DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.020

缺氧大鼠心肌线粒体呼吸功能、ATP含量的变化

罗 刚* 张国斌 谢增柱 刘福玉 (第三军医大学基础部高原医学研究室)重庆, 630038

提 要 目的:探讨缺氧大鼠心肌线粒体呼吸功能和心肌能量代谢的变化。方法:通过 Clark氧电极法和生化方法测定线粒体功能和 FoF_1-ATP酶活力,运用高效液相色谱技术(HPLC)测定心肌组织 ATP含量。结果:急性缺氧大鼠心肌线粒体呼吸功能, FoF_1-ATP酶活力以及 1-苯胺基, 8-萘磺酸镁(ANS)相对荧光强度明显降低($P<0.01$),表明: FoF_1-ATP酶构象发生改变。心肌组织 ATP含量明显减少($P<0.01$)。慢性缺氧上述指标不同程度有所恢复,但仍明显低于平原水平。经相关分析表明: ATP含量与线粒体呼吸控制率(RCR), FoF_1-ATP酶活力及 PaO_2呈明显正相关($P<0.01$)。结论:急性缺氧动物心肌能量代谢障碍可能与心肌线粒体呼吸功能降低, FoF_1-ATP酶活力降低有关系。慢性缺氧后能量代谢的改善,可能是缺氧适应的机理之一。

关键词 缺氧;大鼠;线粒体,心脏; FoF_1-ATP酶活力; ATP含量
中图法分类号 329.24

线粒体作为细胞呼吸和氧化磷酸化的重要场所,在维持心肌细胞正常的能量代谢方面具有重要作用。国外资料表明:急性缺氧可引起心肌线粒体呼吸酶活性改变,但结果十分矛盾,且缺乏系统研究[1,2]。慢性缺氧时心肌线粒体功能及 ATP含量的变化,国外研究不多,国内尚未见报道。我们观察急性和慢性间断缺氧大鼠心肌线粒体呼吸功能, FoF_1-ATP酶活性以及 ATP含量的改变,试图了解缺氧过程中心肌线粒体能量代谢的变化情况,为进一步研究高原适应机理提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

Wistar大鼠 30只,体重 220 g~ 280 g,随机分为:① 平原对照组(Control, $n=10$);② 急性缺氧组(AH, $n=10$):模拟海拔 4000 m高原停留 72 h;③ 慢性缺氧组(CH, $n=10$):模拟海拔 4000 m高原停留 4周,每天 8 h。

1.2 血流动力学指标测定

大鼠麻醉固定后,进行右心室和主动脉插管,连接八导生理记录仪(日本岛津)记录右心室收缩压(RVSP)。采血用 ABL-3(丹麦)血气分析仪作血气分析。然后开胸取心尖部约 0.2 g组织放入液氮,测 ATP含量,余下部分用于线粒体分离。平原组在平原,其它各组动物在低压舱内模拟 4000 m条件下测定生理参数及采集标本。

1.3 线粒体分离及呼吸功能测定

线粒体分离参考 Mariusz等[3]方法。呼吸功能测定采用 Poderoso等[4]方法,底物为苹果酸钠和谷氨酸钠。

1.4 FoF_1-ATP酶活力及 1-苯胺基, 8-萘磺酸镁(ANS)荧光强度测定

参照毛中兴等[5]方法略加改进。反应总体积为 500μl,样本加入量为 25μl,酶活性单位以 μmol P. mg^{-1} pro. min^{-1}表示。

1.5 心肌组织腺嘌呤核苷酸测定[6]

色谱条件: Gilson系列高效液相色谱仪, UV检测器。检测波长: 254 nm,灵敏度 0.01 AUFS。色谱柱: 4.6 mm× 250 mm, YWG-DOGC$_{18}$ 10μm,流动相 2 mmol PBS(pH 5.5),样加入量 20μl。采用恒速洗脱。

1.6 结果统计

所有数据经方差分析和 FLSD检验,部分数据经相关分析,结果以 $\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 血气参数及右室收缩压的改变

缺氧引起 PaO_2, $PaCO_2$显著下降($P<0.01$), RVSP明显升高($P<0.01$),见表 1。

表 1 各组大鼠血气参数及右心室收缩压的改变

Tab 1 Changes of blood gas parameters and RVSP in different group

Group	n	PaO_2(ρ/kPa)	$PaCO_2$(ρ/kPa)	pH	RVSP(ρ/kPa)
Control	10	14.63± 1.88	4.35± 0.14	7.39± 0.04	3.54± 0.24
AH	10	7.15± 1.37*	3.24± 0.27*	7.41± 0.02	5.55± 0.32*
CH	10	7.09± 1.86*	3.38± 0.35*	7.38± 0.03	7.39± 0.35*#

*: $P<0.01$ *vs* control;#: $P<0.01$ CH*vs* AH

* 罗 刚,男, 29岁,讲师,硕士

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

2.2 心肌线粒体呼吸功能的改变

急性缺氧大鼠心肌线粒体Ⅲ态呼吸(ST_3),呼吸控制率(RCR),ADP/O明显降低,Ⅳ态呼吸(ST_4)明显升高,慢性缺氧时 ST_3, RCR有所恢复,但 ST_4仍高于平原水平,见表2

