DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.002
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1611-04

论著

氯霉素处理对急性缺氧大鼠脑线粒体氧化呼吸功能变化研究

陈丽峰[1],柳君泽[1],宋 熔[1],党永明[2] (第三军医大学:[1]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,[2]西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 通过观察氯霉素处理大鼠急性缺氧暴露后脑线粒体呼吸功能和细胞色素氧化酶(COX)活性变化,了解线粒体基因组表达在缺氧引起线粒体呼吸功能改变中的作用。方法 以成年雄性Wistar大鼠建立氯霉素药物处理及高原缺氧模型。应用差速离心法提取脑皮质线粒体,Clark氧电极法测定线粒体呼吸功能,及细胞色素C氧化酶(COX)的活性。结果 ①急性缺氧24 h后大鼠脑线粒体Ⅲ态呼吸(ST3)、呼吸控制率(RCR)显著降低,呼吸Ⅳ态(ST4)较对照组显著升高;②氯霉素处理加缺氧组大鼠脑线粒体ST3较对照组显著降低,ST4较对照组、单纯缺氧、氯霉素组比较均显著降低,RCR与对照组比较显著降低,但高于单纯缺氧、氯霉素组;③单纯缺氧、氯霉素处理组脑组织COX活性显著降低,而氯霉素处理加缺氧组较单纯缺氧组COX活性从正常组的65.7%恢复至86.5%。结论 ①线粒体蛋白合成的抑制可导致线粒体氧化功能障碍,提示线粒体基因组的完整表达在其呼吸功能发挥中的重要作用;②氯霉素处理对缺氧造成的线粒体功能障碍具有保护作用。

关键词:缺氧;线粒体;细胞色素氧化酶;氯霉素
中图法分类号:R329.24;R364.4;R978.13 文献标识码:A

Roles of CAP treatment for respiratory function of mitochondria from cerebral cortex of acute hypoxic exposure rats

CHEN Li-feng[1], LIU Jun-ze[1], SONG Rong[1], DANG Yong-ming[2] ([1]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of mitochondrial DNA (mtDNA) in the respiratory function of cerebral mitochondria in rats exposed to acute hypoxia by observing the changes of mitochondrial respiratory function and cytochrome C oxidase (COX) activity. Methods The rat cerebral cortex mitochondria were isolated by centrifugation. Mitochondrial respiratory function and COX activity were measured by Clark oxygen electrode. Results ① Compared with the control group (C), hypoxia group (H) showed significantly elevated state 4 respiration (ST4), decreased state 3 respiration (ST3), and respiratory control rate (RCR). ② ST3 in group of treatment with chloramphenicol (CAP) plus hypoxia (MH) was significantly lower than that in Group C, while ST4 in Group MH was significantly lower than that in groups C and H. RCR in Group MH was lower than that in Group C, but higher than that in Group H. ③ COX activity in Group H was significantly lower than that in Group C. In Group MH, COX activity was higher than that in Group H, but was still lower than that in Group C. Conclusion The complete expression of mtDNA may play an important role in mitochondrial respiratory function. CAP treatment might be beneficial to the recovery of rat respiratory function.

Key words: hypoxia; mitochondria; cytochrome C oxidase; chloramphenicol

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070290);全军医学科研"十五"计划面上项目(01MB109)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070290) and the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01MB109)
作者简介:陈丽峰(1975-),女,山西省太谷县人,硕士,讲师,主要从事缺氧机制及防治方面的研究。电话:(023)68752340-8305;E-mail:chenlf5468@sina.com
通信作者:柳君泽,电话:(023)68752340-8205;E-mail:liuliu@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-10-13;修回日期:2004-03-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

初进高原后机体因缺氧可发生急性高原反应，严重影响正常生理机能，而中枢神经系统功能障碍又是初入高原者发生急性高原病（高原反应、高原脑水肿）的重要原因。为提高机体对高原急性缺氧的耐受力，人们对此进行了许多研究，脑组织是对缺氧最敏感的组织，耗氧量大、代谢率高、ATP储备少，成为研究的靶器官。组织、细胞对氧利用效率的改变和能量的产生与利用障碍是缺氧时机体机能活动改变的核心；研究急性缺氧时细胞的能量代谢变化规律及其机制对减轻缺氧对机体的损伤、改善机体的活动能力将具有重要意义。氯霉素是线粒体编码蛋白翻译过程的特异抑制剂，而不影响细胞核编码的蛋白质在内质网上的蛋白质合成。利用氯霉素在一定程度上抑制线粒体编码蛋白合成的这一特性，我们建立了氯霉素处理大鼠模型，观察急性缺氧对大鼠脑组织细胞线粒体呼吸功能的变化，COX活性变化，以期了解线粒体自身遗传系统在维持其氧化呼吸功能中的作用，揭示缺氧时组织能量代谢改变的机制以及氯霉素对脑缺氧损伤的线粒体呼吸酶的效应，为改善缺氧时线粒体能量生成效率、提高机体对缺氧环境的生存能力提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

