

克山病是一种“心肌线粒体病 (Mitochondrial Cardiomyopathy)”

杨福翰 林治族 李生广 郭信奇 应芸书 邢晋如

王淑姪 陈文雯 孙 珊 沃维汉 张 克 张 璞 史宝生

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

近年来, 人们对线粒体与疾病的研究领域日益发生兴趣^[1]。一些肌病病人的线粒体结构与功能异常的报道有日益增加的趋势, 有些学者将这类疾病称之为“线粒体肌病 (Mitochondrial Myopathy)”^[2-4]。

克山病是一种病因迄今不明的地方性心脏病, 一般具有慢性病程, 但有时又有突然急发的病情。急型的主要临床表现为急性心源性休克, 心肌的主要病理改变是呈灶状乃至带状的急性坏死^[5]。线粒体是细胞的能量供应中心, 克山病病人心肌线粒体是否异常? 它是否也是一种“线粒体肌病”? 这显然是一个值得研究的问题。过去对克山病病人心肌线粒体的超微结构变化曾用电镜进行过不少观察与研究^[6,7], 对线粒体的氧化磷酸化功能的变化也曾有些报道, 如心肌细胞琥珀酸脱氢酶(SDH)和细胞色素氧化酶活性^[8]的明显降低, 但这些结果大多是用匀浆作为测试材料获得的。本文用多种指标来检验分离的克山病病人心肌线粒体结构与功能的变化。实验结果表明, 克山病病人心肌线粒体明显损伤。结合其它实验室有关克山病病人心肌线粒体病理和生化研究结果的报

道^[9,10], 可以认为克山病是一种“心肌线粒体病 (Mitochondrial Cardiomyopathy)”。

材 料 和 方 法

一、材料来源

克山病病人组 1984年, 1985年和1986年云南楚雄地区克山病死亡共19例。临床及病理尸解检查证实11例亚急性型克山病病人(以下称亚急性克病人), 8例慢性克山病病人(以下称慢性克病人)。所有病例均在死亡后5小时内尸检。尸检时取左心室心肌并立即放置液氮中保存备用。

对照组 1985年吉林省非病死亡健康人9例, 1986年非病死亡健康人吉林省4例, 北京4例。年龄一般为18—25岁。死亡后数小时内(与克山病病人死亡后进行尸检的时间间隔基本相同)进行尸检, 并立即取左心室心肌放置液氮中保存备用。

二、实验方法

1. 克山病病人心肌线粒体的分离 从液氮中取出样品, 在分离液(250 mmol/L蔗糖, 5 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4)中解冻, 预冷(4℃)的分离液中洗涤, 滤纸吸干分离液, 剪成碎块, 加入分离液(按1:8 w(g)/v(ml)比例), 在捣碎器(日本, Marusan)上2档捣碎2分钟, 制成组织匀浆, 在K-24

本文1987年4月29日收到。1987年6月29日接受。

本研究得到“七五”攻关项目75-62-03-02的基金和中国科学院“生85-111”基金资助。

冷冻离心机上按文献^[11]的流程分离线粒体。

2. 心肌线粒体硒含量的测定 按文献^[12]方法进行测定并计算硒含量。

3. 心肌线粒体 Ca、Mg 含量的测定 利用等离子体光谱法测定心肌线粒体 Ca、Mg 的含量。

4. 线粒体琥珀酸氧化活性的测定 利用氧电极参照文献^[13]加以改进测定。测定体系内含 KCl 84 mmol/L, 磷酸缓冲液 15 mmol/L pH 7.5, MgCl₂ 6 mmol/L, 琥珀酸 10 mmol/L, 牛血清蛋白 0.1%, 线粒体悬液约 0.5 mg 蛋白, 反应温度为 28°C。反应体积为 2 毫升。

5. 线粒体琥珀酸脱氢酶活性的测定 参照文献^[14]方法进行测定。

6. 线粒体细胞色素 C 氧化酶活性测定 参照文献^[15]方法进行测定。

7. 线粒体细胞色素氧化酶含量的测定 参照文献^[16]方法, 稍加改进。测定介质的基本成份为甘露醇 0.2 mol/L, 蔗糖 0.087 mol/L, EDTA 0.001 mol/L, Tris-Cl 0.01 mol/L pH 7.4, 0.1% BSA, 磷酸缓冲液 0.05 mol/L pH 7.4。测定时对照池加基本成份以及约 2.0 mg 线粒体蛋白, 这时线粒体呼吸链组份处于氧化状态。实验池除加入基本成份和同量线粒体外, 还加入琥珀酸, ADP, KCN 和 Na₂S₂O₈。反应总体积为 2 ml, 反应温度为 30°C。

