论著

文章编号:1000-5404(2005)14-1424-04

缺氧复合氯霉素处理对大鼠脑皮质线粒体氧化呼吸功能及COX活性的影响

宋 熔,柳君泽,陈丽峰 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 观察大鼠经不同时间低压缺氧并复合线粒体蛋白翻译特异抑制剂氯霉素(CAP)处理后,脑组织线粒体呼吸功能和COX活性的变化以及CAP处理对缺氧过程中线粒体氧化呼吸功能的影响。**方法** 成年雄性Wistar大鼠随机分为对照组、单纯药物处理组和缺氧复合药物处理组,后者为模拟海拔5 000 m高原连续低压缺氧暴露1、5、15 d和30 d,分别于动物处死前7 d按100 mg/kg体质量,腹腔注射0.5% CAP。高速离心密度梯度法分离大鼠脑皮质线粒体,Clark氧电极法测定线粒体呼吸活性,极谱法测量COX活性。**结果** 与对照组相比,单纯CAP处理大鼠脑线粒体ST_3、RCR、OPR及COX活性显著降低;复合缺氧后则线粒体呼吸功能及COX活性明显改善,且随缺氧时间的延长而基本恢复到平原对照组水平。**结论** 缺氧可以改善氯霉素处理大鼠脑皮质COX活性及线粒体的氧化呼吸功能,提高氧化磷酸化效率,其改善程度具有时间依赖性,随缺氧时间的延长而逐渐恢复。

关键词: 缺氧;氯霉素;线粒体;细胞色素氧化酶

中图法分类号: R329.25;R364.4;R978.1 **文献标识码**: A

Effect of CAP-administration on respiratory function and cytochrome c oxidase avtivity in mitochondria from brain cortex of rats exposed to hypoxia

SONG Rong, LIU Jun-ze, CHEN Li-feng (Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To understand the changing aspects of CAP-administration on mitochondrial oxidative phosphorylation function and cytochrome c oxidase (COX) activity during hypoxia exposure and their mechanisms. **Methods** Except the control group (C group), adult male Wistar rats were exposed to a hypobaric chamber simulated 5 000-meter high altitude for 23 h every day for 0, 1, 5, 15, 30 d ($H_{0,1,5,15,30}$) respectively and administrated CAP (100 mg/kg, intraperitoneal injection) every 12 h for 7 d before sacrificed by decapitation. Mitochondrial respiratory function and COX activity were measured by Clark oxygen electrode and polarography, respectively. **Results** As compared with C group, mitochondrial state 3 respiration (ST_3) and respiratory control rate (RCR) and oxidative phosphorylation rate (ORP) and COX activity in H_0 + CAP group all decreased significantly, but by prolonging hypoxia exposure increased and restored to the control level. **Conclusion** Mitochondrial respiratory function, oxidative phosphorylation efficiency and COX activity in rat brain could improve by administrating CAP during hypoxia exposure and almost reach to the control level by prolonging hypoxia exposure.

Key words: hypoxia; choramphenicol; mitochondria; cytochrome c oxidase

氯霉素(chloramphenicol,CAP)是哺乳动物线粒体蛋白翻译的特异性抑制剂,但不影响细胞质中内质网上蛋白质的合成。研究表明二甲胺四环素等线粒体蛋白翻译抑制剂的处理可以降低新生啮齿动物缺血缺氧性脑损害[1];沙鼠在发生脑缺血前或后腹腔注射二甲胺四环素可明显提高其海马CA1锥状神经元的存活率[2],说明线粒体翻译抑制剂的处理能增加细胞的耐缺氧能力。但对于缺氧时线粒体蛋白合成抑制剂(氯霉素)处理对脑线粒体氧化呼吸功能的影响尚少见报道。本研究通过观察大鼠在缺氧0、1、5、15 d及30 d暴露并复合氯霉素处理后,脑组织线粒体呼吸功

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070290)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070290)

作者简介:宋 熔(1971-),女,安徽省灵璧县人,硕士研究生,主治医师,主要从事缺氧组织能量代谢方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68772530

通讯作者:柳君泽,电话:(023)68752336,E-mail: liuliu@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2004-07-06;**修回日期**:2004-09-06

能和COX活性,探讨缺氧和CAP复合后线粒体能量代谢的改变及其可能的机制。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

生物组织氧耗测氧仪(解放军304医院);Ficoll、ADP(Sigma公司,美国);细胞色素C(Sigma公司,进口分装);Chloramphenicol(氯霉素粉剂)(AMRESCO进口分装)苹果酸钠(上海试剂二厂):用前配成0.5 mol/L溶液;丙酮酸钠(湖洲生物化学试剂厂);牛血清白蛋白(上海生工生物工程公司)。

