

不同海拔地区牦牛肌组织线粒体 T-AOC 的测定

李生芳, 杨雪梅, 李莉 (1. 青海大学农牧学院, 青海西宁 810016; 2. 甘肃省兰州市红古区农林局动物检疫站, 甘肃兰州 730084)

摘要 [目的] 为从细胞分子水平进一步探讨牦牛高原低氧适应性的生物学机制及其高原疾病的诊断提供理论依据。[方法] 对青海省玛多县和刚察县成年牦牛的心肌、骨骼肌线粒体总抗氧化能力(T-AOC)进行测定。[结果] 玛多县牦牛心肌、骨骼肌线粒体的T-AOC分别为 28.94 ± 5.11 和 17.86 ± 5.98 U ng 蛋白, 均显著高于刚察县牦牛。在高原低氧环境下, 随着海拔高度的增加, 牦牛心肌、骨骼肌线粒体T-AOC显著增加。玛多牦牛心肌线粒体的T-AOC显著高于骨骼肌, 且差异显著($P < 0.05$), 而刚察牦牛的心肌、骨骼肌线粒体的T-AOC差异不显著($P > 0.05$)。[结论] 牦牛具有对高原低氧环境的显著适应性。

关键词 牦牛; 线粒体; T-AOC

中图分类号 S823.8+5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06828-01

Determination of Mitochondria T-AOC in the Muscle Tissues of Yak in Different Altitude Regions

LI Shengfang et al (College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract [Objective] The research aimed to provide the theoretical basis for further study on the biological mechanism of the adaptability of yak to hypoxia in plateau and the diagnosis of its plateau diseases. [Method] Total antioxidant capacity (T-AOC) of mitochondria in cardiac muscle and skeletal muscle of adult yak in Maduo county and Gangcha county of Qinghai province were determined. [Result] T-AOC of mitochondria in cardiac muscle and skeletal muscle of adult yak in Maduo county were (28.94 ± 5.11) and (17.86 ± 5.98) U ngprot resp., significantly higher than that in Gangcha county. Under hypobaric hypoxia environment of plateau, T-AOC of mitochondria in cardiac muscle and skeletal muscle of yak were significantly increased with the increasing of altitude height. T-AOC of mitochondria in cardiac muscle of yak in Maduo county was significantly higher than that in skeletal muscle, with significant difference ($P < 0.05$). While T-AOC of mitochondria in cardiac muscle and skeletal muscle of yak in Gangcha county had no significant difference ($P > 0.05$). [Conclusion] Yak had a significant adaptability to hypobaric hypoxia environment of plateau.

Key words Yak; Mitochondria; T-AOC

生物体内的抗氧化剂主要由两大类物质组成, 一是抗氧化酶类; 二是非酶类抗氧化剂。该体系的抗氧化作用主要通过以下3条途径来实现: 消除自由基和活性氧以免引发脂质过氧化; 分解过氧化物, 阻断过氧化链; 去除起催化作用的金属离子。而总抗氧化能力(Total Antioxidant Capacity, T-AOC)是反映机体酶促及非酶促体系总抗氧化水平高低的主要指标。有关运动与自由基及抗氧化体系的研究较多, 但对高原土生动物牦牛在不同程度低氧环境中适应性调节的研究甚少^[1]。线粒体是细胞进行生物氧化和能力转换的主要场所, 也是氧自由基损伤的主要目标, 为了从细胞分子水平进一步探讨牦牛高原低氧适应的生物学机制及为高原疾病的诊疗提供理论依据, 笔者对不同海拔地区的牦牛心肌、骨骼肌线粒体中T-AOC进行了测定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试动物。来自西宁乐家湾屠宰场经过长途运输待宰的玛多县(海拔4300 m左右, 年平均气温-4.1)、刚察县(海拔3300 m左右, 年平均气温-0.6)成年牦牛各10头。屠宰后分别采取心肌和骨骼肌组织, 编号并冷藏保存备用。

1.1.2 仪器及试剂。UV-1601 紫外线分光光度计(SHIMADZU公司)、电子天平(瑞士产AB204-E)、普通离心机(北京医用离心机厂LD4-2)、低温离心机、超声波、恒温水浴锅(KS648), 所用化学试剂均为国产分析纯试剂。T-AOC测定试剂盒、考马斯亮蓝测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所(批号:20051028)。

1.2 方 法

1.2.1 样品制备和线粒体提取。取出样品自然解冻后, 用

滤纸吸干外部残血, 称取1.0 g于研钵中, 加入4 mL生理盐水9 mL, 制备成浓度10%的组织匀浆; 取浓度10%的组织匀浆用普通离心机以1000~2000 r/min离心10 min; 弃沉淀取上清液以8000~10000 r/min(低温高速离心机)离心15 min。沉淀物为线粒体, 供组织线粒体中T-AOC的测定。

