文章编号:1000-5404(2006)21-2127-03

论著

模拟高原缺氧大鼠脑线粒体UCP活性与含量的变化及其对线粒体能量合成的影响

郜 攀,柳君泽,夏 琛 (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 观察模拟高原暴露大鼠脑线粒体UCP活性和含量的改变,探讨其对线粒体能量合成功能的影响。**方法** 健康成年SD大鼠置于模拟海拔5 000 m低压舱中,23 h/d,连续3 d。差速离心法分离大鼠脑组织线粒体,Clark氧电极法测定线粒体的呼吸活性,罗丹明123法测定线粒体膜电位,高压液相色谱法测定腺苷酸的含量,用[^{3}H]-GTP结合法测定线粒体UCP活性及含量。**结果** 高原缺氧导致大鼠脑线粒体解偶联蛋白与[^{3}H]-GTP结合的解离常数Kd下降37%,结合[^{3}H]-GTP的最大量Bmax增加2.9倍($P<0.01$);线粒体的呼吸ST3氧耗减为对照组的83.1%,而ST4则升高28%,RCR降为对照的66.67%($P<0.01$);相关分析显示,ST4与反映UCP活性的Kd呈显著负相关,而与UCP含量Bmax呈显著正相关($P<0.01$);同时线粒体内ATP含量仅为对照组的58.4%($P<0.01$),线粒体膜电位显著下降($P<0.01$)。**结论** 模拟高原缺氧暴露可增加脑线粒体解偶联蛋白活性和含量,揭示缺氧时线粒体的呼吸氧耗及能量的生成的改变与关系。

关键词: 高原缺氧; 解偶联蛋白; 线粒体呼吸活性; 能量代谢
中图法分类号: R322.81; R329.2; R339.54 **文献标识码:** A

Effects of brain mitochondrial uncoupling protein content and activity in rat exposed to hypoxia simulating high altitude on mitochondrial energy synthesis

GAO Pan, LIU Jun-ze, XIA Chen (Department of Pathophysiology and Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of rat brain mitochondrial uncoupling protein (UCP) content and activity, and explore the effect of UCP on mitochondrial energy metabolism during hypoxia exposure. **Methods** Adult SD rats were set randomly into control and hypoxia group ($n=8$ in each group). The rats of hypoxia group were put into a hypobaric chamber simulating 5000-meter high altitude for 3 days (23 h/d). The brain mitochondria was isolated by centrifugation. Mitochondrial oxidative respiratory function was measured by Clark oxygen electrode. Mitochondrial membrane potential was detected by Rhodamine123 method. The content of adenine nucleotide pool (ATP, ADP, AMP) in mitochondria was measured by high performance liquid chromatography. UCP content and activity were detected by [^{3}H]-GTP binding method. **Results** High altitude hypoxia resulted in significant increase of UCP activity and a 2.9-fold rise of UCP content of rats ($P<0.01$). Mitochondrial state 3 respiration, respiratory control rate decreased respectively to 83.1% and 66.7% of control group, while the state 4 respiration increased by 28% of control group ($P<0.01$). From the correlation test, ST4 was in a negative line regression with Kd and a positive one with Bmax. Mitochondrial ATP content in hypoxia group decreased to 58.4% of control group ($P<0.01$). The membrane potential was decrease to 80% of control group ($P<0.01$). **Conclusion** Hypoxia can increase the content and activity of brain mitochondrial UCP that affects mitochondrial respiratory oxygen consumption and energy production.

Key words: hypoxia simulated high altitude; uncoupling protein; mitochondrial respiratory activity; energy metabolism

基金项目: 全军医学科学技术研究"十一五"计划课题(06MA193)
Supported by the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Sci & Tech Research of PLA (06MA193)

作者简介: 郜 攀(1980-),男,湖南省祁阳县人,硕士研究生,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)68772279, E-mail:Yuzhigp@msn.com
通讯作者: 柳君泽,电话:(023)68752336;E-mail:Liuliu@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2005-12-26; **修回日期:** 2006-02-24