1.2　动物及实验分组

雄性Wistar大鼠55只(第三军医大学实验动物中心提供),11~14周龄。采用分段随机法分为6组,除平原对照组外,其余动物均于活杀前7 d腹腔注射0.5%氯霉素(100 mg/kg,1次/12 h),低压舱模拟海拔5 000 m高原,大气压为405.35 mmHg每天放回平原1 h打扫、喂食及注射药物。连续减压0 d(未缺氧的药物对照组,H_0 + CAP组)、1 d(H_1 + CAP)、5 d(H_5 + CAP),15 d(H_{15} + CAP)及30 d(H_{30} + CAP)。平原对照组于实验前7 d开始腹腔注射等量的生理盐水于舱外同时喂养。平原对照组和H_0 + CAP组在平原采集标本,其余各组在模拟海拔5 000 m高原低压舱内采集标本。

1.3　指标测定及方法

1.3.1　脑线粒体的提取　参照本实验室建立的方法[3]。蛋白质浓度测定用Lowry's法。

1.3.2　线粒体氧化呼吸活性的测定　参照Clark等[4]的方法。反应总体积1.6 ml,温度30 ℃。将1.5 ml反应介质(75 mmol/L甘露醇,25 mmol/L蔗糖,0.05 mmol/L K^+-EDTA,10 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4,5 mmol/L磷酸-Tris,pH 7.4,100 mmol/L KCl)加入反应池中孵育2 min,以空气饱和,然后加入线粒体悬液0.1 ml,记录反应曲线1~2 min后,依次加入反应底物(0.5 mol/L的苹果酸钠和丙酮酸钠的混合物)10 μl、0.1 mol/L ADP 5 μl。观察线粒体呼吸态的变化,用记录仪连续记录氧耗曲线,计算:①加入ADP后耗氧速率(Ⅲ态呼吸,ST_3)和ADP消耗完后耗氧速率(Ⅳ态呼吸,ST_4),耗氧速率(QO)指单位时间内每毫克线粒体蛋白所消耗的摩尔原子氧(nmol·min^{-1}·mg^{-1})表示;②呼吸控制率(RCR) = ST_3/ ST_4;③氧化磷酸化效率(OPR):单位时间内每毫克线粒体蛋白合成的ATP量(nmol·min^{-1}·mg^{-1})。

1.3.3　细胞色素氧化酶活性测定　参照Rafael的氧电极法[5]。反应总体积1.4 ml,反应温度25 ℃。将1.3 ml预先于25℃水浴中孵育过夜的磷酸-EDTA缓冲液加入反应池中孵育1~3 min,依次加入0.1 mmol/L抗坏血酸溶液50 μl、2 mmol/L细胞色素C 30 μl、50 mmol/L TMPD溶液10 μl,反应1~2 min,待反应曲线斜率(即assay blank,空白值)恒定后,加入线粒体悬液10 μl,记录氧耗曲线。酶活性(A)代表单位时间内所消耗的摩尔原子氧,以nmol·min^{-1}·mg^{-1}蛋白表示。

1.4　统计学处理

数据均以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件包的单因素方差分析,各组均值的多重比较采用FLSD法。

2　结果

2.1　缺氧过程中氯霉素处理大鼠脑皮质线粒体氧化呼吸功能的改变

H_0 + CAP组与平原对照组比较,ST_3、RCR、OPR均显著降低,差异具有非常显著意义($P<0.01$),ST_4无显著性差异。与H_0 + CAP组比较,H_1 + CAP组ST_3降低,差异具有显著意义($P<0.05$);而H_5 + CAP组、H_{15} + CAP组及H_{30} + CAP组则增高,差异具有非常显著意义($P<0.01$)。H_1 + CAP组ST_4低于H_0 + CAP组,差异有显著意义($P<0.05$),但与平原对照组比较,无显著性差异。H_1 + CAP组、H_5 + CAP组、H_{15} + CAP组及H_{30} + CAP组RCR均高于H_0 + CAP组,差异具有非常显著或显著意义($P<0.01$,$P<0.05$)。H_0 + CAP组OPR低于各组,差异具有显著或非常显著意义($P<0.05$,$P<0.01$),见表1。

表1　缺氧过程中氯霉素处理大鼠脑皮质线粒体氧化呼吸功能的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　The mitochondrial respiratory function in cerebral cortex in rats after hypoxia exposure and CAP-administration($\bar{x} \pm s$)

