DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.022

LPS、PLA_2及氧自由基对线粒体跨膜质子转运和H^+-ATPase的影响

陆松敏* 杨鹤鸣 宋双明 刘建仓 李 萍 万志红 贾后军 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室)重庆,400042

提 要 **目的**:研究细菌内毒素(LPS)、磷脂酶A2(PLA_2)及自由基对质子跨膜转运及H^+-ATP酶的影响。**方法**:采用正常大鼠,制备线粒体、亚线粒体(SMP),用SMP与LPS(100 μg/ml)、PLA_2(10 u/ml)、$FeSO_4$/VitC(30/900 μmol/L)分别共同温育(30℃,30 min),用ACMA荧光淬灭法测定质子跨膜转运能力。线粒体与不同浓度LPS、PLA_2和$FeSO_4$/VitC共同孵育,测定H^+-ATP酶、PLA_2、MDA。**结果**:LPS、PLA_2、$FeSO_4$/VitC可致亚线粒体ACMA荧光淬灭显著改变,LPS可引起线粒体膜PLA_2活性、MDA含量升高($P<0.05$),LPS、PLA_2可引起H^+-ATP酶的活性进行性下降,小剂量$FeSO_4$/VitC引起H^+-ATP酶活性升高,大剂量$FeSO_4$/VitC引起H^+-ATP酶活性降低。**结论**:LPS、PLA_2、LPO是造成质子转运能力下降的重要原因,自由基与H^+-ATP酶损伤密切相关。

关键词 内毒素休克;线粒体;质子转运;H^+-ATP酶;PLA_2;氧自由基;大鼠

中图法分类号 R605.11

线粒体功能的改变是影响内毒素休克发生发展的重要因素,而质子跨膜转运是驱动F_0-F_1-ATP酶合成ATP的前提条件。我们的研究已证明内毒素休克线粒体跨膜质子转运能力下降,H^+-ATP酶活性在内毒素休克早期升高,而在内毒素休克晚期下降,但其机制和影响因素至今报告甚少[1]。本研究拟通过离体实验,研究细菌内毒素(LPS)、磷脂酶A_2(PLA_2)及自由基对质子跨膜转运及H^+-ATP酶的影响。

1 材料与方法

健康Wistar大鼠8只,体重(250±50)g,雌雄不拘。直接断头活杀,取肝5 g~10 g,去除筋膜、脂肪组织,置于线粒体分离介质中(0.25 mol/L Sucrose,0.001 mol/L EDTA,0.01 mmol/L Tris-HCL pH7.4,4℃),剪碎,洗净血性液体,加五倍体积的分离液于110 mm玻璃组织匀浆器,置于冰浴内匀浆,按差速离心法制备线粒体和亚线粒体[1],制作的线粒体经电镜证实。将线粒体和亚线粒体颗粒分别用分离介质和SET(0.25 mol/L Sucrose,0.002 mol/L EDTA,0.01 mmol/L Tris-HCL pH7.4,4℃)液制成(5~10)mg Pro./ml悬液,-20℃储存。

1.1 LPS、外源性PLA_2、氧自由基生成剂对亚线粒体质子跨膜转运影响的实验方法

于多孔培养皿中加入亚线粒体和LPS、PLA_2、$FeSO_4$/VitC共同孵育,测定质子转运的变化。实验和分组为:①对照组:亚线粒体悬液2 ml(0.2 mg pro./ml),30℃孵育30 min;②LPS组:亚线粒体悬液2 ml(0.2 mg pro./ml),内加入LPS(200 μg/ml)30℃孵育30 min;③PLA_2组:亚线粒体悬液2 ml(0.2 mg pro./ml)内加入PLA_2(10 u/ml),30℃孵育30 min;④$FeSO_4$/VitC组:亚线粒体悬液2 ml(0.2 mg pro./ml)内加入$FeSO_4$/VitC(30/900 μmol/L),30℃孵育30 min。

