

[文章编号] 1000-4718(2008)04-0755-04

急性重复低氧对小鼠脑组织血氧饱和度、 线粒体功能以及 ATP 水平的影响*

谢胜男^{1,2}, 李昕¹, 李尧华¹, 刘耀波², 于顺^{1,2,△}(首都医科大学宣武医院¹老年病研究所神经生物学研究室,²低氧医学研究所,北京 100053)

[摘要] 目的:探讨急性重复低氧对脑组织血氧饱和度与线粒体功能的影响。方法:将 BALB/c 小鼠置于低氧密闭罐中,通过小鼠呼吸消耗罐内氧造成罐内低氧,以小鼠出现喘呼吸为低氧耐受极限,然后将小鼠转到另一低氧密闭罐中,依此类推,连续进行 5 次低氧。记录小鼠每次的缺氧耐受时间、局部脑组织血氧饱和度,测定每次低氧暴露结束时的脑组织的线粒体复合体 I 活性和 ATP 含量。结果:小鼠的缺氧耐受时间随缺氧暴露次数增加而显著延长。脑组织血氧饱和度在第 1、2 次缺氧暴露时急剧下降,但在第 3、4、5 低氧暴露时先小幅度下降再逐渐恢复至正常水平,然后再缓慢降低。脑组织线粒体复合体 I 的活性随着缺氧次数的增加逐渐被抑制,ATP 含量在第 1 次低氧暴露结束时低于正常水平,在第 3、5 次低氧暴露结束时高于正常水平。结论:急性重复低氧导致脑组织血氧饱和度降低的速度减慢、线粒体功能抑制以及脑组织 ATP 水平增高,后者很可能是动物脑组织耐缺氧能力增强的重要机制。

[关键词] 低氧;小鼠;脑;线粒体;氧饱和度

[中图分类号] R338 [文献标识码] A

Effects of repeated hypoxic exposures on saturation oxygen, mitochondrial function and ATP levels in the mouse brain

XIE Sheng-nan^{1,2}, LI Xin¹, LI Yao-hua¹, LIU Yao-bo², YU Shun^{1,2}(¹Department of Neurobiology, Beijing Institute of Geriatrics, ²Institute for Hypoxia Medicine, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China. E-mail: yushun103@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effects of repeated hypoxic exposures on saturation oxygen and mitochondrial function in the brain. **METHODS:** A BALB/C mouse was placed in an air-sealed jar and hypoxic environment in the jar was established through consumption of the oxygen by respiration of the mouse. A gasp breath was regarded as the hypoxic tolerant limit of the mouse. The mouse was then transferred to a new jar. The mouse was exposed to hypoxia in this way for 5 times. In each run of hypoxic exposure, the hypoxic tolerance time, local brain saturation oxygen was measured. By the end of each hypoxic exposure, the mitochondrial complex I activity and ATP levels in the brain were also examined. **RESULTS:** The hypoxic tolerant time of a mouse increased during repeated hypoxic exposures. The saturation oxygen in the brain declined quickly during the first two hypoxic exposures, but recovered to the normal levels after a short fall during the third to fifth hypoxic exposures. The mitochondrial complex I activity decreased during repeated hypoxic exposures. The ATP levels declined by the end of the first hypoxic exposure, but increased by the end of the third and fifth hypoxic exposure. **CONCLUSION:** Repeated hypoxic exposures lead to increased oxygen saturation and ATP levels but decreased mitochondrial function. The increased ATP levels may be responsible for the increased hypoxic tolerance of the mouse brain.

[KEY WORDS] Anoxia; Mice; Brain; Mitochondria; Oxygen saturation

以往的工作表明,给小鼠进行急性重复低氧暴露,可以降低小鼠的代谢率,表现为体温降低、氧耗量和二氧化碳生成率减少,而动物对低氧的耐受能力却明显增强^[1]。机体利用氧主要是用于葡萄糖的有氧化以产生三磷酸腺苷(ATP),从而为机体提供能量,这一过程发生在线粒体。因此,氧耗量的降

[收稿日期] 2007-02-10 [修回日期] 2007-11-19

* [基金项目]北京市自然科学基金重大项目(No. 7050001)

