

辅酶 Q₁₀ 对缺血心肌线粒体功能和形态的影响

王永利 李国义 杨艳 李蕴山 付绍莹 李淑蓉* 刘贵生* 许维桢**

(河北医学院 药理教研组)

辅酶 Q₁₀(CoQ₁₀)参与呼吸链及电子传递,在氧化还原系统中作为可逆的受氢体行使着催化功能。文献报道 CoQ₁₀能保护或改善缺血心肌的功能、代谢和形态^[1],临床用于治疗冠心病、充血性心衰、心肌炎、心律失常等心血管疾病^[2-4]。本文通过观察 CoQ₁₀对缺血心肌线粒体功能和形态的影响,以探讨其保护缺血心肌的作用机制。

材料和方法

本实验所用 CoQ₁₀系山西大同生化制药厂从猪心中提取出的一种带有 10 个戊烯链的醌衍生物,为黄色粉末,难溶于水。实验前用特制溶剂(100 毫升蒸馏水含 2.5 克吐温-80, 5 克葡萄糖)配成 0.25% CoQ₁₀溶液,避光保存备用。

1、心肌缺血模型的制备

实验用家兔 34 只,体重为 2.3±0.3(平均数±标准差)公斤,雌雄不拘,配对分组,每对动物在同一天内进行实验。乌拉坦 1 克/公斤静脉注射麻醉后,气管插管,人工呼吸。经左侧 3—4 肋间开胸,打开心包,暴露左心室,于冠状动脉左室支上 1/3 处穿二根丝线,以备结扎。自颈动脉插管连水银检压计监测动脉血压,记录 II 导程心电图以监测 S-T 段和心率变化。

给药组于结扎冠脉前 60 和 15 分钟各静脉注射 CoQ₁₀(10 毫克/公斤)一次,对照组则于相同时间静脉注射等容积 CoQ₁₀溶剂(4 毫升/公斤)。记录心电图和血压后,结扎冠脉并立即记录心电图和血压,随后每隔 10 分钟记录一次,直至结扎后 60 或 90 分钟结束实验。选择结扎冠脉后 10 分钟内,心电图 S-T 段抬高 0.2 毫伏以上的动物,迅速摘出心脏,在 4℃以下用乐氏液从主动脉灌流心脏,以灌流后心脏的颜色区分缺血区(暗红色)和非缺血区(浅红色),并分别从缺血区和非缺血区取 1.5×1.5×1.5 立方毫米的心肌组织,置于 2.5%戊二醛溶液内固定,用于超薄切片,以备电镜观

察。剩余心肌仍浸在冰冻乐氏液中,置冰箱过夜以备分离线粒体。

2、线粒体的分离:

从冰冻心肌的缺血区和非缺血区各取等量(1—2 克)组织,剪碎,置于玻璃匀浆器内,加入 10 倍量(容积/重量)SET 提取液(含 0.25 克分子蔗糖, 1 毫克分子 EDTA, 1 毫克分子 Tris—HCl 缓冲液, pH 7.4)制备匀浆,每对标本用同样方法制备四份匀浆,然后同时置于日立 20—P 型高速离心机中,以 1300 转/分(200×g)离心 10 分钟,纱布过滤,滤液再以 6500 转/分(5000×g)离心 10 分钟。弃去上清液,将线粒体部分通过匀浆器重新悬浮在 SET 溶液中(10 毫升/每克组织),再 6500 转/分离心 10 分钟,如此洗涤两次^[5]。从最终的线粒体沉积物取一小块(1.5×1.5×1.5 立方毫米),置于 2.5%戊二醛溶液中固定,用于超薄切片,以备电镜观察。将其余线粒体沉积物悬浮在 KEA 溶液(含 0.18 克分子 KCl, 10 毫克分子 EDTA, 0.5% 牛血清白蛋白,以 Tris 调 pH 7.4)中(2 毫升/1 克组织),用于测定线粒体氧化磷酸化功能,并于负染后进行电镜观察。线粒体蛋白浓度用双缩脲方法测定^[6]。以上步骤均在 4℃下进行。

3、线粒体氧化磷酸化功能测定

用瓦勃呼吸器测定以上四份线粒体悬浮液的氧化磷酸化功能^[7]:将 12 个反应瓶置冰盒中,依次在每个反应瓶中央小槽中加入 0.1 毫升 20% KOH 溶液及一块约 2 平方厘米的圆形滤纸,并加 0.2 毫升冷侧管液(24 mM 葡萄糖、5 毫克己糖激酶)至侧管,加 2 毫升冷反应液(70 mM 蔗糖、50 mM KCl、12 mM NaF、0.15 mM NAD⁺、5 mM MgCl₂、0.3 mM EDTA、0.015 mM 细胞色素 C、2.5 mM ATP、1 毫克无机磷、15 mM 柠檬酸钠)至反应瓶底部,其中 4 个反应瓶底部加入 2 毫升无底物反应液(不含 15 mM 柠檬酸钠,其余成

