DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.003
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2165-04

论著

低压缺氧大鼠脑线粒体内腺苷酸含量及能荷的变化

柳君泽,高文祥,曹利飞,孙秉庸 (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,全军高原生理与高原病重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 对比研究急性和慢性缺氧暴露后脑线粒体内的能量储备和ATP生成能力,探讨急性缺氧致脑功能障碍和慢性缺氧适应的能量代谢机制。方法 Wistar大鼠分为对照组、急性缺氧组和慢性缺氧组。后两组分别于模拟海拔4 000 m高原低压舱内连续缺氧暴露3 d和30 d,每天23.5 h。缺氧组和对照组动物分别在模拟高原条件和平原条件断头处死,取脑组织分离线粒体。高压液相色谱分离并测量线粒体内腺苷酸库(pool)含量,并计算能荷;以琥珀酸为氧化底物检测线粒体的ATP生成速率。结果 急性和慢性低压缺氧暴露后大鼠脑线粒体内的总腺苷酸库变化不明显($P>0.05$),但慢性缺氧组高于急性组($P<0.05$);线粒体内的ATP含量在急性和慢性缺氧时分别降低65.1%和33.5%,慢性缺氧可部分恢复,但仍低于对照组($P<0.05$);ATP在总腺苷酸库中所占比例在急、慢性缺氧时分别是对照的41.5%和42.5%;急、慢性缺氧对线粒体内能荷均无显著影响($P>0.05$);急性缺氧可使以琥珀酸为底物的线粒体ATP生成速率降低41.8%,而慢性缺氧则与对照组无显著差异($P>0.05$)。结论 急性缺氧暴露可显著降低脑线粒体内的能量储备,而线粒体ATP生成能力降低是其原因之一;慢性缺氧暴露则可使其能量储备部分恢复,提示"线粒体适应"在机体对缺氧适应中的作用。

关键词:线粒体;缺氧;ATP;能荷;腺苷酸库
中图法分类号:R364.4;R329.24;R322.81 文献标识码:A

Changes of adenylate pool and energy charge in mitochondria isolated from rat brain exposed to hypobaric hypoxia

LIU Jun-ze, GAO Wen-xiang, CAO Li-fei, SUN Bing-yong (Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanisms in energy metabolism of brain dysfunction during acute hypoxic exposure and adaptation to hypoxia during chronic hypoxic exposure by comparative study of the energy status and adenosine triphosphate (ATP) production ability in mitochondria of rats exposed to acute and chronic hypoxia. **Methods** Wistar rats were randomly divided into normoxic control group, acute hypoxia group and chronic hypoxia group. The acute and chronic hypoxic exposure models were established by exposing rats to a hypobaric chamber simulating 4 000 m above sea level for 3 days and 30 days. Then rats were sacrificed at sea level and at simulated high altitude. Brain mitochondria were isolated by centrifugation program. The size of adenylic acid pool (ATP, ADP, AMP) in mitochondria was separated and measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The ATP production rate of mitochondria was measured by adding succinate into the response medium in isolated organelle *in vitro*. **Results** Compared with that in the normoxic control group, no change of the total size of adenylic acid pool in mitochondria was found during acute and chronic hypoxic exposures ($P>0.05$). The content of adenylic acid in mitochondria in chronic hypoxia group was higher than that in acute hypoxia group ($P<0.05$). The content of ATP in mitochondria decreased by 65.1% and 33.5% in acute and chronic hypoxia groups, respectively. Partial recovery of ATP content was observed in chronic hypoxia group, but APT content was still lower than that in the control group ($P<0.05$). The ratio of ATP to total adenylate pool in acute and chronic hypoxia groups was respectively 41.5% and 42.5% of that in the normoxic control group. Both acute and chronic hypoxic exposures had no effects on energy charge of the mitochondria ($P>0.05$). ATP production rate of oxygenating succinate in isolated organelle *in vitro*

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39730190,30270509)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(39730190, 30270509)
作者简介:柳君泽(1961-),男,山西省运城市人,硕士,教授,主要从事缺氧与线粒体半自主性关系方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68752339-8205
收稿日期:2003-03-11;修回日期:2003-10-20

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

decreased by 41.5% in acute hypoxia group, but no significant difference was found between the chronic hypoxia group and the control group. **Conclusion** Acute hypoxic exposure can significantly decrease the energy reserve of brain mitochondria. The main cause is the drop of ATP production ability in mitochondria. However, chronic hypoxic exposure can partly restore the energy reserve. This suggests the role of mitochondrial adaptation in the body adaptation to hypoxia.

