

Ca²⁺ 循环的变化是心肌线粒体受损伤的敏感指标*

杨志伟 杨福愉

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 在氧自由基的作用下, 心肌线粒体 Ca²⁺ 循环、膜脂的物理状态、氧化磷酸化效率 (ADP/O)、呼吸控制率 (RCR) 值及跨膜电位差都发生了明显的变化。如果将体系中氧自由基的强度减弱到一定程度, 心肌线粒体膜脂物理状态与能量转换功能的改变已不显著, 但其 Ca²⁺ 循环的变化仍很明显。此外, 在解偶联或呼吸抑制条件下, 心肌线粒体 Ca²⁺ 转运功能仍未完全消失; 此时, Ca²⁺ 循环的幅值约为对照的 60%~70%, 表明线粒体 Ca²⁺ 转运并非完全依赖于其呼吸链的功能, 而可能与非 H⁺ 梯度所形成的膜电位差有关。氧自由基对这部分 Ca²⁺ 转运仍有明显影响的结果提示, 后者可能是线粒体结构与功能损伤更为敏感指标。

关键词 线粒体 Ca²⁺ 循环 能量转换 氧自由基

线粒体氧化磷酸化功能与其基质内 Ca²⁺ 浓度的调节的关系十分密切。三羧酸循环中氧化脱羧的 3 个关键酶 - α -酮戊二酸脱氢酶 (OGDH)、丙酮酸脱氢酶 (PDH) 和异柠檬酸脱氢酶 (NAD⁺-IDH) 的活性, 都是受其基质内 Ca²⁺ 浓度调节的^[1]; 同时, 线粒体内 Ca²⁺ 浓度的高低也直接影响到整个细胞的 Ca²⁺ 平衡和代谢。我们实验室基于克山病患者心肌线粒体超微结构和能量转换功能呈广泛明显的损伤, 提出了“克山病是一种心肌线粒体病”的观点^[2], 并注意到克山病病人心肌线粒体的 Ca²⁺ 平衡有异常的现象。其它缺血性心脏病, 如冠心病, 心肌缺血再灌注等患者的心肌线粒体的 Ca²⁺ 平衡及其结构与功能也有呈现明显异常的报道^[3]。克山病的原发病因迄今未明, 一般认为患者体内自由基代谢紊乱可能是其继发病因之一。为此, 本文以体内存在的两种主要的自由基形式 - 超氧阴离子 (O₂⁻) 和羟自由基 (OH[•]) 为损伤因子, 结合克山病区饲料饲养的实验动物, 围绕损伤条件下的心肌线粒体的 Ca²⁺ 平衡和能量转换的敏感性及其相互联系进行了研究。

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar 纯种大鼠, 雄性, 体重 200~250 g。

1995-02-22 收稿

*中国科学院重点课题资助项目

1.2 主要试剂

Fura-2, Fura-2/AM, FCCP, JC-1, Rotenone, Ruthenium Red, 购自 Sigma 公司, Valinomycin 购自 Boehringer Mannheim 公司。所用其它试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

(1) 大鼠心肌线粒体的制备 详见文献[4], 线粒体蛋白浓度为 10.98 mg/mL。

(2) 心肌线粒体内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) 及其 Ca^{2+} 摄取的测定 以 Fura-2/AM 为 Ca^{2+} 荧光指示剂, 根据 McCormack 等的方法^[5] 改进而成, 并将日立公司测定细胞内 Ca^{2+} 浓度的软件用于 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 测定。以 340 和 380 nm 双波长激发, 500 nm 发射, 并根据两者的荧光强度比率计算出 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 。选择测定介质内的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 为 0、210 (生理条件下的细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$) 和 420 nmol/L (线粒体内外 $[\text{Ca}^{2+}]$ 梯度的转折点) 3 个测定点, 来测量 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 。实验是动态地使测定介质中的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 逐渐升高 1 次完成的, 并以测定介质中的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 为 420 nmol/L 与 210 nmol/L 时测得的 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 差来表示心肌线粒体的 Ca^{2+} 净摄取量。