* 河北医学院基础医学研究所电镜室。

** 山西大同医专药理教研组。

分同)。最后在反应瓶底部加入 0.5 毫升线粒体悬浮液(每份线粒体加入三个反应瓶内,两个含底物瓶及一个不含底物瓶)。另取两个反应瓶加入 2.8 毫升蒸馏水及一块约 2 平方厘米的滤纸作为温压计。以上操作时,反应瓶均不离开冰盒。

加入线粒体悬浮液后,迅速把反应瓶固定在检压计上,然后将检压计装到水槽架上,30℃恒温并通氧 5 分钟。调节螺旋使检压计液面下降至 50 毫米处,关闭检压计活塞和反应瓶活塞,往复震摇 2 分钟(100次/分钟),然后调节右管液面至 150 毫米处,读取左管液面读数作为检压计反应前读数。这时关闭震摇开关,小心而迅速将反应瓶侧管液倾入反应瓶中,记录反应开始时间(T_0),重新固定检压计,继续震摇,于 10、20、30 分钟后,按上述步骤读取左管读数。最后迅速在各反应瓶中加入 3 毫升 10% 冷三氯醋酸溶液中中止反应,分别记录各反应瓶反应中止的时间(T_n), T_n-T_0 即为磷酸化时间。

将以上反应混合液以 3500 转/分离心 15 分钟,吸取 0.1 毫升上清液,加 2.9 毫升重蒸蒸馏水和 3 毫升定磷试剂[6 N H_2SO_4 :重蒸蒸馏水:2.5%钼酸铵:10%抗坏血酸=1:2:1:1(体积比),用时新鲜配制,按上述顺序加试剂],摇匀,于 45℃保温 25 分钟,再冷至室温(15 分钟),在 660 nm 处测定光密度。用含底物溶液光密度与无底物溶液光密度之差,从标准曲线上查出磷的微克数,再乘以稀释倍数,即得每毫升样品中的无机磷含量^[8]。计算线粒体 P:O 比值^[7]。用每份线粒体的两个 P:O 比值的平均值进行配对资料 t-检验。

4. 电镜观察

(1) 超薄切片

取上述 2.5%戊二醛溶液固定的心肌组织和线粒体沉积物,脱水后,用环氧树脂-815 包埋,经用 LKB-IV 型超薄切片机切片。

(2) 线粒体悬浮液负染材料制备:

用玻璃毛细管吸取线粒体悬浮液,滴于带膜铜网上,放置 5 分钟,以 2%磷钨酸负染 1.5 分钟,干燥后进行电镜观察。

(3) 电镜观察:

超薄切片和负染材料用日立 H-500 型透射电镜观察,加速电压 75 千伏。

结 果

1. CoQ_{10} 对家兔结扎冠脉前后血压和心率的影响

结果见表 1。

表 1 CoQ_{10} 对家兔冠脉结扎前后血压和心率的影响($\bar{x} \pm SD$)

实验组别	结扎时间 (分)	动物数	血 压 (mmHg)	心 率 (次/分)
对 照 组	0	10	89±16	232±18
	60	10	77±23	189±12**
CoQ_{10} 组	0	10	87±19	230±20
	60	10	80±21	197±17*
对 照 组	0	7	80±14	246±14
	90	7	69±10 ^{an}	207±18**
CoQ_{10} 组	0	7	80±12	234±14
	90	7	55±15 ^{an}	195±23**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$;与结扎前相比较。

^a $p < 0.05$;与^{an}相比较。

冠脉结扎后 60 分钟与结扎前相比,无论 CoQ_{10} 组或对照组,血压均无显著变化,而心率则明显减慢(P 分别 < 0.05 及 0.01),但 CoQ_{10} 组与对照组比较,则无显著差异。

冠脉结扎后 90 分钟, CoQ_{10} 组动物结扎后血压较结扎前显著降低($p < 0.01$),而对照组则无明显差异。在结扎后, CoQ_{10} 组血压较对照组明显为低($p < 0.05$)。心率变化与结扎 60 分钟的动物相似。