Key words: mitochondria; hypoxia; adenosine triphosphate; energy charge; adenylate pool

线粒体是细胞的动力工厂,通过氧化磷酸化消耗掉氧而产生ATP,线粒体内的ATP通过转运进入细胞的其它部位,供细胞各种功能活动所利用,因此线粒体的ATP生成直接影响细胞的功能活动,尤其是在氧和ATP储备少、对缺氧极为敏感的脑组织,这也是缺氧引起包括高原昏迷在内的中枢神经系统功能障碍的重要机制[1]。对缺氧耐受(Hypoxia-tolerant)细胞和缺氧敏感(Hypoxia-sensitive cells)细胞在缺氧时的线粒体氧耗和能量生成的比较研究证实,线粒体在缺氧耐受的形成中起重要的调节作用[2]。关于缺氧暴露后脑线粒体内的能量储备、能量生成能力以及随缺氧暴露时间的变化,少见报道。比较研究急性和慢性缺氧暴露后脑线粒体内的能量储备,对揭示急性缺氧致脑功能障碍和慢性缺氧适应的能量代谢机制都有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

11~13周龄雄性Wistar大鼠20只(二级,本校实验动物中心提供),体质量160~280 g;484型高压液相色谱仪(Water公司);ATP、ADP、AMP标准品(Sigma);其它试剂均为分析纯。

1.2 实验分组与缺氧条件

大鼠分为对照(未缺氧)组(n=7)、急性缺氧组(n=7)和慢性缺氧组(n=6)。缺氧组动物于低压舱内模拟海拔4 000 m高原(大气压61.6 kPa、舱内温度18~23 ℃)连续缺氧暴露3 d(急性缺氧组)和40 d(慢性缺氧组),每天缺氧23.5 h(返回平原30 min以清扫、喂食),12 h日光灯照明。对照组动物于相同条件下饲养在平原(海拔308 m,大气压97.7 kPa,室温18~23 ℃),不经低压缺氧暴露。所有动物喂以标准颗粒合成饲料(本校实验动物中心提供),自由饮水。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠脑线粒体的分离提取 大鼠分别在平原(对照组)和模拟4 000 m高原低压舱内(缺氧组)断头处死,快速取大脑半球,置于0~4 ℃生理盐水中洗涤数次,立即埋入带冰碴的分离介质(0.25 mol/L蔗糖,10 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4,0.5 mmol/L K^+-EDTA)中。以上操作在30 s内完成。经Teflon-玻璃匀浆器制成匀浆液,按文献[3]报道的方法分离并纯化线粒体。匀浆液经2 000× g 离心3 min,取上清液重复1次,收集上清液于12 500× g 离心8 min,沉淀的线粒体用3% Ficoll溶解后铺于6% Ficoll界面上,11 050× g 离心30 min,纯化的线粒体沉淀用分离介质洗涤2次,按10 mg/ml悬浮于分离介质中制成线粒体悬液。按Lowry法测定线粒体蛋白质浓度,以牛血清白蛋白为标准。以上操作均在0~4 ℃,每次实验均需新鲜制备。

1.3.2 线粒体内腺苷酸含量测定 样品处理:于分离的0.1 ml线粒体悬液中加入冰冷的1.6 mol/L的$HClO_4$ 0.2 ml,0 ℃静置5 min后于20 000× g、2 ℃离心10 min,取上清液用2.5 mol/L的K_2CO_3中和(调pH至6.5),充分混合,于0 ℃静置10 min后再次于20 000× g、2 ℃离心10 min,取上清液20 μl行高压液相色谱分离并定量ATP、ADP、AMP含量。色谱条件:色谱柱为hypersil-BDS C18,10 μm,4.6× 250 mm。流动相为20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.0),流速1 ml/min,恒速洗脱。紫外检测波长254 nm,灵敏度0.01 AUSF。样品和标准品用相同的色谱条件。

结果计算:根据洗脱峰面积和标准品浓度,计算3种腺苷酸含量,结果以pmol/mg线粒体蛋白表示,并计算总腺苷酸库(ATP+ADP+AMP)、ATP在总腺苷酸库中的比例(ATP/ATP+ADP+AMP)和线粒体内腺苷酸能荷[(ATP+1/2ADP)/ATP+ADP+AMP][4]。

1.3.3 线粒体ATP合成速率测定 参照Tatuch等[5]的方法并改进。取上述分离的大鼠脑线粒体悬液10 μl加入0.2 ml的反应液(0.25 mol/L蔗糖,2 mmol/L MOPS,pH 7.4,10 mmol/L EDTA,5 mmol/L K_3PO_4,1 mmol/L ADP)中,于37 ℃预热5 min后,加入过量的1.25 mol/L的琥珀酸钠,37 ℃水浴1 h,立即置于冰浴中,加入0.2 ml冰冷的1.6 mol/L的$HClO_4$终止反应并破膜。以下操作同上述线粒体内腺苷酸含量测定。结果以每毫克线粒体蛋白在单位时间内生成ATP的微摩尔数表示(μmol·mg^{-1}·min^{-1})。

