文章编号:1000-5404(2008)03-0223-03

论著

低氧调节大鼠骨骼肌线粒体呼吸链复合体非协同性表达

高文祥,黄 缄,高钰琪,谭小玲,刘福玉,蔡明春,陈 建 (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)

摘 要:目的 观察慢性低氧时大鼠线粒体呼吸链复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ蛋白表达变化并讨论其病理生理学意义。方法 成年雄性Wistar大鼠随机分为慢性低氧(4 500 m,30 d)组和对照组,取双侧腓肠肌,分离线粒体,用Clark氧电极法检测线粒体Ⅲ态呼吸(state 3,ST3)、Ⅳ态呼吸(state 4,ST4)和呼吸控制率(respiratory control ratio,RCR),用Western blot检测线粒体呼吸链复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ蛋白的表达。结果 慢性低氧组大鼠腓肠肌线粒体ST3和RCR显著低于对照组($P<0.05$)。慢性低氧组大鼠腓肠肌线粒体复合体Ⅰ 30×10^3亚基、复合体Ⅱ 70×10^3亚基、复合体Ⅴ α亚基蛋白表达量显著低对照组($P<0.05$)。2组线粒体ST4和复合体Ⅲ核心亚基2蛋白表达无显著性差异($P>0.05$)。结论 低氧可调节大鼠骨骼机线粒体复合体蛋白非协同性表达,导致线粒体氧化磷酸化功能下降。

关键词:低氧;线粒体;骨骼肌;呼吸链复合体;Western blot
中图法分类号:R322.74;R329.25;R364.4 文献标识码:A

Hypoxia induced non-concordant expression of gastrocnemius mitochondrial electron transport chain complexes in Wistar rats

GAO Wen-xiang, HUANG Jian, GAO Yu-qi, TAN Xiao-ling, LIU Fu-yu, CAI Ming-chun, CHEN Jian (Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression changes of mitochondrial electron transport chain (ETC) complexes Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅴ induced by chronic hypoxia. Methods Sixteen adult male Wistar rats were randomly and equally divided into hypoxic group (4 500 m, 30 d) and the normoxic control. Hibateral gastrocnemii were collected and mitochondria were isolated. Respiratory state 3 (ST3), state 4 (ST4) and respiratory control rate (RCR) were measured with Clark oxygen electrode. Mitochondrial ETC complexes Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅴ expressions were measured with Western blot. Results ST3 and RCR were significantly lower in hypoxic group than in the control. Mitochondrial ETC complexes Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅴ expressions were significantly lower in hypoxic group than in the control. No significant difference of ST4 and complex Ⅲ core subunit 2 was found between the 2 groups. Conclusion Non-concordant expression of gastrocnemius mitochondrial ETC complexes can be induced by chronic hypoxia, resulting in the decrease of mitochondrial oxidative phosphorylation function.

Key words: hypoxia; mitochondria; skeletal muscle; electron transport chain complex; Western blot

平原人进入高原,出现最早的是高原反应,但是影响最持久、最难以克服的是劳动能力的降低。长期低氧暴露可导致机体极量和亚极量运动能力下降,最大氧耗量减低,骨骼肌出现超微结构改变[1],但其病理生理学和分子生物学机制目前尚不清楚。线粒体结构和功能的改变是动物习服低氧环境的一个重要机制[2],但其重要功能蛋白活性调节特点及其分子机制尚缺乏研究。本研究建立了慢性低氧Wistar大鼠模型,比较慢性低氧组和对照组大鼠骨骼肌线粒体呼吸链(electron transport chain, ETC)复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ蛋白表达差异,为深入研究低氧线粒体形态和功能改变的分子机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

线粒体复合体Ⅰ 30×10^3亚基、复合体Ⅱ 70×10^3亚基、复合体Ⅴ α亚基、复合体Ⅲ核心亚基2单克隆抗体购自Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)。抗小鼠IgG抗体购自Sigma公司。其余试剂购自上海生工公司。

