

热毒清对家兔线粒体 H^+-ATP 合酶活性 保护作用的实验研究*

实验医学研究中心 梁驹卿 皇甫永穆 李 东 李 萍
同济医科大学 中西医结合研究所 陆付耳 李鸣真 叶望云

内容提要 内毒素制造的家兔全身性 shwartzman 反应模型, 肝线粒体 H^+-ATP 合酶活性下降, 而热毒清组此酶活性正常, 两组间有显著差异 ($P < 0.05$)。提示热毒清注射液具有保护线粒体 H^+-ATP 合酶的作用。

临床上内毒素引起的弥散性血管内凝血(DIC)常合并休克, 严重损害机体组织细胞。组织呼吸主要依赖线粒体, 后者是真核细胞的一个重要而独特的细胞器, 是细胞的能源供应站, 通过氧化磷酸化为细胞提供 ATP, 供给机体生命活动的需要。 H^+-ATP 合酶是线粒体氧化磷酸化过程的一个重要酶, 其活性的改变可从一个侧面反映线粒体功能是否正常。热毒清注射液临床上用于急性感染性疾病, 疗效满意⁽¹⁾。本实验拟从制造家兔的全身 shwartzman 反应探讨热毒清注射液对线粒体氧化磷酸化酶系中 H^+-ATP 合酶活性的影响, 观察其对线粒体有无保护作用。

材料和方法

一、实验动物: 健康日本大耳白兔, 体重 2.0~2.5kg, 雌雄不拘, 同济医科大学医学实验动物中心提供。

二、主要试剂与仪器: (1)精制大肠杆菌 $O_{111}B_4$ 内毒素, 上海生物制品研究所产品, 批号 8301。(2)100%热毒清注射液(金银花、蒲公英、大青叶、鱼腥草), 由宜昌民康制药厂生产, 批号 860301。(3)ATP: 西德 Boehringer Mannheim GmbH 产品。其它均为分析纯或优级纯试剂。(4)仪器: 东德 K26-D 型低温高速离心机。

三、方法

1. 动物分组及处理: 兔 32 只, 随机分为 4 组, 每组 8 只。(1)正常对照组: 不作任何处理。(2)模型组: 从耳缘静脉在 0、24h 给予内毒素, 用量分别为 15、25 $\mu g/kg$ 体重; 另外在 0、12、24h 分别注射生

理盐水 5ml/kg 体重。(3)地塞米松组: 在 0、24h 分别两次静脉注射地塞米松 1mg/kg 体重, 余同模型组。(4)热毒清组: 内毒素给予时间与剂量同模型组, 100%热毒清注射液代替生理盐水。

2. 肝线粒体的制备: 基本按照杨福愉等的方法⁽²⁾略加改进。剪取左叶肝组织置入含 250mM 蔗糖、5mM Tris-HCl、1mM EDTA 的 pH7.4 介质中洗涤, 称重, 剪碎研磨成匀浆。用差速离心法分离线粒体, 最后使线粒体蛋白含量在 1mg/ml 左右, 备用。上述制备过程均保持在 0~4°C 环境。

3. H^+-ATP 合酶活力的测定: 采用张龙翔等的方法⁽³⁾。实验设三个组。A 组为无酶活性对照组, B 组为酶活性组, C 组为寡霉素抑制后的酶活性组。各组先加反应液[含 50mM Tris- SO_4 缓冲液(pH8.0)、6mM ATP、3mM 硫酸镁、95%乙醇 0.01ml]0.5ml, C 组另加寡霉素 4 $\mu g/mg$ 线粒体蛋白。然后, B、C 组再加入线粒体悬液后, 立即将三组试管置于 30°C 水浴保温 5 min 后, 向各管加入 5% 三氯乙酸 0.5ml 终止反应, 最后再向 A 组加入线粒体悬液, 混匀后, 将各管以 3000 rpm 离心 10min, 吸取上清液待测磷。