对于初上高原的人常常不能很快的适应高原低氧环境，从而产生一系列的病理生理过程和临床综合征，严重的发展为高原脑水肿和高原肺水肿，危及生命。其最基本的原因是由于细胞缺氧，导致细胞内线粒体能量代谢障碍，不能合成足够的 ATP 以满足机体代谢的需要。解偶联蛋白家族（uncoupling protein，UCP）是线粒体膜质子转运蛋白，作为质子漏通道，使氧化磷酸化形成的质子梯度降低，但没有 ATP 的生成，产生“无效氧耗”[1,2]。因此研究缺氧时 UCP 活性和含量的变化，及其对线粒体能量代谢的影响，对提高氧的利用和能量的生成有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠 16 只，体质量 100～150 g（第三军医大学实验动物中心提供），Ficoll-400，罗丹明 123（Rhodamine123），鱼藤酮，MOPS（以上皆购自 Sigma 公司，美国），羧基苍鼠苷 CAT（默克公司，美国），[^{3}H]-GTP（Pharmacia 公司，美国）。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 健康成年 SD 大鼠（体质量 100～150 g，雌雄各半）按简单完全随机分组法分为平原对照组和缺氧组，每组 8 只。缺氧组大鼠置于模拟海拔 5 000 m 高原低压舱内 23 h/d，连续减压 3 d。对照组动物于常压和常氧环境中同时饲养。两组动物分别在平原和低压舱内（模拟海拔 5 000 m高原）断头处死，迅速分离脑组织。

1.2.2 脑线粒体的分离 脑线粒体分离采用本实验室建立的方法[3]。大鼠断头处死后，快速分离脑皮层组织。分离介质：0.25 mmol/L 蔗糖，10 mmol/L Tris-HCl，0.5 mmol/L EDTA-K。用 3% 和 6% 的 Ficoll 进行密度梯度离心，最终得到线粒体沉淀，用分离介质悬浮。线粒体蛋白测定采用 Folin-酚法，以牛血清白蛋白为标准。

1.2.3 线粒体呼吸氧耗的测定 参照 Chavez 等[4]的方法。反应总体积 0.8 ml，温度 28 ℃。将 0.7 ml 反应介质加入反应池中孵育 2 min，以空气饱和，然后加入线粒体悬液 0.1 ml，预温 1～2 min 后，依次加入反应底物（0.5 mol/ L 苹果酸钠和 0.5 mol/ L丙酮酸钠的混合物）10 μl 、ADP（0.1 mol/ L）5 μl，记录氧耗曲线，计算在 ADP 加入后（Ⅲ态呼吸，ST3）和 ADP 耗尽后（Ⅳ态呼吸，ST4）的氧耗量。线粒体呼吸活性以消耗 nmol O · min^{-1} · mg^{-1} 线粒体蛋白表示，呼吸控制率（RCR）以Ⅲ、Ⅳ态耗氧之比（ST3/ST4）表示。

1.2.4 线粒体膜电位的测定 线粒体膜电位的测定参照 Emaus 等[5]方法进行。反应介质：150 mmol/ L 蔗糖、5 mmol/ L 氯化镁、5 mmol/ L 琥珀酸钠、2.5 μmol/ L 鱼滕酮、5 mmol/ L 磷酸钾缓冲液（pH 7.4）、1 μmol/ L Rodamine123、20 mmol/ L Hepes。取线粒体悬液 100 μl ，加反应介质 1 ml ，室温下反应 5 min，5 000 × g ，5 min 离心，取上清于 500 nm 处比色测线粒体外 Rhodamine123 浓度（[X]out）。设定线粒体基质体积 1 μl/mg，线粒体内 Rhodamine123 浓度 [X]in = （1 - 1.1 × [X]out）× 10 000/ 蛋白浓度。线粒体膜电位按下式计算：线粒体膜电位（MMP）= 59lg（[X]in/[X]out）。

1.2.5 解偶联蛋白活性的测定 参照 Johannes 等[6]的 [^{3}H]-GTP 结合法。将线粒体悬液（约含有 0.1 mg 线粒体蛋白）加入 0.15 ml 反应液中（100 mmol/L 醋酸钾，5 mmol/L MOPS ，0.5 mmol/L EDTA-Na_2，10 μmmol/L 羧基苍鼠苷，pH 7.0），然后加入不同浓度的 [^{3}H]-GTP（1，2，3，4，6，8，10 μmol/L）于 37 ℃温浴 7 min，10 000 × g 离心 5 min，沉淀以 5% SDS（十二烷基磺酸钠）溶解，取 0.1 ml 于闪烁瓶中，加入闪烁液（0.4% PPO 和 0.02% POPOP 的二甲苯溶液）10 ml，暗适应 3 h以上，液闪计数仪测定其放射活性，并以 Scatchard 作图，计算 GTP 与 UCP 结合的 Bmax 和 Kd。其中 Kd 反映 GTP 与 UCP 结合的解离常数，Kd 越大则说明 UCP 与 GTP 结合的活性越低，即解偶联蛋白活性越低。而 Bmax 代表 UCP 与 GTP 结合的最大量，反映 UCP 的最大含量。