质子转运测定方法采用荧光探剂ACMA标记法(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine,sigma,无水乙醇配制,4℃避光保存)。ACMA标记法[2]:反应缓冲液2 ml(含250 mmol/L KCL,75 mmol/L Sucrose,2 mmol/L $MgSO_4$,30 mmol/L Tris-HCL,pH8.0)中加入亚线粒体和ACMA至终浓度分别为0.2 mg pro./ml和5 μmol/L,30℃搅拌至荧光强度稳定(3 min~5 min),迅速加入NADH或Succinate至终浓度分别为0.5 mmol/L和10 mmol/L,以测定呼吸链引起的跨膜H^+梯度,若测定ATP引起的跨膜H^+转运,先加入呼吸链阻断剂KCN(1 mmol/L),以阻断细胞色素C的电子传递。在RF540型荧光分光光度计上测定,进行ACMA标记激发波长[EX]和发射波长[EM]扫描,测定其荧光强度随时间的下降(荧光淬灭),记录最大相对荧光淬灭值(△Amax),最大荧光淬灭时间[T△Amax(min)]和半数荧光淬灭时间[T1/2△Amax(min)]。

1.2 LPS、外源性PLA_2和外源性氧自由基生成剂对线粒体H^+-ATP酶水解活性影响的实验方法

于多孔培养皿内加入线粒体悬液(终浓度1.0 mg/ml)和不同浓度的LPS、PLA_2和$FeSO_4$/VitC,参照文献[3~5]终浓度见表1。H^+-ATP酶水解活性测定采用定磷法[6]:取0.1 ml上清+2.9 ml H_2O+3.0 ml定磷试剂,45℃温育2 min,660 nm比色,测无机磷量,计算H^+-ATP酶水解活性。活性单位为μmol·mg^{-1} pro.·min^{-1}。无机磷测定采用钼篮法[6]。

* 陆松敏,女,56岁,研究员

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

表1 在线粒体悬液中 LPS，PLA_2 和 $FeSO_4$/Vit C 的终浓度($n=8$)

Tab 1 Final concentration of LPS，PLA_2 and $FeSO_4$/Vit C in mitochondrial suspension ($n=8$)

	1	2	3	4	5	6
LPS(μg/ml)	0	20	100	200	400	1000
PLA_2(u/ml)	0	0.5	5.0	10.0	100.0	200.0
$FeSO_4$/VitC(μmol/L)	0/0	5/150	10/300	20/600	30/900	60/1800

1.3 LPS 对线粒体膜结合的 PLA_2 和脂质过氧化影响的实验方法

线粒体与 LPS 共同孵育，测定 PLA_2 和 MDA。PLA_2 测定采用改良微量滴定法[7]，MDA 测定采用试剂盒内注明的方法。

数据统计采用计算机 Windows Excell5.0 程序。

2 结果

2.1 LPS、外源性 PLA_2 及氧自由基生成剂对线粒体质子跨膜转运的影响

LPS(100 μg/ml)、PLA_2(10 u/ml)和 $FeSO_4$/VitC(30/900 μmol/L)与亚线粒体共同孵育后，能量化时线粒体质子跨膜转运，NADH 以及 Succinate 引起的质子跨膜转运能力均显著下降，表现为最大相对荧光淬灭值(△Amax)减小($P<0.05$)、最大荧光淬灭时间 T△Amax(min)、半数荧光淬灭时间 T1/2△Amax(min)较对照组非常显著延长($P<0.01$)，见表2。

表2 LPS、PLA_2 和 $FeSO_4$/Vit C 与亚线粒体孵育后 ATP，NADH，Succinate 引起的质子跨膜转运造成的 ACMA 荧光淬灭值变化($n=8$)

Tab 2 Changes of ACMA fluorescent quenching on energized and NADH，Succinate induced proton translocation across the inner mitochondrial membrane after treatment with LPS，PLA_2 and $FeSO_4$/Vit C($n=8$)