1.4 统计学处理

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析,各组间均值的多重比较采用FLSD法。

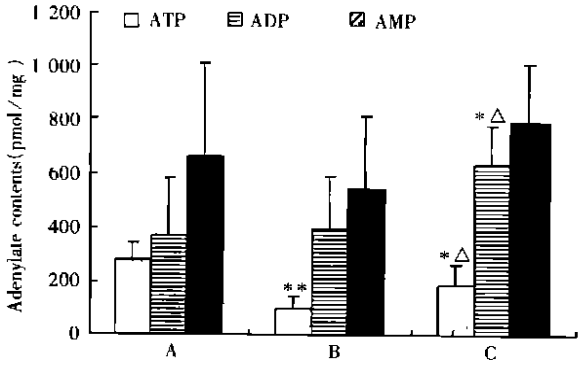
2 结果

2.1 缺氧对脑线粒体内腺苷酸库及能荷的影响

急性和慢性缺氧均可显著降低脑线粒体内的ATP含量(P<0.01,P<0.05),急性缺氧更明显,其ATP含量仅为对照组的34.9%;慢性缺氧暴露后线粒体内ATP含量高于急性缺氧组(P<0.05),但仍低于对照组(P>0.05),为对照组的66.5%,表明可部分恢复;ADP含量在急性缺氧组无显著变化,而慢性缺氧时显著升高,分别高于急性缺氧组和对照组(P<0.05)。缺氧暴露不影响线粒体内AMP含量,见图1。

急性和慢性缺氧时线粒体内总腺苷酸库变化不明显(P>0.05),但慢性缺氧组要显著高于急性组(P<0.05);而无论是急性还是慢性缺氧,ATP在总腺苷酸库中所占比例均明显降低(P<0.01,P<0.05),分别是对照的41.5%和42.5%;线粒体内腺苷酸能荷则无明显改变,见表1。

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



A: Control; B: Acute hypoxia group; C: Chronic hypoxia group; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* A; △: $P<0.05$ *vs* B

图 1　缺氧过程中大鼠脑线粒体内的腺苷酸含量

Fig 1　Content of adenylate pool in cerebral mitochondria of rats during hypoxic exposure

表 1　缺氧对大鼠脑线粒体内总腺苷酸库、ATP 与总腺苷酸库比及能荷的影响($\bar{x}\pm s$)

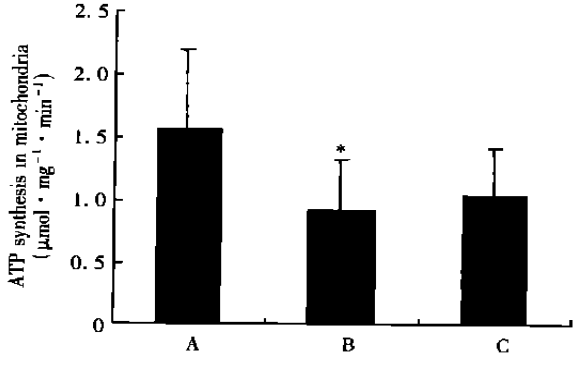
Tab 1　Effects of hypoxic exposure on total adenylate pool, ratio of ATP to total adenylate pool and energy charge in mitochondria from rat brain($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Total adenylate pool (nmol/mg)	ATP/ total adenylate pool	Energy charge
Control	7	1.305±0.512	0.285±0.134	0.385±0.127
Acute hypoxia	7	1.021±0.331	0.117±0.095 **	0.309±0.104
Chronic hypoxia	6	1.597±0.318△	0.121±0.058 *	0.318±0.063

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$ *vs* acute hypoxia

2.2　缺氧暴露大鼠脑线粒体 ATP 合成能力的改变

缺氧可显著降低大鼠脑线粒体内 ATP 的含量, 这与缺氧使线粒体 ATP 的合成能力降低有关。在以琥珀酸为氧化底物的反应体系中, 急性缺氧暴露使线粒体的 ATP 生成速率降低 41.8%($P<0.05$), 而慢性缺氧则使其有所回升, 虽未完全达到对照水平, 但与对照已无差异($P>0.05$), 见图 2。