1.2.6 脑线粒体内腺苷酸含量的测定[7] 取新鲜提取的线粒体悬液和适量的 0.1 mol/L $HClO_4$ 混合，于冰上放置 5 min。然后以 12 000 r/min 离心 20 min。取上清液 400 μl 加入适量 0.5 mol/L K_2CO_3，充分混和，调 pH 值在 5.9～6.0 之间。于冰上放置 5 min，12 000 r/min、4 ℃离心 10 min。取上清液 50 μl 于高压液相色谱仪分离并测定腺苷酸含量。色谱条件：参照本实验室建立的条件[8]，计算 3 种腺苷酸含量，单位为 nmol/mg。

1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件包行 t 检验，回归分析曲线拟合以及相关性分析。

2 结果

2.1 缺氧对大鼠脑线粒体呼吸活性的影响

3 态呼吸（mitochondrial state 3 respiration，ST3）是代表线粒体在 ADP 存在时，氧化磷酸化过程中产生 ATP 的氧耗，4 态呼吸（mitochondrial state 4 respiration，ST4）代表 ADP 耗尽后线粒体的基础耗氧。呼吸控制率（respiratory control rate，RCR）反应氧化磷酸化耦联程度。缺氧时大鼠脑线粒体氧化呼吸功能显著下降。与对照组比较，缺氧组的 ST3 和 RCR 显著下降（P <0.01），而 ST4 则有显著上升（P <0.01）（表 1）。

表 1 缺氧对于大鼠脑线粒体呼吸活性的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	ST3（nmol · min^{-1} · mg^{-1}）	ST4（nmol · min^{-1} · mg^{-1}）	RCR
对照组	8	68.96 ± 4.96	7.65 ± 0.70	8.82 ± 0.70
缺氧组	8	57.32 ± 7.70[a]	9.83 ± 0.90[a]	5.88 ± 0.39[a]

a：P <0.01，与对照组比较

2.2 缺氧对于大鼠脑线粒体膜电位的影响以及 UCP 活性和含量的变化

缺氧时大鼠脑线粒体膜电位同正常对照组相比显著下降（P <0.01），为对照组的 80.48%。UCP 的活性和含量均显著升高（P <0.01），其中含量增加约 2.9 倍（表 2）。

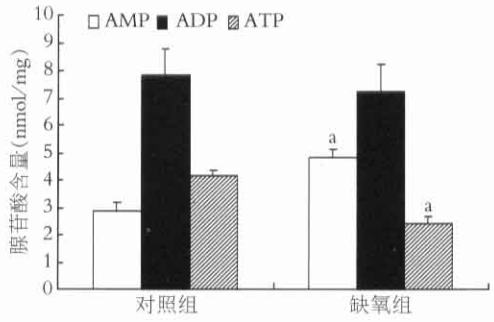
表 2 缺氧对大鼠脑线粒体膜电位的影响以及 UCP 活性和含量的变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	线粒体膜电位	Kd（μmol/L）	Bmax（nmol/mg）
对照组	6	198.91 ± 8.21	1.24 ± 0.08	280.19 ± 103.81
缺氧组	6	160.09 ± 6.41[a]	0.78 ± 0.30[a]	780.23 ± 117.63[a]

a：P <0.01，与对照组比较

2.3　缺氧对于大鼠脑线粒体腺苷酸含量的影响

模拟高原缺氧使大鼠脑组织线粒体内 ATP 含量显著下降($P<0.01$),为对照组的 58.4%,而 AMP 含量则显著增高,缺氧时 ADP 含量与对照组比较没有统计学差别(图 1)。



a: $P<0.01$,与对照组比较

图 1　缺氧对大鼠脑组织线粒体腺苷酸含量的影响

2.4　大鼠 UCP 活性和含量的变化与呼吸活性中 ST4 的相关性分析

Bmax 反映线粒体解偶联蛋白的含量,相关分析显示 Bmax 和 ST4 呈显著线性正相关关系($P<0.01$, $r=0.970$);而反映脑线粒体解偶联蛋白活性的 Kd 与 ST4 氧耗则呈显著线性负相关的关系($P<0.01$, $r=-0.915$)。