Group	n	ST_3 (nmol·min^{-1}·mg^{-1})	ST_4 (nmol·min^{-1}·mg^{-1})	RCR	OPR
Control	8	88.86±11.49	10.28±1.84	8.74±0.83	151.20±14.18
H_0+CAP	10	65.15±7.18**	11.49±2.28	5.78±0.75**	119.90±12.74**
H_1+CAP	8	55.59±6.36**☆	8.01±0.54☆	6.95±0.72**☆	157.16±11.17★
H_5+CAP	10	82.25±10.50★▲	10.63±0.64▲	7.75±1.03★	170.75±28.79★
H_{15}+CAP	9	84.66±11.83★▲	11.80±2.14△	7.31±1.32*★	150.58±25.10★○
H_{30}+CAP	10	77.22±9.82*★▲	9.05±1.67	8.66±0.95★▲◇	144.96±16.24☆●

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; ☆: $P<0.05$, ★: $P<0.01$, *vs* H_0 + CAP; △: $P<0.05$, ▲: $P<0.01$, *vs* H_1 + CAP; ○: $P<0.05$, ●: $P<0.01$, *vs* H_5 + CAP; ◇: $P<0.05$, *vs* H_{15} + CAP

2.2　缺氧过程中氯霉素处理大鼠脑皮质COX活性的变化

与平原对照组比较,H_0 + CAP组COX活性显著降低,差异具有非常显著意义($P<0.01$);与H_0 + CAP组比较,H_1 + CAP组、H_{15} + CAP组及H_{30} + CAP组COX活性增高,差异具有非常显著意义($P<0.01$),见表2。

表2　缺氧过程中氯霉素处理大鼠脑皮质COX活性的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　The COX activity in cerebral cortex mitochondria in rats after hypoxia exposure and CAP-administration($\bar{x} \pm s$)

Group	n	COX activity(nmol·min^{-1}·mg^{-1})	%
Control	8	628.48±62.09	100
H_0+CAP	10	380.90±117.92**	61
H_1+CAP	8	543.86±82.03★	87
H_5+CAP	7	443.05±98.30**△	70
H_{15}+CAP	9	519.61±119.50*★	83
H_{30}+CAP	9	578.74±44.74★	92

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; ★: $P<0.01$, *vs* H_0 + CAP; △: $P<0.05$, *vs* H_1 + CAP

3 讨论

3.1 缺氧过程中氯霉素处理对大鼠脑皮质线粒体呼吸功能的影响及意义

线粒体是细胞有氧呼吸和能量供应的主要场所。研究表明,中到重度缺氧的新生鼠心肌细胞,其线粒体功能受到显著抑制,能量生成障碍[6]。我们以往的研究也表明急性缺氧时脑组织线粒体呼吸功能下降,表现为 RCR 降低,氧化与磷酸化一定程度的脱耦联,但长期或慢性缺氧时,线粒体功能有所恢复[7]。ST_3 是指线粒体在 ADP 存在时的快速摄氧速率,ST_4 是指 ADP 耗尽后较低的摄氧速率,在消耗氧的同时,不伴有 ATP 的合成,是一个"无效"的氧耗过程。RCR 为 ST_3/ ST_4的比值,是评价线粒体结构完整性和氧化磷酸化耦联程度的灵敏指标之一。ST_3 和 RCR 下降说明 ADP 对呼吸链电子传递速率的刺激效应降低。OPR 是指单位时间内单位线粒体蛋白合成的 ATP 量,反映能量的生成效率。

