论著

文章编号:1000-5404(2009)10-0898-04

急性低氧加重氰化钠对大鼠离体肝线粒体能量代谢的抑制作用

卢国守[1],刘福玉[1],高钰琪[1],杨晓红[2],罗勇军[3],高文祥[1] (第三军医大学高原军事医学系:[1]病理生理学与高原生理学教研室,高原医学教育部重点实验室,全军高原生理与高原病研究重点实验室,[2]军事医学地理学教研室,[3]高原疾病学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 通过观察不同浓度的NaCN对模拟高原急性低氧大鼠离体肝脏线粒体呼吸氧耗、膜电位和复合酶Ⅳ活性的影响,探讨急性低氧条件下氰化物中毒大鼠线粒体能量代谢变化特点。**方法** 16只SD大鼠按简单完全随机分组法分为对平原照组和急性低氧组,急性低氧组大鼠暴露于低压舱内,模拟海拔5 000 m高原,23 h/d,连续3 d;对照组大鼠于常压和常氧环境中同时喂养。用差速离心法提取肝线粒体,分别在0、0.01、0.1、0.25 mmol/L NaCN条件下采用Clark氧电极法测定线粒体呼吸氧耗和复合酶Ⅳ活性并计算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)和复合酶Ⅳ耗氧率,用Rhodamine123法测定线粒体膜电位(the mitochondrial membrane potential,MMP)。**结果** 0.01、0.1、0.25 mmol/L NaCN均可显著抑制线粒体呼吸功能,降低线粒体膜电位,且呈剂量依赖关系。与相应NaCN浓度的对照组比较,急性低氧组线粒体功能受抑制程度显著增加。**结论** 急性低氧加重NaCN对大鼠肝脏线粒体能量代谢的抑制作用,其机制可能与急性缺氧大鼠线粒体氧化磷酸化脱偶联、呼吸链复合体Ⅳ功能降低及线粒体膜电位改变有关。

关键词: NaCN;低氧;线粒体呼吸氧耗;膜电位;复合酶Ⅳ

中图法分类号: R322.47;R992;R995 **文献标识码:** A

Acute hypoxia exacerbates inhibitory effects of sodium cyanide on energy metabolism in rat *in vitro* liver mitochondria

LU Guo-shou[1], LIU Fu-yu[1], GAO Yu-qi[1], YANG Xiao-hong[2], LUO Yong-jun[3], GAO Wen-xiang[1] ([1]Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, Key Laboratory of High Altitude Medicine of Ministry of Education, Key Laboratory of High Altitude Physiology and High Altitude Disease of PLA, [2]Department of Military Medical Geography, [3]Department of High Altitude Disease, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate effect of sodium cyanide (NaCN) at different concentrations on the mitochondrial respiratory oxygen consumption, the mitochondrial membrane potential (MMP) and activity of the complex Ⅳ of mitochondrial breath train in *in vitro* liver mitochondria from the rats exposed to simulated high altitude hypoxia, and to explore the characteristics of energy metabolism in the mitochondria from the rats subjected to cyanide poisoning during acute hypoxia exposure. **Methods** Adult Sprague-Dawley (SD) rats were set randomly into control and acute hypoxia groups ($n=8$ in each group). The acute hypoxic rats were exposed to simulate 5 000 m high altitude in a hypobaric chamber 23 h/d for 3 d. Rats in the control group were bred in the normoxia condition at the same time. The liver mitochondria were isolated by centrifugation. Mitochondrial oxidative respiratory consumption and activity of the complex Ⅳ was measured by Clark electrode after the treatment of NaCN at 0, 0.01, 0.1 and 0.25 mmol/L respectively, so as to calculate mitochondrial state 3 respiration (ST3), state 4 respiration (ST4), respiratory control rate (RCR), the rate of oxidative phosphorylation (OPR), and oxygen consumption rate of the complex Ⅳ. MMP was detected by Rhodamine 123 method at the

基金项目: 全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G077)

Supported by the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA(06G077)

作者简介: 卢国守,男,内蒙古自治区包头市人,硕士研究生,医师,主要从事线粒体缺氧生物学方面的研究。电话:(023)65011925,E-mail:lgs2005113@163.com

通信作者: 高文祥,E-mail:gaowx@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2009-01-17;**修回日期:** 2009-03-24

above-mentioned concentrations of NaCN. **Results** NaCN at 0.01, 0.1 and 0.25 mmol/L inhibited the mitochondrial oxidative respiratory function, and decreased MMP significantly. The inhibitory effects of NaCN on energy metabolism in mitochondria was in a dose-dependent manner. Compared with the treatment of NaCN at the corresponding concentration in the control group, mitochondrial function in the acute hypoxia group was inhibited more seriously. **Conclusion** Acute hypoxia exacerbates the inhibitory effects of sodium cyanide on energy metabolism in rat liver mitochondria. Its mechanism might be relevant to the decoupling of oxidative phosphorylation, functional down-regulation of complex Ⅳ in respiratory chain and changes of the mitochondrial membrane potential in liver mitochondria from rats exposed to acute hypoxia.

