DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.03.001

烧伤焦痂提取液对大白鼠肝线粒体呼吸功能及能化作用的抑制作用

陈宗荣 冯 江 董 燕 王松保

（卫防系 复合伤研究室）

提 要 大鼠背部皮肤Ⅱ度烧伤（20%BSA）9天后，肝线粒体呼吸控制率下降，为正常值的63.7%（P<0.01），第Ⅲ态降为正常值的71.09%（P<0.01），第Ⅳ态稍有增加。最大磷酸化率为正常值的62.13%（P<0.01）。

取烧伤后9天大鼠烧伤焦痂作成粗提取液，以生理盐水稀释后与正常大鼠肝线粒体在0℃放置10分钟后，可产生对线粒体呼吸的抑制；抑制程度与稀释度有关，1:32及1:64稀释度最为明显。与正常皮肤提取液的抑制作用相比，差异非常明显（P<0.01），呼吸控制率下降的主要原因是第Ⅳ态呼吸值增加，与第Ⅳ态正常值相比，差异非常显著（P<0.01）。

焦痂提取液还明显地抑制了线粒体内膜能化作用。用藏红O作为检测试剂，以1:32及1:64烧伤焦痂粗提取液处理正常肝线粒体后，藏红O最大吸收峰左移及吸光度下降的程度减少或完全消失。

关键词 烧伤；烧伤毒素；焦痂粗提取液；线粒体功能；线粒体内膜能化作用

烧伤休克可造成肝线粒体呼吸功能失常[1]，但关于烧伤晚期肝线粒体功能障碍的报告不多，烧伤毒素对肝线粒体呼吸功能的论著尤不多见，烧伤焦痂能产生某些毒性物质已为一些作者所证实[2-6]。本文的目的是：1. 探索重度烧伤晚期肝线粒体功能障碍的程度；2. 观察烧伤焦痂粗提取液对肝线粒体功能是否有抑制作用；3. 初步研究造成线粒体功能失常的原因。

材料及方法

雄性Wistar种大白鼠，200～300g，分为三组：对照组（n=16），假致伤组（n=16），烧伤组（n=12）。致伤方法，肝线粒体制备及功能测定均见前文[8]。

焦痂粗提液制备 取烧伤9天后焦痂，剪去皮下脂肪组织，以氯仿除去皮面脂肪，液氮中冷冻后4℃冰箱过夜解冻。切碎后按1:10（w/v）加入0.9% NaCl液（pH 7.4）。在0℃打成匀浆，在4℃离心10分钟（1000×g）。弃去上层的脂肪及底层无活力的纤维组织。取中层乳白色悬液，以两层纱布过滤，即为焦痂粗提液，依同法取正常皮肤制成正常皮肤提取液，各以0.9%NaCl液稀释成系列稀释液备用。在测定焦痂提取液对线粒体功能的抑制作用时，将线粒体配至40mg/ml，在测定时加入等量的系列稀释液使线粒体的浓度为20mg/ml，先以0.9% NaCl稀释正常线粒体于0℃放置10分钟，然后按前述方法[8]测呼吸控制率。在测定正常皮肤提取液及焦痂提取液的作用时，以同一份正常线粒体分别稀释、0℃放置10分钟然后测定。先从高稀释度开始，至1:32为止。实验结束时，重测0.9%NaCl液稀释的正常线粒体功能，以排除线粒体老化的影响。

线粒体内膜能化作用 正常线粒体在加入底物（如琥珀酸钠）后即呈内膜能化作用、测定方法见Mittnacht文[10]。能化作用的表现有二：1、以藏红O为探针时，E_{640nm}在能化后降低；2. 最大吸收峰左移，记录最大吸收峰所在的波长值λ_{max}及吸光度E。求得能化前后最大吸收峰波长及吸光度之差，记为$\triangle\lambda_{max}$及$\triangle E$。

