

· 缺血缺氧与心肌损害 ·

牛磺酸对烫伤大鼠心肌线粒体成分和酶活性的保护作用

万福生 李国辉 章洁 余乐涵 赵小曼



【摘要】目的 了解牛磺酸对大鼠烫伤后心肌线粒体成分和酶活性变化的影响。**方法** 将 120 只大鼠背部脱毛后造成 30% TBSA 的Ⅲ度烫伤。分为烫伤组(60 只), 伤后腹腔注射等渗盐水(4 mL · kg⁻¹ · 1% TBSA⁻¹); 牛磺酸治疗组(60 只), 伤后腹腔注射 20 g/L 牛磺酸液(200 mg/kg)。伤后 1、3、6、12、24、48 h 处死大鼠, 取心肌组织检测心肌线粒体琥珀酸脱氢酶(SDH)、细胞色素 c 氧化酶(CCO)、超氧化物歧化酶(SOD)、Ca²⁺-腺苷三磷酸酶(ATPase)活性和细胞色素 c、细胞色素 aa3、丙二醛(MDA)、细胞质及线粒体内 Ca²⁺ 含量。另取 10 只大鼠作为对照组, 模拟烫伤不予补液, 1 h 后处死大鼠取心肌组织检测以上指标。**结果** 烫伤组大鼠伤后 1 h CCO 活性即开始下降, 伤后 6、12 h 下降最明显, 而 SDH 活性在伤后 6 h 下降最明显, 且各时相点均低于对照组; 牛磺酸治疗组 CCO 和 SDH 下降不明显, 伤后 3、6、12 h CCO 活性与烫伤组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。伤后 3、6、12、及 24 h 烫伤组心肌线粒体细胞色素 c 和细胞色素 aa3 均显著降低, 而牛磺酸组虽然有所下降, 但以上 4 个时相点的值均高于烫伤组($P < 0.05$)。烫伤组 SOD 活性在伤后 3、6、12 h 均显著性下降, Ca²⁺-ATPase 活性在伤后 3、6、12 及 24 h 均有不同程度下降; 而牛磺酸治疗组虽然有所下降, 但以上 4 个时相点 SOD、Ca²⁺-ATPase 值均高于烫伤组($P < 0.05$)。伤后 3~48 h 烫伤组、牛磺酸治疗组 MDA 值均高于对照组($P < 0.05$), 但牛磺酸治疗组低于烫伤组($P < 0.05$)。伤后 1 h 烫伤组大鼠心肌线粒体中 Ca²⁺ 即开始升高为 13.7 ± 1.5, 伤后 3、6、12、24 h 分别为 24.8 ± 2.6、29.7 ± 3.1、16.3 ± 1.9 及 13.5 ± 1.7, 均高于对照组(10.7 ± 1.6, $P < 0.05$); 心肌细胞质中 Ca²⁺ 在伤后 3、6、12、24 h 也明显高于对照组($P < 0.05$)。伤后 3、6、12 及 24 h 牛磺酸治疗组大鼠心肌线粒体中 Ca²⁺ 浓度分别为 16.8 ± 2.8、18.7 ± 1.9、10.5 ± 1.8 及 13.3 ± 1.7, 均低于烫伤组。**结论** 牛磺酸对烫伤大鼠心肌线粒体成分和酶活性破坏具有保护作用, 其机制与提高线粒体清除氧自由基的能力和减轻 Ca²⁺ 超载有关。

【关键词】 烧伤; 心肌; 线粒体, 心脏; 牛磺酸

Protective effects of taurine on myocardial mitochondria and their enzyme activities in rats with severe burn
WAN Fu-sheng, LI Guo-hui, ZHANG Jie, YU Le-han, ZHAO Xiao-man. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, P. R. China