		△Amax	T△Amax	T1/2△Amax
ATP	Control	13.55±0.71	3.50±0.41	0.63±0.05
	LPS(100 μg/ml)	10.38±0.62*	5.33±0.80*	1.14±0.09**
	PLA_2(10 u/ml)	8.43±0.79*	6.02±1.10**	2.24±0.18**
	$FeSO_4$/Vit C(30/900 μmol/L)	9.05±0.66*	5.97±0.97**	1.34±0.11**
NADH	Control	17.35±0.95	3.32±0.64	0.53±0.06
	LPS(100 μg/ml)	12.03±0.81*	4.47±0.60*	1.01±0.08**
	PLA_2(10 u/ml)	9.96±1.07*	7.62±0.10**	2.04±0.31**
	$FeSO_4$/Vit C(30/900 μmol/L)	13.10±0.88*	5.67±0.79**	1.33±0.79**
Succinate	Control	13.55±0.71	3.50±0.41	0.63±0.05
	LPS(100 μg/ml)	11.88±1.82	5.81±0.70*	1.01±0.90**
	PLA_2(10 u/ml)	11.04±1.09*	6.20±0.09**	1.82±0.22**
	$FeSO_4$/Vit C(30/900 μmol/L)	8.85±0.96*	4.92±0.59**	1.13±0.21**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

可见，LPS、PLA_2、$FeSO_4$/VitC 直接与亚线粒体共同孵育可引起亚线粒体能量化和 NADH、琥珀酸所致的质子跨膜转运能力下降，其中 NADH 所致的质子跨膜转运对 LPS 最敏感。

2.2 不同浓度 LPS、外源性 PLA_2、氧自由基生成剂对线粒体 H^+-ATP 酶水解活性的影响

2.2.1 不同浓度 LPS 对线粒体 H^+-ATP 酶水解活性的影响

较大剂量(>100 μg/ml)LPS 与线粒体孵育后 H^+-ATP 酶活性显著降低($P<0.05$)，LPS 终浓度为 1.0 mg/ml 时，H^+-ATP 酶水解活性降为对照的 71%($P<0.01$)，呈明显的剂量依赖关系($r=0.845$，$P<0.05$)。而小剂量 LPS 时，H^+-ATP 酶活性影响不大，见表3。

2.2.2 PLA_2 对 H^+-ATP 酶活性的影响

H^+-ATP 酶活性随 PLA_2 剂量加大而下降，见表3。

2.2.3 脂质过氧化对 H^+-ATP 酶活性的影响

$FeSO_4$/VitC 小剂量(10/300 μmol/L)与线粒体孵育后 H^+-ATP 酶活性显著提高($P<0.05$)，大剂量(90/1800 μmol/L)时 H^+-ATP 酶活性降为原来的 69%($P<0.01$)，见表3。

2.3 LPS 对线粒体 PLA_2 活性和脂质过氧化的影响

2.3.1 不同浓度 LPS 对线粒体膜结合 PLA_2 活性的影响

大肠杆菌内毒素(>100μg/ml)与线粒体直接孵育后线粒体膜结合 PLA_2 活性显著升高，LPS 浓度为1.0 mg/ml 时，线粒体 PLA_2 活性约为对照组的 2.5 倍($P<0.05$)，见表4。

2.3.2 不同浓度 LPS 对线粒体脂质过氧化的影响

LPS(>100μg/ml)与线粒体共同温育后线粒体脂质过氧化产物 MDA 含量显著升高，且有明显的剂量依赖关系($r=0.951$，$P<0.05$)。LPS 浓度为 1.0 mg/ml 时 MDA 含量为对照组的 137%，见表4。

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

表 3　不同浓度 LPS、PLA_2 及 $FeSO_4$/Vit C 对 H^+-ATPase 水解活性的影响($n=8$)

Tab 3　Changes of mitochondrial H^+-ATPase hydrolysis activity after treatment with different concentration of LPS、PLA_2、$FeSO_4$/Vit C ($n=8$)