(3) 心肌线粒体 Ca^{2+} 释放能力的测定 首先制得 10mg 蛋白/mL 浓度的载有 Fura-2/AM 的心肌线粒体悬液。加入 200 nmol/L 的 Ca^{2+} , 供心肌线粒体充分摄取, 时间约 10 min。然后加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 的钉红以阻断其对 Ca^{2+} 的摄取, 并除去介质中的 Ca^{2+} 。在含有 10 mmol/L Na^+ 和 2 mmol/L Mg^{2+} 的测定介质中, 以 340 和 380 nm 为激发波长, 500 nm 为发射波长, 对上述心肌线粒体连续荧光检测 4 min。通过计算实验开始与结束时的 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 差值, 可得到心肌线粒体 Ca^{2+} 的净释放量。

(4) 心肌线粒体 OGDH 相对活力的测定 采用荧光分光光度法。据报道^[6], 荧光测定介质中的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 为 250、450 和 550 nmol/L 时, 线粒体内的 OGDH 相对活力分别可达 10%、50% 和 90% 左右。故在上述 3 种条件下来测定 OGDH 相对活力。

(5) 荧光探针 DPH 检测心肌线粒体膜脂荧光寿命^[7]。

(6) 心肌线粒体膜脂流动性测定^[8]。

(7) 氧化磷酸化效率 (ADP/O) 和呼吸控制率 (RCR) 的测定^[9]。

(8) 心肌线粒体跨膜电位的测定 主要依据 Martin 等的方法^[9] 完成。心肌线粒体跨膜电位的校正采用 K^+ 的扩散电位法。

(9) O_2^- 或 $\text{OH}^\cdot$ 的产生 采用黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶或 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ 体系。详见文献 [7, 14]。

2 结果

2.1 心肌线粒体 Ca^{2+} 循环对氧自由基损伤的敏感性

(1) 氧自由基对心肌线粒体呼吸链能量转换功能的影响 受一定强度的 O_2^- 或 $\text{OH}^\cdot$ 影响, 以 α -酮戊二酸、NADH 和琥珀酸为底物的心肌线粒体的 ADP/O 和 RCR 值均明显地低于对照 (图 1 和表 1), 表明上述两种氧自由基明显干扰了心肌线粒体呼吸链的氧化磷酸化功能。若将体系中氧自由基的强度降低到一定程度 (O_2^- , $\text{OH}^\cdot$ 分别降低至 75%, 70%), 以 α -酮戊二酸为底物的 RCR 和 ADP/O 值与对照相比仍有较明显的降低, 而以 NADH 和琥珀酸为底物的 RCR 和 ADP/O 值与对照相比已无显著差异。这一结果的出现看来与 α -酮戊二酸脱氢酶的活性受基质内 Ca^{2+} 浓度调节有关。

表1 在氧自由基的作用下,心肌线粒体呼吸链 ADP/O 值的变化

	底 物		
	α -酮戊二酸	NADH	琥珀酸
对 照	3.61 ± 0.12	2.88 ± 0.08	1.83 ± 0.06
+OH $\cdot$	$2.58 \pm 0.11^{\text{a}}$	$2.37 \pm 0.09^{\text{a}}$	$1.45 \pm 0.07^{\text{a}}$
+OH $\cdot$ (70%)	$2.91 \pm 0.07^{\text{a}}$	2.86 ± 0.15	1.82 ± 0.04
+O $_2^{\cdot -}$	$2.84 \pm 0.29^{\text{a}}$	$2.38 \pm 0.11^{\text{a}}$	$1.44 \pm 0.05^{\text{a}}$
+O $_2^{\cdot -}$ (75%)	$2.89 \pm 0.11^{\text{a}}$	2.85 ± 0.10	1.82 ± 0.07

a) 与对照相比, $P < 0.01$, ($n=6$, 均值 $\pm$ 标准差)

(2) 氧自由基对心肌线粒体膜脂中 DPH 探针荧光寿命的影响 用纳秒荧光光谱仪测得的心肌线粒体膜脂中 DPH 的荧光衰减图谱如图 2 所示。通过计算荧光寿命的测试结果如表 2 所示, DPH 探针在心肌线粒体膜脂中存在着两种寿命形式。一种为 8.0 ns 左右的较长的寿命成分 (τ_1); 另一种为 2.5 ns 左右的较短的寿命成分 (τ_2)。前者所占的比例约 80% 左右; 后者所占的比例约 20%。较长的寿命是反映在膜脂双层区域中 DPH 分子的荧光慢衰变形式; 而较短的寿命则反映 DPH 分子在脂与蛋白相接触的区域(界面脂)中的荧光快衰变形式^[10]。在一定强度的 O $_2^{\cdot -}$ 或 OH $\cdot$ 的作用下, 心肌线粒体膜脂中 DPH 的两种荧光寿命成分均明显地低于对照, 提示 DPH 分子周围的物理状态发生了变化。如果将体系中氧自由基的强度减弱到原来的 70% 左右, 与对照相比, 膜脂中 DPH 的两种荧光寿

