论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0390-03

GDP对大鼠脑线粒体呼吸氧耗的抑制作用及其对膜电位的影响

夏 琛,柳君泽,徐 瑜 (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 通过观察二磷酸鸟苷(guanosine diphosphate, GDP)对大鼠脑线粒体呼吸氧耗作用的量-效关系及对膜电位的影响,探讨脱偶联蛋白(uncoupling proteins, UCP_S)活性改变与线粒体呼吸氧耗和膜电位的关系。**方法** 应用差速离心法提取大鼠脑线粒体,分别在不同浓度GDP干预下采用Clark氧电极法测定线粒体呼吸氧耗并计算Ⅲ态呼吸(state 3 respiration, ST3)、Ⅳ态呼吸(state 4 respiration, ST4)、呼吸控制率(respiratory control rate, RCR)、氧化磷酸化效率(oxidative phosphorylation, OPR)和采用Rhodamine123法测定线粒体膜电位(MMP)。**结果** 大鼠脑线粒体ST3、ST4、RCR、OPR随GDP的浓度改变而改变;当GDP的浓度为0~1.4 mmol/L时,呈剂量依赖关系;当GDP达到1 mmol/L时抑制作用最明显,抑制率达51.3%;大于或小于1 mmol/L时其抑制率均降低;在GDP对呼吸氧耗抑制率最高时MMP最高。**结论** UCP_S的抑制剂(GDP)可直接抑制分离的大鼠脑线粒体呼吸氧耗和MMP,并呈一定的量-效关系,提示UCP_S活性改变可影响线粒体呼吸氧耗和MMP。

关键词: 二磷酸鸟苷;线粒体呼吸氧耗;膜电位

中图法分类号: R322.81;R329.25 **文献标识码:** A

Inhibition of GDP on mitochondrial respiratory oxygen consumption and its effect on the mitochondrial membrane potential of rat brain

XIA Chen, LIU Jun-ze, XU Yu (Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate effect of guanosine diphosphate (GDP) on the mitochondrial respiratory oxygen consumption and the mitochondrial membrane potential (MMP) of rat brain and explore the relationship of the change of uncoupling proteins (UCP_S) activity with the oxygen consumption and MMP. **Methods** The mitochondria of rat brain were isolated by centrifugation. Mitochondria oxidative respiratory consumption was measured by Clark electrode after the treatment of GDP at different concentrations so as to calculate mitochondrial state 3 respiration (ST3), mitochondrial state 4 respiration (ST4), respiratory control rate (RCR), and the rate of oxidative phosphorylation (OPR). MMP was detected by Rhodamine 123 method at the different concentrations of GDP. **Results** With the increase of GDP concentration form 0 to 1.0 mmol/L, the values of ST3, ST4 and OPR were reduced while RCR was elevated. But when the concentration increased to 1.4 mmol/L, the former 3 indexes begun to increase while the later declined. When the GDP concentration reached to 1 mmol/L, the inhibitory rate was only 35.1%, 51.3%, 14.2% to ST3, ST4 and OPR respectively, while RCR was increased to 133.2%. No matter the concentration was over 1 mmol/L or under 1 mmol/L, the ability of inhibition was attenuated. MMP reached to the highest point when GDP exerted the highest inhibitory rate on mitochondrial respiratory oxygen consumption. **Conclusion** GDP, an inhibitor of UCP_S, can regulate the respiratory oxygen consumption and MMP of the isolated rat brain mitochondrial directly in a dose-effect fashion. The change of UCP_S activity can affect the respiratory oxygen consumption and MMP.

Key words: guanosine diphosphate; mitochondrial oxidative consumption; mitochondrial membrane potential

线粒体的能量产生有赖于氧化磷酸化,通过氧的消耗形成跨内膜两侧的质子梯度($\triangle H^+$),与电位梯度($\triangle\Psi$)共同构成跨膜质子电动势($\triangle P$),是驱动ATP合成的势能。脱偶联蛋白(UCP_S)是线粒体内膜上的质子漏通道,能降低内膜两侧形成的质子梯度,使ATP合酶的驱动势能降低,从而使ATP合成减少。二磷酸鸟苷(guanosine diphosphate, GDP)是UCP_S的抑制剂,可通过

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 Research Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06MA193)

作者简介: 夏 琛(1979-),女,湖北省武汉市人,硕士研究生,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)68752340-8202, E-mail: xiachen58@yahoo.com.cn