Key words: NaCN; hypoxia; mitochondrial oxidative consumption; mitochondrial membrane potential; the complex Ⅳ of mitochondria

高原低氧环境下氰化物的毒力增强加重呼吸和心血管系统器官的损伤机制尚不清楚[1]。线粒体(mitochondria)是细胞呼吸的主要场所和进行氧化磷酸化的重要结构,在维持细胞正常的能量代谢、离子转运及其结构、功能方面具有重要作用。氰化物中毒和高原低氧均可导致线粒体功能障碍,提示线粒体功能障碍可能是高原氰化物中毒系统器官功能损伤加重的原因之一。本研究通过建立急性缺氧大鼠模型,观察不同浓度 NaCN 体外孵育对肝脏线粒体呼吸功能、膜电位和复合酶Ⅳ活性的影响,以探讨缺氧复合氰化物中毒对线粒体能量代谢的影响,从实验研究的角度为战时急进高原部队防治氰类战剂中毒提供新的思路和线索。

1　材料与方法

1.1　材料

二磷酸腺苷(ADP)、罗丹明 123(Rodamine123)、鱼藤酮等皆购自 Sigma 公司,谷氨酸钠购自国药集团化学试剂有限公司,苹果酸钠购自天津光复精细化工研究所,NaCN 购自重庆市煌辉化学危险品销售公司。

1.2　方法

1.2.1　动物模型的建立　　健康成年 SD 大鼠 16 只,体质量(150 ± 10)g,雄性,清洁级,由第三军医大学实验动物中心提供,按简单完全随机分组法分为平原对照组和急性低氧组,每组 8 只。将低氧处理大鼠置于低压舱内,模拟海拔 5 000 m 高原(大气压保持在 405.35 mmHg,室温维持在 22 ~ 25 ℃,相对湿度恒定 70%),人工照明(7:00 ~ 19:00),23 h/d (每天放回平原 1 h 打扫、喂食),连续减压 3 d。对照组动物于常压和常氧环境中同时饲养。所有动物喂以定量标准颗粒饲料(第三军医大学实验动物中心提供,每天平均 15 g/只),自由饮水。对照组和低氧组大鼠分别在平原和低压舱内断头处死,迅速分离肝组织。

1.2.2　肝脏线粒体制备　　肝组织线粒体的分离提取参照 Cardoso 等[2]的方法。大鼠断头处死后,剖腹取约 1 g 肝组织块,置于带冰渣的分离介质(250 mmol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, pH 7.5)中,剪碎并匀浆后进行差速离心,最终得到线粒体沉淀,以适量分离介质悬浮。线粒体蛋白测定采用 Brade-Ford 法,以牛血清白蛋白为标准。

1.2.3　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(75 mmol/L 蔗糖,225 mmol/L 甘露醇,0.05 mmol/L EGTA,5 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris,4 mmol/L K_2HPO_4,1 mmol/L KH_2PO_4,pH 7.4)加入反应池中温浴1 min,以空气饱和,加入反应底物(1.25 mol/L 谷氨酸钠 10 μl,1.25 mol/L 苹果酸钠 10 μl)及 NaCN 至终浓度分别为 0、0.01、0.1、0.25 mmol/L,30 ℃温浴 5 min,加入 0.1 mol/L ADP 5 μl,记录氧耗曲线,并计算Ⅲ态呼吸(ST3)和Ⅳ态呼吸(ST4)的氧耗率、呼吸控制率(respiratory control rate, RCR) 以及氧化磷酸化效率(oxidative phosphorylation, OPR)。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})。RCR 以 ST3/ST4 表示,OPR 表示单位时间内每毫克线粒体蛋白所合成的 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 的纳摩尔数与相应所消耗的纳摩尔原子氧之比。

1.2.4　线粒体膜电位(the mitochondrial membrane potential, MMP)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),加入 NaCN 至终浓度分别为 0、0.01、0.1、0.25 mmol/L,30 ℃孵育 5 min,以 5 000 × g 离心 5 min,取上清液测定荧光强度,并计算线粒体膜电位。