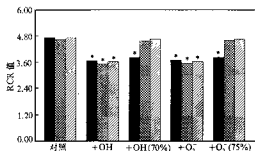


图1 受氧自由基的影响, 心肌线粒体呼吸链 RCR 值的改变

*示 $P < 0.01$, ($n=6$, 均值 $\pm$ 标准差)■ 示 α -酮戊二酸, ▨ 示 NADH, ▤ 示琥珀酸

命的两种荧光寿命成分均明显地低于对照, 提示 DPH 分子周围的物理状态发生了变化。如果将体系中氧自由基的强度减弱到原来的 70% 左右, 与对照相比, 膜脂中 DPH 的两种荧光寿

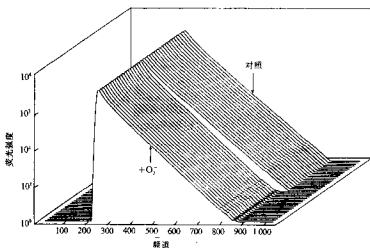


图2 DPH 探针在心肌线粒体膜脂中的荧光衰变情况

表 2 受氧自由基的情况, 心肌线粒体膜脂中 DPH 荧光寿命的变化

	n	τ_1	τ_2
对 照	7	8.04 ± 0.05	2.48 ± 0.06
+OH·	7	$7.63 \pm 0.06^{*d}$	$2.14 \pm 0.14^{*d}$
+OH· (70%)	8	7.99 ± 0.03	2.48 ± 0.02
+O ₂ ·	10	$7.66 \pm 0.23^{*d}$	$2.12 \pm 0.13^{*d}$
+O ₂ · (75%)	8	7.90 ± 0.05	2.36 ± 0.06

a) 与对照相比, $P < 0.01$, (单位为 ns, 均值 $\pm$ 标准差)

命组分仍略有缩短, 但统计学上已无显著差异, 表明该强度的氧自由基不足以明显影响 DPH 周围膜脂的物理状态。

(3) 受氧自由基的影响, 心肌线粒体膜脂流动性的变化
将一定强度的 O₂· 或 OH· 作用于心肌线粒体, 后者膜脂

中 DPH 探针的荧光偏振度与对照相比明显增大, 这意味着膜脂的微粘度增大, 而膜脂的流动性变小。如果体系内加入初始强度 70% 左右的氧自由基, 其膜脂流动性与对照相比已没有显著的差别 (图 3), 这揭示, 该强度的氧自由基对膜脂物理状态基本上没有影响。

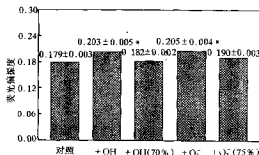


图 3 氧自由基对心肌线粒体膜脂流动性的影响

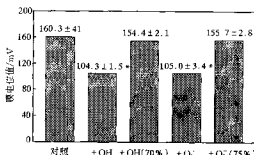
 $P < 0.01$ ($n=6$), 均值 $\pm$ 标准差

图 4 氧自由基引发的心肌线粒体跨膜电位值的变化

 $*P < 0.01$ ($n=6$), 均值 $\pm$ 标准差

(4) 受氧自由基的影响, 心肌线粒体跨膜电位值的变化 从图 4 可见, 在一定强度的氧自由基的作用下, 心肌线粒体能量化后的膜电位值明显低于对照, 表明心肌线粒体内膜结构的完整性已有明显的破坏。若将体系内氧自由基的强度减弱到原来的 70% 左右, 其膜电位值与对照相比已没有明显的改变。提示该强度的氧自由基未明显影响心肌线粒体内膜结构的完整性。