1.2.2 测定方法。T-AOC的测定按照试剂盒说明书操作, 线粒体中蛋白质的测定用考马斯亮蓝法。

1.2.3 数据处理。测定结果用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间进行t检验。

2 结果与分析

表1表明, 玛多牦牛心肌和骨骼肌线粒体中T-AOC显著高于刚察牦牛($P < 0.05$), 其主要原因是高海拔地区由于氧

表1 不同海拔高度牦牛肌组织线粒体中T-AOC的测定结果

U ng 蛋白 Protein

Table 1 Content of T-AOC in mitochondria of Yaks muscular tissue at different altitudes

组别 Group	心肌 Myocardium		骨骼肌 Skeletal muscle	
	$\bar{x} \pm s$	范围	$\bar{x} \pm s$	范围
玛多牦牛 Maduo yak	28.94 ± 5.11 c	21.25 ~35.85	17.86 ± 5.98 b	7.48 ~26.41
刚察牦牛 Gangcha yak	7.07 ± 6.01 a	2.02 ~21.70	8.09 ± 4.80 a	3.58 ~18.62

注: 各组牦牛均为10头, 不同小写字母表示组间差异显著。

Note: There are 10 yaks in each group. Different lowercases in the same column mean significant differences.

分压低和血饱和度的减少, 使机体在低氧诱导下T-AOC增强, 这一结果与史福胜^[1]报道的结果相一致, 在低氧环境下, 随着海拔高度的升高, 血液和组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性显著增加。在正常情况下, 体内自由基产生和清除处于动态平衡中, 但当机体在高海拔缺氧和强辐射等条件下, 体内自由基浓度升高, 对机体组织的毒害加重, 而与自由基有

作者简介 李生芳(1963-), 女, 藏族, 青海湟原人, 畜牧兽医助理师, 从事畜牧兽医临床工作。

收稿日期 2008-04-07

(下转第6832页)

表5 重复性实验

Table 5 Repeatability experiment

样品编号 No. of samples	还原糖测定值 Determined value of reducing sugar mg/ml					标准差 Standard deviation	平均值 Average	变异系数 Variation coefficient
1	0.697 8	0.731 9	0.724 1	0.708 6	0.712 7	0.013 0	0.715 0	0.018 6
2	0.703 7	0.714 5	0.727 9	0.725 1	0.733 6	0.011 9	0.721 0	0.016 5
3	0.706 9	0.696 4	0.731 5	0.719 9	0.724 8	0.014 1	0.715 9	0.019 8
4	0.719 1	0.698 0	0.726 3	0.731 2	0.701 7	0.014 8	0.715 3	0.020 0
5	0.707 0	0.718 1	0.731 7	0.730 4	0.716 8	0.010 3	0.720 8	0.014 3

法,因为操作简单、灵敏度高、线性好被广泛用于葡萄糖等还原糖检测,但用于测定D-半乳糖醛酸则比较少见。

通过单因素实验探索,利用3,5-二硝基水杨酸法测定D-半乳糖醛酸含量的最佳测定条件为:波长540 nm、 $V_{DNS}/V_{总体系}=4/8$,反应温度100℃,反应时间5 min,最佳测定时间60 min内。该条件下可以准确测定的D-半乳糖醛酸范围为0.5~1.1 mg/ml,反应建立的方程 $y=1.0226x-0.2784$,相关系数 $r=0.9997$,样品平均回收率99.96%,统计方法表明该方程显著存在。多次实验验证,该方法测D-半乳糖醛酸含量时操作简便、准确度高、重复性好。

参考文献

- [1] 宋志军,纪重光.现代分析仪器与测试方法[M].西安:西北农业大学出版社,1995:195-196.
[2] 宋占午,王莱,刘艳玲.3,5-二硝基水杨酸测定还原糖含量的条件探讨

[J].西北师范大学学报:自然科学版,1997,33(2):52-55.