8. 线粒体 H⁺-ATP 酶活力及受寡霉素抑制百分率的测定 按方法^[17]进行, 线粒体加入量一般为 50—80 μg 蛋白质。

9. 加 ATP 能量化时线粒体膜电位的测定 参照 Robertson 等方法^[18]前加以改进。样品测定体系含 250 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 μg 鱼藤酮, 3 mmol/L ATP, 1 mmol/L ANS 和 250 μg 线粒体蛋白/ml。线粒体样品中, 加入 ATP 后 30°C 保温 2 分钟, 再加入 ANS 保温 1 分钟, 在日立 650—60 荧光分光光度计上, 进行发射光谱扫描。激发波长为 390 nm。对照杯不加 ATP, 同样记录发射荧光光谱。各扫描图谱均分别减去背景荧光。对比对照与加 ATP 能量化时的荧光光谱即可计算出能量化时 ANS 荧光强度降低的幅度, 也就可以看出线粒体膜电位的变化情况。

10. 线粒体膜流动性的测定 参照文献^[12]方法进行, 每反应管加 100 μg 心肌线粒体蛋白。

11. 利用电镜 X 射线微区分析法对线粒体内含电子致密无定形物质的鉴定 超薄切片经以下三种不同方法处理后, 电镜观察, 鉴定无定形物质。

a) 超薄切片只用醋酸双氧钨染色, 不经柠檬酸铅染色。

b) 约 1000 Å 的超薄切片用铺有炭膜 100 目铜网捞取, 电镜 JEM 200 CX, 配有 EDA × 8100/60 能谱分析仪, X 射线微区分析线粒体内无定形物质所含各类元素,^[19,20]适用电压 100 Kv, 样品台倾斜角为 30 度, X 射线出射角为 22.9 度, 石墨样品台测试, 检测时间为 400 秒。对照用磷酸钙盐混合在 Epon 812 中聚合, 切 1000 Å 薄片, 同样条件做 X 射线微区分析。

c) 超薄切片在次氯酸钾溶液分别处理 0.5、1 和 2 分钟, 蒸馏水漂洗后, 电镜观察。

实验结果

一、克山病病人心肌线粒体硒、Ca、Mg 含量的测定

表 1 给出了克山病病人心肌线粒体硒含量的测定结果, 从表 1 可以看出亚急性克病人心肌线粒体硒的含量仅为非病对照的 1/8, 慢克病人硒含量约相当对照的 1/3, 而较亚急性病人高 1.5 倍, 三组间的差异均有统计学上的显著性。

表 1 克山病病人心肌线粒体硒含量

样品	例数	硒含量 (ng/mg 蛋白)	显著性判断
(1) 非病对照	9	1.59 ± 0.053	(1) — (2) P < 0.001
(2) 亚急性克病人	6	0.175 ± 0.085	(2) — (3) P < 0.001
(3) 慢克病人	4	0.439 ± 0.096	(1) — (3) P < 0.001

表 2 是克山病病人心肌线粒体 Ca、Mg 含量的测定结果。结果表明亚急性克病人心肌线粒体 Ca 含量显著高于非病对照组, 几乎为对照组的 2 倍, 而 Mg 含量, 亚急性克病人与对照组在统计学上无明显差别。

表 2 克山病病人心肌线粒体的 Ca、Mg 含量 (ng/mg 蛋白)

样品	例数	Ca 含量	Mg 含量
非病对照	6	889.2 ± 135.2	146.7 ± 30.4
亚急性病人	7	1677.2 ± 288.2	156.9 ± 33.3
		P < 0.05	NS*
慢性病人	2	1388.5	119.5

* 表示无显著差异

二、克山病病人心肌线粒体内膜呼吸酶系的变化

表 3 结果表明亚急性病人琥珀酸氧化酶系活性明显低于非病对照组, 只相当对照组的 1/3。慢性病人较对照组也低, 但比亚急性病人为高, 三组样品之间相互比较均有统计上的显著性差异。