△通讯作者 Tel:010-83198890;E-mail:yushun103@yahoo.com.cn

低提示线粒体功能发生变化。此外,ATP水平的变化是决定组织细胞在缺氧条件下能否生存的关键^[2]。为了证明重复低氧暴露小鼠能量代谢的变化及其与耐缺氧能力之间的关系,我们对小鼠在重复低氧暴露过程中对缺氧最敏感的脑组织的血氧饱和度、线粒体功能以及ATP的含量进行了动态观察。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 实验动物 BALB/c近交系雄性小鼠,6-8周龄,体重18-22g,清洁级动物,由军事医学科学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器 辅酶Q(Sigma);还原型辅酶I(NADH)(Solarbio);抗霉素A(Sigma);ATP检测试剂盒(Promega);BCA蛋白定量试剂盒(Pierce);局部组织血氧饱和度测定仪(Vioptix);DU-800分光光度计(Beckman);临床诊断微孔板式发光仪(伯托公司);其它试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 动物模型的制备及耐受时间的测定 小鼠急性重复低氧暴露模型的制备采用我室已建立的方法进行,详见以前文献描述^[9]。简言之,将动物置于含有新鲜空气、经标定的125mL的密闭罐内,立即以橡皮塞盖紧瓶口并计时,一旦动物出现喘呼吸,立即取出,待小鼠恢复反正反射后,将其放入另一相同容积的密闭罐内,密闭计时,如此重复,根据低氧暴露次数,将小鼠分为H0、H1、H2、H3、H4、H5组,即重复低氧暴露0、1、2、3、4、5次。

2.2 脑组织血氧饱和度的测定

取1只小鼠,去掉头部皮毛,将电极固定到头部皮肤上,然后把小鼠放入密闭罐中,盖紧橡皮塞,使小鼠进行重复低氧暴露,用局部组织血氧饱和度测定仪记录小鼠在各次低氧暴露过程中脑组织局部血氧饱和度的动态变化情况。

2.3 线粒体复合I的活性测定

① 提取线粒体 将40只小鼠随机分成4组,每组10只,命名为H0、H1、H3、H5组,分别进行0次、1次、3次和5次低氧暴露。当小鼠达到耐受极限时立即拿出,脱臼处死,取全脑,按照1/5(W/V)的比例加入提前冰上预冷的线粒体分离液(MIB, Sucrose 0.32 mol/L, EDTA-K⁺ 1 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L),用Per-coll密度梯度差速离心法提取线粒体^[6],最后再用20 μL线粒体呼吸缓冲液(RB, mannitol 300 mmol/L, KH₂PO₄ 10 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L,

pH 7.2)悬浮线粒体沉淀,在检测线粒体复合体I的活性之前,放入-80℃冻存。

② 线粒体复合体I的活性测定 从-80℃取出冻存的线粒体冰上融化,用BCA法蛋白定量,在测定活性之前,使线粒体快速地反复冻融3次,取100 μg线粒体蛋白加入1 mL的反应缓冲液(KCl 110 mmol/L, KH₂PO₄ 5 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, Tris-HCl 20 mmol/L, NaN₃ 3 mmol/L, Antimycin A 1 mg/L, Co-enzymeQ10 0.1 g/L),37℃水浴共同孵育3 min,再加入NADH启动反应(0.1 g/L),然后用紫外分光光度计测定NADH 1 min内在340 nm波长下吸光度(A值)的降低情况^[7]。

2.4 脑组织ATP含量的测定

① ATP的提取 将20只小鼠随机分成4组,每组5只,命名为H0、H1、H3、H5组,分别进行0次、1次、3次和5次低氧暴露。当小鼠达到耐受极限时立即拿出,断髓取全脑,并迅速把全脑投入液氮中,然后放入-80℃冻存。实验前从-80℃取出小鼠全脑,按照1:5(W/V)的比例加入10%(V/V)的冰上预冷的HClO₄,匀浆,45 000 r/min离心10 min,离心后弃沉淀,取500 μL上清混匀,用200 μL 2.5 mol/L的KOH中和,再45 000 r/min离心5 min,取上清备用^[8]。待所有样品准备完毕后,从每个样品中取10 μL,然后用Tris-EDTA(0.1 mol/L Tris-acetate buffer含有2 mmol/L EDTA, pH 7.75)稀释1 000倍,混匀后从中取10 μL准备检测。

