroxide levels of rat. Biochem Med 1980; 24:185～189
2. 周浔、方允中。WR-2721对辐射所致脂类过氧化的影响Ⅰ、照射小鼠肝与脑亚细胞各部分脂类过氧化值。辐射研究与辐射工艺学报 1985; 3(4):24～27
3. Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folrn phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265
4. Yagi K. Assay for blood plasma or serum In "Oxygen Radicals in Biological Systems". Methods in Enzymdogy Vol. 105 Ed.by Lester Packer, Academic Press Inc, New York 1984; 328:331
5. Ohkawa H, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95:351～358
6. 侯少范、朱振源。生物材料中生育酚的荧光测定法。分析化学 1981; 10(9):535～539
7. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. Fed Proc 1973; 32(8):1870～1874
8. 陈宗荣，等。烧伤焦痂粗提取液对大鼠肝线粒体呼吸功能及内膜能化作用的抑制作用。第三军医大学学报1986; 8(3):195～202
9. 陈宗荣，等。复合烧伤时大鼠肝线粒体呼吸功能障碍。创伤杂志 1986; 2(1):7
10. Willson RL. Free radical repair mechanism and the inter actions of glutathione and vitamins C and E. "Radioprotectors and Anticarcinogens" Ed. by Nygraard OF and Simic MG. Academic Press Inc, New York 1983; 1～22

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

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

Chen Zongrong, et al (Department of Antiatomic Medicine, Third Military Medical College)

20% TBSA full thickness burns was inflicted on the back of rats with a 5 KW bromotungsten lamp. The animals were sacrificed on the 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th, and 9th day post-burn. Then the lipid peroxide and Vitamin E contents of the plasma, eschar and liver homogenate, mitochondria and microsomes were determined. It was found that the lipid peroxide content of the plasma and eschar increased postburn. The elevation of lipid peroxide level in the eschar showed 2 peaks on the 2nd and 7—9th day postburn and was related to the positive bacterial culture of the subeschar tissues. The changes of the lipid peroxide levels in the mitochondria and microsomes were similar to those in the eschar. The elevation of plasma lipid peroxide showed only one peak on the 3rd day postburn. The vitamin E levels in these tissues decreased markedly after injury, reached the lowest point 3—5 days after burns, and maintained at a low level throughout the whole course of observation.

The causes of the increase of lipid peroxidation and its damage to the subcellular structures were briefly discussed.

Key words: Burns/blood; Lipid peroxides/analysis; Vitamin E/blood; Liver/analysis

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