表 3 克山病病人心肌线粒体琥珀酸氧化酶系活性

样品	例数	琥珀酸氧化酶系活性 nmol O ₂ /分 钟·mg 蛋白	显著性判断
(1) 非病对照	9	81.4 ± 6.3	(1) — (2) P < 0.001
(2) 亚急性病人	7	20.6 ± 3.2	(2) — (3) P < 0.01
(3) 慢性病人	5	36.8 ± 5.0	(1) — (3) P < 0.02

从表 4 可以看出亚急性病人琥珀酸脱氢酶活性和细胞色素 C 氧化酶活性也均较对照组明显降低。慢性病人两种呼吸酶活性的降低幅度虽不及亚急性病人, 但其活力也只有对照的大约 1/2 左右。

我们用差异光谱法测定了克山病病人心肌线粒体细胞色素 C 氧化酶的含量。测定结果

表 4 克山病病人心肌线粒体呼吸酶系活性

样 品	例 数	琥珀酸脱氢酶		细胞色素 C 氧化酶	
		比活 ($\mu\text{mol suc}$ 耗 氧化/分·mg 蛋白)	显著性判断	比 活 (k/分·mg 蛋白)	显著性判断
(1) 非病对照	9	0.643 ± 0.003	(1) — (2) P < 0.001	8.73 ± 0.778	(1) — (2) P < 0.001
(2) 亚急性病人	7	0.278 ± 0.026	(2) — (3) P < 0.02	3.367 ± 0.487	(2) — (3) P < 0.02
(3) 慢性病人	4	0.313 ± 0.053	(1) — (3) P < 0.001	4.868 ± 0.347	(1) — (3) P < 0.001

(见图 1)表明亚急性病人细胞色素氧化酶含量与对照相比, 无明显变化。这进一步表明亚急性病人细胞色素氧化酶活性的降低, 不是由于该酶组分的减少所引起的, 而是由于该酶比活力下降造成的。

关于克山病病人心肌线粒体超微结构有明显变化已有不少报道, 因此需要考虑线粒体在分离过程中有否因不稳定而形成碎片的可能性。从我们的实验结果看。与对照相比, 克山

病人心肌线粒体的分离产率没有明显变化, 沉淀线粒体后的上清液也没有发现明显的碎片。这说明克山病病人心肌线粒体呼吸酶系的变化, 基本上反映了在体内的情况。

三、克山病病人线粒体 H⁺-ATP 酶活性及其对寡霉素敏感性的测定

H⁺-ATP 酶复合体是线粒体氧化磷酸化偶联的“关键”装置, 因此对克山病病人心肌线粒体 H⁺-ATP 酶活性及其对寡霉素(Oligomycin)

表 5 克山病病人心肌线粒体 H^+ -ATP 酶活力和 oligomycin 抑制敏感性

样 品	例 数	比 活 力		oligomycin 抑制	
		ATP 水解 μmol 水/分 $\cdot\text{mg}$ 蛋白	显著性判断	%	显著性判断
(1) 非病对照	9	0.410 ± 0.079	(1)-(2) $P < 0.01$	77.64 ± 5.11	(1)-(2) $P < 0.001$
(2) 亚急性病人	7	0.157 ± 0.019	(2)-(3) $P < 0.05$	44.80 ± 4.33	(2)-(3) NS
(3) 慢性病人	4	0.335	(1)-(3) NS	52.71	(1)-(3) $P < 0.05$

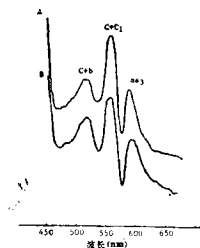


图 1 人心肌线粒体细胞色素氧化酶差异光谱图

A. 正常 B. 亚急性

的敏感性也作了测定。从表 5 看出, 亚急性克病人 H^+ -ATP 酶活力明显低于非病对照组, 较慢克病人也低。但慢克病人与对照无明显差异。对寡霉素的抑制敏感性, 亚急性病人较对照组明显降低。慢克病人也较对照组低, 但慢克病人与亚急性病人之间无明显差别。