(5) 氧自由基对心肌线粒体 Ca²⁺ 转运的影响 表 3 所示的结果表明: 在一定强度的氧自由基作用下, 心肌线粒体 Ca²⁺ 的摄取发生了明显的变化, 表现为测定介质中的 [Ca²⁺] 从 210 nmol/L 增加到 420 nmol/L 时, [Ca²⁺]_m 的增加明显低于对照。当测定介质中 [Ca²⁺] 为 0 和 420 nmol/L 时, [Ca²⁺]_m 明显低于对照; 而测定介质中的 [Ca²⁺] 为 210 nmol/L 时, [Ca²⁺]_m 明显高于对照。同时, 心肌线粒体 Ca²⁺ 的释放量显著增加, 表现为实验开始到结束的 [Ca²⁺]_m 降低的数值明显大于对照。此时, [Ca²⁺]_m 趋向与介质中的 [Ca²⁺] 一致, 提示线粒体内膜的通透性增强。此外, 心肌线粒体 OGDH 的相对活性在 3 个活力点均有显著的下降。表现为测定介质中的 [Ca²⁺] 为 200, 450 和 550 nmol/L 时, 基质内相应的 NAD⁺ 还原量均明显地低于对照。

若将体系内氧自由基的强度减弱到初始强度的 70% 左右, 心肌线粒体的 Ca²⁺ 摄取、释放功能及基质内 OGDH 的相对活性仍显著低于对照。所不同的是, 当测定介质中 [Ca²⁺] 为 0, 210 和 420 nmol/L 时, 相应的 [Ca²⁺]_m 均明显低于对照。

表3 氧自由基对心肌线粒体 Ca^{2+} 摄取、释放和 OGDH 相对活力的影响^{a)}

$[\text{Ca}^{2+}]_i$	0	210	420	摄取的 Ca^{2+}
对 照	21.3±0.8	152.0±5.9	521.8±7.3	360.1±6.9
+OH·	14.9±0.8 ^{b)}	179.2±5.9 ^{b)}	431.9±5.6 ^{b)}	234.7±2.5 ^{b)}
+OH· (70%)	15.1±0.7 ^{b)}	110.7±1.6 ^{b)}	374.0±3.3 ^{b)}	263.2±2.0 ^{b)}
+O ₂ ⁻	14.9±0.8 ^{b)}	176.7±4.9 ^{b)}	412.0±4.2 ^{b)}	235.2±1.9 ^{b)}
+O ₂ ⁻ (75%)	15.9±0.6 ^{b)}	112.7±1.6 ^{b)}	374.9±3.5 ^{b)}	262.1±2.1 ^{b)}
时间/s	0~60	180~240	释放的 Ca^{2+}	
对 照	137.8±6.8	59.3±7.2	78.5±4.1	
+OH·	137.6±7.6	45.3±3.1 ^{b)}	92.4±4.8 ^{b)}	
+OH· (70%)	137.4±5.3	75.9±5.2 ^{b)}	61.7±4.1 ^{b)}	
+O ₂ ⁻	138.2±7.7	48.7±3.7 ^{b)}	89.6±6.7 ^{b)}	
+O ₂ ⁻ (75%)	137.5±7.1	76.3±4.3 ^{b)}	60.6±4.0 ^{b)}	
OGDH 相对活力/%		$[\text{Ca}^{2+}]_i$		
		200	450	550
对 照		10.3±2.0	49.6±1.5	85.5±3.2
+OH·		7.5±0.5 ^{a)}	39.7±1.5 ^{a)}	70.8±4.4 ^{a)}
+OH· (70%)		7.8±0.1 ^{a)}	40.3±1.5 ^{a)}	74.1±1.2 ^{a)}
+O ₂ ⁻		7.6±1.1 ^{a)}	40.3±1.4 ^{a)}	70.7±6.7 ^{a)}
+O ₂ ⁻ (75%)		7.7±0.2 ^{a)}	41.3±0.7 ^{a)}	71.1±0.5 ^{a)}

a) 表中无明确注明数值的单位均为 nmol/L

b) 与对照相比, $P < 0.01$, ($n=6$, 均值 ± 标准差)c) $[\text{Ca}^{2+}]_i$: 悬液中的 Ca^{2+} 浓度

从前述结果中可以明显看出, 心肌线粒体 Ca^{2+} 转运系统较其能量转换功能更容易受到氧自由基的损伤。

与其能量转换功能和膜脂的物理状态相比, 克山病区粮饲养的大鼠心肌线粒体 Ca^{2+} 转运系统或这一系统在体外“老化”时所表现的损伤也更为明显(未发表结果)。

2.2 解偶联或呼吸抑制条件下, 心肌线粒体 Ca^{2+} 循环及氧自由基的影响

一般认为, 心肌线粒体 Ca^{2+} 转运系主动运送过程, 它必然紧密依赖于线粒体电子传递与氧化磷酸化过程。但我们发现心肌线粒体 Ca^{2+} 转运并非完全依赖于, 而还与非 H^+ 梯度形成的膜电位有关。