表2　各组大鼠心肌线粒体呼吸功能的改变

Tab 2　Changes of myocardial mitochondrial respiratory functions in different group during hypoxia

Group	n	ST_3 (nanoatoms oxygen· mg^{-1}· min^{-1})	$2ST_4$ (nanoatoms oxygen· mg^{-1}· min^{-1})	PCR	ADP/O
Control	10	332.91± 16.98	60.95± 8.31	5.36± 0.41	2.83± 0.17
AH	10	261.55± 21.01	126.88± 5.85*	2.06± 0.60*	2.20± 0.16*
CH	10	264.80± 17.37	81.03± 6.44*#	3.26± 0.67*#	2.40± 0.11*

*: $P < 0.01$ *vs* control,#: $P < 0.01$ C.H *vs* AH

2.3 心肌线粒体 FoF_1-ATP酶构象发生改变

急性缺氧引起大鼠心肌线粒体 FoF_1-ATP酶活力及 ANS荧光张度明显降低,表明:急性缺氧时 FoF_1-ATP使构象发生改变.慢性缺氧虽有所恢复但仍明显低于正常水平,见表3

表3　各组大鼠心肌线粒体 FoF_1-ATP酶及 ANS荧光强度的改变

Tab 3　Changes of myocardial mitochondrial FoF_1-ATPase activity and ANS fluroescense intensity in different group

Group	n	FoF_1-ATPase (μmol pi· mg^{-1}· min^{-1})	ANS fluroescense intensity (relative unit)
Control	10	7.17± 0.27	54.50± 1.31
AH	10	4.28± 0.18*	41.85± 1.86*
CH	10	5.42± 0.23*#	44.69± 1.01*#

*: $P < 0.01$ *vs* control;#: $P < 0.01$ CH *vs* AH

2.4 心肌组织腺嘌呤核苷酸的变化

急性缺氧大鼠心肌组织 ATP含量明显降低,ADP, AMP含量明显升高.慢性缺氧虽有所恢复,但 ATP仍低于平原对照,见表4

表4　各组大鼠心肌组织 ATP, ADP和 AMP含量的改变

Tab 4　Changes of rat myocardium ATP, ADP and AMP contents in different group

Group	n	ATP(μmol/mg)	ADP(μmol/mg)	AMP(μmol/mg)
Control	10	71.34± 5.17	93.24± 9.01	14.00± 3.27
AH	10	34.66± 3.56*	115.33± 5.86*	19.88± 2.87*
CH	10	41.45± 4.49*#	106.97± 10.10*#	18.99± 1.97*

*: $P < 0.01$ *vs* control;#: $P < 0.01$ CH *vs* AH

2.5 各指标间相关分析

心肌线粒体 RCR, FoF_1-ATP酶活力及 PaO_2分别与心肌组织 ATP含量呈正相关。RCR: $r = 0.9770$, $P < 0.01$; FoF_1-ATP酶: $r = 0.9694$, $P < 0.01$; PaO_2: $r = 0.9771$, $P < 0.01$

3 讨论

心肌内高能化合物 ATP在维持心肌收缩和细胞内外离子的恒定方面具有重要作用.目前国外只有少数学者探讨高原低氧动物心肌 ATP和 CP含量的变化[7]。而慢性缺氧动物 ATP含量的变化,国内尚未见报道.我们的研究发现:急性缺氧大鼠心肌 ATP含量明显下降.而慢性缺氧组虽有所恢复,但仍未达到正常水平。

有关急性缺氧时心肌 ATP下降的机理可能和 ATP生成减少或利用增多有关。线粒体是细胞呼吸的主要场所,现有资料表明:急性缺氧动物心肌线粒体呼吸功能可以增高,不变或降低[1,8]。所得矛盾结果的原因可能和动物种属的不同,缺氧严重程度以及实验条件件的差异有关. FoF_1-ATP酶位于线粒体内膜,是 ATP合成的关键酶,有关缺氧动物该酶的变化还未见报道.在实验中我们运用1-苯胺基,8-萘磺酸镁(ANS)荧光探针和 FoF_1-ATP酶特异结合,通过观察其荧光强度的变化来判定该酶构象与氧化磷酸化程度的改变,并测定其活性。同时观察线粒体呼吸功能的变化。结果发现:急性减压缺氧3 d大鼠心肌线粒体,以苹果酸和谷氨酸为底物的 ST_3显著下降, ST_4明显升高, RCR, ADP/O降低,而 FoF_1-ATP酶活性及 ANS荧光强度也显著下降,表明该酶构象发生了改变.经相关分析发现: ATP含量分别与 RCR, FoF_1-ATP酶活力以及 PaO_2呈正相关。以上结果提示:急性缺氧一方面可引起动物 PaO_2降低,导致 NADH氧化呼吸链障碍和苹果酸穿梭系统受抑制,呼吸链电子传递障碍,因而影响线粒体呼吸功能.另一方面,急性缺氧时 FoF_1-ATP酶构象发生改变也可影响该酶活性.因此,线粒体呼吸功能和 FoF_1-ATP酶活力的降低可能是引起急性缺氧动物 ATP生成减少, ATP含量降低的重要原因之一。