② ATP含量的测定 ATP含量测定方法参照ATP检测试剂盒说明书进行,使用仪器为临床诊断微孔板式发光仪。

3 统计学处理

应用SPSS11.5软件进行数据统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间的差异用单因素方差分析法检验。

结 果

1 急性重复低氧暴露对小鼠缺氧耐受时间的影响

小鼠被放入第1个密闭罐后,随着氧气的减少,小鼠的呼吸加快,自主活动减少并且出现发绀,随后出现躁动不安,呼吸加深加快,发绀更加明显,出现痉挛样动作并最终出现喘呼吸。当小鼠第2次被放入密闭罐后,表现和第1次相似,但耐受时间明显延长。以后在第3、4、5次低氧暴露时,小鼠处于安静状态,呼吸深慢而有规律,发绀更明显。随着低氧暴露次数的增加,小鼠耐受时间成倍增加,统计结果显

示,小鼠在第1、2、3、4、5低氧密闭罐中的平均耐受时间分别是(17 ± 2 、 46 ± 6 、 82 ± 16 、 102 ± 15 和 120 ± 13)min,见图1。

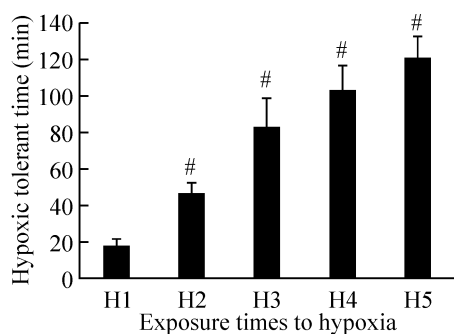


Fig 1 Effect of repeated hypoxic exposures on the hypoxic tolerant time of mice. $\bar{x} \pm s$. $n = 10$. # $P < 0.01$ vs H1. H1 - H5 represents hypoxic exposure times.

图1 重复低氧暴露对小鼠耐缺氧时间的影响

2 急性重复低氧暴露对小鼠脑组织血氧饱和度的影响

通过对重复低氧小鼠脑组织血氧饱和度变化的动态监测,可以看到随着低氧次数的增加,血氧饱和度降低的速度逐渐减慢,在第1、2次低氧暴露过程中,血氧饱和度呈急剧直线下降的趋势,然而第3、4、5次低氧暴露过程中,血氧饱和度先是小幅度降低,约20 min以后又开始逐渐上升并恢复到正常水平,在此水平持续一段时间后,再缓慢降低(图2),在对5只小鼠重复低氧暴露的观察中,脑组织血氧饱和度的变化趋势基本一致。

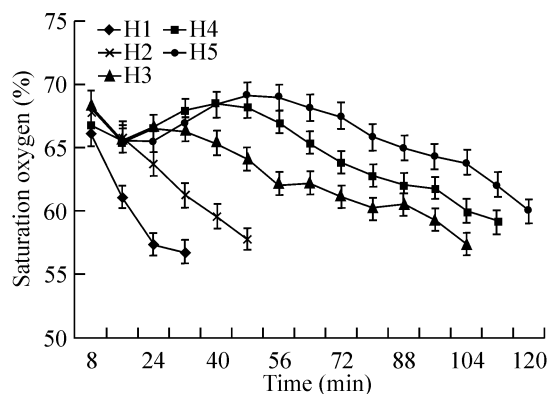


Fig 2 Effect of repeated hypoxic exposures on the saturation of blood oxygen in the mice brain tissue. $\bar{x} \pm s$. $n = 5$.