【Abstract】Objective To investigate the effects of taurine on myocardial mitochondria and their enzyme activities in rats with severe burn. **Methods** One hundred and twenty healthy adult Wistar rats were subjected to 30% TBSA full-thickness burn. They were randomly divided into burn group (B, with intraperitoneal injection of isotonic saline), treatment group (T, with intraperitoneal injection of taurine, 200 mg/kg), with 60 rats in each group. Ten rats with sham scald were used as control (S group). The myocardial tissue samples in B and T groups were harvested at 1, 3, 6, 12, 24 and 48 postburn hours (PBH) for determination of activity respectively of succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome oxidase (CCO), the superoxide dismutase (SOD), Ca²⁺-ATPase in mitochondria, and contents of cytochrome c (Cyt c), cytochrome aa3 (Cyt aa3), malondialdehyde (MDA), and Ca²⁺ in mitochondria and cytoplasm. The myocardial tissue samples of controls were harvested at 1 PBH for determination of above indices. **Results** The activity of CCO in B group was decreased at 1 PBH, especially at 6, 12 PBH. The activity of SDH in B group was decreased to lowest level at 6 PBH, and its value was lower than that of S group at each time point. The activity of CCO or SDH in T group was not obviously decreased, and the activity of CCO at 3, 6, 12 PBH showed significant difference compared with B group ($P < 0.05$). The contents of Cyt aa3 and Cyt c in B group at 3, 6, 12, 24 PBH were obviously decreased, which were significantly lower than those in T group ($P < 0.05$). The activity of SOD in B group at 3, 6, 12 PBH was obviously decreased, the activity of Ca²⁺-ATPase at 3, 6, 12 and 24 PBH was decreased to different extent, which was significantly lower than those in T group ($P <$

基金项目: 国家自然科学基金(30060029); 江西省主要学科学术带头人项目(050010)

作者单位: 330006 南昌大学医学院生物化学与分子生物学教研室(万福生、章洁、余乐涵、赵小曼); 南昌大学第一附属医院烧伤科(李国辉)

0.05)。The MDA contents in B and T groups were higher than that in S group at 3 ~ 48 PBH, and it was highest in B group ($P < 0.05$)。The Ca^{2+} content of mitochondria in B group at 1 PBH was increased (13.7 ± 1.5), and it was (24.8 ± 2.6), (29.7 ± 3.1), (16.3 ± 1.9) and (13.5 ± 1.7) at 3, 6, 12, 24 PBH respectively, and they were all higher than that of S group (10.7 ± 1.6 , $P < 0.05$)。The Ca^{2+} contents of cytoplasm in group B at 3 ~ 24 PBH were also higher than that in S group ($P < 0.05$)。The Ca^{2+} content of mitochondria in T group at 3, 6, 12, 24 PBH was (16.8 ± 2.8), (18.7 ± 1.9), (10.5 ± 1.8) and (13.3 ± 1.7) respectively, which were lower than that in B group at every time point。Conclusion Taurine have protective effect on mitochondria and their enzyme activities in myocardium in rats with severe burn, and it may be attributable to improving the ability of eradicating oxygen free radicals and alleviating Ca^{2+} overload in the mitochondria。

【Key words】 Burns; Myocardium; Mitochondria, heart; Taurine

严重烧伤后早期存在心肌损害,但其发生机制及防治措施有待进一步研究^[1-3]。牛磺酸是动物体内含量最为丰富的自由氨基酸。研究表明,牛磺酸可通过清除氧自由基、抑制膜脂质过氧化、维持细胞渗透压及稳定细胞膜等多种机制发挥细胞保护作用^[4,5]。本研究通过观察牛磺酸对大鼠烫伤后心肌线粒体成分和部分酶活性变化的影响,以期对烧伤后早期心肌损害的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

牛磺酸、还原型细胞色素 c、二硫苏糖醇均购自美国 Sigma 公司, Ca^{2+} -腺苷三磷酸酶(ATPase)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,三羟基氨基甲烷、乙二胺四乙酸购自上海化学试剂采购供应站。Z8000 型塞曼效应原子吸收分光光度计(日本日立公司), 722S 型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 动物分组及模型制作

成年 Wistar 大鼠(南昌大学实验动物中心)130 只,雌雄各半,体质量 220 ~ 265 g。其中 120 只分为烫伤组和牛磺酸治疗组,每组 60 只大鼠。2 组大鼠于腹腔注射 2 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,背部剃毛,剃毛区置于 97 °C 水浴中 18 s,造成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实)。烫伤组伤后腹腔注射等渗盐水($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 1\% \text{ TBSA}^{-1}$);牛磺酸治疗组同法注射 20 g/L 牛磺酸液(200 mg/kg)。于伤后 1、3、6、12、24、48 h 处死大鼠取心脏待测。另取 10 只作为对照组,置于 37 °C 水中 18 s 模拟烫伤,伤后不补液,1 h 后处死大鼠取心脏待测。

1.3 心肌线粒体的分离纯化

将大鼠心脏用等渗盐水冲洗、剪碎后加入匀浆介质,制备匀浆液,经 $600 \times g$ 离心 10 min,取上清液,再经 $10\,000 \times g$ 离心 15 min,所得沉淀即为线粒体,4 °C 保存备用,以 Lowry 法进行蛋白定量。上清

