DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.032
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1320 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1320-03

论著

不同氧浓度下大鼠肝细胞有氧代谢酶CCO、PDH、KGDH活性的实验研究

马正伟,汪仕良,王凤君,王 裴 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察缺氧对肝脏实质细胞糖有氧氧化的影响。方法 利用体外培养的肝细胞缺氧模型,模拟创伤后的缺血、缺氧状态,以正常培养的大鼠肝细胞为对照,采用生物化学的方法,分析不同氧浓度及缺氧时间下肝细胞有氧氧化关键酶活性的变化,并测定了细胞内ATP含量的变化。结果 与正常对照组相比,缺氧肝细胞内丙酮酸脱氢酶(PDH)、α-酮戊二酸脱氢酶(KGDH)、细胞色素C氧化酶(CCO)活性在缺氧培养1 h即显著降低,并持续到16 h;缺氧时肝细胞内ATP含量随时间延长而下降,4 h达到最低。结论 缺氧后肝细胞有氧氧化及细胞内ATP的产生严重受抑。

关键词:创伤;肝细胞;有氧氧化;ATP
中图法分类号:R-332;R322.47;R345.4 文献标识码:A

Changes of activities of CCO, PDH, KGDH in aerobic metabolism in rat BRL cells after hypoxia

MA Zheng-wei, WANG Shi-liang, WANG Feng-jun, WANG Pei (Institute of Burn Research PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of hypoxia caused by trauma on glucose aerobic metabolism in cultured rat liver cells. Methods Cells were exposed to different concentrations of oxygen to simulate hypoxic state after trauma, and then the activities of enzymes related to glucose aerobic metabolism in hepatocytes were determined. Hepatocytes cultured under normal condition were used as normal control. Results Compared with those of the normal control group, the activities of PDH, KGDH, CCO were significantly lower under different hypoxic conditions, especially in 1% O_2 group. Conclusion Glucose aerobic metabolism and production of ATP are inhibited by hypoxia.

Key words: trauma; hepatocyte; aerobic oxidation; ATP

分子氧主要参与生物有机体的氧化还原反应,作为线粒体产生能量的终末电子受体发挥作用。葡萄糖经有氧氧化或无氧酵解产生的ATP是许多哺乳动物细胞的主要能源。缺血缺氧是严重创伤所致的主要病理生理改变之一,因此研究创伤所致的缺血缺氧对机体实质细胞的糖代谢,特别是糖有氧氧化的影响将不仅可了解创伤后细胞葡萄糖的分解代谢的改变,并有助于了解创伤后细胞能量代谢的变化及其发生的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和培养 大鼠肝细胞株BRL购自中科院上海细胞库,采用含10%小牛血清的1640培养液,于5%CO_2孵箱中37 ℃进行培养,细胞生长融合为单层后可用于实验。配制1% O_2、5%CO_2、94% N_2(A组);7.5% O_2、5% CO_2、87.5% N_2(B组);15%O_2、5%CO_2、80%N_2(C组)3种不同氧浓度的混合气体,作为缺氧细胞的生长环境,模拟创伤后的体内缺氧状况,以正常生长的细胞作为对照(O_2浓度为21%)。观察不同氧浓度及缺氧时间下细胞有氧氧化关键酶活性的改变。所设的时相点有1、2、4、8、16 h。

1.1.2 试剂 硫胺素焦磷酸(TPP)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)、丙酮酸钠、α-酮戊二酸、N, N, N', N'-四甲基对苯二胺(TMPD)、细胞色素C(cytochrome C)、辅酶A购自Sigma公司;NAD、抗坏血酸、2, 4-二硝基苯肼购自Ameresco公司。

1.2 观察的指标及方法

1.2.1 细胞的裂解 分别于各时相点以胰酶消化、离心收集细胞,加入细胞裂解液,重新悬浮细胞,冰浴15 min,12 000 r/min 4 ℃离心30 min,取上清进行酶活性的测定。