图2 重复低氧暴露对小鼠大脑组织血氧饱和度的影响

3 急性重复低氧暴露对小鼠脑组织线粒体复合体 I 活性的影响

应用紫外分光光度计,在340 nm的波长下测得从H0组到H5组,每毫克线粒体蛋白每分钟消耗的NADH的量分别为(24.8 ± 4.9 、 20.7 ± 7.5 、 17.4 ± 5.8 、 14.1 ± 3.0) $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ protein,消耗的

NADH的量即可代表线粒体复合体I的活性,可以看到,随着低氧暴露次数的增加,单位时间内消耗的NADH的量逐渐减少,H1和H0组相比,差异无统计学意义,H3、H5组和H0组相比差异显著($P < 0.05$, $n = 10$),见图3,说明在经过急性重复低氧暴露以后,线粒体复合体I的活性逐渐被抑制。

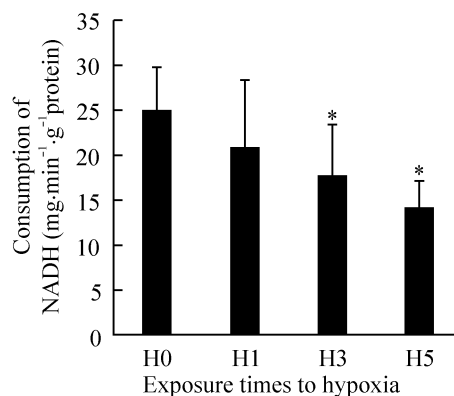


Fig 3 Effect of repeated hypoxic exposures on the activity of mitochondrial complex I in the mice brain. $\bar{x} \pm s$. $n = 10$. * $P < 0.05$ vs H0.

图3 重复低氧暴露对小鼠脑组织中线粒体复合体 I 活性的影响

4 急性重复低氧暴露对小鼠脑组织 ATP 含量的影响

应用临床诊断微孔板式发光仪测得从H0到H5组,样品中ATP的含量分别为(8.21 ± 1.01 、 4.98 ± 0.99 、 14.50 ± 1.72 、 11.78 ± 2.53) $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ protein,小鼠脑组织中的ATP含量在1次低氧暴露以后出现一过性降低,3次低氧暴露以后出现升高趋势,5次低氧暴露以后又有所降低,但仍高于H0组,H1、H3、H5组和H0组相比差异均显著($P < 0.01$, $n = 6$),H5组和H3组相比差异显著($P < 0.05$, $n = 6$),见图4。

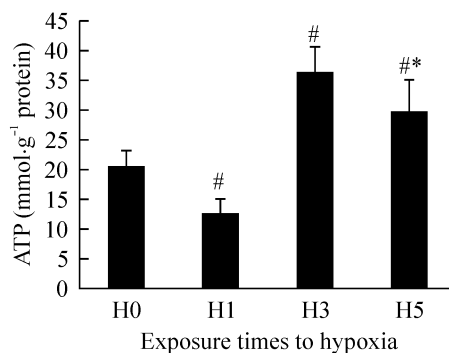


Fig 4 Effect of repeated hypoxic exposures on the amount of ATP in the mice brain. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. # $P < 0.01$ vs H0; * $P < 0.05$ vs H3.

图4 重复低氧暴露对小鼠大脑组织 ATP 含量的影响

讨 论

动脉氧分压主要取决于吸入气体的氧分压和肺的呼吸功能,静脉氧分压主要取决于组织摄取氧的能力。在前2次低氧暴露过程中,随着密闭罐中氧气的减少,小鼠呼吸、心率加快,烦躁不安,组织细胞加强对氧气的利用,动静脉氧分压均急剧下降,表现为血氧饱和度的急剧直线下降。小鼠在经历了2次低氧暴露以后,有可能启动了低代谢代偿机制,降低了组织对氧的需求量,所以,在第3、4、5次低氧暴露过程中,虽然动脉氧分压随着外界氧气的逐渐减少仍不断降低,但在一段时间内,静脉氧分压可以随着低代谢的启动和组织对氧气摄取的降低而逐渐升高,最后随着动脉氧分压的进一步降低再缓慢降低,表现为脑组织血氧饱和度先降低后恢复至正常水平,然后再缓慢降低的过程。

在正常情况下,机体利用氧主要是用于线粒体的有氧氧化。我们的研究表明,重复急性低氧暴露可以降低线粒体复合体I的活性,从而从呼吸链途径抑制有氧氧化的过程,减少了脑组织对氧气的需求量。