小鼠抗人 *COX*Ⅰ、抗牛 *COX*Ⅳ单克隆抗体（Molecular Probe）；碱性磷酸酶标记的马抗小鼠IgG（北京中山公司）；其它试剂及聚偏二氟乙烯（PVDF）膜等购自上海生工生物工程公司。

1.2 实验动物与分组

成年雄性Wistar大鼠40只（体质量140～220 g，第三军医大学实验动物中心提供），随机分为4组：平原对照组（control，C组）、氯霉素药物处理组（medication，M组）、单纯缺氧组（hypoxia，H组）和氯霉素药物处理＋缺氧组（medication＋hypoxia，MH组），每组各10只。药物处理为0.5%氯霉素腹腔注射（50 mg/kg），1次/12 h，实验前7 d开始连续注射。动物缺氧条件为：低压舱模拟海拔5 000 m高原，大气压为405.35 mmHg，连续减压24 h。

平原对照组与药物处理组于舱外同时喂养，并于实验前7 d开始腹腔注射等量生理盐水。全部动物喂以标准颗粒饲料（本校实验动物中心提供），自由饮水。C、M组在平原取材，H、MH组在模拟海拔5 000 m高原低压舱内采集标本，其中有几例因减压等因素致死亡，故未纳入后续统计处理。

1.3 实验方法

1.3.1 大脑皮质线粒体的提取 采用本实验室建立的方法[1]。线粒体蛋白质测定采用Lowry's法。

1.3.2 分离线粒体的电镜观察 将提纯的线粒体沉淀1 mm^3置于3%戊二醛固定液中固定，冲洗后用1%锇酸固定，逐渐丙酮脱水，环氧树脂618包埋，制超薄切片后用2000EX型透射电镜观察，记录并拍照。

1.3.3 线粒体呼吸活性的测定 参照Chavez等[2]的方法，反应总体积1.6 ml，温度28 ℃。将1.5 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，观察线粒体呼吸态的变化，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（R）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，氧化磷酸化效率（OPR）以单位时间内单位线粒体蛋白合成的ATP量（OPR＝ST3×P/O）表示，单位是nmol·min^{-1}·mg^{-1}，其中P/O即磷氧比值为向反应体系中加入ADP的nmol数与因此而消耗氧量的nmol原子数之比。

1.3.4 细胞色素氧化酶活性的测定 采用氧电极法[3]。反应总体积1.4 ml，反应温度25 ℃。将1.3 ml预先于25 ℃水浴中孵育过夜的磷酸-EDTA缓冲液加入反应池中孵育1～3 min，然后依次加入抗坏血酸溶液（0.1 mmol/L）、细胞色素C溶液（2 mmol/L）、TMPD溶液（50 mmol/L）各50、30、10 μl，反应1～2 min，待反应曲线斜率（即assay blank，空白值）恒定后，加入线粒体悬液10 μl，记录氧耗曲线。酶活性（A）以原子氧的消耗速率表示，单位nmol·min^{-1}·mg^{-1}，活性计算公式为：

$$A=(240\times V\times \triangle X\times 2)/(X\times V\times \triangle t\times mg)$$

其中240是指每ml空气饱和的溶液中所含的nmol分子氧，V指反应总体积（ml），△X表示氧耗量（除去空白值，以记录纸上相对应的格数表示），2表示由分子氧变成原子氧时的系数，X表示反应体系中总的氧含量（以记录纸上相对应的格数表示），V指加入的样本体积（ml），△t耗氧时间（min）。