Incubation with LPS		Incubation with PLA_2		Incubation with $FeSO_4$/VitC	
LPS ($\mu g/ml$)	H^+-ATPase ($\mu mol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$)	PLA_2 ($\mu g/ml$)	H^+-ATPase ($\mu mol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$)	$FeSO_4$/VitC ($\mu mol/L$)	H^+-ATPase ($\mu mol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$)
0	2.01±0.24	0	2.01±0.14	0/0	1.98±0.01
20	2.02±0.09	0.5	2.03±0.09	5/150	2.16±0.05
100	1.82±0.11	5.0	1.65±0.18*	10/300	2.19±0.40*
200	1.82±0.07*	10.0	1.53±0.13**	20/600	1.82±0.13
400	1.61±0.06*	100.0	1.31±0.16**	30/900	1.45±0.27**
1000	1.43±0.07**	200.0	1.24±0.18**	90/1800	1.39±0.25**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

表 4　不同浓度 LPS 对线粒体膜结合 PLA_2 活性和线粒体膜 MDA 含量的影响($n=8$)

Tab 4　Changes of mitochondrial membrane-associated PLA_2 activity amd MDA content of mitochondrial membrane after treatment with different concentration of LPS($n=8$)

LPS($\mu g/ml$)	0	20	100	200	400	1000
PLA_2(μ/mg pro)	4.52±0.77	4.77±0.60	6.60±0.59*	7.97±0.83*	8.56±0.98*	10.03±1.20*
MDA(nmol mg pro)	6.05±0.77	6.06±0.81	7.27±0.87*	7.56±0.70*	7.58±0.75	8.28±0.73*

*：$P<0.05$ *vs* control

3　讨论

本结果证明 LPS、PLA_2 和自由基可直接造成质子跨线粒体内膜转运能力下降及 H^+-ATP 酶活性下降，且 PLA_2、LPS 与质子转运的损伤呈显著量效关系($P<0.05$)。即随 LPS 和 PLA_2 量的升高，线粒体质子转运和 H^+-ATP 酶活性下降呈线性加重。

LPS 是如何作用于线粒体的？Shimahara[6]报告 LPS 和线粒体一起孵育，膜流动性下降，膜成份改变，认为 LPS 是通过膜表面受体结合而起作用。我们的研究证明 LPS 可引起线粒体膜 PLA_2 升高，MDA 增加，从而造成膜脂的水解和破坏。Jacoobs[4]认为脂多糖与膜相互作用，使细胞膜表面电荷下降，降低其疏水性，从而诱导膜融合，使 LPS 首先与膜粘附，然后再整合入膜双层，LPS 的脂 A 部分呈 S 型直接插入膜脂双层深部，造成膜脂流动性下降，相变温度升高，膜分子运动所需之活化能升高[8,9]，呼吸链电子传递困难。所以认为呼吸链脂成份的改变直接影响线粒体质子跨膜转运。同时膜通透性增加，质子漏升高，也影响质子转运。

PLA_2 是线粒体膜损伤的重要因素，内毒素休克时血浆和组织 PLA_2 升高[10]，线粒体 PLA_2 活性升高[11]。外源性 PLA_2 可引起细胞和线粒体损伤[10]。PLA_2 可引起一系列脂介质和脂质过氧化物释放。本研究也证明在内毒素休克早期 PLA_2 活性已明显升高，休克 8 h 为对照值的 8 倍。体外实验证明 LPS 可引起线粒体 PLA_2 活性升高，而 PLA_2 又可引起线粒体质子跨膜转运和 F_0-F_1-ATP 酶活性下降。提示 PLA_2 对膜脂的水解和破坏是质子转运下降的重要原因。

线粒体是体内氧自由基(OFR)产生的重要部位，F_0-F_1-ATP 酶又是氧自由基的首要靶位之一。膜脂的组成与性质对维持膜蛋白质构象，保持酶活性是必不可少的。脂质过氧化造成脂链缩短，MDA 引起膜脂和蛋白的交联，造成线粒体膜蛋白内聚，流动性下降，细胞产生不可逆性损伤。H^+-ATP 酶对底物磷酸化障碍是自由基影响能量生成的原因[11]，氧自由基是 H^+-ATP 酶活性下降的重要原因。

离体实验中小剂量氧自由基可引起 H^+-ATP 酶活性升高，而大剂量氧自由基造成 H^+-ATP 酶活性下降，与在体实验中内毒素休克早期 H^+-ATP 酶活性升高，而晚期下降的结果完全一致[1]。说明自由基与 H^+-ATP 酶损伤关系密切。至于小剂量自由基对 H^+-ATP 酶的激活作用的机制尚待阐明。