A: Control; B: Acute hypoxia group; C: Chronic hypoxia group; *: $P<0.05$ *vs* A

图 2　线粒体 ATP 合成能力

Fig 2　Changes of ATP synthetic ability in isolated mitochondria *in vitro* from rat brain exposed to hypoxia

3　讨论

脑组织对缺氧极为敏感, 急性缺氧尤其是高原缺氧可引起中枢神经系统功能紊乱, 导致高原反应和高原昏迷(高原脑水肿)。目前认为, 高原脑水肿在病理上是血管源性和细胞中毒性脑水肿的混合, 因而在发病机制上除了缺氧引起脑血管扩张、脑血流增加和血管通透性增强、血浆外渗导致颅内压增高外, 脑细胞能量代谢障碍、ATP 生成不足、"钠泵"失灵, 从而引起神经细胞、神经胶质细胞、血管内皮细胞等脑组织细胞的广泛水肿也是其主要原因之一[6]。而缺氧时线粒体功能障碍却是中枢神经系统损伤的重要机制[7], 因此脑组织能量代谢障碍在缺氧性脑功能紊乱中占重要地位。另外, 机体在经历长期缺氧环境暴露后, 从各器官系统到组织、细胞均可逐步产生适应机制, 而"线粒体适应"(Mitochondria adaptation)又是机体对长期高原缺氧暴露后在组织与细胞水平上所产生的重要适应机制[8,9]。ATP 是细胞生命活动可以直接利用的能源。线粒体内的 ATP 主要靠氧化磷酸化产生, 因而线粒体内的腺苷酸库(Adenylate pool, ATP、ADP、AMP)的大小不仅反映了线粒体的氧化呼吸活性和生成高能磷酸化合物的能力, 同时也反映了细胞的能量储备状态。缺氧暴露可降低线粒体的氧化呼吸功能, 从而影响细胞的能量供应。模拟海拔 5 000 m 高原缺氧 14 d 的大鼠左心室肌线粒体氧耗和 ATP 合成明显降低[10]; 低压(46 663 Pa)缺氧 4 周的大鼠心肌细胞内 ATP、ATP/ADP 比值、磷酸肌酸含量显著降低, ATP 的合成减少, 高 ADP 时的线粒体呼吸偶联降低[11]。但这些实验所观察的仅仅是组织中的腺苷酸含量, 受细胞利用的影响, 不能直接反映线粒体的能量储备功能。本实验结果显示, 模拟海拔 4 000 m 高原急性缺氧 3 d 的大鼠, 虽然脑线粒体内总腺苷酸库以及能荷没有明显改变, 但 ATP 含量降低 65.1%, 致使 ATP 在总腺苷酸中的比例降低, 仅为对照的 41.5%, 使得急性缺氧暴露时线粒体内的腺苷酸储备严重降低, 这无疑会影响诸如离子泵等细胞的功能活动, 从而导致细胞中毒性水肿, 是引起脑功能紊乱的重要原因。能荷也是细胞能量状态的指标, 反映高能磷酸键在 ATP、ADP、AMP 之间的相互转换, 急性和慢性缺氧暴露虽使线粒体内能荷值有降低趋势, 但无显著差异, 可能 ATP 的减少与 ADP、AMP 的相对增高有关, 表明可供细胞直接利用的高能化合物减少。

影响线粒体内 ATP 含量的因素包括来源与去路两个方面。线粒体内 ATP 的来源就是通过氧化磷酸化产生, 而去路则有以下几个途径: ① 通过线粒体膜上的特殊转运载体(腺苷酸转运体, ANT)转出线粒体, 进入细胞的其它部位供细胞生命活动利用, 这是主要途径; ②留在线粒体内供其自身内部的需要, 包括核酸

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

(mtDNA 和 mtRNA)、蛋白质等生物大分子的合成、物质进出线粒体的转运耗能和内部的化学反应过程等;③转变成磷酸肌酸和其它三磷酸核苷等高能磷酸化合物。本实验显示,急性缺氧暴露可使线粒体ATP生成速率降低41.8%,表明合成减少是缺氧时线粒体内ATP降低的主要原因。但ATP含量却降低65.1%,其降低的程度显然大于合成降低的程度,造成这种差异可能与缺氧时上述ATP的利用、转运及转换为其它高能磷酸化合物(如磷酸肌酸)等因素有关。