CAP 是哺乳动物线粒体蛋白翻译的特异性抑制剂,不影响细胞质中蛋白质合成。文献[8]报道,当线粒体内蛋白质合成被特异性抑制后,线粒体的大小、数目、形状及膜通透性等均发生改变,阻断线粒体的蛋白合成会导致能量产生的衰退[9]。CAP 对细胞呼吸功能的影响不仅是阻断线粒体蛋白的合成,而且还与自由基代谢异常有关[10],DF-1 细胞用 CAP 处理后 ATP 产量明显降低,而且细胞增殖也显著下降[11]。这些提示,CAP 可通过作用于线粒体而影响到细胞和组织的功能。本实验通过给大鼠注射 CAP,抑制线粒体蛋白的合成,发现脑线粒体 ST_3、RCR 及 OPR 均显著降低,ST_4 无明显变化,表明当线粒体的蛋白合成被抑制后,线粒体的氧化磷酸化耦联程度及氧化磷酸化效率均受到显著抑制,提示 mtDNA 编码呼吸链基因的表达在线粒体氧化呼吸功能维持中的重要作用。本实验同时显示,大鼠不同时间缺氧暴露过程中用线粒体蛋白翻译抑制剂 CAP 处理,除了缺氧 1 d(H_1 + CAP 组)ST_3 比单纯 CAP 处理组降低外,随时间延长则逐渐恢复并高于单纯 CAP 处理组(H_0 + CAP 组),在缺氧 5 d 和 15 d 时甚至已经达到平原对照水平,提示缺氧可以改善甚至增强 CAP 处理大鼠的氧耗速率;缺氧对 CAP 处理大鼠脑线粒体 ST_4 的影响除缺氧 1 d 可显著降低,其它各组均无显著变化;缺氧暴露可使 CAP 处理大鼠脑线粒体 RCR 和 OPR 显著升高,甚至达到平原对照水平,明显改善已被 CAP 抑制的氧化呼吸效率。

CAP 处理可以降低大鼠脑线粒体呼吸氧耗和氧化磷酸化效率,而复合缺氧暴露则可使线粒体氧化呼吸功能恢复,改善氧化磷酸化效率,但其机制在急性缺氧(1 d)和延长的(prolonged)缺氧(5、15 d)有所不同,急性缺氧通过降低"无效"氧耗,而后者则是通过增加 ADP 刺激的氧耗速率而实现的。我们的结果还提示:不论在 CAP 处理后复合急性缺氧还是慢性缺氧过程中再给予 CAP 处理,均可以改善单纯药物处理大鼠脑线粒体的氧化磷酸化耦联程度及氧化磷酸化效率,而且,线粒体的氧化呼吸功能的改善具有时间依赖性,随缺氧时间的延长而逐渐恢复。

3.2 缺氧过程中氯霉素处理大鼠脑皮质 COX 活性的改变

COX 是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物,在调节线粒体氧化磷酸化功能和细胞能量产生中起主要作用。我们以往研究发现缺氧时大鼠脑皮质 COX 活性降低,并且与缺氧存在时间依赖关系,在缺氧 15 d 以内呈进行性降低,缺氧 30 d 时 COX 活性有部分恢复[12]。有关线粒体蛋白合成抑制剂对 COX 活性的影响尚少见报道。本实验显示大鼠注射 CAP 后脑皮质 COX 活性明显降低,仅为对照组的61%。CAP 处理大鼠经不同时间低压缺氧暴露后,除缺氧 5 d 组脑皮质 COX 活性无显著变化外,其余各组均有显著改善,尤其在缺氧 1 d 和 30 d 时已接近平原对照水平,提示 CAP 处理复合急性缺氧或慢性缺氧,均可以改善单纯药物处理大鼠脑皮质 COX 活性,与线粒体氧化呼吸活性的改变趋势大体一致,提示 COX 活性的改善是缺氧暴露致 CAP 处理大鼠脑线粒体氧化呼吸功能改善的基础之一。

综上所述,缺氧复合氯霉素处理,可以改善单纯氯霉素处理大鼠脑皮质 COX 活性及线粒体的氧化呼吸功能,提高氧化磷酸化效率,其改善程度具有时间依赖性,随缺氧时间的延长而逐渐恢复。其机制尚不明确,有待深入研究。文献[1]报道,二甲胺四环素(一种半合成四环素),具有抑制线粒体蛋白合成的作用,可以降低新生啮齿动物缺血缺氧性脑损害;沙鼠在脑缺血前或后腹腔注射二甲胺四环素,其海马 CA1 锥状神经元的存活率明显提高[2],提示药物干预具有"化学预处理"的作用。这些报道和本实验的结果均表明线粒体翻译抑制剂的处理能增加细胞的耐缺氧能力,提示氯霉素可能具有促进机体对缺氧习服的作用,但其作用及其机制还有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Arvin K L, Han B H, Du Y, *et al*. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury[J]. Ann Neurol, 2002,

52(1):54-61.

[2] Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, *et al*. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(26): 15769-15774.

[3] 高文祥,柳君泽,吴利平,等. 急、慢性缺氧对大鼠脑线粒体能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 879-882.

[4] Clark J B, Nicklas W J. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization [J]. J Biol Chem, 1970, 245(18): 4724-4731.

[5] Rafael J. Cytochrome c oxidase[A]. In: Bergemeyer H U, Bergemeyer J, Grassl M. Methods of Enzymatic Analysis: enzymes 1, oxidoreductases, transferases[M]. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. 266-273.