四、克山病人心肌线粒体能量化后膜电位的变化

ANS 是带负电的荧光探针, 它与膜结合后量子产率大增, 在一定的离子浓度下, 结合在膜上的 ANS 的荧光强度的变化可反映膜表

面电位的变化。线粒体能量化后会形成膜电位。从这一参数的变化情况可反映线粒体偶联磷酸化功能正常与否。加 ATP 使线粒体能量化后, 由于跨膜电位的形成, 与膜结合的 ANS 量减少, 荧光强度变弱。故可根据 ANS 荧光强度下降的幅度变化, 表示膜电位的变化见图 2。

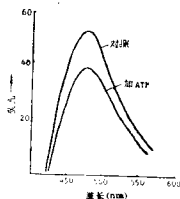


图 2 加 ATP 能量化后荧光强度变化的图谱

表 6 给出了克山病病人心肌线粒体在 ATP 能量化后膜电位的变化, 结果表明, 亚急性克病人心肌线粒体膜电位的变化较非病对照为小, 说明亚急性病人利用 ATP 能量化过程有障碍。

五、克山病病人心肌线粒体膜脂流动性的变化

膜的流动性是膜结构的基本特征, 线粒体

表 6 克山病病人心肌线粒体 ATP 能量
化后膜电位的变化

样 品	例数	荧光强度的下降
非病对照	6	9.92 ± 1.03
亚急性病人	6	3.47 ± 1.16 $P < 0.01$
慢克病人	2	6.05

膜的流动性可能与呼吸链各组分的电子传递功能及能量转换都有密切关系^[21]，我们用荧光探针 DPH 来测试克山病病人心肌线粒体膜的流动性并与非病对照作比较。

从表 7 可见亚急性病人线粒体膜的荧光偏振度比非病对照组明显偏高，说明亚急性病人线粒体膜脂流动性变小。慢克病人线粒体膜荧光偏振度与对照相比无明显变化，说明二者膜脂流动性也无多大差异。

表 7 克山病病人心肌线粒体膜脂的流动性

样品	例数	荧光偏振度	显著性判断
(1) 非病对照	8	0.112 ± 0.007	(1) — (2) $P < 0.02$
(2) 亚急性病人	7	0.176 ± 0.011	
(3) 慢克病人	4	0.150 ± 0.014	(1) — (3) NS

六、电镜 X 射线微区分析克山病病人心肌线粒体内含电子致密无定形物质

克山病病人心肌亚显微结构发生病变是非常明显的，尤其是线粒体的变化更为显著。此外，还注意到线粒体内出现较多的电子致密无定形物质。有人曾推断这是磷酸钙的沉淀物。本文用三种方法来加以鉴别，实验结果如下：

1. 在亚急性病人和非病对照组都能观察到相当数量的线粒体内出现相似的电子致密无定形物质，但对对照组中数量较少，体积小。（见图版 I，图 1，2）

2. 电子致密无定形物质受电子染色影响。在未经柠檬酸铅染色的切片中，我们发现线粒体内的无定形物质电子密度并不高。这一现象

似乎可以说明无定形物质不大可能是磷酸钙（见图版 I，图 3）。

3. 电镜 X 射线微区分析无定形物质，未能检测到 Ca 峰，而磷酸钙的对照样品中，则可测得明显的钙峰（见图版 I，图 4，5a，5b）。

4. 无定形物质能被次氯酸钾消化，并随消化时间的增加，无定形物质逐渐消失，并在该位置呈现空洞。与此同时，心肌细胞内的胶原纤维、肌纤维 Z 线，以及糖原颗粒和无定形物质一样，同样可被消化，并在原位置呈现空洞。（见图版 I，图 6，7）次氯酸钾能消化蛋白质，这说明电子致密无定形物质是一种蛋白颗粒。

综上所述，可以认为亚急性病人心肌线粒体内含电子致密无定形物质不是磷酸钙，很可能是一种经病变导致变性凝聚的蛋白质。

讨 论

本文对克山病病人心肌线粒体的呼吸酶系（琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶）、能量转换的关键装置—— H^+ -ATP 酶活性等进行了分析，并与非病死亡健康人心肌线粒体的相应指标作了比较。实验结果表明，亚急性病人心肌线粒体无论是呼吸酶系还是 H^+ -ATP 酶活性及其对寡霉素敏感性都遭到明显的损伤。ATP 使线粒体膜量化后膜电位变化的情况与上述结果也是吻合的。从线粒体膜脂流动性的测试结果来看，亚急性病人心肌也明显低于非病对照。根据碰撞假说（Collision hypothesis）膜的流动性对线粒体的电子传递与氧化磷酸化偶联均有很明显的影晌^[21]，因此这些结果也都是