基金项目:国家自然科学基金(30393131,30300123)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30393131, 30300123)
作者简介:高文祥,女,重庆市人,博士,副教授,主要从事低氧习服-适应的线粒体机制方面的研究。电话:(023)68752335-8204,E-mail:gaowx@mail.tmmu.com.cn
通信作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail:gyq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-12-27;修回日期:2007-04-06

1.2 动物与分组

成年雄性 Wistar 大鼠共 16 只，体质量 200～220 g，按随机数字表法分为慢性低氧组和对照组，每组 8 只。慢性低氧组大鼠在模拟 4 500 m 高原低压舱内饲养，连续低压低氧 30 d；对照组大鼠在舱外（300 m）同时饲养。各组动物断头处死，取双侧腓肠肌分离提取线粒体。

1.3 线粒体提取

参照 Luo 等[3]的方法进行。腓肠肌组织块按 1∶10 的质量体积比加入线粒体分离介质（250 mmol/L 蔗糖，10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4），匀浆，1 500 × *g* 离心 10 min，共 2 次，取上清。8 000 × *g* 离心 15 min，取沉淀，用分离介质悬浮备用。上述操作均在 0～4 ℃ 进行。线粒体蛋白含量测定按 Lowry 法[4]，以牛血清白蛋白作为蛋白标准。

1.4 线粒体呼吸功能测定

采用 Clark 氧电极法，参照 Luo 等[3]的方法用生物组织氧耗仪（782 Oxygen Meter，Strathkelvin Instruments，UK）测定线粒体氧耗。以谷氨酸钠/苹果酸钠作为反应底物。以加入 ADP 刺激线粒体耗氧量作为线粒体Ⅲ态呼吸（state 3，ST3），以 ADP 耗竭后线粒体耗氧量作为线粒体Ⅳ态呼吸（state 4，ST4），ST3 和 ST4 以单位线粒体蛋白单位时间内所消耗的氧原子物质的量表示（nmol · min^{-1} · mg^{-1}）。计算线粒体呼吸控制率（respiratory control rate，RCR），RCR = ST3/ST4。

1.5 线粒体呼吸链复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ蛋白表达检测

Western blot 参照《分子克隆实验指南》[5]。浓缩胶浓度 4%，分离胶浓度 10%，蛋白上样量为 20 μg。电泳结束后，以电转印法将蛋白转移至 PVDF 膜，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST（体积分数为 0.1% 的吐温-80，100 mmol/L Tris，质量体积分数为 0.9% 的 NaCl，pH 7.5）封闭过夜。线粒体呼吸链复合体抗体以 0.2 μg/ml 稀释，室温孵育 1.5 h；抗小鼠 IgG 以 1∶1 000 稀释，室温孵育 1 h。以对照组蛋白表达量为 100%，慢性低氧组蛋白表达量以其与对照组蛋白灰度值比值的百分比表达。

1.6 统计处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，对线粒体呼吸功能和呼吸链亚基蛋白表达量进行独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 线粒体呼吸功能

慢性低氧组大鼠腓肠肌线粒体 ST3 和 RCR 显著低于对照组（$P<0.05$），二者 ST4 差异不显著（$P>0.05$，表 1）。

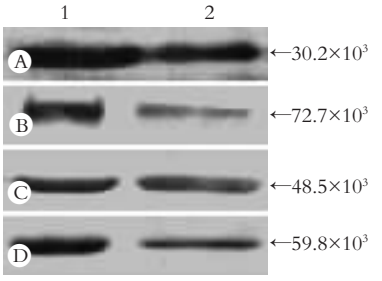
表 1 两组大鼠腓肠肌线粒体呼吸功能比较（$n=8$，$\bar{x} \pm s$）

组别	ST3（nmol · min^{-1} · mg^{-1}）	ST4（nmol · min^{-1} · mg^{-1}）	RCR（ST3/ST4）
对照组	14.058 ± 2.048	1.457 ± 0.509	10.725 ± 3.924
慢性低氧组	11.629 ± 1.739[a]	1.918 ± 0.767	6.861 ± 2.602[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2 线粒体呼吸链复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ蛋白表达