[6] Casey T M, Pakay J L, Guppy M, *et al*. Hypoxia causes downregulation of protein and RNA synthesis in noncontracting Mammalian cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2002, 90(7): 777-783.

[7] 柳君泽,高文祥,罗德成,等. 缺氧大鼠脑线粒体的能量合成特点[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(6): 540.

[8] Mazzocchi G, Neri G, Robba C, *et al*. Investigation on the turnover of adrenocortical mitochondria. X. A correlated biochemical stereological study of the effects of chronic treatment with chloramphenicol on the mitochondria of the rat zona fasciculata [J]. Am J Anat, 1978, 153(1): 67-79.

[9] Hyde G E, Durham D. Increased deafferentation-induced cell death in chick brainstem auditory neurons following blockade of mitochondrial protein synthesis with chloramphenicol[J]. J Neurosci, 1994, 14(1): 291-300.

[10] Karbowski M, Kurono C, Wozniak M, *et al*. Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26(3-4): 396-409.

[11] Korohoda W, Pietrzkowski Z, Reiss K. Chloramphenicol, an inhibitor of mitochondrial protein synthesis, inhibits myoblast fusion and myotube differentiation[J]. Folia Histochem Cytobiol, 1993, 31(1): 9-13.

[12] 谭小玲,柳君泽,曹利飞,等. 长时间缺氧对大鼠脑皮质线粒体细胞色素氧化酶活性及亚基Ⅰ、Ⅳ蛋白表达的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2002, 13(4): 239-242.

(编辑　栾　嘉)

文章编号:1000-5404(2005)14-1427-01

个案与短篇

超声检查对急性阑尾炎的诊断和分型

Ultrasonography in diagnosis and classification of acute appendicitis

程蔚然[1],艾正友[2],李卓良[2]　(四川省简阳市人民医院:[1]功能科超声室,[2]普外科,简阳 641400)

急性阑尾炎早期诊断对手术时机的选择具有重要意义。本文分析了176例经超声诊断为阑尾炎病例,以探讨成人及小儿阑尾炎的声像图特征及对临床分型的意义,并初步探索适合外科手术的最佳检查时段。

1　资料与方法

1.1　研究对象

2000年1月至2004年1月,经临床确诊为阑尾炎患者184例,仅经超声检查确诊为阑尾炎的患者176例,男92例,女84例,年龄1.7~87岁,平均38岁。发热83例。转移性腹痛89例,占50.6%,腹痛开始至就诊时间最短2.5 h,最长14 d,平均9.5 h,48 h内就诊者119例,占67.6%。

1.2　使用仪器

TOSHIBA 240A型黑白超声仪,探头频率3.75~7.5 MHz,TOSHIBA SSA550型黑白超声仪,探头频率3.0~6.0 MHz及ALOKA SSD 5500彩色多普勒超声仪,探头频率5~13 MHz。

1.3　操作方法

常规扫查:检查时患者取仰卧位,先于右侧腹沿升结肠由远至近扫查,逐渐显示回盲部,探头逐渐移至盲肠末端,然后缓慢旋转探头,作扇形扫查,显示出阑尾根部,追踪阑尾体部及尖端,直至满意显示阑尾图像;也可自阑尾体部及尖端追踪至根部及盲肠和升结肠。观察阑尾外形及尖端指向,测量阑尾大小(长度,及最大外径)及阑尾张力、阑尾壁厚度、阑尾壁回声、管腔内情况及阑尾周围情况以及腹腔积液范围。肠气较多时应适当加压探头。补充扫查:若右下腹未探及阑尾,根据腹痛定位体征增加扫查范围,可扩大至盆腔、右上腹以及腹膜后检查以排除异位阑尾炎。妊娠期妇女检查时,在子宫上方至肝下区间的腹腔内扫查。

2　结果

184例临床手术确诊为阑尾炎中,超声确诊为阑尾炎176例,全部与手术结果符合,另有11例超声诊断阑尾炎可疑,结果与手术符合8例,误诊3例:1为原发性腹膜炎;1例为盲肠憩室炎所致肠脂垂炎,1例为右附件炎。超声定性诊断符合率95.7%(176/184),各型阑尾炎超声诊断符合率见表1。

(下转1431页)

作者简介:程蔚然(1970-),男,四川省简阳市人,主治医师,主要从事超声诊断工作。电话:(0832)7068061,E-mail:dragonmarkchina@hotmail.com

收稿日期:2005-04-11;修回日期:2005-04-20