维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)02－0138－03

高压氧对大鼠局灶性脑缺血/再灌注脑线粒体能量代谢的影响

周泽芳，谢 鹏，牟 君，邹德智

(重庆医科大学临床学院神经内科，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨高压氧(HBO)对大鼠局灶性脑缺血/再灌注(IR)后脑线粒体三磷酸腺苷(ATP)生成量及质子转移性三磷酸腺苷合成酶(F_0F_1－ATPase)活性的影响。方法：用线栓法阻断大脑中动脉(MCA)的大鼠局灶性 IR 模型。用 Clark 的 Ficoll 密度梯度法分离纯化的线粒体，用生化方法测定线粒体 F_0F_1－ATPase 活性，用高效液相色谱技术(HPLC)测定脑线粒体腺苷酸含量。Wistar 大鼠 30 只，随机分为 3 组：正常对照组(normal)6 只，缺血/再灌注组(IR 组)12 只，高压氧治疗组 12 只。IR 组、HBO 组缺血时间均为 2h，两组均等分为再灌注 2h、24h($I_{2h}R_{2h}$、$I_{2h}R_{24h}$、HBO－$I_{2h}R_{2h}$、HBO－$I_{2h}R_{24h}$2 组；IR 组用 1 个大气压(ATA)O_2 治疗；HBO 组用 2.5ATAO_2 治疗。结果：HBO 治疗后 ATP 生成量及 F_0F_1－ATPase 活性增加；IR 组 ATP 生成量、F_0F_1－ATPase 活性明显低于 HBO 组。结论：HBO 可能是通过恢复 F_0F_1－ATPase 的活性，增加 ATP 合成而改善脑线粒体有氧代谢，减轻缺血性脑损害，保护脑组织的

【关键词】高压氧；脑缺血/再灌注；ATP 生成量；ATP 合成酶

【中国图书分类法分类号】R743.34 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－26

Effects of hyperbaric oxygen on cerebral mitochondrial energy metabolism after brain ischemia/reperfusion in rats

ZHOU Zefang, et al

(*Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of hyperbaric oxygen(HBO) on the levels of cerebral mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) and proton－translocating ATP synthases(F_0F_1－ATPase) after brain ischemia/reperfusion (IR) in rats. *Methods*: Thirty Wistar rats were randomly divided into 3 groups: normal contorl group ($n=6$), IR group ($n=12$) and HBO group ($n=12$). IR was performed by ligation of the middle cerebral artery for 2 hours (hs) and then reperfusion in both the IR and HBO groups. The IR group was subdivided into group $I_{2h}R_{2h}$ and group $I_{2h}R_{24h}$. The HBO group was subdivided into group HBO－$I_{2h}R_{2h}$ and group HBO－$I_{2h}R_{24h}$. The IR group was treated by 2.5 ATAO_2. The HBO group was treated by 2.5 ATA O_2. The pure mitochondria was separated by Clak's Ficoll density gradient method. The activity of F_0F_1－ATPase was determined by biochemical technigue and the level of cerebral ATP by high－performance liquid chromatography (HPLC). *Results*: The level of ATP and the activity of F_0F_1－ATPase increased after HBO treatment. In the IR group, the level of ATP and the activity of F_0F_1－ATPase were significantly lower than those of the HBO group($P<0.01$). *Conclusion*: HBO improves mitochondrial oxygen metabolism, alleviates cerebral ischemic injury and protects brain tissues by means of recovering the activity of F_0F_1－ATPase and increasing the synthesis of ATP.

【Key words】Hyperbaric oxygen; Cerebral ischemia/reperfusion; Level of ATP; ATP synthase

线粒体(mitochondria)是组织细胞有氧代谢的场所。脑缺血及缺血再灌注可引起线粒体的功能失调，启动脑细胞损伤的一系列病理生理过程[1]。本研究在大鼠局灶性脑缺血/再灌注(IR)后用高压氧(HBO)，评价 HBO 对线粒体能量代谢的影响。以探讨 HBO 对缺血脑组织的保护作用，为 HBO 的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备及动物实验分组

Wistar 大鼠，体重 250～300g，雌雄不拘。用经颈外动脉线栓法阻断右侧大脑中动脉(MCA)的大鼠局灶性 IR 模型。实验共分 3 组，正常组(normal)6 只，缺血再灌注组(IR)12

作者介绍：周泽芳(1964－)，女，硕士，副主任医师，主要研究方向：脑血管疾病。

基金项目：重庆市科委自然科学基金项目(97－4778)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

只，高压氧治疗组(HBO)12 只；其中后两组又等分为再灌注 2h 和 24h 2 组($I_{2h}R_{2h}$、$I_{2h}R_{24h}$、HBO－$I_{2h}R_{2h}$、HBO－$I_{2h}R_{24h}$)；缺血时间均为 120min。每组动物均为 6 只