有联系的。综上所述,本文通过多项指标的测试都反映克山病病人心肌线粒体的明显损伤。很有趣的是,与亚急性相比,慢克病人心肌线粒体各项功能的损伤情况都比较轻,这也可能是一种代偿性的结果。

克山病病区一般都系低硒地带,实验证明,在克山病病区的粮食或食盐中补以亚硒酸钠就能明显降低发病率^[22,23]。从亚细胞、分子水平来深入探讨硒的这种预防作用显然是很有趣的。本文分析比较了克山病病人与非病死亡健康人心肌线粒体硒的含量,结果表明,亚急性病人心肌线粒体硒含量仅为非病对照组的12.5%左右,而慢克病人心肌线粒体硒含量也明显低于对照,前者仅为后者的1/2,但它比亚急性病人高1.5倍左右。大骨节病也广泛分布于低硒地区,我们曾报道大骨节病病人红细胞及红细胞膜含硒量都明显低于对照^[13],在离体情况下,亚硒酸钠有明显防止红细胞因“老化”而导致溶血的作用^[24],它能稳定红细胞膜骨架,防止收缩蛋白(Spectrin)从膜上解离下来^[25]。克山病病人心肌线粒体含硒量明显低于非病对照,这与线粒体功能损伤有否内在的联系?硒是否对线粒体膜也具有稳定作用,这都是很有趣而值得深入探讨的问题。

一般认为,心脏病可能与心肌细胞的Ca超负荷有联系,从本文分析克山病病人心肌线粒体Ca、Mg的含量来看,克山病病人的Ca含量明显高于非病对照。Ca对细胞代谢的重要性是大家所熟知的,因而它的跨膜运送、调控都是当前活跃的研究领域,线粒体是细胞内“Ca库”之一,它对调节细胞内Ca浓度具有十分重要的作用,所以,克山病病人心肌线粒体

功能异常与心肌线粒体Ca含量增高有否内在的联系,这都是需要进一步研究的,很可能这对于克山病病变过程的阐明会有较大的作用。

过去曾有报道,急性克山病病人心肌线粒体内含有电子致密颗粒,认为是磷酸钙的沉淀物^[26],Jenning等人^[27,28]用动物模拟急性缺血心肌实验指出,线粒体电子致密内含物包括两类,一种是变性脂、蛋白质凝聚物,另一种是颗粒状或针状的含钙积聚物。本文对亚急性、慢克病人心肌线粒体电镜观察的结果,除表明它们的超微结构都有明显损伤外,也观察到线粒体内含有无定形电子致密物质,经电镜X射线微区分析和次氯酸钾消化等方法验证,认为很可能是经病变导致的线粒体蛋白质的凝聚物,但没有观察到颗粒状和针状含钙的线粒体内含物。这一结果与Kawamura^[29]用活检方法测定心肌梗塞病人的心肌线粒体电子致密内含物的报道结果一致。至于我们的结果与以前急性克山病报道结果的差异,可能与克山病类型的不同有关。看来,进一步研究克山病病人心肌细胞与心肌线粒体Ca的代谢、调控、运送有否异常的问题还是很重要的。如果发生异常,它们与低硒和线粒体功能损伤又有什么内在的联系?这都有待于工作的进一步深入,有关研究正在进行中。

综上所述,根据我们多指标的测定结果,并结合兄弟单位病理^[6]、生化^[10]的研究结果,一致说明克山病患者心肌线粒体发生了明显的损伤与异常。有关线粒体与疾病的研究1962年已经开始,近年来这方面的工作逐渐增多。例如日本名古屋大学医学部最近研究肌肉病病人的骨骼肌线粒体,发现不仅细胞色素C氧化