液用于 Ca^{2+} 的测定。

1.4 检测指标

1.4.1 细胞色素 c 氧化酶(CCO)和琥珀酸脱氢酶(SDH)活性测定 按文献[5]方法进行。

1.4.2 细胞色素含量测定 取 2 个比色杯,分别加入线粒体悬液适量。1 个为参照杯,1 个为测定杯。测定杯加入连二硫酸钠,记录波长 540 ~ 630 nm 处的氧化-还原光谱。取 540 ~ 550 nm 光谱差计算细胞色素 c 含量;取 605 ~ 630 nm 处光谱差计算细胞色素 aa3 含量,以 $\mu\text{mol/g}$ 蛋白表示。

1.4.3 SOD、 Ca^{2+} -ATPase 及 MDA 含量的检测 按试剂盒说明书进行。

1.4.4 细胞质及线粒体内 Ca^{2+} 含量的检测 采用原子吸收分光光度法。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行处理,两组间均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠心肌线粒体内 CCO、SDH 活性变化

烫伤组伤后 1 h CCO 活性即开始下降,伤后 6、12 h 下降最明显;而 SDH 活性在伤后 6 h 下降最明显,且各时相点均低于对照组。牛磺酸治疗组 CCO 和 SDH 下降不明显,伤后 3、6、12 h CCO 活性与烫伤组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 细胞色素含量

烫伤组心肌线粒体细胞色素 c 和细胞色素 aa3 在伤后 3、6、12 及 24 h 均显著性降低,而牛磺酸组虽然有所下降,但前述 4 个时相点的值均高于烫伤组($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 SOD、 Ca^{2+} -ATPase 活性及 MDA 含量

烫伤组伤后 3、6、12 h SOD 活性均显著下降;而 Ca^{2+} -ATPase 活性在伤后 3、6、12 及 24 h 亦有不同程度下降。牛磺酸治疗组虽然有所下降,但其值均高于烫伤组($P < 0.05$)。伤后 3 ~ 48 h 烫伤组和牛

表 1 2 组烫伤大鼠心肌线粒体内 SDH、CCO 活性的比较($U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤后时间(h)					
		1	3	6	12	24	48
烫伤组	60						
CCO		4.8 ± 0.3 ^a	4.3 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.9 ± 0.3 ^a	4.8 ± 0.4 ^a	5.3 ± 0.4
SDH		2.98 ± 0.31	3.07 ± 0.28	2.73 ± 0.27 ^a	3.10 ± 0.28 ^a	2.95 ± 0.27	3.02 ± 0.28
牛磺酸治疗组	60						
CCO		5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.3 ^b	5.0 ± 0.3 ^b	4.9 ± 0.3 ^b	5.2 ± 0.3	5.4 ± 0.3
SDH		3.14 ± 0.27	3.06 ± 0.26	2.98 ± 0.28	3.28 ± 0.27	2.95 ± 0.28	3.08 ± 0.27

注:对照组鼠数 10 只,细胞色素 c 氧化酶(CCO)活性为(5.7 ± 0.3) $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$,琥珀酸脱氢酶(SDH)活性为(3.25 ± 0.26) $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与烫伤组比较,^b $P < 0.05$

表 2 2 组烫伤大鼠心肌线粒体细胞色素 c、细胞色素 aa3 含量的比较($\mu\text{mol/g}$ 蛋白, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤后时间(h)					
		1	3	6	12	24	48
烫伤组	60						
细胞色素 c		0.65 ± 0.04	0.47 ± 0.05 ^a	0.31 ± 0.06 ^a	0.38 ± 0.08 ^a	0.45 ± 0.10 ^a	0.64 ± 0.08
细胞色素 aa3		0.85 ± 0.07 ^a	0.63 ± 0.07 ^a	0.52 ± 0.06 ^a	0.50 ± 0.06 ^a	0.63 ± 0.07 ^a	0.75 ± 0.07
牛磺酸治疗组	60						
细胞色素 c		0.63 ± 0.07	0.65 ± 0.06 ^b	0.57 ± 0.05 ^b	0.52 ± 0.05 ^b	0.58 ± 0.06 ^b	0.61 ± 0.05
细胞色素 aa3		0.85 ± 0.06	0.81 ± 0.06 ^b	0.74 ± 0.06 ^b	0.90 ± 0.31 ^b	0.71 ± 0.05 ^b	0.77 ± 0.05

注:对照组鼠数 10 只,细胞色素 c 值为(0.64 ± 0.05) $\mu\text{mol/g}$ 蛋白,细胞色素 aa3 值为(0.83 ± 0.07) $\mu\text{mol/g}$ 蛋白;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与烫伤组比较,^b $P < 0.05$