1.2 实验条件

HBO 舱为 GYQ－A2 型动物氧舱，实验用气为医用液态氧。治疗前用纯氧气洗舱 3 次，舱内氧浓度大于 95%。HBO－$I_{2h}R_{2h}$于再灌注 2h 用 2.5ATAO_2 治疗 1h，HBO－$I_{2h}R_{24h}$于再灌注 2、12、24h 用 2.5ATAO_2 治疗各 1h。$I_{2h}R_{2h}$于再灌注 2h 用 1ATAO_2 治疗 1h，$I_{2h}R_{24h}$于再灌注 2、12、24h 用 1ATAO_2 治疗各 1h。

1.3 大鼠脑线粒体的分离

采用改良的 Clark[2] 的 Ficoll 密度梯度法分离纯化的线粒体。用 Lowry[3] 法测定脑线粒体蛋白质，以牛血清白蛋白为标准。

1.4 脑线粒体中腺苷酸含量的测定

按高文祥、邓峰等[4] 方法加以改进，在 Water－484 高效液相色谱仪上测定腺苷酸含量，以上操作过程均在 2～4℃完成。

1.5 F_0F_1－ATP 酶活性测定

参照高文祥、Tatuch Y[5] 等的方法。磷的测定用南京建成生物研究所药盒，方法按说明进行。酶活性以 37℃反应条件下每 mg 线粒体蛋白每分钟释放无机磷的纳摩尔数表示。

1.6 统计处理

所有数据均经计算机运用 OXSTAT－Ⅱ数据统计软件处理，两组间比较采用 t 检验或方差分析。所有结果以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，显著性差异水平 $P<0.05$

2 结 果

2.1 各组大鼠脑组织匀浆 ATP、ADP 和 AMP 含量的变化

表 1 各组大鼠脑组织 ATP、ADP 和 AMP 含量的变化

($n=6, \bar{x}\pm s$, $ug/mg\ pro$)

组别 Group	三磷酸腺苷 ATP	二磷酸腺苷 ADP	一磷酸腺苷 AMP
normal	171.52±23.54	140.4±21.94	165.43±35.45
$I_{2h}R_{2h}$	139.85±16.75	150.4±23.43	180.35±23.50
$I_{2h}R_{24h}$	132.35±13.68[a]	171.6±22.54	197.05±30.45
HBO－$I_{2h}R_{2h}$	150.78±30.25	143.4±21.38	173.58±28.52
HBO－$I_{2h}R_{24h}$	165.23±21.58[bc]	148.4±23.58	172.75±29.35

a: $P<0.01$, Compared with normal b: $P>0.05$, Compared with the normal c: $P<0.01$, Compared with IR at same time point

HBO 治疗组与常压下缺血再灌注组相比 ATP 明显增高($P<0.01$)，接近正常组($P>0.05$)，表明 HBO 可以改善脑缺血再灌注时脑组织的有氧代谢(表 1)。

2.2 线粒体 F_0F_1－ATP 酶活性的变化

HBO 治疗后，F_0F_1－ATP 酶活性与 IR 组相比存在显著差异，$P<0.01$。表明 HBO 可保护脑细胞，稳定线粒体膜，减少缺血对 F_0F_1－ATPase 抑制(表 2)。

表 2 各组大鼠脑组织线粒体 F_0F_1－ATP 酶活性的变化($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	例数 n	质子转移性三磷酸腺苷合成酶 F_0F_1－ATPase(nmPi/mg/min)
normal	6	30.43±1.94
$I_{2h}R_{2h}$	6	23.15±2.04
$I_{2h}R_{24h}$	6	16.58±1.85[a]
HBO－$I_{2h}R_{2h}$	6	24.98±1.75
HBO－$I_{2h}R_{24h}$	6	28.88±2.25[bc]

a: $P<0.01$, Compared with the normal b: $P>0.05$, Compared with the normal c: $P<0.01$, Compared with IR at same time point

3 讨 论

脑组织中高能化合物 ATP 为维持脑功能和细胞内外离子恒定所必须，其含量变化是反映线粒体能量生成及利用的重要指标。线粒体膜富含磷脂，线粒体生化功能与能量代谢很大程度依赖于膜磷脂的完整[6]。缺血/再灌注时自由基引发的线粒体膜脂质过氧化或细胞内形成脂质过氧化物作用于线粒体膜，使膜的液态及流动性改变，从而导致线粒体功能障碍。