1.2.5　线粒体内膜呼吸链复合酶Ⅳ活性测定　　参照 Rafael[5]的氧电极法。Clark 电极反应池中加入磷酸-EDTA 700 μl,抗坏血酸 25 μl,细胞色素 C 15 μl,四甲基对苯二胺盐酸盐(TMPD)5 μl, 30 ℃温浴1 min。加入线粒体悬液 10 μl (含 0.01 mg 线粒体蛋白)及 NaCN 至终浓度分别为 0、0.01、0.1、0.25 mmol/L,孵育 5 min, 记录氧耗曲线,计算单位时间单位线粒体蛋白氧耗量。

1.3　统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用双因素方差分析比较 2 组间差异,采用 Simple contrasts 进行 0.01、0.1 、0.25 mmol/L NaCN 各

浓度组与0 mmol/L NaCN 浓度组比较,采用均数多重比较检验LSD 法进行相应 NaCN 浓度组组间比较。

2 结果

2.1 NaCN 对急性低氧大鼠离体肝线粒体呼吸活性的影响

反应介质中加入 0.01、0.1、0.25 mmol/L NaCN 均可显著抑制线粒体呼吸功能,与反应介质中含 0 mmol/L NaCN 时比较,ST3、RCR 和 OPR 显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),ST4 显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),且随着 NaCN 浓度升高,线粒体呼吸功能逐渐降低。与对照组相应的 NaCN 处理浓度比较,ST3、RCR 和 OPR 均降低,ST4 升高($P<0.05$,$P<0.01$),见表1。

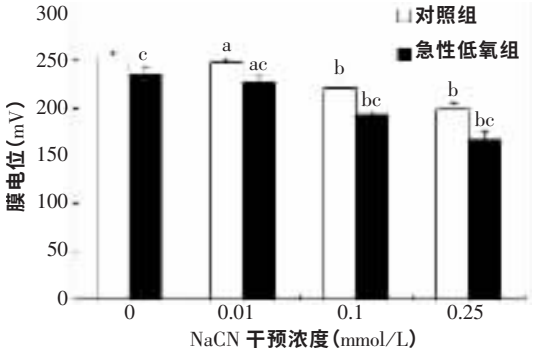
表1 NaCN 对模拟高原急性低氧大鼠离体肝线粒体呼吸活性的影响
($nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$, $n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	ST3	ST4	RCR	OPR
对照组 NaCN 浓度				
0 mmol/L	60.65 ± 4.31	7.98 ± 0.68	7.64 ± 0.71	149.73 ± 9.99
0.01 mmol/L	56.09 ± 4.72[a]	8.70 ± 0.64[a]	6.46 ± 0.48[b]	137.93 ± 15.30[a]
0.1 mmol/L	42.29 ± 4.47[b]	9.49 ± 0.78[b]	4.47 ± 0.46[b]	96.86 ± 11.33[b]
0.25 mmol/L	32.48 ± 3.12[b]	10.28 ± 0.60[b]	3.16 ± 0.30[b]	72.32 ± 7.65[b]
急性低氧组 NaCN 浓度				
0 mmol/L	51.11 ± 2.55[d]	11.09 ± 0.54[d]	4.61 ± 0.16[d]	118.55 ± 5.12[d]
0.01 mmol/L	47.07 ± 2.03[ad]	11.98 ± 0.56[ad]	3.93 ± 0.12[bd]	109.25 ± 5.78[ad]
0.1 mmol/L	36.00 ± 5.00[bc]	12.85 ± 1.06[bd]	2.79 ± 0.18[bd]	77.43 ± 9.49[bd]
0.25 mmol/L	28.19 ± 4.25[bc]	13.76 ± 1.05[bd]	2.04 ± 0.21[bd]	59.40 ± 8.23[bd]

RCR 为 ST3/ST4 比值;a:$P<0.05$, b:$P<0.01$ 与 0 mmol/L NaCN 比较; c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与相应 NaCN 浓度的对照组比较

2.2 NaCN 对急性低氧大鼠离体肝线粒体膜电位的影响

反应介质中加入 0.01、0.1、0.25 mmol/L NaCN 均可显著降低线粒体膜电位,表现为 MMP 显著低于反应介质中含 0 mmol/L NaCN 时($P<0.05$,$P<0.01$),且随着 NaCN 浓度升高,MMP 逐渐降低。与对照组相应的 NaCN 处理浓度比较,急性低氧组 MMP 显著降低($P<0.01$)。见图1。