机体经慢性缺氧暴露后逐步产生对缺氧的耐受,这是机体对低氧环境逐步适应(习服)的结果。通过对高原世居者和移居者的比较研究证实,移居者主要靠器官系统的功能性代偿适应,而世居者则更多地依靠组织和细胞的代谢适应,具体反映在线粒体的功能上,使其产能效率和氧的利用效率增高,称之为"线粒体适应"(Mitochondrial adaptation)[8,12]。本实验表明,大鼠经模拟高原低压缺氧暴露40 d后,脑线粒体的ATP合成能力、总腺苷酸库的含量已与对照组无显著差异,而且显著高于急性缺氧组;而ATP含量虽低于对照组,但与急性缺氧比较显著增高,已由急性缺氧时对照的34.9%上升至66.5%。结果说明,慢性缺氧虽不能使线粒体内的能量储备完全恢复至平原对照,但可以部分恢复,从而使细胞的能量状态得到改善,这种缺氧时线粒体能量代谢改变的特性,正是机体对缺氧适应的重要机制之一。Green等[13]在对攀登Denali山(海拔6 194 m)的5名登山运动员研究发现,经过21 d的高原习服返回平原后,虽然静息时骨骼肌收缩细胞腺苷酸和磷酸肌酸含量没有显著变化,但运动后与习服前运动相比,磷酸肌酸含量却不降低,肌肉中乳酸的含量也不升高,提示高原习服明显改善了骨骼肌细胞的能量状态。

参考文献:

[1] 柳君泽,高文祥,罗德成,等.缺氧大鼠脑线粒体的能量合成特点[J].第三军医大学学报,1998,20(6):540.

[2] Turcotte M L, Parliament M, Franko A, *et al*. Variation in mitochondrial function in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant human glioma cells[J]. Br J Cancer, 2002,86(4):619—624.

[3] Clark J B, Nicklas W J. The metabolism of rat brain mitochondria[J]. J Biol Chem, 1970,245:4724—4731.

[4] Shofer S L, Tjeerdema R S. Effects of hypoxia and toxicant exposure on adenylate energy charge and cytosolic ADP concentrations in abalone[J]. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1998,119(1):51—57.

[5] Tatuch Y, Robinson B H. The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NAPP shows the ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993,192(1):124—128.

[6] 吕永达.高原医学与生理学[M].天津:天津科技翻译出版社,1995.349—356.

[7] Dimauro S, Simonetti S, Chen X, *et al*. Mitochondrial dysfunction as a mechanism of CSN injury[J]. Res Publ Assoc Res Nerv Dis, 1993,71:67—79.

[8] 吴天一.高原医学的黄金时代——从第二届世界高原医学及生理学大会看当前高原医学进展[J].高原医学杂志,1997,7(2):1—7.

[9] 香山科学会议.科学前言与未来(第六集)[M].北京:中国环境科学出版社,2002.80—89.

[10] Nouette G K, Forestier F, Marthan R, *et al*. Effects of bupivacaine on mitochondrial energy metabolism in heart of rats following exposure to chronic hypoxia[J]. Anesthesiology, 2002,97(6):1507—1511.

[11] Thurich T, Bereiter H J, Schneider M, *et al*. Hemodynamics and mitochondrial energy metabolism in right heart hypertrophy after acute hypoxic stress[J]. Arzneimittelforschung, 1999,49(3):212—220.

[12] 吴天一.高原人类群体研究及其重要性[J].高原医学杂志,2000,10(3):56—61.

[13] Green H, Roy B, Grant S, *et al*. Human skeletal muscle exercise metabolism following an expedition to mount denali[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000,279(5):R1872—1879.

(编辑 郭建秀)

欢迎订阅《第三军医大学学报》

《第三军医大学学报》为国内外公开发行的综合性医药卫生类学术刊物。1979年创刊以来,先后被确定为《中国科技论文统计源期刊》和"中国临床医学类核心期刊"、"中国特种医学类核心期刊"、"中国综合性医药卫生类核心期刊"、"中国生物医学核心期刊";并被《中国科学技术期刊文摘》、《中国生物学文摘》、《中国医学文摘》、《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国科学引文数据库》、《万方数据库》、《俄罗斯文摘杂志(AJ)》和《美国化学文摘(CA)》等国内外20余家重要数据库和权威性文摘期刊所收录。本刊为半月刊,版本采用国际标准大16开本(210 mm×297 mm),国内统一刊号:CN51—1095/R,国际标准刊号:ISSN 1000—5404,国内邮发代号:78—91,国外邮发代号:M6529。

本刊登载校内外广大医疗、教学、科研工作者在医药科研领域中所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法。主要栏目设有:专家论坛、基础医学、临床医学、军事医学、预防医学、综述、技术方法、科研简报、经验与短篇、个案报道等。

地 址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部 邮 编:400038

联系人:王 红 电 话:(023)68752187,68752189

网 址:http://dsjydxxb.periodicals.com.cn E-mail:aammt@mail.tmmu.com.cn

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