1.4 统计学处理

数据均以$\bar{x}\pm s$表示；采用SPSS10.0统计软件的单因素方差分析，各组均值的多重比较采用LSD法。

2 结果

2.1 线粒体提取质量

分离线粒体的透射电镜观察显示，提取的沉淀中主要成分是线粒体，纯化的线粒体为圆形或椭圆形，多数线粒体有完整的膜性结构，保持了较完整的嵴结构，少数线粒体有肿胀、嵴稀疏（图1）。

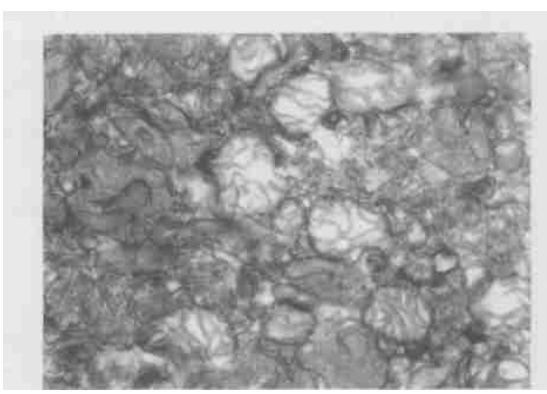


图1 线粒体提取物透射电镜图 （TEM×12 500）

Fig 1 Photograph of mitochondria （TEM×12 500）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

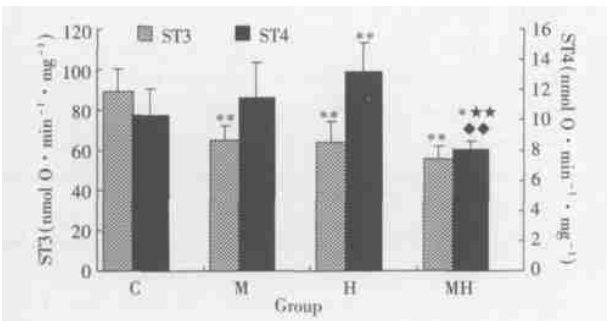
通过 Clark 氧电极测定线粒体的呼吸氧耗, 正常脑组织线粒体氧化磷酸化偶联程度较高, 呼吸控制率(RCR)在7.9 以上。

2.2　大鼠脑皮质线粒体氧化呼吸功能

与对照组(C 组)比较, 急性缺氧组(H 组)大鼠脑线粒体 ST3、RCR 显著降低, ST4 显著升高, 差异均具有非常显著意义($P<0.01$); OPR 虽有降低, 但不具统计学意义。

与 C 组比较, M 组大鼠脑线粒体 ST3、RCR 及 OPR 均显著降低, 差异具有非常显著意义($P<0.01$), 而 ST4 无明显变化。

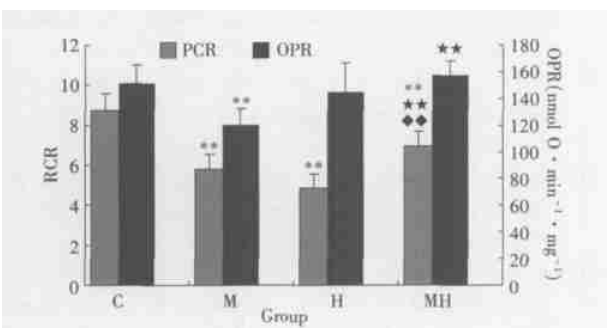
MH 组大鼠脑线粒体ST3 较 C 组显著降低($P<0.01$), 但与 H 组、M 组均无显著差异, ST4 较 C 组显著降低($P<0.05$), 与 H 组、M 组比较也显著降低, 差异具有非常显著意义($P<0.01$), RCR 与 C 组比较显著降低, 但高于 H 组及 M 组, 差异均具有非常显著意义($P<0.01$), OPR 较 M 组显著升高($P<0.01$), 与 C 组、H 组均无显著差异(图 2, 3)。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* C; ★★: $P<0.01$, *vs* M; ◆◆: $P<0.01$, *vs* H

图 2　急性缺氧与药物处理对大鼠脑线粒体呼吸活性氧耗的影响($\bar{x}\pm s$)

Fig 2　Effects of acute hypoxia on respiratory activity in mitochondria from the cerebral cortex of the control and CAP-treated rats ($\bar{x}\pm s$)



**: $P<0.01$, *vs* C; ★★: $P<0.01$, *vs* M; ◆◆: $P<0.01$, *vs* H

图 3　急性缺氧与药物处理对大鼠脑线粒体氧化磷酸化偶联的影响($\bar{x}\pm s$)