酶,而且复合体 I 与 II 等膜蛋白的功能都呈现异常^[2,3]。有些学者将肌细胞线粒体发生异常的疾病称之为“线粒体肌病”。根据克山病患者心肌细胞线粒体结构与功能方面呈现如此广泛与明显的异常,可以将克山病称之为“心肌线粒体病(Mitochondrial Cardiomyopathy)”。这使我们对于克山病发病机理的了解又深入了一步,也为克山病的监测、诊断和预防提供了新的依据。

摘 要

亚急性克山病人心肌线粒体内膜电子传递链的琥珀酸氧化酶系,琥珀酸脱氢酶和细胞色素氧化酶活性明显低于对照。 H^+ -ATP 酶的活性及其对寡霉素敏感性都明显下降。ATP 能量化后线粒体膜电位的变化也比对照明显降低。膜脂流动性低于对照。亚急性克山病人心肌线粒体内观察到较多的电子致密无定形物质,经电镜 X 射线微区等方法分析,认为这些物质不是 $Ca_3(PO_4)_2$,而可能是一种蛋白质聚集体。此外,心肌线粒体的钙含量远低于对照,而 Ca 含量明显高于对照。上述结果都反映亚急性克山病人心肌线粒体明显损伤。根据克山病患者心肌细胞线粒体结构与功能方面呈现的如此广泛与明显的异常,可将克山病称为“心肌线粒体病(Mitochondrial Cardiomyopathy)”。

参 考 文 献

- [1] Carafoli, E., I. Roman, 1980, Mitochondria and Disease. *Mol. Aspects Med.*, 3: 295—495.
- [2] Tanaka, M., M. Nishikini, T. Ozawa, S. Miyabashi and K. Tada, 1986, Lack of Subunit II of Cytochrome C Oxidase in
- A Patient with Mitochondrial Myopathy. (Private communication)
- [3] Tanaka, M., M. Nishikini, H. Suzuki, T. Ozawa, E. Okino and H. Takahashi, 1986, Multiple cytochrome Deficiency and Deteriorated Mitochondrial Polypeptide Composition in Fatal Infantile Mitochondrial Myopathy and Renal Dysfunction. (Private communication)
- [4] Morgan-Hughes, J. A., 1986, The Mitochondrial Myopathies. in "Myology" (A. G. Engel and B. C. Banker, eds) pp 1709—1743, McGraw Hill Book Co., New York
- [5] 王凡, 1984, 克山病发病机理的研究。《中国医学科学杂志》, 天津科学技术出版社 159—166 页
- [6] 李相忠, 王孝铭, 李红, 辛淑敏, 李富华, 吴振铎, 1981, 急性克山病心肌病变性质及其发病学探讨。《中华心血管病杂志》, 9: 104—108.
- [7] 王克烈, 郭树范, 1982, 克山病心肌线粒体的病理变化。第三次全国克山病病理及发病机制专题会议论文集, 16—18 页
- [8] 白秀起, 戴玉平, 邹自洁, 1984, 云南楚雄地区尸检克山病人心肌呼吸酶活性测定。白求恩医科大学学报副刊, 心肺生化化学论文集, 115—116.
- [9] 楚雄克山病综合考察病理学工作组, 1986, 楚雄克山病综合考察病理学研究进展。云南楚雄克山病综合考察总结会议文件, 云南, 昆明
- [10] 楚雄克山病综合考察生化工作组, 1986, 克山病发病机理研究的新进展。云南楚雄克山病综合考察总结会议文件, 云南, 昆明
- [11] 中国科学院生物物理研究所线粒体研究小组, 1980, 《线粒体的分离与活性测定》, 2—3 页
- [12] 杨福愉, 黄芬, 林治尧, 张克, 史宝生, 傅一工, 李生广, 孙瑞, 陈建文, 张洪萍, 郭管奇, 沃维汉, 张日清, 邢青如, 陈文安和周建, 1981, 永寿大骨节病患儿红细胞膜的变化。《永寿大骨节病科学考察文集》, 366—371, 人民卫生出版社 北京
- [13] Estabrook, R. W., 1967, Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurement of ADP:O Ratios. *Methods in Enzymol.*, 10: 41—47.
- [14] In-cheol, Kim and Diana, S. Beattie, 1973, Formation of the yeast Mitochondrion