1.2.2 丙酮酸脱氢酶(Pyruvate dehydro genase, PDH)活性的测定[1] 在TPP、CoA、NAD存在的条件下,丙酮酸被PDH催化生成乙酰CoA,NAD接受H,生成NADH,通过测定25 ℃时NADH在340 nm处吸光度的增加值来反映酶的活力。酶活力单位:25 ℃,每分钟生成1 μmol NADH为一个酶活力单位。

1.2.3 α-酮戊二酸脱氢酶(α-ketoglutarate dehydro genase, KGDH)活性的测定[1] 在TPP、CoA、NAD存在的条件下,α-酮戊二酸被KGDHC催化生成乙酰CoA,NAD接受H,生成NADH,通过测定25 ℃时NADH在340 nm处吸光度的变化来测定酶的活力。酶的一个活力单位定义为1 min内由NAD形成1 μmol NADH。1 mU为一分钟内由NAD形成1 nmol NADH。

1.2.4 细胞色素C氧化酶(Cytochrome C oxidase, CCO)活性的测定 参照Burke等[2,3]的方法,在25 mmol/L pH 7.8 Tris-HAc的缓冲液中进行,反应总体积为2.5 ml,加入0.7 mmol/L N, N, N', N'-四甲基对苯二胺(TMPD)和抗坏血酸7 mg以及细胞色素C 5 μmol/L作为电子供体。TMPD可以非酶性还原细胞色素C,抗坏血酸用来还原TMPD,当以TMPD作为底物时,氧的摄取速率反映了细胞色素C氧化酶活性的改变。

1.2.5 ATP含量的测定 采用高效液相色谱法[4],仪器为Gilson高效液相色谱仪,分析柱为SephrisorbC18 250 4.6 mm,流动相为50 mmol/L pH 6.5的PB,检测器为UV 260。柱速0.8

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202)
作者简介:马正伟(1972—),女,山西省山阴县人,博士,助理研究员,主要从事代谢与营养方面的研究,现在全军肝胆外科研究所工作。电话:(023)68754655
收稿日期:2001-08-28;修回日期:2002-03-27

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

ml/min, 进样量为 20 μl。分析时间 20 min。数据处理 Gilson Model621 Data Master。单位以 $\mu g/10^6$ cells 表示。

1.3 统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 8.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同氧浓度及缺氧时间对培养细胞 PDH 活性的影响

当肝细胞在 3 种 O_2 浓度下生长时, PDH 活性下降, 与正常对照组相比, 各时相点 PDH 活性均显著低于正常对照组, 8 h 活性最低。各时相点下 PDH 活性均在 1% O_2 浓度组的最低, 15% O_2 浓度组最高, 但各组间的差异无统计学意义, 见表 1。

表 1　不同氧浓度下大鼠肝细胞 PDH 活性的变化(U/g $n=6$ $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of activity of PDH in rat BRL cells

(U/g $n=6$ $\bar{x}\pm s$)

Group	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h
A	34.64±5.82	18.17±4.30 *	14.79±8.25 *	15.37±4.72 *	14.32±4.96 *	18.13±2.97 *
B	34.64±5.82	22.29±4.53 *	17.53±4.27 *	18.92±4.35 *	18.27±5.16 *	21.10±7.93 *
C	34.64±5.82	22.55±7.84 *	17.97±3.15 *	20.52±5.94 *	18.50±4.56 *	25.09±7.21 *

*: $P<0.05$ *vs* normal control(0 h)

2.2 不同氧浓度及缺氧时间对培养肝细胞 KGDH 活性的影响

3 种 O_2 浓度下, 肝细胞的 KGDH 活性下降, 各时相点 KGDH 活性均显著低于正常对照组, 8 h 活性最低。KGDH 随时间的变化规律与 PDH 一致。除了 4 h 组外, 其余各时相点下 1% O_2 组 KGDH 活性均显著低于 15% O_2 组, 表明缺氧可抑制细胞 KGDH 活性, 以 1% O_2 浓度组的作用更为明显, 见表 2。