Fig 3　Effects of acute hypoxia on oxidative-phosphorylation coupling in mitochondria from the cerebral cortex of the control and CAP-treated rats ($\bar{x}\pm s$)

2.3　大鼠脑皮质 COX 活性

M 组及 H 组大鼠分别经氯霉素处理和急性缺氧后, 脑组织 COX 活性显著降低, 与正常对照组相比, 差异有非常显著意义($P<0.01$); 而 MH 组大鼠经 a、b 两因素复合处理后, COX 活性与 M 组、H 组比较是升高的, 差异有非常显著意义($P<0.01$), 与 C 组比较无显著差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1　急性缺氧及药物处理后大鼠脑线粒体 **COX** 活性的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of COX activity in mitochondria from the cerebral cortex of the control rats and CAP-treated acute hypoxic rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	COX activity (nmol O·min^{-1}·mg^{-1})
C	8	628.48±62.09
M	10	380.90±17.91 **
H	7	412.79±60.13 **
MH	8	543.86±82.03★★◆◆

**: $P<0.01$, *vs* C; ★★: $P<0.01$, *vs* M; ◆◆: $P<0.01$, *vs* H

3　讨论

高原环境对机体的危害主要是乏氧性缺氧, PaO_2 降低必然导致线粒体内 PO_2 下降, 出现线粒体功能障碍。关于缺氧对线粒体呼吸功能的影响研究报道较多[4~6]。ST3 是代表 ADP 对线粒体氧化呼吸刺激效应的指标, ST3 和 RCR 下降说明 ADP 对呼吸链电子传递速率的刺激效应降低。ST4 代表无 ADP 时的基础耗氧, 也即意味着此时无 ATP 的合成, 是一个"无效"氧耗的过程。OPR 可以反映氧化磷酸化效率的大小。

本实验结果表明, 模拟 5 000 m 高原连续缺氧暴露 24 h, 大鼠脑线粒体ST3 和 RCR 显著降低, ST4 显著升高, 表明急性缺氧时脑线粒体氧化呼吸功能降低、"无效氧耗"增加。当机体 ATP 需要增加时, 并不能靠 ADP 刺激电子传递来增加氧耗, 使氧化磷酸化在一定程度上脱偶联。大鼠脑线粒体呼吸功能的这种变化可能参与了急性缺氧影响脑能量代谢从而导致神经系统功能障碍的机制。ST4 的升高不伴有 ADP 的磷酸化, 无能量生成, 此时质子不通过 F0F1-ATPase 进行 ATP 合成, 而直接通过线粒体内膜回到基质, 其结果导致贮存在质子电化学势能中的自由能的消耗, 形成质子漏, 质子漏并不是真正的无效氧耗, 它具有产热、增加代谢调节潜能、清除有害自由基和调节碳流等生理功能[7]。

氯霉素抑制线粒体的蛋白翻译是具有特异性的, 它并不影响胞浆蛋白的合成, 其抑制蛋白质合成的机制是降低核糖体上肽基转移酶的催化反应常数。当线粒体内蛋白质合成被特异性抑制后, 线粒体的大小、数目、形状以及膜的通透性等都发生改变[8], 但这些变化与此时线粒体能量代谢改变的关系尚缺乏研究。

本实验通过给大鼠注射氯霉素, 建立线粒体蛋白合成抑制动物模型, 结果显示当线粒体的蛋白合成被抑制后, 线粒体的氧化磷酸化偶联程度及氧化磷酸化

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

效率均受到了影响，与文献[8]报道的结构改变相一致。氯霉素处理动物急性缺氧后，脑线粒体ST3呼吸较单纯缺氧组没有进一步降低，表明给药和缺氧两因素对ST3的作用不是简单相加的结果，一定程度上起到相互"减弱"的作用；ST4不仅比药物处理组和单纯缺氧组显著降低，而且也显著低于正常对照组，表明急性缺氧可显著降低线粒体蛋白合成抑制大鼠的脑线粒体"无效氧耗"；RCR虽与正常组比较是降低的，但比单纯缺氧及单纯药物处理组显著升高；而OPR显著高于药物处理组，与正常对照组则无差异，表明急性缺氧可部分改善氯霉素处理大鼠脑线粒体的氧化磷酸化偶联，在一定程度上提高氧化磷酸化效率。