(1) 解偶联或呼吸抑制条件下, 心肌线粒体 Ca^{2+} 的转运状况 心肌线粒体在含有 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 呼吸抑制剂 rotenone 或 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的解偶联剂 FCCP 的磷酸缓冲液中温育 10 min, 其呼吸已基本停止或其呼吸链的偶联功能已基本丧失(图 5)。

结果还表明, 完全解偶联或呼吸被抑制的心肌线粒体还存在着约为对照 60%~70% 的 Ca^{2+} 摄取(图 6(a)) 和释放(图 6(b)) 功

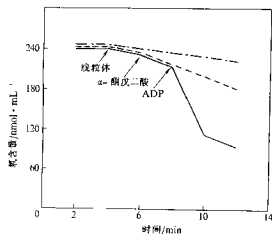
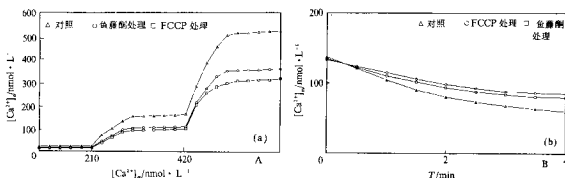


图5 解偶联或呼吸抑制的心肌线粒体呼吸状态的变化

图6 解偶联或呼吸抑制心肌线粒体的 Ca^{2+} 摄取(a)和释放(b)

能。那么这两种心肌线粒体 Ca^{2+} 转运的驱动力源于何处呢?

(2) 解偶联或呼吸抑制的心肌线粒体膜电位值的变化 鉴于线粒体 Ca^{2+} 的内向转运是其 Ca^{2+} 循环的限速步骤,且前者与跨膜电位的关系非常密切。我们检测了解偶联或呼吸被抑制的心肌线粒体跨膜电位,发现解偶联或呼吸被抑制的心肌线粒体仍存在着约 100 ~ 110 mV 左右的膜电位差(图 7)。由于此时心肌线粒体内膜两侧已不存在 H^+ 电化学梯度($\Delta\mu_{H^+}$);同时,测定介质中的 $[K^+]$ 与心肌线粒体基质内 $[K^+]$ 基本相等;故此膜电位的产生与内膜两侧 H^+ 和 K^+ 以外的其它带电粒子分布不平衡有关,它很可能是上述 Ca^{2+} 循环的动力源泉。

(3) 氧自由基对解偶联心肌线粒体 Ca^{2+} 循环的影响 前述所及,体系内 70% 左右强度的氧自由基仍可明显影响心肌线粒体 Ca^{2+} 循环,故我们用该强度的氧自由基来影响解偶联的心肌线粒体。如表 3 所示,在上述强度的氧自由基(O_2^- 或 $OH\cdot$)作用下,解偶联心肌线粒体摄取或释放 Ca^{2+} 的功能进一步明显减弱;基质内 OGDH 的相对活力显著降低;表明氧自由基对心肌线粒体内膜 Ca^{2+} 循环组有直接的损伤作用。