线粒体有氧氧化的主要作用是产生三磷酸腺苷(ATP),为机体提供能量,当有氧氧化的过程被抑制时,脑组织ATP的水平将会发生怎样的变化呢?我们的研究表明,脑组织ATP的含量在第1次低氧暴露后出现一过性的降低,第3次低氧暴露后逐渐升高,第5次低氧暴露后又有所回落,但仍高于正常水平。这种变化的原因可能有以下2个。(1)无氧糖酵解的变化。以往研究表明,小鼠在急性重复低氧暴露过程中,脑中GLUT1和GLUT3 mRNA和蛋白表达水平均呈现第3次低氧暴露后升高,第5次低氧暴露后下降的趋势^[9],反映了小鼠脑细胞的葡萄糖代谢呈先升高后下降趋势。在脑内葡萄糖的有氧氧化途径受到抑制的情况下,葡萄糖代谢则主要是通过增强的无氧糖酵解途径来生成ATP为组织提供能量。(2)机体代谢率的降低。在重复低氧暴露以后,机体也可以通过一些机制降低对ATP的需求,例如可以关闭一些ATP依赖性的离子泵以及减少某些蛋白质的合成^[10]。以往在急性重复低氧暴露小鼠所观察到的体温、呼吸频率、心跳明显降低也表明了对能量消耗的减少^[11]。以上脑组织无氧糖酵解的先升高后降低和代谢率的降低都可能是组织ATP水平在一过性降低后先升高再有所回落的原因。

组织在低氧或无氧条件下免受损伤的前提条件是保持组织的ATP处于正常水平^[2],某些新生动物

在持续性的严重低氧和无氧条件下可以通过降低组织的代谢来维持组织ATP水平^[11]。然而,大多数成年动物由于不能在缺氧时有效降低其组织代谢水平,使组织的ATP水平难以维持。因此,其耐受低氧的能力极为有限。本研究的结果表明,不耐受低氧的成年动物在急性重复低氧暴露以后对低氧的耐受时间显著延长,对缺氧最敏感的脑组织ATP的水平比正常水平有所升高,提示ATP水平的升高有可能是小鼠耐低氧能力增强的重要机制。重复低氧暴露以后组织ATP水平升高的具体机制还有待于进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] 吕国蔚,崔秀玉,于 顺,等. 低氧耐受极限与低氧预适应[J]. 中国神经科学杂志,2004,20(5):388-393.
- [2] Philip E, Paul H. Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia[J]. J Exp Biol, 2002, 205 (Pt 23): 3579-3586.
- [3] Lu GW, Liu HY. Downregulation of nitric oxide in the brain of mice during their hypoxic preconditioning[J]. J Appl Physiol, 2001, 91(3): 1193-1198.
- [4] 吕国蔚,史美堂,李 凌,等. 急性重复缺氧对小鼠缺氧耐受性的影响及其机制的初步探讨[J]. 中国病理生理杂志,1992,8(4):425-430.
- [5] Boutilier RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia[J]. J Exp Biol, 2001, 204 (Pt 18): 3171-3181.
- [6] Morin C, Zini R, Simon N, et al. Dehydroepiandrosterone and β -estradiol limit the functional alterations of rat brain mitochondria submitted to different experimental stresses[J]. Neuroscience, 2002, 115(2): 415-424.
- [7] Mildaziene V, Naucience Z, Baniencie R, et al. Multiple effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria[J]. Toxicol Sci, 2002, 65(2): 220-227.
- [8] Khan HA. Bioluminometric assay of ATP in mouse brain: Determinant factors for enhanced test sensitivity[J]. J Biosci, 2003, 28(4): 379-382.
- [9] 方海侠,郭 秒,于 顺,等. 急性重复低氧暴露与小鼠脑内葡萄糖转运体蛋白1,3基因表达及耐受能力[J]. 中国临床康复, 2005, 17(35): 74-76.
- [10] Tinton S, Tran - Nguyen QN, Buc - Calderon P. Role of protein - phosphorylation events in the anoxia signal - transduction pathway leading to the inhibition of total protein synthesis in isolated hepatocytes[J]. Eur J Biochem, 1997, 249(1): 121-126.
- [11] Ismail - Beigi F. Metabolic regulation of glucose transport[J]. J Membr Biol, 1993, 135(1): 1-10.