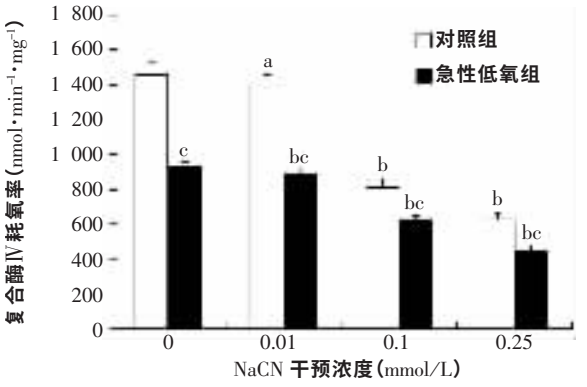


a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 0 mmol/L NaCN 比较; c: $P<0.01$,与相应 NaCN 浓度的对照组比较

图1 NaCN 对模拟高原急性低氧大鼠离体肝线粒体膜电位的影响

2.3 NaCN 对急性低氧大鼠离体肝线粒体复合酶Ⅳ活性的影响

反应介质中加入 0.01、0.1、0.25 mmol/L NaCN 均可显著降低复合酶Ⅳ活性,表现为复合酶Ⅳ耗氧率显著低于反应介质中含 0 mmol/L NaCN 时($P<0.05$,$P<0.01$),且随着 NaCN 浓度升高,复合酶Ⅳ耗氧率逐渐降低。与对照组相应的 NaCN 处理浓度比较,急性低氧组复合酶Ⅳ活性降低($P<0.01$)。见图2。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 0 mmol/L NaCN 比较; c: $P<0.01$,与相应 NaCN 浓度的对照组比较

图2 NaCN 对模拟高原急性低氧大鼠离体肝线粒体复合酶Ⅳ活性的影响

3 讨论

氰化物进入机体后能迅速解离出氰离子(CN^-),CN^-对线粒体呼吸链有很强的亲和力,阻断电子从细胞色素氧化酶即细胞色素 aa_3($Cytaa_3$)传递给氧,导致氧化磷酸化不能进行,ATP 的生成严重受阻,从而引起组织严重缺氧,能量衰竭[6,7]。对于线粒体功能的研究,目前主要采用体外孵育的方法。但在线粒体提取和孵育的过程中,结合于 $Cytaa_3$ 的 CN^-可能与之解离,因此不能真实反映氰化物对线粒体功能的影响。本研究表明,0.01 mmol/L NaCN 体外孵育即可显著降低常氧和缺氧大鼠肝脏线粒体 ST3、RCR、OPR、膜电位和复合体Ⅳ活性,并使 ST4 显著升高,从而抑制线粒体呼吸功能。随着 NaCN 浓度增加,其对肝脏线粒体功能的抑制作用进一步加强,表现出量效依赖关系。这一结果表明,本研究所采用的 NaCN 体外孵育离体肝脏线粒体模型,可以有效反映氰化物对常氧和缺氧动物线粒体功能的影响。ST3 为 ADP 转化为 ATP 的氧化磷酸化过程中的氧耗,是代表 ADP 对线粒体氧化呼吸刺激效应的指标;ST4 为 ADP 耗尽后的基础氧耗,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 CN^-与线粒体呼吸链末端的细胞色素氧化酶结合并抑制其活性后,电子传递受阻,电子传递速率降低,导致 ST3 降低。由于电子传递速率下降,在电子传递过程中被泵至线粒体内膜外侧的 H^+减少,导致跨线粒体内膜的 H^+梯

度(△P,为驱动 H^+ 经 F0F1-ATP 酶生成 ATP 的原动力)降低,ATP 生成减少,表现为 OPR 降低。在本实验中,MMP 的降低即反映了△P 的降低。氰化物抑制复合酶Ⅳ活性的同时,可激发复合酶Ⅰ(NADH 脱氢酶复合体)活性的增强[8],复合酶Ⅰ可产生氧自由基[9],从而使线粒体呼吸链脱耦联,电子漏增多,诱使质子漏增加,最终导致 ST4 升高,MMP 和 OPR 进一步降低。ST3 的降低及 ST4 的升高又使得 RCR 降低。

本研究表明,急性低氧组大鼠肝脏线粒体 ST3、RCR、OPR、膜电位和复合体Ⅳ活性均显著低于相同 NaCN 浓度的对照组,ST4 则显著高于对照组,提示急性低氧可以加重 NaCN 对大鼠肝脏线粒体能量代谢的抑制作用,这可能是高原低氧环境下氰化物对于组织器官损伤加重的一个重要机制。急性缺氧状况下,线粒体内膜电子传递链末端(即细胞色素氧化酶)接受电子的氧原子减少,另外,长链脂酰辅酶 A 和花生四烯酸堆积以及钙超载均可抑制呼吸链上的电子传递,造成呼吸链电子传递阻滞,电子传递速率下降,ST3 和 MMP 下降,继之 OPR 下降[10,11]。同时,电子传递阻滞可发生电子漏,进而诱发质子漏,导致 ST4 升高,MMP 和 OPR 进一步降低;另外,急性缺氧 ST4 升高可能和线粒体内外钙循环加速、ATP/ADP 转运载体受抑制,而导致Ⅳ态耗氧显著升高亦有关。在急性缺氧的基础上,当 NaCN 作用于肝线粒体时,复合酶Ⅳ活性被进一步抑制,使线粒体呼吸功能和膜电位进一步降低。