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

总之，本研究说明了LPS、PLA_2及OFR均可导致膜脂破坏，并造成呼吸链H^+-ATP酶活性下降和跨膜质子转运能力下降。说明线粒体膜脂正常结构是线粒体质子电化学梯度维持所必不可少的。

参考文献

1 Elferink M G, Hellingwerf K J, Konings W N. The relation between electron transfer, proton-motive force and energy-consuming process in cell of rhodopseudomonans sphaeroides. Biochem Biophys Acta, 1986; 848(1): 56

2 Westerhoff H V. A minimal hypothesis for membrane-linked free energy transduction. Biochem Biophys Acta, 1984; 768(3): 257

3 Caten M, Luviseto S, Potashinic *et al*. The nature of mitochondrial respiration and discrimination between membrane and pump properties. Biochem J, 1995; 310(4): 477

4 Jacoobs D M. Fluorescent detection of lipopolysaccharide interaction with model membrane. Adv Exp Biol, 1990; 256(2): 233

5 Brand M D, Steverding D, Kadebech *et al*. The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. Eur J Biochem, 1995; 232(5): 586

6 Shimahara Y, Ozywa F, Ida T *et al*. Role of mitochondria enhancement in maintain hepatic energy change level in endotoxin shock. J Surg Res, 1982; 33(3): 314

7 Cox G B, Gibson F. The assembly of F_0-F_1-ATPase in *Escherichia Coli*. Current Topics in Bioenergetics, 1985; 15(2): 163

8 陆松敏，刘建仓，郭素清等. 失血性休克时红细胞膜脂流动性及其相变温度的变化. 第三军医大学学报，1995; 17(5): 399

9 Poter R K, Brand M D. Body mass dependence of H^+-leak in mitochondria and its relevance to metabolic rats. Nature, 1993; 362(6): 628

10 Lebwitz M S, Pederson P L. Protein inhibitor of mitochondrial ATP syntheses: Relation of inhibitor structure to pH dependent regulation. Arch Biochem Biophys, 1996; 330(3): 342

11 刘建仓，陆松敏，李　著等. 家兔内毒素休克时肝肾心肺线粒体磷脂酶A_2(PLA_2)及其膜流动性的改变. 中国病理生理学杂志，1995; 11(6): 762

（收稿：1997-09-23；修回：1998-06-10）

（编辑　张大春）

Effects of LPS, PLA_2 and oxygen free radicals on proton translocation across inner mitochondrial membrane and H^+-ATPase

Lu Songmin, Yang Hemin, Song Shuangming, Liu Jiancang, Wan Zhihong, Jia Houjun (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To elucidate the effects of LPS, PLA_2 and oxygen free radical (OFR) on proton transmembrane translocation and H^+-ATPase. Methods: Normal rats were sacrificed to prepare liver mitochondria and SMPs *in vitro*. After the SMPs were incubated with LPS (100 μg/ml), PLA_2(10 μg/ml)and $FeSO_4$/Vit C (30/900 μmol/L) respectively at 30℃ for 30 min, the proton translocation of SMPs was assayed with fluorescent probe ACMA. The mitochondria were incubated in different concentrations of LPS, PLA_2 and $FeSO_4$/Vit C to determine H^+-ATPase, PLA_2 and MDA. Results: ① The fluorescent quenching of ACMA and H^+-ATPase were significantly decreased after the treatment with LPS, PLA_2 and $FeSO_4$/Vit C at high dosages ($P<0.05$). ② The mitochondrial PLA_2 activity and MDA content were significantly increased after the treatment with LPS ($P<0.01$). Conclusion: LPS, PLA_2 and LPO are the important causes for the decrease of proton translocation across the membrane and OFR is closely related to the damage of H^+-ATPase.

Key words endotoxic shock; mitochondrion; proton translocation; H^+-ATPase; PLA_2; oxygen free radical; rat

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