结 果

正常大白鼠肝线粒体呼吸值见表1。烧伤后9天RCR下降非常明显（下降了36.3%），第Ⅲ态呼吸值下降了28.91%（P<0.01），

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

第Ⅳ态稍有上升。第Ⅲ态/第Ⅳ态比值上升，ADP/O比下降，最大磷酸化率下降了37.89%（$P<0.01$）。

表 1　烧伤后 9 天大鼠肝线粒体呼吸功能

	State 3	State 4	RCR	$\frac{\text{State 4}}{\text{State 3}}\times 100$	ADP/O	MPR
	Nanoatoms O/min /mg protein					μmoles ATP/min /mg protein
正常组 (n=16)	186.95±26.24	34.74±4.21	5.40±0.38	18.69±1.29%	1.36±0.14	0.256±0.042
假致伤组 (n=16)	194.80±41.78	38.62±8.62	5.10±0.40	19.79±1.35%	1.38±0.12	0.268±0.050
烧伤组 (n=12)	132.90±27.80*	39.40±9.04	3.44±0.04*	29.79±3.32*	1.19±0.05*	0.159±0.033

Mean±SEM

与正常组相比差异非常显著（$P<0.01$）

State 3（第Ⅲ态），State 4（第Ⅳ态），RCR（呼吸控制率），ADP/O（磷氧比），MPR（最大磷酸化率）

表 2　正常皮肤提取液对大鼠肝线粒体呼吸功能的抑制作用

	State 3	State 4	RCR	$\frac{\text{State 4}}{\text{State 3}}\times 100$	ADP/O	MPR
	Nanoatoms O/min /mg protein					μmoles ATP/min /mg protein
正常线粒体 (n=12)	330.56±52.49	73.02±10.72	4.59±0.44	23.0±2.0%	1.27±0.13	0.422±0.093
正常皮肤提取液 (n=12) 1:32	334.47±80.97	93.0±21.16*	3.47±0.69*	28.0±4.0%*	1.17±0.16	0.392±0.113
(n=12) 1:64	289.63±153.34	91.22±20.96*	3.99±0.58*	26.0±4.0%	1.19±0.17	0.431±0.127
(n=12) 1:128	318.00±64.07	75.98±19.73*	4.38±0.74	24.0±4.0%	1.26±0.17	0.401±0.099

Mean±SEM　*与正常组相比差异显著（$P<0.05$）　*与正常组相比差异非常显著（$P<0.01$）

表 2 显示正常皮肤提取液对正常大鼠肝线粒体呼吸的作用。只有浓度较大的稀释液才对线粒体呼吸有抑制作用。表 3 显示焦痂粗提液对线粒体呼吸的作用。1:32稀释液使呼吸控制率下降了54%，1:64稀释液使之下降了32%，甚至1:512高度稀释的焦痂粗提液还使呼吸控制率下降了19%。比较表 2 及表 3 的数据，可见主要差异在1:32（$P<0.01$）及1:64（$P<0.01$）两个稀释度上，在1:128时，两组差异无统计学意义。两组数据上的差异主要表现在第Ⅳ态呼吸值的增加。例如在1:32时，正常皮肤提取液使第Ⅳ

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

表 3　烧伤焦痂提取液对正常大鼠肝线粒体呼吸功能的抑制作用

	State 3	State 4	RCR	$\frac{\text{State 4}}{\text{State 3}} \times 100$	ADP/O	MPR
	Nanoatoms O/min /mg protein				μmoles ATP/min /mg protein	
正常线粒体 (n = 12)	330.56±52.49	73.02±10.72	4.59±0.44	23.0±2.0%	1.27±0.13	0.422±0.093
焦痂提取液						
1:32 (n = 12)	287.56±70.71	139.16±36.61*	2.10±0.29*	48.0±5.0%*	0.95±0.14*	0.270±0.070*
1:64 (n = 12)	324.97±70.04	106.26±21.19*	3.13±0.62*	33.0±6.0%*	1.11±0.19*	0.356±0.079
1:128 (n = 12)	332.03±94.46	95.23±28.26*	3.68±0.76*	29.0±5.0%*	1.23±0.18	0.415±0.139
1:256 (n = 12)	351.74±66.9	90.88±12.3*	3.91±0.69*	27.0±5.0%*	1.25±0.21	0.443±0.123
1:512 (n = 12)	331.67±101.48	88.6±20.15	3.72±0.69*	27.0±5.0%*	1.18±0.17	0.378±0.138