质子转移性 ATP 合成酶能将光合作用或者呼吸链产生的能量转变成 ATP，这类酶称为 F_0F_1－ATP 酶[7]。F_0F_1－ATP 酶位于线粒体内膜，是 ATP 合成的关键酶。在细胞损伤的发展中起关键作用的是 F_0F_1－ATP 酶[7]。脑缺血再灌注时，F_0F_1－ATP 酶构象发生改变而影响该酶活性。F_0F_1－ATP 酶依赖于心磷脂发挥活性，它的活性与心磷脂含量或磷脂中不饱和脂肪酸含量有关，脑缺血再灌注时，线粒体膜磷脂降解，多不饱和脂肪酸丢失，使 F_0F_1－ATP 酶活性下降[8]。缺血时 F_0F_1－ATP 酶活性改变可能与线粒体内膜腺苷酸载体功能障碍[9]及 Ca^{2+}、Mg^{2+} 浓度变化[10]有关。

脑缺血再灌注时高能磷酸化合物之所以恢复慢且总腺苷酸水平明显下降，可能与下列因素有关。

维普资讯 http://www.cqvip.com

①缺血再灌注所致线粒体 F_0F_1 - ATP 酶活力的降低。②ATP 合成的前身物质在再灌注时被冲洗出去,使脑组织失去再合成高能磷酸化合物的物质基础。③再灌注时,线粒体膜发生氧自由基诱发的脂质过氧化反应使线粒体呼吸功能受损,ATP 合成障碍。

本实验结果表明,HBO 能增加脑缺血再灌注时 F_0F_1 - ATP 酶活性及 ATP 生成量,改善线粒体能量代谢,可能机制为①改善组织缺血缺氧:在 HBO 下脑皮质血流量减少,脑血管阻力增加,但脑耗氧量相应降低更甚,在 $1ATAO_2$ 下脑耗氧量下降 16%,在 $2ATAO_2$ 下脑耗氧量下降 38%[11];同时 HBO 使血浆物理溶解氧增加,并促进氧向组织细胞内弥散;故在 HBO 下脑组织的氧分压仍高。脑缺血再灌注时,HBO 可改善成纤维细胞的功能,刺激新生血管形成,提高缺血部位的灌注压,使缺血部位的血流灌注增加[12];②HBO 通过改善缺氧,阻断自由基产生的途径,抑制自由基诱发的脂质过氧化过程,使脑部脂类过氧化水解物的形成趋向稳定,从而恢复线粒体膜的流动性,以便呼吸酶发挥正常功能。③HBO 可减少脑缺血再灌注时 L 型钙通道的开放,降低细胞内游离钙浓度,避免细胞内钙超载[13],使线粒体结构及功能恢复。

本实验直接反映了 HBO 对脑缺血/再灌注过程中 ATP 生成的关键酶及 ATP 生成量的影响,说明 HBO 可通过改善缺氧,改善脑组织有氧代谢,从而保护脑细胞,减少缺血性神经元损害。

参 考 文 献

[1] Neils Sims. Selective impairment of respiration in mitochondria isolated from brain suberegions following mitochondria isolatecl from brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat[J]. J Neurosury, 1991; 76(3): 244 - 250.

[2] Clark JB, William J, Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria[J]. J Biochem, 1970; 245(18): 4724 - 4731.

[3] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the polinphenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951; 1993; 265 - 272.

[4] 邓 峰,刘昭荣,吴小红,等. 高效液相色谱检测低氧时大鼠脑组织中腺苷酸含量[J]. 解放军预防医学杂志, 1996; 14(3): 185 - 188.

[5] Tamch Y, Robinson BH. The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993; 192(1): 124 - 128.

[6] Dandan S, David G. Ischemia - induced changes in cerebral mitochondrial free fatty acids, phospholipids and respiration in the rat[J]. J Neurochem, 1994; 62(9): 1921.

[7] Uhlin U, Cox GB, Cuss JM. Crystal structure of the epsion subunit of the proton - translocatin ATP synthase from Escherichia cloi[J]. Structure, 1997; 5(9): 1219 - 1230.

[8] Nakhara I, Kikuchi Taki W. Changes in major phospholipids of mitochondrial during postischemia reperfusion is rat brain[J]. J Neurosurge, 1992; 76(2): 244.

[9] Carbonera D. Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress[J]. Biochem Biophys Acta, 1988; 943: 245 - 255.

[10] Tak yee AW. Suppression of mitochondrial respiratory function after short - term anoxia[J]. Am J Physiol, 1987; 252: C362 - 368.

[11] 史玉泉,主编. 实用神经病学[M]. 上海科学技术出版社, 1995; 1141 - 1143.

[12] Aamir Siddiqui, John D Davidson, Thomas A Mustoe. Ischemic tissue oxygen cap - acitance after hyperbaric oxygen therapy: A new physiologic concept[J]. Plast Reconstr Su - rg, 1997; 99: 148 - 153.

[13] 方以群,刘景昌. 高压氧对脑缺血及再灌注时海马游离 Ca^{2+} 及钙通道的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 1995; 11(2): 129 - 132.