慢性低氧组大鼠腓肠肌线粒体呼吸链复合体Ⅰ 30×10^3 亚基、复合体Ⅱ 70×10^3 亚基、复合体Ⅴ α 亚基蛋白表达量显著低对照组（$P<0.05$），分别降低 36.30%、43.26%、36.08%，2 组复合体Ⅲ核心亚基 2 蛋白表达量差异不显著（$P>0.05$，图 1）。



A：复合体Ⅰ 30×10^3 亚基；B：复合体Ⅱ 70×10^3 亚基；C：复合体Ⅲ核心亚基；D：复合体Ⅴ α 亚基

1：对照组；2：慢性低氧组

图 1 两组大鼠腓肠肌线粒体呼吸链复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ蛋白表达

3 讨论

线粒体是细胞呼吸的主要场所，细胞内 90% 以上的氧在线粒体内进行氧化磷酸化，依次经过呼吸链复合体Ⅰ（NADH-辅酶 Q 还原酶）或Ⅱ（琥珀酸-辅酶 Q 还原酶）、Ⅲ（辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶）、Ⅳ（细胞色素 C 氧化酶）电子传递作用还原成水，最后由复合体Ⅴ（F0F1-ATP 酶）合成三磷酸腺苷供给组织功能和代谢需要。本研究结果显示，慢性低氧组 RCR 下降，说明二磷酸腺苷对呼吸链电子传递速率的控制程度降低，反映氧化磷酸化过程在一定程度上的脱偶联。但两组线粒体 ST4 没有显著性差异，提示慢性低氧组线粒体无效氧耗并未增加，其 RCR 下降主要是由于氧化（电子传递）和/或磷酸化作用下降所致 ST3 降低。线粒体呼吸链复合体酶活性改变可能是其重要机制。

低氧可以调节线粒体呼吸链复合体酶活性[3,6,7]，使其三磷酸腺苷合成能力降低[8]。主要有两种方式：①定性调节或短期调节，通过改变酶的空间构象、米氏常数（K_m）值等调节酶活性。②定量调节或长期调节，通过影响基因的表达改变有活性的酶分子数或改变酶转换数等调节酶活性。低氧可下调线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）的转录和翻译[9]，提示低氧可影响线粒体呼吸链复合体基因和蛋白表达而定量调节其活性。但另有研究认为，低氧虽然抑制线粒体呼吸链复合体Ⅳ细胞色素氧化酶（cytochrome c oxidase，COX）活性，但并不诱导 COX Ⅰ亚基（mtDNA 编码）和Ⅳ亚基[核 DNA（nuclear DNA，nDNA）编码]蛋白表达改变[7]，提示低氧通过定性调节影响 COX 活性。本研究中，慢性低氧组大鼠腓肠肌的线粒体复合体Ⅰ 30×10^3 亚基、复合体Ⅱ 70×10^3 亚基、复合体Ⅴ α 亚基（均为 nDNA 编码）蛋白表达量显著低于对照组（$P<0.05$），2 组复合体Ⅲ核心亚基 2 蛋白（nDNA 编码）表达量差异不显著（$P>0.05$）。结合以往的研究[7]，提示低氧调节 nDNA 和 mtDNA 编码的线粒体呼吸链各复合体蛋白表达呈非协同性。

线粒体呼吸链复合体蛋白由 nDNA 和 mtDNA 共

同编码。mtDNA 编码的呼吸链复合体基因表达由线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, mtTFA)和 mtTFB 调节,nDNA 编码的呼吸链复合体基因表达受核呼吸因子-1(nuclear respiratory factor 1, NRF-1)和 NRF-2 调节[10],相同转录因子调控的基因表达具有协同性。由于 mtTFA 和 mtTFB 的转录可被 NRF-1 和 NRF-2 活化,因而 mtDNA 编码蛋白表达同时受 NRF-1 和 NRF-2 调控[10],mtDNA 和 nDNA 基因表达理论上也应该是协同的。然而,与 mtDNA 编码蛋白不同的是,nDNA 编码的复合体蛋白是在细胞质内进行转录和翻译,其前体蛋白通过线粒体外膜和内膜上的蛋白转运复合物转运进入线粒体,进行最后的组装[11]。综上所述,线粒体蛋白转运是影响线粒体蛋白水平的关键环节,其功能状态容易受到外环境影响,其功能失调可导致多种疾病发生。目前,国外已开始尝试从线粒体蛋白转运的角度对相关疾病进行治疗的研究。因此,低氧调节 nDNA 编码的复合体蛋白非协同性表达可能涉及转录、翻译、翻译后修饰以及线粒体蛋白转运等多个环节,其机制值得进一步探讨。