关于氰化物中毒及解毒国内外已有较多报道,但在高原低氧环境下氰化物中毒及其防治的研究尚显匮乏。目前常用的抗氰药物,如 4-DMAP 等,其解毒机制是将血红蛋白氧化为高铁血红蛋白,与细胞色素氧化酶争夺氰离子,解除 CN^- 对细胞色素氧化酶的抑制作用。然而,在高原低氧环境下应用 4-DMAP 等解毒药物,由于血液高铁血红蛋白含量增加会进一步加重组织缺氧,因此在高原应用 4-DMAP 解毒需要减少使用剂量,导致其防治效果并不理想[12]。本研究表明,急性低氧引起线粒体损伤和功能障碍,可以加重 NaCN 对大鼠肝脏线粒体能量代谢的抑制作用,这可能是高原低氧环境下氰化物对于系统和器官损伤加重的一个重要机制。本课题组此前的研究中也表明抗缺氧物质二十八烷醇可以显著提高密闭缺氧氰化物中毒小鼠存活时间[13]。采用药物或营养物质改善和提高高原低氧环境下线粒体的能量代谢功能,可以提高低氧线粒体对氰化物中毒的耐受能力,可能对于高原氰化物中毒起到辅助防治作用。

本研究通过建立急性缺氧大鼠模型,观察不同浓度 NaCN 体外孵育对肝脏线粒体呼吸功能、膜电位和复合酶Ⅳ活性的影响,结果提示:①NaCN 体外孵育显著抑制大鼠肝脏线粒体功能。②急性低氧加重 NaCN 体外孵育大鼠肝脏线粒体能量代谢障碍。③其机制可能与急性缺氧大鼠线粒体氧化磷酸化脱偶联、呼吸链复合体Ⅳ功能降低及线粒体膜电位改变有关,为部队急进高原遭受氰类战剂中毒的防治提供了实验依据。

参考文献:

[1] 唐　禾, 蔡　颖, 王　涛, 等. 缺氧复合氰化钠中毒对大鼠心功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(2): 126 - 128.

[2] Cardoso C M, Moreno A J, Almeida L M, *et al*. Comparison of the changes in adenine nucleotides of rat liver mitochondria induced by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen[J]. Toxicol *In Vitro*, 2003, 17(5 - 6): 663 - 670.

[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] Rafael J. Cytochrome c oxidase[M]//Bergmeyer H U, Bergmeyer J, Grassl M. Methods of Enzymatic Analysis. vol. 3. Weinheim: Verlag Chemie, 1983: 266 - 273.

[6] Megarbane B, Delahaye A, Goldgran-Toledano D, *et al*. Antidotal treatment of cyanide poisoning[J]. J Chin Med Assoc, 2003, 66(4): 193 - 203.

[7] Cummings T F. The treatment of cyanide poisoning[J]. Occup Med (Lond), 2004, 54(2): 82 - 85.

[8] 吴波拉, 陈醒言, 朱桐君, 等. 氰化钠急性染毒对大鼠大脑皮层损伤的作用机制[J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19(2): 74 - 77.

[9] Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, *et al*. Mitochondrial electron transport complex Ⅰ is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium[J]. Circ Res, 1999, 85(4): 357 - 363.

[10] 高文祥, 黄　缄, 高钰琪, 等. 低氧调节大鼠骨骼肌线粒体呼吸链复合体非协同性表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3): 223 - 225.

[11] 唐　禾, 蔡　颖, 董兆君. 缺氧复合 NaCN 中毒对大鼠心脏病理和 cyt-c 活性的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(20): 2290 - 2292.

[12] 叶华虎, 袁菊芳, 王艳静, 等. 缺氧环境下氰化物的毒性变化及 4-DMAP 的解毒效果研究[J]. 高原医学杂志, 2006, 16(1): 1 - 4.

[13] 卢国守, 刘福玉, 高钰琪, 等. 二十八烷醇对急性缺氧小鼠氰化物中毒防治作用的实验研究[J]. 西南国防医药, 2008, 18(2): 163 - 164.

(编辑　吴培红)