Mean±SEM

State 3(第Ⅲ态),State 4(第Ⅳ态), RCR(呼吸控制率), ADP/O(磷氧比), MPR(最大磷酸化率)

*与正常值相比差异非常显著($P<0.01$)

*与正常值相比差异显著　($P<0.05$)

态呼吸值增加了24.6%，而焦痂粗提液却使之增加了90.5%，比对照值将近增加了一倍。由于每对数据都是在同一份线粒体悬液测得，故差异就更为可信。

在测定正常线粒体内膜能化作用前（共作了三组实验）先测呼吸控制率。只有呼吸控制率大于4.0的样品才用于实验。表 4 显示生理盐水、正常皮肤提取液及焦痂提取液的系列稀释液对同一份正常线粒体内膜能化作用的影响。图 1 显示生理盐水对能化作用的影响。λmax由 521.0nm 左移至501.0nm，$\Delta\lambda max = 20nm$。吸收峰在能化前后之差为 $\Delta E = 0.2643$。图 2 显示1:32正常皮肤提取液与线粒体作用后内膜能化前后的重叠吸收光谱：$\Delta\lambda max = 19nm$，$\Delta E = 0.3313$；当稀释度为 1:16 时、$\Delta\lambda max = 14nm$，$\Delta E = 0.3361$。图 3 显示1:32焦痂粗提液与同一份线粒体作用后对内膜能化作用的影响。$\Delta\lambda max = 0$ 表明吸收峰左移现象完全消失，$\Delta E = 0.1966$。1:16焦痂提取液结果与1:32的结果相同。较稀的焦痂稀释液如 1:64、1:128 的结果与正常皮肤提取液1:16稀释度的结果相同。在实验结束后（约在制备后 6 小时）线粒体内膜能化的功能依然良好。

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

表 4　大鼠肝线粒体能化作用抑制现象

RCR = 4.34

	内膜能化前入$_{max}$	内膜能化后入$_{max}$	$\triangle\lambda_{max}$	能化前吸光度E	能化后吸光度E	$\triangle$E
正常线粒体	521 nm	501 nm	20 nm	0.8781	0.6138	0.2643
正常皮提取液1:64	521 nm	500.5nm	20.5nm	0.8044	0.5052	0.2992
正常皮提取液1:32	521.5nm	502.5nm	19 nm	0.8100	0.4787	0.3313
正常皮提取液1:16	520.5nm	506.5nm	14 nm	0.8345	0.4984	0.3361
焦痂提取液1:128	521.0nm	507.5nm	13.5nm	0.8128	0.4837	0.3291
焦痂提取液1:64	521.5nm	506.0nm	15.5nm	0.8744	0.5837	0.2907
焦痂提取液1:32	521.5nm	522.0nm	-1.5nm	0.8570	0.6604	0.1966
焦痂提取液1:16	521.5nm	522.5nm	-1.0nm	0.8857	0.6937	0.1920
同一份正常线粒体	521.0nm	508.0nm	13 nm	0.7977	0.4374	0.3603

$\triangle\lambda_{max}$ 最大吸收峰波长差；$\triangle$E最大吸收峰吸光度之差

讨　论

烧伤患者血清内究竟有无“毒素”以及这种或这些毒素是否与烧伤后期病程或死亡有关尚存在不同看法。六十年代中一些认为感染已足解释烧伤的晚期死亡[11]。近来许多作者不断报道患者血清或实验动物及患者焦痂粗提液中含有某些物质可致小白鼠死亡[3,12]、肝细胞超微结构变化[13]、原位肝脏或分离肝细胞代谢变化[14]以及细胞传递免疫机能变化[15]。日本一些作者报导烧伤患者血清及焦痂提取液中含有抑制大鼠肝线粒体呼吸功能的因素，且此毒性作用出现的时间在伤后 7 ～14天，恰与焦痂软化、降解与吸收的时间相符[16,17]。作者等曾用烧伤后 5 天的焦痂提取液与正常皮肤提取液作比较，当浓度大时，两者均呈抑制作用，浓度稀时均无抑制作用（未发表数据）。在改用烧伤后 9 天的焦痂提取液方显出与正常皮肤提取液有明显差异的抑制作用，说明伤后时间与抑制因素的出现有一定关系。