- [3] 王琳,刘国生,王林嵩,等.DNS法测定纤维素酶活力最适条件研究[J].河南师范大学学报:自然科学版,1998(3):66-69.
[4] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生物化学实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1987.
[5] 管斌,丁友慰,谢来苏,等.还原糖测定方法的规范[J].无锡轻工大学学报,1999(3):74-79.
[6] 齐香君,苟金霞,韩戎,等.3,5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究[J].纤维素科学与技术,2004(3):17-19.
[7] 胡锡阶,肖建辉,肖瑜,等.3,5-二硝基水杨酸比色法定糖的条件优化[J].遵义医学院学报,2005(1):9-11.
[8] 赵春玲,王秀霞,李琼.3,5-二硝基水杨酸比色法测定废烟草中总糖[J].湖北工业大学学报,2006(6):62-65.
[9] 王文玲,黄雪松.DNS法测定木糖含量时最佳测定波长的选择[J].食品科学,2006,27(4):196-198.
[10] 尹银嘉,魏士超,马宝瑕.3,5-二硝基水杨酸法测二味康口服液多糖的含量[J].中国医院药学杂志,2008(7):414-416.
[11] 张树政.分析化学[M].北京:人民教育出版社,1998:495-496.
[12] 武汉大学.分析化学[M].北京:高等教育出版社,2000:232.

(上接第6828页)

关的线粒体又是氧自由基损伤的主要目标。细胞生命活动所需能量的80%由线粒体提供。线粒体是合成三磷酸腺苷(ATP)的主要场所^[2]。宋玲等报道,模拟高原缺氧对机体影响的细胞机制以及线粒体功能改变在机体对缺氧习服-适应的研究中发现,线粒体琥珀酸脱氢酶及细胞色素氧化酶在缺氧一定时间发生代偿性的活性增强,可能与心肌乃至机体缺氧的习服-适应有关,但慢性缺氧对线粒体功能的影响有随缺氧时间延长而加重的趋势^[3]。而高原世居动物对低氧适应并不太依赖于器官功能的变化,更重要的是通过对细胞代谢的调整和许多抗低氧因子诱导从分子水平上来适应高原低氧环境^[4]。据魏登邦等^[5]报道,高原鼯鼠心肌、骨骼肌中浆膜腔液乳酸脱氢酶(LDH)活性显著低于小白鼠,表明高山动物有氧代谢增强,对无氧糖酵解的依赖性降低了。

3 结论与讨论

(1) 线粒体是细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所,在正常状态下,大约有2%~3%的氧被从线粒体电子传递链中漏出的电子还原成超氧阴离子,并经过歧化作用产生过氧化氢^[6-7]。线粒体是体内氧自由基的主要来源之一,在生理条件下,线粒体内存在着有效的抗氧化机制。已有研究资料表明^[8],高海拔地区的低气压与低氧分压是一个主要的生态因子,机体在低氧的诱导下具有很强的抗氧化能力,此外,在运动中组织相对缺氧和无氧代谢加强也是自由基产生的一个因素^[9]。试验结果显示,随着海拔高度的增加,牦牛心肌、骨骼肌线粒体T-AOC显著增加,表明高

原土生动物对低氧适应除了主要依赖于血液学特征和肺组织形态学特征,还依赖组织适应,即建立在细胞线粒体功能结构、酶学、有氧与无氧代谢供能系统等一系列组织生理学的细胞分子水平上。

(2) 试验结果显示,玛多牦牛心肌线粒体的T-AOC显著高于骨骼肌,而刚察牦牛的心肌、骨骼肌线粒体的T-AOC差异不显著($P>0.05$)。在正常生理条件下,心肌线粒体抗氧化酶活性的增加反映出心肌氧化应激的增强,一方面这些抗氧化酶的底物 O_2 和 H_2O_2 激活了抗氧化酶;另一方面,机体可能存在对外界环境应激等因素适应性的调节^[10],其机理有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 史福胜.青海玛多和循化牦牛血浆及组织SOD活性的研究[J].青海大学学报,2004,22(2):48-50.
[2] 刘戎,宣昭林.活性氧、线粒体与细胞凋亡[J].中国地方病防治杂志,2005,20(5):285-288.
[3] 宋玲,孙秉庸,张国斌.模拟高原缺氧不同时间对大鼠心肌线粒体功能的影响及其在习服-适应中的意义[J].高原医学杂志,1999,9(3):9-12.
[4] 周兆年,王利华,袁锋.长期居住海平面后藏族经受急性减压低氧时的心泵和呼吸功能[J].科学通报,1992(3):269-271.
[5] 魏登邦,马建宾.高原鼯鼠和小白鼠心肌及骨骼肌肌红蛋白含量与乳酸脱氢酶活性的比较研究[J].青海大学学报,2001,19(2):20-21.
[6] CHANP H. Role of oxidants in ischemic brain damage [J]. Stroke, 1996, 27: 1124-1129.
[7] CADENAS E, DAMES K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging [J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29: 222-230.
[8] 吕永达.高原医学与高原生理学[M].天津:天津科技翻译出版社,1995:112-113.
[9] YU B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species [J]. Physiol Rev, 1994, 74(1):139-162.
[10] J.L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging [J]. Med Sci Sports Exerc, 1993(59):225-231.