2. CoQ_{10} 对线粒体氧化磷酸化功能的影响

线粒体氧化磷酸化功能用 P/O 比值大小表示,结果见表 2。

缺血区线粒体 P/O 比值,无论缺血 60 或 90 分钟, CoQ_{10} 组均显著高于对照组($p < 0.05$)。而非缺血区线粒体 P/O 比值,在缺血 90 分钟时两组间则无显著差异。比较缺血区与非缺血区线粒体 P/O 比值,对照组存在显著差异($p < 0.05$),而 CoQ_{10} 组无显著性。

缺血区与非缺血区 P/O 比值的比率代表线粒体氧化磷酸化效率, CoQ_{10} 组比率显著高于对照组($p < 0.05$)。此外,缺血区 P/O 比值随着缺血时间延长,似呈时间依赖性降低。

3. CoQ_{10} 对线粒体超微结构的影响

无论缺血 60 或 90 分钟,非缺血区线粒体形态在 CoQ_{10} 组和对照组大致相似,即线粒体

表 2 CoQ₁₀ 对线粒体氧化磷酸化功能的影响($\bar{x} \pm SD$)

缺血时间 (分)	实验组别	动物数	线粒体蛋白 (毫克/瓶)	耗氧量 (微克原子)	耗磷量 (微克分子)	P/O	缺血区 P/O 非缺血区 P/O
60	对照组缺血区	10	1.9±0.3	3.1±0.5	5.9±2.1	1.9±0.4	
	CoQ ₁₀ 组缺血区	10	2.1±0.2	3.9±0.3	8.7±2.0	2.3±0.6*	
90	对照组缺血区	7	1.9±0.2	3.0±0.6	4.7±1.6	1.6±0.4 ^{ab}	
	对照组非缺血区	7	2.5±0.2	4.3±0.7	11.5±2.3	2.7±0.4 ^a	0.58±0.11
	CoQ ₁₀ 组缺血区	7	2.2±0.2	3.5±0.5	7.3±1.6	2.1±0.3*	
	CoQ ₁₀ 组非缺血区	7	2.7±0.3	4.2±0.9	11.4±3.2	2.7±0.4	0.75±0.03**

* p<0.05; **p<0.01; 与对照组相比较。

^ap<0.05 与^{ab}相比较。

排列紧密,膜完整,嵴规则,基质清楚。而缺血区线粒体形态,无论超薄切片观察或负染材料观察,在CoQ₁₀组均比对照组为完好。在对照组,线粒体排列紊乱,基质肿胀或空泡化,嵴紊乱或断裂,膜周围突出许多小泡,甚至整个线粒体呈大空泡状,嵴部分消失(图B₁,B₂,B₃)。在CoQ₁₀组,线粒体与心肌纤维排列规则,线粒体完整,膜、嵴、基质均清晰,虽然基质部分肿胀,嵴稍有分离,但内部结构仍保持较良好,嵴排列也较规则(图A₁,A₂,A₃)。

讨 论

线粒体功能是决定暂时缺血心肌能否存活的关键^[9]。Naylor报告,CoQ₁₀保护缺血心肌的作用与它能防止心肌线粒体损害有关^[10]。本实验测定的各组线粒体P/O比值变化与相应的超微结构变化相一致的结果也支持这种论点,即CoQ₁₀不仅具有维持线粒体氧化磷酸化功能的能力,且能明显减轻结扎冠脉后线粒体膜和嵴的受损程度。这表明CoQ₁₀可能是通过保护线粒体膜和嵴,保持线粒体结构完整而维持其氧化磷酸化功能的。据文献报道,CoQ₁₀这种作用与它作为一种抗氧化剂而抑制引起细胞和亚细胞膜损伤的脂肪过氧化有关^[11]。此外,CoQ₁₀进入线粒体内调节呼吸链各种酶过程,从而改善缺血心肌的代谢,促进ATP合成也是原因之一^[1,12,13]。

一般研究缺血心肌线粒体超微结构,大多采用心肌组织超薄切片,可观察到整个心肌细

胞结构和局部心肌线粒体群的变化。本实验除采用此种方法外,尚观察了经高速离心分离的线粒体超薄切片和负染材料,得以更精细地观察心肌线粒体的细微变化,从而为CoQ₁₀维持线粒体氧化磷酸化功能提供了可能的超微结构证据。

另外,本实验结果还表明,CoQ₁₀在结扎冠脉90分钟后使动脉血压显著降低,与文献报道相符^[3]。但结扎后60分钟血压无显著变化,原因未明。CoQ₁₀组在结扎90分钟后有降低心率倾向,但无显著意义。比较各组心率变化,结扎冠脉后均比结扎前显著降低,这似与结扎冠脉手术本身有关。