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

收稿日期: 2006-08-28;**修回日期:** 2006-11-29

与 UCP_S 结合而降低其活性，从而减少质子漏[1]。本实验通过观察不同浓度 GDP 对大鼠脑线粒体呼吸氧耗和膜电位的影响，探讨 UCP_S 活性改变对跨膜质子电动势形成的影响。

1　材料与方法

1.1　实验动物及试剂

健康成年 SD 大鼠 8 只，体质量 120～150 g，雌雄各半，由本校实验动物中心提供，Ficoll-400、Rhodamine123 和鱼藤酮均购自 Sigma 公司。

1.2　脑线粒体制备

脑线粒体制备参照本实验室建立的方法[2]，大鼠断头处死后，迅速分离两侧大脑半球，置于带冰碴的分离介质（0.25 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl、0.5 mmol/L EDTA-$2K^+$）中，匀浆后用差速和密度梯度离心法分离线粒体。线粒体蛋白测定用 Folin-酚法。

1.3　线粒体呼吸功能测定

参照 Chavez 等[3]的方法，设定反应总体积为 0.8 ml，将 0.1 ml 线粒体悬液（含 0.1 mg 线粒体蛋白）和 0.7 ml 反应介质（25 mmol/L 蔗糖、75 mmol/L 甘露醇、0.05 mmol/L EDTA-2K、100 mmol/L KCl、5 mmol/L K_2HPO_4、10 mmol/L Tris-HCl）加入反应池中空气饱和 1 min 后，分别与 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L GDP 和反应底物（0.5 mol/L 苹果酸、0.5 mol/L 丙酮酸钠）28 ℃温浴 1 min 后，再加入 0.1 mol/L ADP 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。线粒体呼吸活性以单位时间内每毫克线粒体蛋白消耗多少表示（nmol · min^{-1} · mg^{-1}），呼吸控制率（respiratory control rate，RCR）以Ⅲ、Ⅳ态呼吸氧耗量之比（ST3/ST4）和氧化磷酸化效率（oxidative phosphorylation，OPR）表示单位时间内每毫克线粒体所合成的 ATP 量（OPR = ST3 × P/O），单位为 nmol · min^{-1} · mg^{-1}，其中 P/O 值为反应体系中加入 ADP 的 nmol 数与相应所消耗的 nmol 原子氧之比。

1.4　线粒体膜电位的测定

参照 Emaus 等[4]的方法，将 0.1 ml 线粒体悬液（含 0.1 mg 线粒体蛋白）加入 1 ml 反应介质（150 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L $MgCl_2$、5 mmol/L 琥珀酸钠、2.5 μmol/L 鱼藤酮、5 mmol/L K_2HPO_4、20 mmol/L HEPES、1 μmol/L Rhodamine123），分别与 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L GDP 室温下反应 5 min，以 5 000 × g 离心 5 min，取上清液测定荧光强度算出线粒体外 Rhodamine123 浓度（$[X]_{out}$），设定线粒体基质体积为 1 μl/mg，线粒体内 Rhodamine123 浓度 $[X]_{in} = (1 - 1.1 \times [X]_{out}) \times 10\,000$/蛋白浓度，线粒体膜电位（MMP）= 59 $\lg([X]_{in}/[X]_{out})$。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行组间方差分析和回归分析曲线拟合以及相关性分析。

2　结果

2.1　线粒体呼吸活性的变化

随着 GDP 浓度从 0 mmol/L 升高至 1 mmol/L，ST3、ST4 和 OPR 逐渐降低，RCR 逐渐升高；随着 GDP 从 1 mmol/L 升高至 1.4 mmol/L，ST3、ST4 和 OPR 逐渐升高，RCR 逐渐降低。GDP 的抑制率与浓度呈一定的量-效关系，当 GDP 为 1 mmol/L 时抑制率达最高，ST3、ST4 和 OPR 分别降低 35.1%、51.3% 和 14.2%，而 RCR 升高 33.2%（表 1，图 1）。

表 1　不同浓度 GDP 对大鼠脑线粒体呼吸氧耗的影响（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