表 2　不同氧浓度下大鼠肝细胞 KGDH 活性的变化(U/g, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of activity of KGDH in rat BRL cells

(U/g, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h
A	58.07±5.22	27.24±2.52 *	18.67±4.60 *	21.17±5.09 *	10.08±1.75 *	15.31±1.40 *
B	58.07±5.22	24.28±1.84 *	21.54±2.09 *	25.24±2.97 *	14.05±2.02△	19.17±1.37 *△
C	58.07±5.22	40.24±9.53 *△#	36.17±1.38 *△#	23.20±3.13 *△	16.25±1.55 *△	19.98±1.93 *△

*: $P<0.05$ *vs* normal control(0 h); △: $P<0.05$ *vs* A; #: $P<0.05$ *vs* B

2.3 不同氧浓度及缺氧时间对培养细胞 CCO 活性的影响

当肝细胞在 3 种 O_2 浓度下培养时, CCO 活性下降, 各时相点活性均显著低于正常对照组。3 种氧浓度下, CCO 活性均在 1 h 开始下降, 4 h 达到最低, 8 h 后又有所回升。除了 CCO 活性在 1% O_2 组和 7.5% O_2 组在 1 h 没有差异外, 其余各时相点下 CCO 活性均在 1% O_2 组最低, 15%组最高, 7.5% O_2 组居中, 并且具有显著性差异。表明缺氧可显著抑制细胞 CCO 活性, 1% O_2 浓度组作用更为明显, 见表 3。

表 3　不同氧浓度下大鼠肝细胞 CCO 活性的变化(U/g, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of activity of CCO in rat BRL cells

(U/g, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h
A	63.32±6.90	48.69±3.26 *	34.16±2.30 *	19.61±2.15 *	24.58±2.63 *	26.72±1.06 *
B	63.32±6.90	47.54±3.45 *	42.03±3.24 *△	33.02±3.11 *△	35.04±2.85 *△	38.30±3.98 *△
C	63.32±6.90	57.17±4.77 *△#	53.99±4.54 *△#	50.11±5.51 *△#	42.95±6.52 *△#	44.39±5.06 *△#

*: $P<0.05$ *vs* normal control(0 h); △: $P<0.05$ *vs* A; #: $P<0.05$ *vs* B

2.4 缺氧对培养肝细胞内 ATP 含量的影响

当肝细胞在缺氧条件下培养时, 3 种氧浓度下, 细胞内 ATP 的含量下降, 在缺氧 1 h 时即显著低于正常对照组。细胞内 ATP 含量均随缺氧时间的延长逐步降低, 4 h 时达到最低, 以后逐渐增加, 至 16 h 仍未能完全达到正常水平, 其中 15% O_2 浓度组 ATP 水平接近正常对照。缺氧对细胞 ATP 含量的影响在 1% O_2 浓度组最为明显, 见表 4。

表 4　不同氧浓度下大鼠肝细胞 ATP 含量的变化($\mu g/10^6$ cells, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effects of hypoxia on cellular ATP content in hepatocytes

($\mu g/10^6$ cells, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h
A	12.74±0.43	4.80±0.20 *	2.28±0.89 *	1.94±0.69 *	3.71±0.34 *	5.07±1.50 *
B	12.74±0.43	9.22±0.34 *△	4.57±0.87 *△	3.67±0.42 *	4.66±0.24 *	7.14±0.28 *△
C	12.74±0.43	6.79±0.14 *△#	6.33±2.80 *△#	3.07±0.50 *△	6.34±0.92 *△#	9.54±0.86 *△#

*: $P<0.05$ *vs* normal control(0 h); △: $P<0.05$ *vs* A; #: $P<0.05$ *vs* B

3 讨论

一般情况下, 细胞主要依靠有氧氧化和线粒体的氧化磷酸化产生 ATP, 作为细胞生存和各种功能活动的能源。氧作为线粒体终末电子受体在氧化磷酸化产生 ATP 的过程中起重要作用。本研究发现三种氧浓度下, 细胞 PDH、KGDH、CCO 活性均明显受到抑制, 即使是缺氧程度最轻的 15% O_2 组在培养 1 h 时 3 种酶的活性已显著低于正常对照组, 提示 PDH、KGDH、CCO 对缺氧极为敏感。