表 3 2 组烫伤大鼠心肌线粒体 SOD、 Ca^{2+} -ATPase 及 MDA 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤后时间(h)					
		1	3	6	12	24	48
烫伤组	60						
SOD($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)		502 ± 24	482 ± 28 ^a	420 ± 24 ^a	429 ± 28 ^a	490 ± 31	481 ± 29
Ca^{2+} -ATPase($\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)		45 ± 5	38 ± 4 ^a	36 ± 4 ^a	34 ± 4 ^a	40 ± 4 ^a	45 ± 5
MDA(mmol/mg 蛋白)		5.1 ± 0.5	9.0 ± 1.0 ^a	12.6 ± 1.1 ^a	10.2 ± 1.0 ^a	8.4 ± 1.0 ^a	8.2 ± 0.9 ^a
牛磺酸治疗组	60						
SOD($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)		531 ± 28 ^a	507 ± 22 ^b	503 ± 23 ^b	499 ± 20 ^b	505 ± 25	508 ± 22
Ca^{2+} -ATPase($\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)		47 ± 5	42 ± 4 ^b	43 ± 4 ^b	41 ± 3 ^b	44 ± 4 ^b	42 ± 4
MDA(mmol/mg 蛋白)		5.1 ± 0.5	5.7 ± 0.5 ^{ab}	7.1 ± 0.7 ^{ab}	7.1 ± 0.7 ^{ab}	6.4 ± 0.7 ^{ab}	5.6 ± 0.6 ^b

注:对照组鼠数 10 只,超氧化物歧化酶(SOD)值为(508 ± 22) $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, Ca^{2+} -腺苷三磷酸酶(ATPase)值为(47 ± 7) $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,丙二醛(MDA)值为(5.2 ± 0.5) mmol/mg 蛋白;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与烫伤组比较,^b $P < 0.05$

磺酸治疗组 MDA 值均高于对照组 ($P < 0.05$),但牛磺酸治疗组低于烫伤组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 Ca^{2+} 浓度的变化

烫伤组大鼠伤后 1 h 心肌线粒体中 Ca^{2+} 开始升高为 13.7 ± 1.5 ,伤后 3、6、12、24 h 分别为 24.8 ± 2.6 、 29.7 ± 3.1 、 16.3 ± 1.9 及 13.5 ± 1.7 ,均高于对照组 (10.7 ± 1.6 , $P < 0.05$);心肌细胞质中的 Ca^{2+} 在伤后 3、6、12、24 h 也明显高于对照组 ($P < 0.05$)。牛磺酸治疗组大鼠心肌线粒体中 Ca^{2+} 浓度在伤后 3、6、12 及 24 h 分别为 16.8 ± 2.8 、 18.7 ± 1.9 、 10.5 ± 1.8 及 13.3 ± 1.7 。

3 讨论

心肌细胞是机体内线粒体含量最丰富的细胞,

而线粒体又是提供细胞生命活动能量的细胞器,并对一些病理因素(如创伤和应激)的作用非常敏感,可引起线粒体结构与功能改变。研究表明,烧伤后早期存在心肌线粒体结构与功能损伤,主要为电子传递活性下降、能量代谢障碍、 Ca^{2+} -ATPase 活性下降及 Ca^{2+} 转运紊乱等^[6-9]。细胞色素 c 和细胞色素 aa3 是呼吸链的重要组成部分,其含量降低势必导致 CCO 活力下降,影响氧化磷酸化过程。本研究结果显示,大鼠烫伤后心肌线粒体中 SDH、CCO 及 SOD 活性均有不同程度的降低;细胞色素 c 在伤后 3 h 呈显著性降低,伤后 6 h 线粒体中细胞色素 c 降低程度最大,伤后 24 h 仍显著低于对照组,烫伤后 48 h 才基本恢复至正常水平;牛磺酸治疗组心肌线粒体细胞色素 c 的释放明显高于烫伤组,SDH、CCO 及 SOD

活性明显高于烫伤组。表明烧伤后心肌线粒体成分和酶活性受到一定的破坏,牛磺酸针对此破坏有较好的保护作用,其机制可能与牛磺酸提高了心肌线粒体对氧自由基的清除能力,降低了脂质过氧化损伤有关。