表 4 氧自由基对解偶联心肌线粒体 Ca^{2+} 转运的影响^{a)}

$[Ca^{2+}]_o$	0	210	420	摄取的 Ca^{2+}
对 照	13.0 ± 0.9	93.2 ± 2.4	306.7 ± 6.6	213.5 ± 6.4
$+O_2^-$ (75%)	$8.2 \pm 0.3^{b)}$	$72.4 \pm 3.2^{b)}$	$245.3 \pm 8.0^{b)}$	$172.9 \pm 8.1^{b)}$
$+OH\cdot$ (70%)	$7.9 \pm 0.1^{b)}$	$69.8 \pm 1.7^{b)}$	$239.9 \pm 2.9^{b)}$	$170.1 \pm 5.5^{b)}$
时间/s	0 ~ 60	180 ~ 240		释放的 Ca^{2+}
对 照	135.1 ± 7.7	86.9 ± 4.5		48.2 ± 2.6
$+O_2^-$ (75%)	134.7 ± 6.3	$95.8 \pm 5.2^{b)}$		$39.0 \pm 1.9^{b)}$
$+OH\cdot$ (70%)	134.9 ± 5.7	$95.1 \pm 4.7^{b)}$		$39.8 \pm 1.7^{b)}$
OGDH 相对活力/%		$[Ca^{2+}]_o$		
	200	450	550	
对 照	6.6 ± 0.2	26.6 ± 1.3	49.0 ± 1.2	
$+O_2^-$ (75%)	$4.3 \pm 0.2^{b)}$	$20.5 \pm 1.2^{b)}$	$40.4 \pm 1.1^{b)}$	
$+OH\cdot$ (70%)	$4.2 \pm 0.2^{b)}$	$19.7 \pm 1.1^{b)}$	$38.5 \pm 1.3^{b)}$	

a) 表中无明确注明数值的单位均为 nmol/L

b) 与对照相比, $P < 0.01$, ($n=6$, 均值 $\pm$ 标准差)

c) $[Ca^{2+}]_o$: 基液中的 Ca^{2+} 浓度

氧自由基对呼吸被抑制的心肌线粒体 Ca^{2+} 循环的影响与其对解偶联心肌线粒体 Ca^{2+} 循环的相应影响基本一致(结果未示)见表4。

3 讨论

在一定强度的氧自由基作用下,心肌线粒体膜脂双层内发生了脂质过氧化反应,这会使膜脂中的不饱和脂肪酸的含量减小,而饱和脂肪酸的含量相对增多。膜脂成分的这种变化将直接影响到其物理状态,导致处于膜脂双层和界面脂中的DPH探针周围微环境的变化,使其疏水性降低,有序性增强;受激发后,DPH分子内的电子在激发态的平均滞留时间缩短。同时,膜脂内DPH探针的荧光偏振度也显著增大,这意味着膜脂流动性的明显降低。脂质过氧化反应的中间产物——脂类自由基及其终产物——丙二醛还可使膜内蛋白质发生链式聚合作用,并造成膜蛋白分子内和分子间交联^[4]。上述膜脂成分和物理状态的改变通过脂与蛋白的相互作用可导致线粒体膜蛋白功能的损伤,在本实验中反应为以 α -酮戊二酸、NADH和琥珀酸为底物的氧化磷酸化效率(ADP/O)、呼吸控制率(RCR)值的显著降低。与此同时,心肌线粒体摄取和释放 Ca^{2+} 的功能及其内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 也发生了明显的变化,这很可能与此刻心肌线粒体内膜结构的完整性受损(跨膜电位值的显著降低已说明了这一点,见图4)有关。

当体系内氧自由基的强度减弱到一定程度时,心肌线粒体膜脂物理状态及其跨膜电位值几乎没有变化,而其摄取和释放 Ca^{2+} 的功能及其基质内的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 仍有明显降低,这可能与内膜 Ca^{2+} 转运蛋白本身受损有关。此时,尽管体系内氧自由基的强度已经减弱,心肌线粒体内膜脂双层仍可以发生过氧化反应,该反应及其引发的链式聚合和交联作用,以及脂对蛋白的作用仍可能影响内膜 Ca^{2+} 转运蛋白的功能;由于膜脂物理状态的变化不明显,故用荧光寿命和偏振的方法没有检测出来。与此同时,以 α -酮戊二酸为底物的ADP/O和RCR值仍有较为显著的降低,而以NADH和琥珀酸为底物的相应数值没有明显的变化。这一结果进一步证明: α -酮戊二酸脱氢酶的活性是受基质内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 调节的。受氧自由基影响,基质内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 降低,造成OGDH活力下降,导致后者催化 α -酮戊二酸脱氢所生成NADH的量减少,因而进入呼吸链的底物量也降低。此刻呼吸链组分本身的活性看来并未受到明显的损伤,因为以NADH和琥珀酸为底物的能量转换指标未有显著的变化。为什么受强度减弱的氧自由基影响,同样分布在心肌线粒体内膜上的呼吸链组分的活性却没有明显变化呢?这很可能与其自身某些特殊的生化性质有关。近有文献报道,线粒体呼吸链组分中还原形式的泛醌借助于琥珀酸或NADH可以还原体系中的 O_2^- 和 H_2O_2 ^[13]。此外,呼吸链在电子传递过程中因电子漏也可自行产生 O_2^- ^[13]。 O_2^- 被SOD歧化为 H_2O_2 和 O_2 。 H_2O_2 可以被呼吸链自身所清除。