CCO 是终末电子传递体, 其作用是催化还原性的细胞色素 C 将电子传递给氧, 使作为终末电子受体的氧彻底还原生成水。以往的研究及本实验均证实了缺氧本身可导致细胞色素氧化酶活性的下降。肝细胞在 20 mmHg 的 PO_2 下孵育 3 ~ 5 h, 表现出可逆的呼吸抑制, 同时伴随[NAD(P)H] 的增高; 相似地, 缺氧孵育的肝脏 CCO V_{max} 下降了 44%; 分离的牛心细胞色素 C 氧化酶在相似的条件下孵育, CCO 的 V_{max} 经历了可逆的降低[5]。缺氧导致 CCO 的改变提示缺氧可通过降低细胞色素 C 氧化酶的 V_{max} 而抑制其活性, 与呼吸链的抑制有关。大鼠吸入氧从 15%下降至 4%的过程中, 当氧浓度降低至 10%以下时, 肝脏细胞色素氧化酶的含量显著降低, 随氧浓度的下降而下降[6]。另有研究表明缺氧还可以减少酵母细胞中细胞色素 C 氧化酶的基因表达[2,3]。这些均提示缺氧可以在不同水平影响 CCO 的活性。

丙酮酸转化为乳酸或乙酰 CoA 决定了糖的分解代谢向无氧酵解或有氧氧化的方向进行, 因此这是糖代谢的一个十字路口。本研究表明缺氧本身可抑制肝细胞内 PDH 的活性, 抑制丙酮酸的氧化, 并且 PDH 活性有随氧浓度的降低而降低的趋势。PDH 活性的这种改变与缺氧时细胞氧化磷酸化受到抑制, 导致三羧酸循环中间代谢产物堆积引发的抑制效应有关。$NADH/NAD^+$、乙酰 CoA/CoA 比值增高反馈抑制了 PDH 的活性; 同时乙酰 CoA/CoA、$NADH/NAD^+$ 比值增加时, 可激活 PDH 激酶而使 PDH 磷酸化转变为无活性形式。尽管本研究并未测定缺氧条件下肝细胞内 NADH、NAD^+、乙酰 CoA、CoA 含量的变化, 但有研究表明 95% N_2/5% CO_2 条件下培养的肝细胞 $NADH/NAD^+$ 比值显著增高, 并且发生于质膜破损之前[7]; 缺氧肝脏的 NADH 的荧光密度进行性降低[8], 这些均提

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

示本实验观察到的缺氧肝细胞内 PDH 活性的变化可能是这些调节物作用所致。

本研究结果表明缺氧肝细胞内 KGDH 活性下降，并在整个实验期中均保持较低的水平。KGDH 是三羧酸循环的关键酶，不受磷酸化和去磷酸的调节，但 ATP 能抑制其活性。关于缺氧导致 KGDH 活性抑制的确切机制目前尚不清楚。

由此可见，当肝细胞在缺氧调节下培养时，其有氧氧化关键酶均显著受到抑制，表明缺氧可抑制细胞的有氧氧化。此外，Levy 等[9]用差异显示法发现缺氧时骨骼肌和心肌细胞内核编码的 F1F0-ATP 合成酶的亚基（亚基 e）的基因表达在翻译前水平（即 mRNA）被下调，进一步证实了缺氧可下调与 ATP 合成有关的酶基因的表达。缺氧条件下细胞内 ATP 含量的下降可能是缺氧对线粒体内与 ATP 合成有关酶的活性协同调节的结果。

参考文献：

[1] Lai J C, Cooper A J. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors[J]. J Neurochem, 1986, 47(5): 1 376—1 386.