GDP 浓度 (mmol/L)	ST3 (nmol · min^{-1} · mg^{-1})	ST4 (nmol · min^{-1} · mg^{-1})	RCR	OPR (mol · min^{-1} · mg^{-1})
0	70.77 ± 4.19	8.00 ± 0.61	8.85 ± 0.46	123.67 ± 10.76
0.4	66.15 ± 3.53	6.89 ± 0.41[a]	9.60 ± 0.66	117.24 ± 7.12
0.6	62.32 ± 3.48[a]	5.95 ± 0.34[a]	10.47 ± 0.48[b]	109.39 ± 7.01[b]
0.8	56.88 ± 3.82[a]	4.94 ± 0.33[a]	11.51 ± 1.22[a]	106.99 ± 6.07[a]
1.0	45.90 ± 3.17[a]	3.90 ± 0.43[a]	11.79 ± 1.42[a]	106.14 ± 7.25[a]
1.2	60.95 ± 3.21[a]	5.57 ± 0.37[a]	10.95 ± 1.12[a]	118.40 ± 8.49
1.4	70.25 ± 3.04	7.92 ± 0.56	8.87 ± 0.46	122.40 ± 13.54

a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与 0 mmol/L GDP 比较

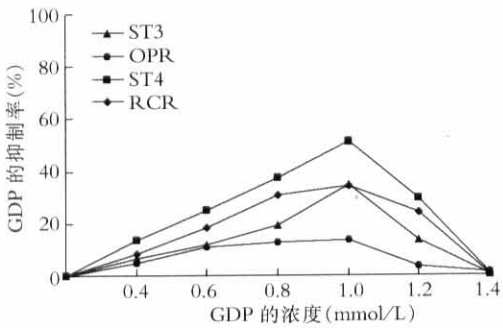
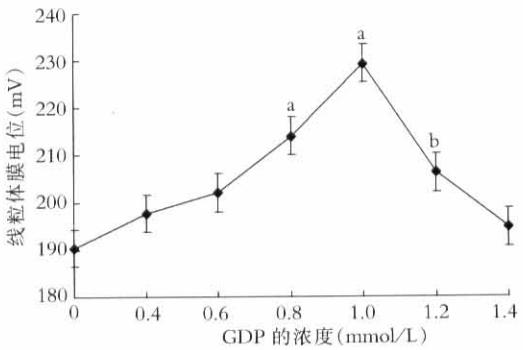


图 1　GDP 对大鼠脑线粒体呼吸活性的抑制率

2.2　线粒体膜电位的变化

随着 GDP 浓度从 0 mmol/L 升高至 1 mmol/L，MMP 逐渐升高；随着 GDP 从 1 mmol/L 降低至 1.4 mmol/L，MMP 逐渐降低。当 GDP 浓度为 1 mmol/L 时，MMP 最高，升高率达 20.4%（图 2）。



a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与 0 mmol/L GDP 比较

图 2　GDP 对膜电位的影响（$n = 8$）

2.3　线粒体呼吸氧耗与膜电位的相关性分析

大鼠脑 MMP 随着线粒体 ST4 氧耗的减少而逐渐增高，MMP 和线粒体 ST4 氧耗呈显著负相关（$r = -0.743$，$P < 0.01$）。

3 讨论

线粒体的氧化磷酸化是电子传递链将电子传递给氧的过程中将质子从内膜基质侧转到内膜外，从而在线粒体内膜两侧形成质子梯度（$\triangle H^+$），其与线粒体内膜电位梯度（$\triangle \Psi$）两者共同构成驱动 ATP 合酶的跨膜质子电动势（$\triangle P$），催化 ADP 和无机磷合成 ATP。然而质子不仅可以通过 ATP 合酶转移到基质侧，而且还可以通过内膜上的脱偶联蛋白（UCP_S）漏回到基质[5]。质子不通过 ATP 合酶而回到基质的过程称为质子漏。线粒体氧的消耗是形成跨膜质子梯度的基础，因此消耗的氧不仅用于氧化磷酸化生成 ATP，而且还用于质子漏以热能的形式散发，这部分氧耗为“无效氧耗”。正常情况下在大鼠肝细胞中“无效氧耗”占线粒体呼吸氧耗的 33.3%[6]。