据此,我们推论:在受氧自由基等因素影响的情况下,心肌线粒体 Ca^{2+} 转运失调可能首先发生,之后通过影响基质内3个 Ca^{2+} 敏感的脱氢酶而使其能量转换功能降低。整体大鼠喂以低硒克山病区粮及体外“老化”心肌线粒体 Ca^{2+} 平衡的变化比其氧化磷酸化功能的改变更为显著的结果也支持了上述推论。这不仅对克山病,而且对其它缺血性心脏病发病机理的阐明也许都将是有意義的。

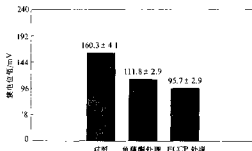


图7 解偶联或呼吸抑制心肌线粒体跨膜电位的测定

实验中我们还发现,解偶联或呼吸抑制的心肌线粒体 Ca^{2+} 转运(包括 Ca^{2+} 的摄取和释放)功能仍未完全消失(这样的结果目前尚未见文献报道),这表明线粒体的 Ca^{2+} 转运并非完全依赖于其呼吸链的功能,而很可能与非 H^+ 梯度形成的膜电位差有关。受氧自由基的影响,这部分 Ca^{2+} 转运(包括 Ca^{2+} 的摄取和释放)功能也有明显降低,其降低的幅度与受相同强度的氧自由基影响的正常心肌线粒体的降低幅度基本一致,提示它可能是心肌线粒体结构与功能损伤的更为敏感指标。

致谢 衷心感谢本组钟文敏同志在本文线粒体能量转换功能的测定及图表的制作过程中给予的热忱帮助。

参 考 文 献

- McCormack J G, Bromidge E S, Dawes N J. Characterization of the effects of Ca^{2+} on the intramitochondrial Ca^{2+} -sensitive dehydrogenases within intact rat-kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 934: 282~292
- 杨福临, 林治煊, 李生广等. 克山病是一种心肌线粒体病. *实验生物学报*, 1987, 20: 473~485
- Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*, 1988, 255: 357~360.
- Marshall S E, McCormack J G, Denton R M. Role of Ca^{2+} ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat epididymal tissue. *Biochem J*, 1984, 218: 249~260
- McCormack J G, Browne H M, Dawes N J. Studies on mitochondrial Ca^{2+} -transport and matrix Ca^{2+} using fura-2-loaded rat heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 973: 420~429
- Lukacs G L, Kapus A, Fonyo A. Parallel measurement of oxoglutarate dehydrogenase activity and matrix free Ca^{2+} in fura-2-loaded rat heart mitochondria. *FEBS Lett*, 1989, 229: 219~223
- 杨志伟, 杨法军, 忻文刚等. 硝基抗坏血酸阴离子导致的心肌线粒体膜损伤. *生物物理学报*, 1994, 10: 63~67
- 燕玉生, 李力, 刘晓丹等. 克山病区粮喂养大鼠后心肌细胞自由钙浓度变化与碘的作用. *生物化学杂志*, 1992, 8: 452~456
- Martin R. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochem*, 1991, 30: 4480~4486
- Cohen H. Analysis of cell membrane micro-heterogeneity using the fluorescence lifetime of DPH-type fluorophores. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1104: 273~282
- Stadtman E R, Oliver C N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J Biol Chem*, 1991, 266: 2005~2008
- Forsmark P, Nordenbrand K, Ernster L. *Biological Free Radical Oxidations and Antioxidants*. Padova: CLFUP, 1992. 79~85
- Forman H J, Boveris A. Superoxide Radical and Hydrogen Peroxide in Mitochondria. *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press, 1982. V: 65~90
- Zhao Baolu, Li Xiaojie, He Runge et al. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophysics*, 1989, 14: 175~185