磷的测定采用 Muszbek 等的方法⁽⁴⁾。线粒体悬液蛋白含量的测定, 采用改良的 Lowry 法⁽⁵⁾, 以牛血清蛋白为标准。最终换算成 H^+-ATP 合酶比活力, 即每毫克蛋白每分钟水解释放 1 个微克分子无机磷的酶量为一个酶活性单位($\mu mole\ pi/min/mg\ pro$)。

结 果

四组肝细胞线粒体 H^+-ATP 合酶活性及寡霉素抑制百分率, 结果见附表。

从表中可以看出, 各组加寡霉素后, 其 H^+-ATP 合

*国家自然科学基金资助课题

附表 H⁺-ATP 合酶活性和寡霉素对其的抑制率

	例数	酶活性 [△] (M±SD)	寡霉素对酶活性抑制率(%)
正常对照组	8	0.360±0.032**	85
模型组	8	0.280±0.015*	86
地塞米松组	8	0.336±0.024	84
热毒清组	8	0.341±0.018**	88

注: [△]酶活性单位为 $\mu\text{mole pi/min/mg pro}$; *与正常对照组比较 $P < 0.05$; **与模型组比较 $P < 0.05$

酶活性被抑制的百分率为85~88%。模型组与正常对照组和热毒清组比较,酶活性显著下降 ($P < 0.05$);热毒清组和地塞米松组则与正常对照组相近,并无显著差异 ($P > 0.05$)。而地塞米松组与模型组间虽然差异不显著,但前者酶活性趋于接近正常对照组。

讨 论

内毒素所引起的全身 shwartzman 反应表现为脏器内微血栓广泛形成,导致组织缺血和细胞损伤。细胞呼吸主要依赖线粒体。H⁺-ATP 合酶镶嵌于线粒体内膜上,在氧化磷酸化过程中能促使ADP形成ATP。

Leena Mela 的实验表明,缺血和内毒素中毒性休克能使线粒体ATP酶复合体活力下降⁽⁸⁾。可溶性毒素具有解偶联作用,其机理可能是通过游离脂酸的释出而间接起作用。最近有人报道,感染性疾病产生过量的自由基,使酶蛋白中氨基酸氧化及酶蛋白交联等结构改变,致酶活性下降甚至丧失;细胞及亚细胞的不饱和脂酸受自由基作用产生脂肪酸的各种自由基与蛋白质连锁反应,形成蛋白质分子聚合物,损害膜结构,影响膜的通透性均可使膜酶活性发生改变⁽⁷⁾,使ATP合成减少。

热毒清具有清热解毒功效。其减轻内毒素对线粒体H⁺-ATP合酶的毒性作用,可能通过抑制内毒素诱导的自由基及脂肪酸自由基的形成,减缓了毒害作用。血清过氧化脂质水平可以反映体内自由基和过氧化脂质的新陈代谢。我校中西医结合研究所实验观察内毒素对血清过氧化脂质含量的影响,热毒清组测定

值明显低于模型组 ($P < 0.01$),而与正常对照组无显著差异 ($P > 0.05$),这一结果支持了上述观点。电镜观察同时发现,模型组线粒体肿胀,热毒清组和地塞米松组则基本正常。亦说明热毒清对线粒体的保护作用。此外,该所实验表明,热毒清能使内毒素结构崩解,拮抗内毒素所致DIC生物效应⁽⁸⁾;且对内毒素所引起的溶酶体膜的损伤亦有保护作用⁽⁹⁾。以前认为类固醇药(如地塞米松)对内毒素致伤的线粒体具有保护作用,本实验也得到相近似结果。

总之,热毒清具有上述多功能效应,在一定程度上解除了内毒素对肝细胞线粒体H⁺-ATP合酶的损害,为阐明其保护肝细胞线粒体生理功能之作用机理和临床应用提供一定的科学根据。