UCP_S是质子漏的主要通道蛋白，其活性的改变对跨膜△P 有重要的调节作用。嘌呤核苷酸是 UCP_S的抑制剂，不少实验证实 GDP 对 UCP_S的活性有明显的抑制作用，如在转基因小鼠的白色脂肪组织中 UCP-1 过表达引起膜电位降低，加入 0.5 mmol/L GDP 时可使膜电位升高[7]；0.5 mmol/L GDP 可明显提高因环境温度改变的大鼠心肌线粒体氧化磷酸偶联程度[8]；1 mmol/L GDP 对小鼠胸腺中 UCP-1 有明显的抑制作用[9]。GDP 可通过与 UCP_S上嘌呤核苷酸结合位点结合后使 UCP_S的构象改变，从而抑制其对质子的转运，嘌呤核苷酸中的 GTP、GDP、ATP 和 ADP 与该位点的结合能力较强，而 GMP 和 AMP 与该位点的结合能力只有前4 者的1/50，并且 ATP 和 GTP 与该位点紧密结合，ADP 和 GDP 与该位点松弛结合[1]。

本实验通过应用 GDP 对 UCP_S的抑制作用，观察 UCP_S的活性被不同程度抑制后对大鼠脑线粒体呼吸氧耗和 MMP 的影响，以探讨质子漏与能量生成和氧耗的关系。结果显示线粒体 ST3、ST4、RCR、OPR 以及 MMP 随 GDP 的浓度而改变，当 GDP 的浓度为 0～1.4 mmol/L 范围时，呈剂量依赖关系，当 GDP 达到 1 mmol/L时 ST3、ST4、RCR、OPR 的抑制率达最高，分别为 35.1%、51.3%、33.2% 和 14.2%；MMP 也升高 20.4%。ST3 为 ADP 转化为 ATP 的氧化磷酸化过程中的氧耗；ST4 为 ADP 消耗完后的基础氧耗，主要反映“无效氧耗”；RCR 反映氧化磷酸化偶联程度；OPR 反映氧化磷酸化效率大小。当 GDP 对 UCP_S抑制后，通过 UCP_S漏回到基质的质子减少了，$\triangle H^+$ 和 $\triangle \Psi$ 增高，从而使跨膜 △P 增高，减少了因质子漏而形成的“无效氧耗”，因此大鼠脑线粒体呼吸氧耗以及膜电位随 GDP 的浓度改变而改变，ST4 的降低幅度明显大于 ST3，同时 RCR 明显提高，即氧化磷酸化偶联程度明显提高。从 ST4 和 MMP 的回归曲线可以看出，两者呈负相关，即“无效氧耗”越小，膜电位越高，从而充分说明通过抑制了 UCP_S活性，使质子漏回到基质的越少，使跨膜 $\triangle H^+$ 和 $\triangle \Psi$ 越高，MMP 越高。提示 GDP 可通过抑制 UCP_S 活性改变线粒体呼吸氧耗和膜电位，即 UCP_S活性的改变对线粒体呼吸氧耗和跨膜电动势有一定的影响作用。当 GDP 浓度高于 1.4 mmol/L 时，可能因为高浓度的 GDP 降低环境中的 pH 值，从而使 GDP 与 UCP_S的亲和力降低所致[10]，但具体机制尚不确定。本实验仅通过 GDP 直接对分离的大鼠脑线粒体作用来观察呼吸氧耗以及 MMP 的改变，但脑组织中的 UCP_S的具体功能以及如何利用 UCP_S的功能提高脑线粒体能量产生都有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Klingenberg M, Echtay K S. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1504(1): 128－143.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Garlid K D, Jaburek M, Jezek P, *et al*. How do uncoupling proteins uncouple? [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1459 (2－3): 383－389.

[6] 宋志刚，王德华. 质子漏及其在基础代谢中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(4): 474－477.

[7] Baumruk F, Flachs P, Horakova M, *et al*. Transgenic UCP1 in white adipocytes modulates mitochondrial membrane potential [J]. FEBS Lett, 1999, 444 (2－3): 206－210.

[8] Simonyan R A, Skulachev V P. Thermoregulatory uncoupling in heart muscle mitochondria: involvement of the ATP/ADP antiporter and uncoupling protein[J]. FEBS Lett, 1998, 436 (1): 81－84.

[9] Czarna M, Jarmuszkiewicz W. Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba Acanthamoeba castellanii mitochondria[J]. FEBS Lett, 2005, 579 (14): 3136－3140.

[10] Huang S G, Klingenberg M. Two-stage nucleotide binding mechanism and its implications to H^+ transport inhibition of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria[J]. Biochemistry, 1996, 35(24): 7846－7854.

（编辑 陈聪连）