致谢:河北医学院基础医学研究所电镜室李文镇、雷建章教授指导电镜观察并提出宝贵意见。孟祥琴同志参加部分技术工作。

参 考 文 献

- [1] Ohhara, H. et al.: 1981, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13 (1): 65—74.
- [2] 许维楨: 1980, *山西医药杂志*, 2: 42—44.
- [3] Yamagami, T. et al.: 1976 (Pub. 1977), *Biomed. Clin. Aspects of Coenzyme Q*, Proc. Int. Symp., New York, Elsevier, 231—242.
- [4] Karl, F.: 1982, *IRCS Med. Sci.: Clin. Med.*, 10 (4): 348—349.
- [5] Von Korff, R. W.: 1965, *J. Biol. Chem.* 240: 1351—1358.
- [6] Gornall, A. G. et al.: 1949, *ibid*, 177: 751—758.

- [7] Sordahl, L. A. et al.: 1971, The Mitochondrion, In: Methods in Pharmacology, Vol. 1, New York, 247—286.
- [8] 张龙翔等, 1982, 生化实验方法和技术, 第一版, 北京, 人民教育出版社 221—224.
- [9] Shlofer, M. et al.: 1980, *Basic Res. Cardiol.*, 75 (4): 555—571.
- [10] Nayler, W. G.: 1980, In: Biomed. Clin. Aspects of Coenzyme Q, Vol. 2, Elsevier/North-Holland, 409—425.
- [11] Kawasaki, T. et al.: 1981, In: Biomed. Clin. Aspects of Coenzyme Q Vol. 3, Elsevier/North-Holland Biomed. Press., 337—348.
- [12] Katagiri, T. et al.: 1981, *Ibid*, 349—359.
- [13] Ohhara, H. et al.: 1981, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13 (8): 741—752.

动物淋巴细胞体外转化反应稳定性因素的探讨

(一) 影响家兔 T 淋巴细胞转化反应因素的研究

王文新 赵月梅

(兰州医学院病理生理学教研室)

淋巴细胞转化反应(简称淋转)是机体细胞免疫机能状态的重要指标之一,在临床方面已被广泛应用^[1-3]。为了能在实验动物中建立常规的测定方法,获得较好的可复性和稳定性,并能客观地反映机体细胞免疫功能状态,我们对家兔淋转体外培养诸影响因素的条件进行了较系统的观察研究,初步判明其影响因素。实验结果总结如下。

材料与方 法

一、血 样

从健康家兔耳缘静脉取血,每毫升全血加入 15~20 单位肝素。

二、淋巴细胞转化反应的方法

采用微量全血培养方法^[1]。将肝素化全血 0.1 毫升,置于含植物血凝素 (PHA) 133 微克/毫升营养液 (广州医药工业研究所生产,批号 81066。配制成 0.1% 浓度,即 0.1 毫升含有 100 微克)和含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 液 3 毫升小瓶中,每毫升营养液加入青—链霉素各 100 单位,用 5.6% NaHCO₃ 调至 pH 7.4,置于 37℃ 温培育(为后述方便,将此种营养液称为基础营养液)68~72 小时。终止培养后,将培养物先移至离心管内,经 1000 转/分离心 10 分钟后弃去 2/3 上清液,加入低渗盐水至原液量,再置于 37℃ 温育,使大部分红细胞溶解,经 1000 转/分离心 10 分

钟全弃上清液。然后用冰醋酸—甲醇混合液悬浮,经 1500 转/分离心 10 分钟,全弃上清液。上述步骤再重复一次。弃上清液留适量将细胞悬浮,用滴管移至玻片上使之自然散开,待干后用 Wright-Giemsa 染色。将每一标本在油镜下计数 200 个淋巴细胞,并算出淋巴细胞母细胞(包括染色体型及过渡型)的百分比,即为淋巴细胞转化率。

三、动物编组

影响淋转诸因素的条件,包括小牛血清含量和 PHA 含量的变化,营养液不同 pH 值以及不同血量等四个方面进行观察研究。为此,将动物分为四大组,每组选健康家兔 10 只。对一种影响因素,每次实验取一只家兔外周血进行比较,而不同量度值设复管 3 瓶,取其均值为一次实验数据。

结 果

一、不同小牛血清含量对淋转的影响

将基础营养液中小牛血清含量分别改为 5%, 10%, 15%, 20% 和 25% 等五种,各加入 0.1 毫升同一只家兔外周血进行培育。从图 1 可以看出,含 5% 及 10% 其转化率只有 20.2 ± 3.96% 或 20.0 ± 4.16%, 而含量为 15% 和 20% 时,则转化率分别增至 43.6 ± 3.48% 及 52.0 ± 1.84%, 但当含量增加到 25% 时,其转化率反而仅为 29.9 ± 5.28%。分别经统计学处