参 考 文 献

1. 武汉医学院第二附属医院,等. 中药“抗炎6号”注射液治疗282例急性感染性疾病. 湖北中医杂志 1984; 5: 14.
2. 杨福愉,等. 电离辐射对线粒体结构和功能的影响. 实验生物学报 1964; 9(3):261.
3. 张龙翔,等. 生化实验方法和技术. 第1版. 北京:人民教育出版社,1981:28—32.
4. Muszbek L, et al. A highly sensitive method for the measurement of ATPase activity. Anal Biochem 1977; 77: 282.
5. Mary AK, et al. A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal Biochem 1978; 87:206.
6. Leena Mela, et al. Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. Amer J of Physiol 1971; 220(2):571.
7. 周翔,等. 血清过氧化脂质的测定和意义. 白求恩医科大学学报 1985; 11(4):358.
8. Lin Ju-sheng, et al. Inhibitory action of chinese medicinal preparation-anti-inflammatory agent No. 6 on DIC resulting from endotoxin experimental study. Acta Academiae Medicinae Wuhan 1985; 5(1):23.
9. Deng Yi-ming, et al. Studies on the stabilizing effect of traditional Chinese preparation-Re Du Qing on the membrane of lysosomes. J Tongji Medical University 1988; 8(2): 122.

《陕西中医》征订启事

《陕西中医》为综合性中医药学术期刊。本刊主要开辟有:临床报道、专题笔谈、老中医经验、古方今用、针灸经络、理论探讨、方药研究、研究生论坛、

医苑新人、百家论医、辅导讲座以及文献综述、实验研究等20多个栏目。本刊为月刊,国内外公开发行,邮发代号:国内:52—24,国外:M671,每册定价0.70元,欢迎读者在当地邮局(所)办理订阅。

Moreover, the cost was low. Using this method, the authors had screened twenty Chinese herbs and found that *Salvia miltiorrhiza* and its extracts inhibit cellular cholesterol biosynthesis efficiently.

(Original article on page 604)

Experimental Study of Protective Action of Re-Du-Qing(热毒清) on H⁺-ATP Synthase Activity of Mitochondria in the Rabbit

Liang Juqing(梁驹卿), Huangfu Yongmu(皇甫永穆), Lu Fu'er(陆付耳)*, et al

Dept. of Molecular Biology, Research Center of Experimental Medicine,

**Institute of the Integration of TCM-WM, Tongji Medical University, Wuhan*

To observe the effect of Re-Du-Qing on the toxic effect of endotoxin, the rabbit model of general Stewartman reaction was made by injection of endotoxin into ear vein and the H⁺-ATP synthase activities of rabbit liver mitochondria were measured. The results showed that the H⁺-ATP synthase activity of endotoxin group was significantly lower than that of the normal group and group which had been simultaneously injected Re-Du-Qing ($P < 0.05$). The level of H⁺-ATP synthase activity was almost raised to normal value, when Re-Du-Qing or dexamethasone was injected simultaneously with endotoxin respectively. It suggested that Re-Du-Qing was able to alleviate the nocuous effect of endotoxin on H⁺-ATP synthase activity in the mitochondria of rabbit liver cells.

(Original article on page 607)

Study of Huoxue-Huayu(活血化瘀)in Treating Experimental Intraocular Hemorrhage by Electroretinography

Duan Junguo(段俊国), Deng Yaping(邓亚平), et al

Chengdu College of TCM, Chengdu

Experiments were conducted in chinchilla rabbits to determine the effect of Huoxue-Huayu (promote blood circulation to remove blood stasis) on the electroretinogram (ERG). An animal model of intraocular hemorrhage was established by radiating of Q-switched ruby laser in 58 eyes of 39 rabbits. After laser radiation, the amplitudes of ERGs of the animal eyes were remarkably reduced. The animals were randomly divided into 3 groups. One group was the control group without any treatment. The other two groups were treated with Yandi Decoction III(眼底III号, a composite prescription of Huoxue-Huayu) and urokinase respectively for 3 weeks. The depressed ERGs in the Yandi Decoction III treated group showed remarkable recovery during 6 weeks after starting treatment, comparing with that in the control group and the urokinase treated group ($P < 0.05$). Finally, the 33% of the lost amplitude of a-wave and 28% of b-wave in the Yandi Decoction III treated group were recovered. The mechanism of ERG recovery in the Huoxue-Huayu therapy was also preliminarily discussed in the paper.

(Original article on page 609)