3　讨论

高原环境对机体的危害主要是乏氧性缺氧。正常人初上高原常常会发生高原反应,其原因在于 PaO_2 降低,导致供给机体线粒体能量代谢需要的氧不足,从而出现线粒体能量代谢功能障碍。而脑组织对缺氧非常敏感,短时间的脑组织缺氧有可能导致不可逆的影响。因此研究脑组织线粒体氧耗与 ATP 产生关系,对于控制线粒体的无效氧耗,增加线粒体供能效率,防治缺氧引起的脑功能障碍有重要的意义。

线粒体在进行氧化磷酸化时,三羧酸循环中脱下的氢经线粒体内膜上的呼吸链从内膜基质侧泵至膜间隙,而呼吸链传来的电子则被氧接受,从而在内膜的两侧形成质子梯度。在这个电化学梯度的驱动下,质子穿过内膜上的 ATP 酶复合物而回到基质,释放的能量能够促使 ADP 和无机磷结合成 ATP。

UCP 作为线粒体内膜上的另一种质子载体,质子可以通过解偶联蛋白进入基质,未经过 ATP 酶的质子并不参与 ATP 的合成,结果导致储存在质子电化学势能总的自由能被消耗,能量以热的形式散发。UCP 的这一作用虽然没有合成 ATP,但是仍然消耗了氧气,此过程即为通常说的"质子漏"。质子漏消耗的能量在静息代谢率中占有相当大的比重:有实验[9]证明,在骨骼肌中通过质子漏消耗的能量占总能量的 20% ~ 50%,因此解偶联蛋白和能量代谢有密切的关系。目前国内外关于模拟高原缺氧对于解偶联蛋白影响的研究仅见于缺氧时大鼠心脏 UCP3 基因的表达,对于脑皮层组织 UCP 活性和含量影响的报道少见。

我们的结果显示,大鼠经模拟 5 000 m 高原缺氧暴露 3 d 后,脑皮层组织线粒体 UCP 活性和含量均增加,表明缺氧时质子漏增加,线粒体的氧化磷酸化偶联程度降低,氧化磷酸化脱偶联,机体的无效氧耗加强。由相关性分析显示,反映解偶联蛋白活性和含量的 Kd 和 Bmax 与 ST4 的变化均呈线性相关关系,解释了 ST4 在缺氧时增高的原因;ST3 在缺氧时下降,则是由于缺氧时机体氧不足,导致线粒体氧化磷酸化速率降低。由于 UCP 含量和活性升高,引起线粒体氧化磷酸化水平下降,质子漏和"无效氧耗"的增加,即使得线粒体内膜外的质子通过解偶联蛋白进入线粒体内增加,跨线粒体内膜质子梯度被消耗,因此导致缺氧时线粒体膜电位下降,减少线粒体的能量生成,ATP 合成减少,线粒体内 ATP 含量降低,从而导致线粒体能量代谢发生障碍。

参考文献:

[1] JEZEK P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins—UCPn[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(10): 1190 - 1206.

[2] 伊迎春,林汉华. 解偶联蛋白的研究进展[J]. 国外医学:儿科学分册,2003, 30(3): 156 - 158.

[3] 柳君泽, 高文祥, 蔡明春, 等. ATP 浓度和缺氧暴露对大鼠脑线粒体 RNA 和蛋白质体外合成的影响[J]. 生理学报,2002, 54(6): 485 - 489.

[4] CHAVEZ J C, PICHIULE P, BOERO J, *et al*. Reduced mitochondrial respiration in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia[J]. Neurosci Lett, 1995, 193(3): 169 - 172.

[5] EMAUS R K, GRUNWALD R, LEMASTERS J J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties[J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 850(3): 436 - 448.

[6] JOHANNES R, INGELORE P, XUEMING W. Effect of pH and $MgCl_2$ on the binding of purine nucleotides to the uncouphing protein in membrane particles from brown fat mitochondrial[J]. Eur J Biochem, 1994, 223(3): 971 - 980.

[7] SCHONFELD P, SCHILD L, BOHNENSACK R. Expression of the ADP/ATP carrier and expansion of the mitochondrial (ATP + ADP) pool contribute to postnatal maturation of the rat heart[J]. Eur J Biochem, 1996, 241(3): 895 - 900.

[8] 柳君泽,高文祥,曹利飞,等. 低压缺氧大鼠脑线粒体内腺苷酸含量及能荷的变化[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(24): 2165 - 2168.

[9] BRAND M D, BRINDLE K M, BUCKINGHAM J A, *et al*. The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance[J]. Int J Ober Relat Metab Disord, 1999, 23(Suppl 6): S4 - S11.

(编辑　薛国文)