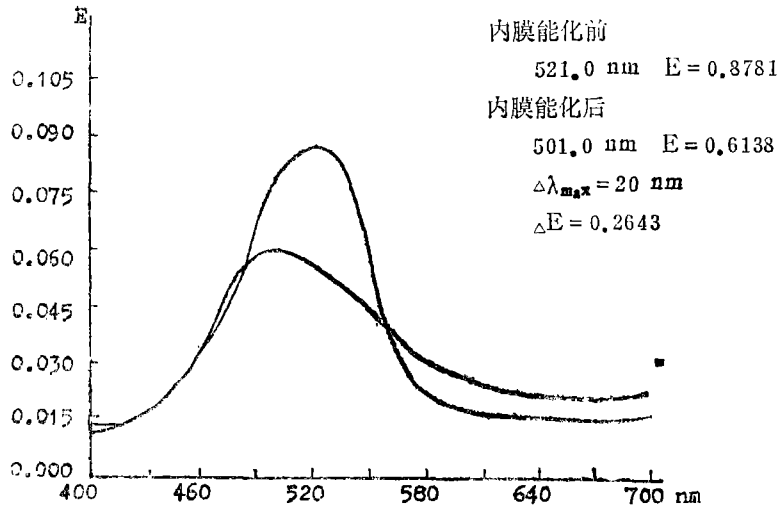


图 1　正常线粒体内膜能化作用

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

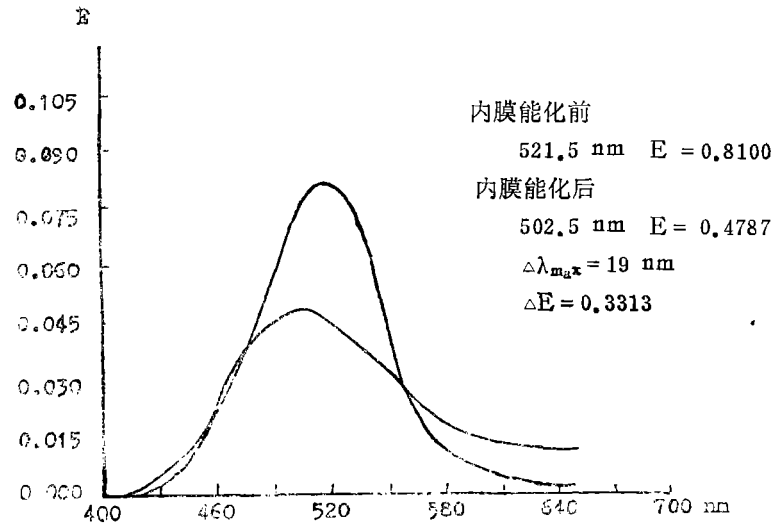


图2 经正常皮膜提取液(1:32)处理后线粒体内膜能化作用

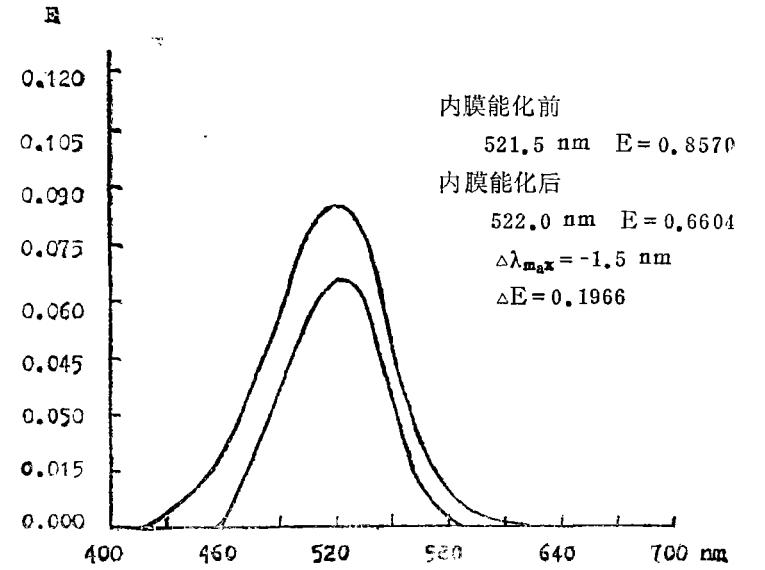


图3、经烧伤焦痂提取液(1:32)处理后线粒体内膜能化作用

在与焦痂提取液作用后，正常线粒体第Ⅳ态呼吸值增加表明线粒体的氧化磷酸化有脱偶联现象，线粒体的偶联状态首先与内膜的能化作用有关，然后由这种能化作用推动ATP合成。根据化学渗透理论，电子传递偶联磷酸化有赖于内膜的完整，否则在电子传递时，移位的电子就会漏回去，不能建立跨膜质子梯度，也就不能产生推动ATP合成的质子运动力 (Protonmotive force, Pmf)[18]。Pmf可用分光光度法测定。藏红O为一种带正电荷的染料，在染料与内膜结合后，由于染料与内膜上的蛋白结合部位改变，可产生最大吸收峰左移及吸光度下降现象[19]。在因各种因素致内膜受损通透性增加时，Pmf下降，左移现象减少或完全消失[20]。本实验中发现1:16、1:32焦痂粗提液可使正常线粒体内膜能化作用抑制，表明内膜受损，与前所报告的烧伤后线粒体超微结构病损相

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

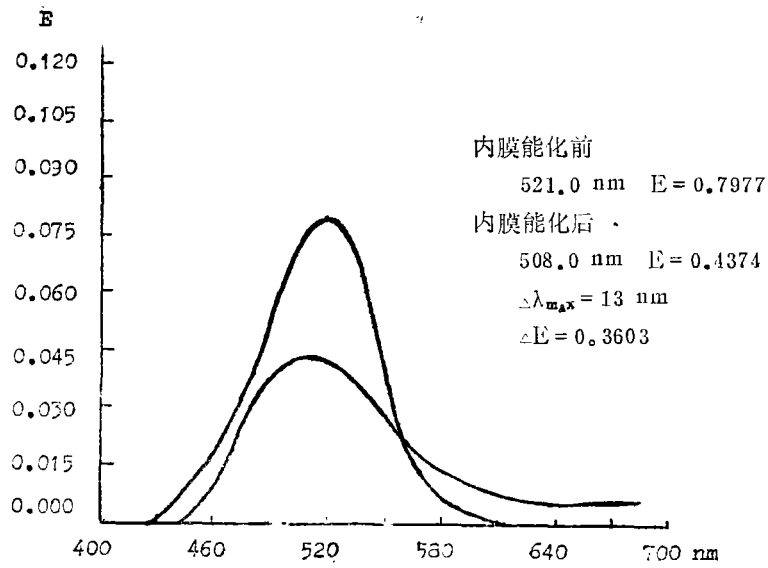


图 4　正常线粒体在 0 ℃放置 6 小时后内膜能化作用

符[9]。Kremer等人报导以焦痂毒素注射至小鼠腹腔内可产生与烧伤后相同的肝线粒体损害，用毒素的抗血清保护则此病变不发生[13]。以上资料说明焦痂内可能含有某种能破坏内膜完整性的“毒素”。但由于焦痂下往往有大量细菌（主要是大肠杆菌，未发表资料），细菌内毒素的作用尚不能除外，有关研究正在进行中。

参 考 文 献

1. Apprille JR, et al. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. J Trauma 1977; 17(4):279

2. Rosenthal SR, et al. Purified burn toxic factor and its competin. Surgery 1972; 71(4):527～536

3. Schoenenberger GA, et al. Isolation and characterization of a toxic lipid-protein complex formed in mouse skin by controlled thermal energy. Comparison to an inactive precursor derived from thermally unexposed or native skin. Biochim Biophys Acta 1972; 263:149～163

4. Schoenenberger GA, et al. Physical, chemical and biological properties of a specific toxic lipid-protein complex formed in thermally altered mouse skin. Biochim Biophys Acta 1972; 263:164～177