线粒体既是能量代谢的主要场所,又是调节细胞内钙稳态的重要细胞器之一。烧伤后细胞和线粒体均处于一种应激状态,此时线粒体 Ca^{2+} 摄取加强是细胞对付应激的一种方式,可能是导致烧伤后线粒体 Ca^{2+} 释放障碍而引起线粒体 Ca^{2+} 超载的一个重要原因。本实验结果表明,伤后 3 h 烫伤组心肌线粒体中 Ca^{2+} 和 MDA 水平较对照组显著升高,而 Ca^{2+} -ATPase 活性在伤后 3、6、12 及 24 h 均有不同程度降低;牛磺酸对烫伤后心肌线粒体中 Ca^{2+} 和 MDA 含量的升高及 Ca^{2+} -ATPase 活性下降有较好的拮抗作用。线粒体 Ca^{2+} 浓度升高可以激活线粒体磷脂酶 A2,该酶在严重烧伤后早期心肌线粒体损伤中起重要作用;同时可以激活一氧化氮合酶,使一氧化氮合成增加,高浓度的一氧化氮具有强烈的细胞毒性。一氧化氮可与线粒体 CCO 的氧结合位点结合,竞争性抑制 CCO 活性,导致其氧利用障碍和线粒体呼吸功能下降。一氧化氮还可介导线粒体通透性转换孔开放,引起线粒体中细胞色素 c 释放,激活细胞质半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3,导致细胞凋亡^[10]。

因此,牛磺酸不但能提高心肌线粒体清除氧自由基的能力,减少线粒体膜成分的降解,而且能调节 Ca^{2+} -ATPase 活性,抑制线粒体 Ca^{2+} 超载,从而对线粒体结构和功能起到保护作用。

参考文献

- [1] 黄跃生. 严重烧伤后早期心肌损害的细胞分子机制与防治策略研究进展. 中华烧伤杂志, 2006, 22(3): 161-163.
- [2] 李国辉. 深入开展烧伤后早期脏器损害的研究. 中华烧伤杂志, 2004, 20(5): 260-261.
- [3] Huang YS, Li ZQ, Yang XC. Roles of ischemia and hypoxia and the molecular pathogenesis of post-burn cardiac shock. Burns, 2003, 29(8): 828-833.
- [4] 万福生, 李国辉. 牛磺酸对严重烧伤大鼠心肌损害的保护作用. 中华烧伤杂志, 2005, 21(3): 173-176.
- [5] 万福生, 刘波, 赵小曼, 等. 牛磺酸对大鼠在体缺血再灌注心肌线粒体呼吸酶系的影响. 基础医学与临床, 2000, 20(4): 45-47.
- [6] 万福生, 李国辉, 余乐涵, 等. 川芎嗪对严重烧伤早期心肌损害的保护及初步机制. 中成药, 2006, 28(11): 1613-1616.
- [7] 彭念寅, 周红, 司良毅. 吡那地尔对烫伤大鼠心肌线粒体结构及呼吸功能的影响. 中华烧伤杂志, 2005, 21(3): 170-172.
- [8] Xia ZF, Horton JW, Tang HT, et al. Metabolic disorder in myocardial intracellular free calcium after thermal injury. Burns, 2001, 27(5): 453-457.
- [9] 夏照帆, 田建广, 唐洪泰, 等. 烫伤大鼠心肌收缩功能与细胞内游离钙的研究. 中华烧伤杂志, 2001, 17(6): 342-344.
- [10] 余华荣, 张能, 方海立. 牛磺酸对细胞因子诱导的胰岛细胞凋亡的影响. 重庆医科大学学报, 2001, 26(4): 378-381.

(收稿日期: 2007-07-15)

(本文编辑: 张红)

读者 · 作者 · 编者

中华医学会关于论文采用不同文种进行再次发表的规定

根据国际惯例(参考《向生物医学期刊投稿的统一要求》)和我国的实际情况,对符合以下条件的论文,中华医学会系列杂志允许并接受同一研究的有关论文采用不同语种的再次发表。

1. 高质量、有影响的科研论文。
2. 作者须征得相关期刊的同意,首次发表论文的期刊和准备再次发表的期刊均无异议。作者需向再次发表的期刊提供首次发表该论文期刊的同意书,论文首次发表的时间和论文复印件、单行本或原稿。
3. 尊重首次发表的权益,再次发表至少在首次发表 1 周之后。
4. 再次发表的论文应面向不同的读者,建议节选或摘要刊登。
5. 再次发表的论文必须完全忠实原文,真实反映原有的资料及观点,作者的顺序不能改动。
6. 在再次发表的文题中应标出是某篇文章的再次发表(全文、节选、全译或节译)。
7. 在再次发表的文题页脚注中,要让读者、同行和文献检索机构知道该论文已全文或部分发表过,并标引首次发表的文献。如:“本文首次发表在《中华内科杂志》,2006,45(1):21-24”,英文为“This article is based on a study first reported in the Chin/Intern Med, 2006, 45(1): 21-24”。

中华医学会杂志社