- drial Membrane I. Effects of Inhibitors of Protein Synthesis on the Kinetics of Enzyme Appearance during Glucose De-repression. *Eur. J. Biochem.* 35(2), 509-518.
- [15] Lucile Smith, 1955, Spectrophotometric Assay of Cytochrome C Oxidase. *Methods of Biochemical Analysis*, 2, 427-434.
- [16] 杨韶瑜, 邢青如, 王淑淑, 1980, 玉米线粒体抗氰化物氧化的研究—— α -酮戊二酸和琥珀酸氧化对氰化物敏感性的比较. *中国科学*, 1, 60-66.
- [17] 李生广, 孙珊, 1983, 利用分光光度法测定 ATP 酶水解活力. *生物化学与生物物理进展*, 6, 70-71.
- [18] Robertson, D. E. and H. Rottenber, 1983, Membrane Potential and Surface Potential in Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 258, 11039-11048.
- [19] Hayst, N. A., 1980, "X-Ray Microanalysis in Biology", University park Press, U. S. A.
- [20] Chandlen, J. A., 1979, "X-Ray Microanalysis in the Electron Microscope", University park press U. S. A.
- [21] Slater, E. C., J. A. Berdan and M. A. Herweijer, 1985, A Hypothesis for the Mechanism of Respiratory-chain Phosphorylation not Involving the Electrochemical Gradient of Protons an Obligatory Intermediate. *Biochim. Biophys. Acta*, 811: 217-231.
- [22] Xiaoshu Chen, Xuccun Chen, Guangqui Yang, Zhimei Wen, Junshi Chen and Keyou Ge, 1980, Relation of Selenium Deficiency to the Occurrence of Keshan Disease, in "Selenium in Biology and Medicine", (Eds. Spallholz, J. E. et al) 171-175.
- [23] 杨光沂, 1981, in Third Intern. Symp. on Se in Biology and Medicine., Beijing (in press)
- [24] 杨韶瑜, 洪维汉, 1986, 硒与红细胞膜的研究——I. 硒对红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性和流动性的影响. *中国科学 B 辑*, 4, 396-400.
- [25] 洪维汉, 杨韶瑜, 1986, 硒与红细胞膜的研究——II. 硒对红细胞膜的保护作用. *中国科学 B 辑*, 4, 401-407.
- [26] 洪涛主编, 1980, 线粒体的超微结构超微病理. 《生物医学超微结构与电子显微镜技术》337-344, 科学出版社, 北京.
- [27] Jennings, R. B. and C. E. Ganote, 1974, Structural Change in Myocardium during Acute Ischemia. *Circ. Res.* 34-35 (Suppl III), 156-172.
- [28] 田村公一, 斯淑刚, 1983, 缺血时的心脏显微结构. *病理学*, 10(6), 815-821.
- [29] Kawamura, K., M. J., Cowley, R. B. Karp, J. A. Mantle, J. R. Logic, W. J. Rogers, R. O. Russell, C. E. Rackley JR., and T. N. James, 1978, Intramitochondrial Inclusion in the Myocardial Cells of Human Hearts with Coronary Disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 10: 797-811.

KESHAN DISEASE—A KIND OF “MITOCHONDRIAL CARDIOMYOPATHY”

Yang Fu-yu Lin Zhi-huan Li Sheng-guang Guo Bei-qi Ying Yun-shu Xing

Qing-ru Wang Shu-ya Chen Wen-wen Sun Shan Wo Wei-han

Zhang Ke Zhang Ying and Shi Bao-sheng

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing, CHINA)

ABSTRACT

Keshan disease (KD) is an endemic primary cardiomyopathy in certain areas of China, characterized by severe deterioration, multiple focal necrosis. In the present paper abnormalities of the structure and function of myocardial mitochondria from patients with subacute KD were examined.

Activities of succinic dehydrogenase, succinic oxidase, cytochrome oxidase, H^+ -ATPase as well as its sensitivity to oligomycin and the change of membrane potential resulting from energization by ATP were significantly lowered in patient myocardial mitochondria than that of the control mitochondria. However, the spectrum of reduced minus oxidized cytochromes in patient mitochondria showed no obvious difference in the content of cytochrome oxidase. Obtained results also showed a markedly decrease in lipid fluidity of

patient mitochondria. In addition, a higher amount of moderately electron-dense amorphous inclusions was observed in the mitochondria from patients with KD. Electron microscopic x-ray microanalysis and protein digestion test demonstrated that these are not $Ca_3(PO_4)_2$, but may be a kind of coagulated protein particles.