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

慢性缺氧动物心肌线粒体呼吸功能及 ATP含量的改变,目前国外研究尚少,国内外还未见报道 我们在实验中注意到: 慢性缺氧动物心肌线粒体 ST_3增加不甚明显,但 ST_4显著降低, RCR, ADP/O 虽有所回升,但仍低于平原对照,与 Costa 等[9]报道类似 而 FoF_1-ATP酶活力及 ANS荧光强度明显恢复; ATP含量也明显增加 与急性缺氧比较,慢性缺氧组 PaO_2大致不变,说明慢性缺氧大鼠线粒体呼吸功能的改善与 PaO_2无关 我室已往研究证明: 急性缺氧可引起线粒体变性坏死,慢性缺氧则引起线粒体增生[10]。可以推测: 慢性缺氧大鼠心肌线粒体功能的部分恢复,可能与心肌单位重量组织中线粒体数目的增加有关。FoF_1-ATP酶活性的增加可能是缺氧适应后其构象有所恢复的结果,其具体作用机理仍有待进一步研究证实

综上所述,急性缺氧时心肌线粒体呼吸功能及 FoF_1-ATP酶活力降低可能是能量代谢障碍的重要环节。慢性缺氧心肌线粒体功能的部分恢复,对于提高氧的利用,增加 ATP的生成,维持心功能可能具有重要的适应意义

参考文献

1 Locher A, Michler R, Thomas N *et al*. Mitochondrial oxidative phosphorylation in myocardial anoxia: effects of albumin. J Mol Cell Cardiol, 1976; 8: 465

2 谢增柱. 高原低氧对冠状循环及心肌代谢的影响. 见: 吕永达,李开兴 主编. 高原医学与生理学. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1995: 67~ 69

3 Mariusz M Z, Juian S, Gabriela N *et al*. The respiration and calcium content of heart mitochondria from rats with Vitamin D induced cardionecrosis. Biochem J, 1985; 266(2): 155

4 Poderoso J J, Fernandez S, Carreras M C *et al*. Liver oxygen uptake dependence and mitochondrial function in septic rats. Circ Shock, 1994; 44(2): 175

5 毛中兴,杨泽田. 冷暴露大鼠心肌线粒体 H^+ 运转 ATP酶活力及能量偶联的改变. 第四军医大学学报, 1990; 11(4): 292

6 Homs E B, Han H K, Helligso P. Analytic evaluation of high energy phyposphate determination by HPLC in myocardial tissue. J Mol Cell Cardiol, 1994; 26(1): 41

7 Andre R, Sylviane L. Energy metabolism patterns in mammalian myocardium adpated to chronic physopathogical conditions. Cardiovas Res, 1996; 31(2): 163

8 Hans M P, Thommas N, Berthold S *et al*. Mitochondrial function in oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell, Cordioros Res, 1995; 28(1): 1

9 Costa L E, Alberto B, Koch O R *et al*. Liver and heart mitochondrial in rats submitted to chronic hypoxia. Am J Physiol, 1988; 255: C123

10 Xie Zengzhu, Lui Fuyu, Wang Shijun *et al*. Preventive and therapeutic effects of mitrendipiine on hypoxic right ventricular hypertrophy. Acta Pharmacologica Sinica, 1996; 17(4): 337

(收稿: 1996-11-20;修回: 1997-04-12)

(编辑 刘 鹏)

Changes of mycardial mitochondrial respiratory function and ATP content in hypoxic rats

Luo Gang, Zhang Guobing, Xie Zhengzhu, Liu Fuyu (Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To determine the changes of myocardial energy metabolism in hypoxic rats. Method: 30 adult Wistar rats were equally devided into three groups: 1) normal control group; 2) actu-hypoxic group; 3) chronic-hypoxic group. The changes of respiratory function, activity of FoF_1-ATPase and ANS fluroescense intensity in myocardial mitochondria were observed with clark oxygen electrode and tiochemical method and the content of ATP in myocardial tissue measured with high performance liquid chromatography (HPLC). Results: 1) The respiratory function, FoF_1-ATPase activity and ANS flurosecense intensity were significantly decreased in acute-hypoxic. Though the above parameters were increased in chronic-hypoxic group as compared with thore in the acute-hypoxic group, they remained lower than those in the control. 2) ATP content was positively correlated to PCR, FoF_1-ATPase activity and PaO_2. Conclusion: The failure of myocardial energy metabolism in acute-hypoxic rats may be due to the decrease of mitochondrial respiratory function and ATP production. The improvement of energy metabolism in chronic-hypoxic rats in one of the mechanisms for hypoxic adjustment.

Key words hypoxia; mitochondrial function; FoF_1-ATPase; ATP content; rat

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