[2] Burke P V, Raitt D C, Allen L A, *et al*. Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast[J]. J Biol Chem, 1997, 272(23): 14 705—14 712.

[3] Poyton R O, Burke P V. Oxygen regulated transcription of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1 101(2): 252—256.

[4] Schweinsberg P D, Loo T L. Simultaneous analysis of ATP, ADP, AMP, and other purines in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1980, 181: 103—107.

[5] Chandel N S, Budinger G R, Choe S H, *et al*. Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes[J]. J Biol Chem, 1997, 272(30): 18 808—18 816.

[6] Seifalian A M, El-Desoky H, Delpy D T, *et al*. Effect of graded hypoxia on the rat hepatic tissue oxygenation and energy metabolism monitored by near-infrared and 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. FASEB J, 2001, 15(14): 2 642—2 648.

[7] Khan S, O' Brien P J. Modulating hypoxia-induced hepatocyte injury by affecting intracellular redox state[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1 269(2): 153—156.

[8] Stidwill R P, Rosser D M, Singer M. Cardiorespiratory, tissue oxygen and hepatic NADH responses to graded hypoxia[J]. Intensive Care Med, 1998, 24(11): 1 209—1 216.

[9] Levy F H, Kelly D P. Regulation of ATP synthase subunit e gene expression by hypoxia: cell differentiation stage-specific control[J]. Am J Physiol, 1997, 272(2 Pt 1): C457—C465.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)11-1322-02

T-C 糊剂治疗弯曲根管的临床效果观察

Clinical effects of mixed paste of Tinidazole and Cafalexin on meandering root canal therapy

王彦清，游古莲 （第三军医大学附属新桥医院口腔科，重庆 400037）

作者采用根尖部少量塑化液置入法加替硝唑（Tinidazole）头孢氨苄素（Cafalexin）糊剂（简称 T-C 糊剂[1]），进行弯曲根管的根管充填治疗，收到良好的效果。

1 临床资料

1.1 一般资料

门诊收治 153 例患者 174 根管弯曲牙。男 85 例，女 68 例，年龄 19～72 岁，病例包括冠折 43 牙，牙髓炎 34 牙，尖周炎 69 牙，牙周牙髓综合症 28 牙。其中前牙 142 牙，双尖牙 32 牙，经 X 线证实所有患牙均系根管弯曲，根尖部弯曲≤1/3 者 126 牙，1/3～1/2 者 31 牙，≥2/3 者 17 牙。

1.2 材料与方法

1.2.1 材料 塑化液 1 份，常用根管锉及根管充填器械。根管糊剂：替硝唑 6 份，头孢氨苄素 4 份，研磨成粉，分别置于消毒瓶内，用适量丁香油液，调成糊剂现配现用。

1.2.2 方法 常规开髓去尽冠髓和根髓，扩根，根管预备，反复用 0.9%生理盐水、0.9%甲硝唑液、3%双氧水反复交替冲洗根管后，引流、封药，在患者无痛的情况下，根尖部置少量塑化液，待 3～4 min 塑化液凝固后，重新扩挫根管上部，吹干，进行 T-C 糊剂根管充填后行永久充填。

1.3 疗效评估标准

（1）治愈：患牙无不适，功能正常，X 线片示尖周病变愈合；（2）改善：患牙无不适，叩痛轻微，X 线片示根尖阴影缩小 1/2 以上；（3）无效：患牙仍有自觉症状及叩痛，或牙龈肿胀和原有瘘管未愈，X 线片示根尖阴影不见缩小。

2 结果

经 3 年随诊观察 154 例 174 牙，痊愈 148 牙，有效 14 牙，无效 12 牙，总有效率 93.1%，见表 1。

（下转 1324 页）

作者简介：王彦清（1980—），男，辽宁省抚顺市人，医师，主要从事口腔内科方面的研究，现在辽宁省新宾县人民医院口腔科工作，新宾 113200。电话：(0413)5030558

收稿日期：2001-09-15；修回日期：2001-12-27

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