线粒体的氧化呼吸是依靠其内膜上电子传递链的逐步电子传递来实现的。COX是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物，是线粒体氧化能力的关键调节部位，其利用从亚铁细胞色素C传来的电子催化氧的4个电子还原，并产生质子电化学电位梯度（$\triangle\mu H$），同时把氧化还原反应中的能量通过氧化磷酸化转变为含高能磷酸键的ATP，在能量产生中起主要作用，是线粒体氧化呼吸的限速酶，在调节线粒体氧化磷酸化功能和细胞的能量需求中起关键性作用。文献[12]报道，脑神经元功能活动状态随COX活性而改变，缺氧时COX活性下降提示神经细胞机能活动降低，尤其在缺氧急性期下降更为明显，因此缺氧时COX活性下降可能是缺氧导致中枢神经系统功能障碍的机制之一。

本实验结果表明，在急性低氧环境下脑线粒体氧化呼吸功能的下降与COX活性的降低有关，而氯霉素处理的的大鼠经急性缺氧暴露后，其COX活性的部分恢复对线粒体呼吸功能的改善起至关重要的作用。

缺氧对COX活性的调节机制并不清楚，对低等真核生物如酵母的研究认为，缺氧可能通过两种途径影响酶活性[13]：①定量调节，又称长期调节，即缺氧可通过影响基因的表达，导致有活性的酶分子数的改变。②定性调节，即短期调节，缺氧通过细胞内环境的改变，如离子浓度、细胞pH、自由基以及酶反应底物等的变化，导致酶的空间构象发生改变或化学修饰，表现出不同的催化活性。本实验结果显示急性缺氧能使氯霉素处理的大鼠脑COX活性升高，可能与给予线粒体蛋白合成抑制剂后大鼠对缺氧的反应不如单纯缺氧时敏感有关，在一定程度上减弱了缺氧对酶活性的调节。国内外有关抗生素在缺血缺氧损伤中发挥的作用亦有研究报道，已经有实验证实二甲胺四环素(半合成四环素)，在缺血缺氧损伤、退行性病变的实验动物模型中，对发育中的脑起神经保护作用，其机制可能与阻止活性caspase-3的形成有关[9]；也有文献报道，红霉素体内注射可以提高细胞的缺氧耐受性[10]，这两种抗生素均与氯霉素一样可以特异阻断线粒体蛋白合成。至于详细的调控机制还有待进一步在转录和蛋白水平上进行研究。

参考文献：

[1] 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.

[2] 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.

[3] Jovanovic M D, Ninkovic M, Malicevic Z, *et al*. Cytochrome C oxidase activity and total glutathione content in experimental model of intracerebral aluminum overload[J]. Vojnosanit Pregl, 2000, 57(3): 265－270.

[4] Rehncrona S, Mela L, Siesjo B K. Recovery of brain mitochondrial function in the rat after complete and incomplete cerebral ischemia[J]. Stroke, 1979, 10(4): 437－446.

[5] Puka Sundvall M, Wallin C, Giuand E, *et al*. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury[J]. Brain Res, 2000, 125(1-2): 43－50.

[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]. 中国病理生理杂志，2000，16(10)：879－882.

[7] 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.

[8] Mazzocchi G, Neri G, Pobba C, *et al*. Investigation on the turnover of adrenocortical mitochondria. X. A correlated biochemical stereological study of the effects of chronic treatment with chloramphenicol on the mitochondria of the rat zona fasciculate[J]. Am J Anat, 1978, 153(1): 67－79.

[9] Arvin K L, Han B H, Du Y, *et al*. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury[J]. Ann Neurol, 2002, 52(1): 54－61.

[10] Huber R, Kasischke K, Ludolph A C, *et al*. Increase of cellular hypoxic tolerance by erythromycin and other antibiotics[J]. Neuroreport, 1999, 10(7): 1543－1546.

[11] Bruno A, Martinuzzi Y, Tang Y, *et al*. A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV[J]. Am J Hum Genet, 1999, 65(3): 611－620.

[12] Zhang C, Wong Riley M T. Synthesis and degradation of cytochrome c oxidase subunit mRNAs in neurons: differential bigenomic regulation by neuronal activity[J]. J Neurosci Res, 2000, 60(3): 338－344.

[13] Burke P V, Poyton R O. Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase[J]. J Exp Biol, 1998, 201(Pt 8): 1163－1175.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net