A markedly lower Se and higher Ca content were found in the patient mitochondria than that of the control.

Results also indicated that the defects in myocardial mitochondria from the chronic KD patients were less extensive than those in mitochondria of patients with subacute KD.

Based on the above results, it seems not inappropriate to denote the Keshan disease as a kind of 'mitochondrial cardiomyopathy'.

Key words: Keshan disease, Mitochondrial cardiomyopathy.

图 版 说 明

图 版 I

- 图 1 亚急性克病人心肌线粒体。线粒体内大量呈现大的电子致密无定形物质(见箭头标处)。×19,000
- 图 2 非病对照心肌线粒体。部分线粒体内呈现很小的电子致密无定形物质(见箭头标处)。×25,000
- 图 3 未经染色的线粒体内含物。图 1 中的电子致密无定形物质在未经染色条件下呈现低的电子密度。×19,000
- 图 4 亚急性克病线粒体内含物的 X 射线微区分析谱。用 X 射线微区分析亚急性克病人心肌线粒体内电子致密无定形物质, 没有获得 Ca 峰, 但测得固定剂的 Os 峰和包埋介质的 Cl 峰。
- 图 5a 含有磷酸钙的标准样品的超薄切片电子显微照片。×20,000
- 图 5b 含磷酸钙标准样品的 X 射线微区分析谱。用 X 射线微区分析标准样品呈现小而明显的 Ca 峰和 P 峰。
- 图 6 用次氯酸钾消化后的亚急性克病人心肌细胞的线粒体。超薄切片经次氯酸钾浸泡处理 2 分钟后, 亚急性克病人心肌线粒体内电子致密无定形物质被消化, 并呈现空洞。×9,000
- 图 7 用次氯酸钾消化后的亚急性克病人心肌细胞。经次氯酸钾浸泡消化 1 分钟后, 亚急性克病人心肌线粒体内的胶原纤维、肌纤维的 Z 线, 糖原颗粒和电子致密无定型物质均被消化, 不呈现电子密度。×6,000

EXPLANATION OF FIGURES

PLATE I

- Fig. 1. Mitochondria in the myocardial cells of the subacute Keshan disease patients. Mitochondria exhibit many moderately electron-dense amorphous inclusions which are large in size (arrow). ×19,000
- Fig. 2. Mitochondria in the myocardial cells of normal human heart. Mitochondria exhibit a few moderately electron-dense amorphous inclusions which are tiny in size (arrow). ×25,000
- Fig. 3. Intramitochondrial inclusions in an unstained ultrasection of the myocardial tissue. The moderately electron-dense amorphous inclusions of figure 1 exhibit low electron-density in this figure. ×19,000
- Fig. 4. Summed x-ray spectra of intramitochondrial inclusion. No peak of calcium is detected on moderately electron-dense amorphous inclusion in the myocardial cells of the subacute Keshan disease patient by x-ray microanalysis, and Os peak from the fixative and Cl peak from the embedding medium are detected on the same site.
- Fig. 5a. Photograph of the ultrasection of standard sample containing calcium phosphate. ×20,000
- Fig. 5b. Summed x-ray spectra of standard sample containing calcium phosphate. Standard sample (arrow in figure 5a) exhibit small but obvious Ca and P peaks.
- Fig. 6. Mitochondria of the myocardial cells of the subacute Keshan disease patient after potassium hypochlorite digestion. Some cavities appear in the sites of the moderately elec-

tron-dense amorphous inclusions, after the ultrasection of the myocardial cells of subacute Keshan disease patient is treated with potassium hypochlorite for two minutes. $\times 9,000$

- Fig. 7. Myocardial cells of the subacute Keshan disease patient after potassium hypochlorite digestion. Treating the ultrasection with potassium hypochlorite for a minute, all the collagen fibrils, Z bands on myofibrils, glycogenosomes and moderately electron-dense amorphous inclusions of the myocardial cells are digested and thus appearing no electron-density. $\times 6,000$

.....

.....

图 版 I