5. Schmidt K, et al. Studies on the structure and biological effects of pyrotoxins purified from burned skin. World J Surg 1979; 3:361～365

6. Fedorov NA, et al. Isolation and study of toxic fractions from burned skin. Problem Med Chem 1974; 20(4):371 (Russian)

7. Kremer B, et al. Toxin specific ultrastructural alterations of the mouse liver after burn injuries and the possibility of a specific antitoxic therapy. Scand J Plast Reconstr Surg 1979; 13:217～222

8. Kremer B, et al. The present status of research in burn toxins. Intensive Care Med 1981; 7:77～87

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

9. 陈宗荣、陈意生、孟小明，等。放射复合烧伤对大白鼠肝线粒体呼吸功能的影响。创伤杂志 1986；2：7

10. Mittnachts Jr,and Farber J. Reversal of ischaemic mitochondrial dysfunction. J Biol Chem 1981；256:3199～3206

11. Moyer CA, and Butcher HR. Burns, shock and plasma volume regulation. CV Mosby Comp. St Louis, Mo. 1967

12. Rosenthal SR. Substances released from the skin following thermal injury-Burn toxin. Surgery 1959；46:932

13. Kremer B. Burn toxin. In "Immune Consequences of Thermal Injury" Chapter 6, pp 90～118, 1981

14. Schölmerich J, et al. Effects of cutaneous human or mouse burn toxin on the metabolic function of isolated liver cells. Scand J Plast Reconstr Surg 1979；13:223～230

15. Schoenenberger GA, et al. Experimental evidences for a significant impairment of host defense for gram-negative organisms by a specific cutaneous toxin produced by severe burn injuries. Surg Gynaec Obstet 1979；141(4):555～561

16. Aoyama H, et al. Toxic effects of extracts from burned skin, serum and blister fluid of burn patient on mitochondrial function. Burns 1980；7:33

17. Suzuki K, et al. Isolation of a substance toxic to mitochondrial function from the burned skin of rats. Burns 1981；8(2):110～117

18. Ekerman KEO, Wikstrom MKE. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Letts 1976；68(2):191～197

19. Colonna R, et al. The problem of cation-binding sites in the energized membrane of intact mitochondria. Eur J Biochem 1973；34:577～585

Inhibitory Effect of Crude Extract of Burn Eschar on Mitochondrial Function in Rats

Chen Zongrong, et al

(Research Laboratory, Department of Public Health, Third Military Medical College)

Whole thickness burn (20% TBSA) was produced in adult rats of Wistar strain. The animals were divided into two groups: In the first group, liver mitochondrial respirarory function was determined polarographically on the 9th day postburn (PB). In the second group, burn eschar was removed 9 days PB and extracted with physiological saline. Extract of normal rat skin was prepared in a similar way. Liver mitochondria were prepared from normal rats and incubated with serial dilutions of the extracts of eschar and normal skin

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

respectively. The respiratory function was then determined.

It was found that the respiratory control ratio (RCR) in the burn group was much depressed (63.7% as compared to normal). State 3 respiration rate also decreased (71.09% viz normal) but state 4 slightly increased. The differences were very significant ($P<0.01$). In the second experiment, RCR was also much inhibited in the eschar extract treated mitochondria, mainly due to elevation of the state 4 respiration. The RCR value in the normal skin extract treated group also showed some degree of inhibition but the inhibition was much weaker than in the burn eschar extract treated group ($P<0.01$). The inhibitory effect was totally absent in higher dilutions in the normal skin extract group while in the eschar extract group, slight but definite inhibition was demonstrated up to the dilution of 1:512.

The energization of the mitochondrial membrane was also affected by the eschar extract (3 experiments). When normal mitochondria were incubated with eschar extract, the degree of "Blue shift" of the maximal absorbancy of safranine O was either diminished or totally absent. Besides, the extent of decrease of maximal absorbancy at 540 nm was much smaller than the controls after energization. Slight inhibitory effects were also observed at more concentrated dilutions of the extract of the normal skin. The mechanism of this disturbance of the membrane energization was briefly discussed.

Key words Burns; Burn toxin; Extract of burn eschar; Mitochondrial function; Mitochondrial membrane energization

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