参考文献:

[1] 高钰琪. 高原军事医学[M]. 重庆:重庆出版社, 2005:180-220.
[2] 宋　玲,孙秉庸,张国斌. 模拟高原缺氧不同时间对大鼠心肌线粒体功能的影响及其在习服-适应中的意义[J]. 高原医学杂志, 1999, 9(3):9-12.
[3] Luo G, Xie Z Z, Liu F Y, *et al*. Effects of vitamin C on myocardial mitochondrial function and ATP content in hypoxic rats[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1998, 19(4):351-355.
[4] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1):265-275.
[5] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁,黎孟枫,译. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1996:880-898.
[6] 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]. 中国病理生理学杂志, 2000, 16(10):879-882.
[7] 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.
[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] 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.
[10] 陆松敏. mtDNA 与缺血缺氧性细胞损伤及疾病的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(11):1104-1105.
[11] 高文祥,陈　建,高钰琪. 线粒体蛋白转运的研究进展[J]. 重庆医学, 2006, 35(19):1795-1798.

(编辑　郭建秀)

文章编号:1000-5404(2008)03-0225-01

个案与短篇

肺表面活性物质预防早产儿呼吸窘迫综合征的疗效观察

万小红[1],曾小靓[2]　(江西省九江市妇幼保健院:[1]急诊科,[2]新生儿科,江西 九江 332000)

新生儿呼吸窘迫综合征(neonatal respiratory distress syndrome, NRDS)严重威胁早产儿生命,肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)缺乏是其发病原因[1]。我院 NICU 于 2003 年 1 月开始对高危早产儿应用 PS 预防 RDS,取得了很好的效果,现报告如下。

1　对象与方法

1.1　对象

收集我院 NICU 2003 年 1 月至 2006 年 12 月收治的 80 例高危早产儿,符合以下条件:出生体质量 < 1 500 g 或胎龄 < 30 周,可能发生 NRDS;入院时或 PS 应用前,X 线胸片示无 RDS 改变。根据早产儿是否预防性应用 PS 分为预防组和对照组,每组 40 例,预防组胎龄(28.8 ± 1.1)周,体质量(1 135.5 ± 153.2) g;对照组胎龄(29.0 ± 0.9)周,体质量(1 164.2 ± 134.1) g。两组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。RDS 诊断按《实用新生儿学》RDSX 线诊断标准[1]。

1.2　方法

预防组出生后立即给予 PS 制剂,全部使用固尔苏(意大利凯西制药公司),剂量 100 mg/kg,因经济原因只给药 1 次,生后 15~75 min 用药。患儿取仰卧位,经气管插管一次性注入药液。一般 6 h 内不作翻身、拍背及气道内吸引。若患儿反应好,无明显呼吸困难表现,血氧饱和度 > 90%,则 10 min 后拔管,头罩吸氧。有明显呼吸困难者,先行鼻塞持续气道正压呼吸(CPAP)通气,若 FiO_2 增至 0.6 以上,临床症状、血气未见改善时,即予以机械通气。对照组上机指征相同。其余支持治疗两组相同。

观察指标:观察生命体征、血气、经皮氧分压及氧饱和度等变化及胸片结果。记录氧疗时间、机械通气时间、病死率及主要并发症的发生。

统计学分析:结果以 $\bar{x} \pm s$ 或中位数表示,组间比较采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验、χ^2 检验、非参数检验。

(下转 236 页)

作者简介:万小红,女,江西省九江市人,主治医师,主要从事小儿急救方面的研究。电话:(0792)8222897, E-mail:lyxwxh6610@sina.com
收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-10-23