

· 基础研究 ·

心肌线粒体复合体在高脂模型小鼠心脏缺氧-复氧中的作用

朱师超, 邵永丰*

南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:研究高脂模型小鼠心肌线粒体复合体功能变化,并探讨其在心肌缺氧/复氧(模拟缺血再灌注)中的作用。方法:将12只雄性2周龄C57B6小鼠随机分为高脂饮食组和对照组,进行20周高脂饮食和正常饮食喂养,并记录体重。实验结束后,提取心脏线粒体,将其在密闭空间内耗尽氧气后,维持缺氧状态30 min再通入氧气以模拟心脏缺血再灌注过程。通过氧气浓度检测探针测量并记录线粒体的耗氧率(oxygen consumption rate, OCR),荧光比色法检测线粒体复合体活性,荧光分光光度计测量活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生速率。结果:高脂饮食组心肌线粒体的OCR明显高于对照组($P < 0.05$),同时线粒体复合体II的活性在高脂饮食组中明显升高($P < 0.05$)。OCR在两组中均升高,尤其是在高脂饮食组,且这种升高可以被复合体II抑制剂Malonate抑制。比较线粒体ROS的产生速率也发现相同倾向。结论:线粒体复合体II的活性在高脂模型小鼠中有较大变化,且这种变化可能是心肌缺氧/复氧(模拟缺血再灌注)损伤加剧的机制。

[关键词] 缺氧/复氧;线粒体;复合体II;缺血再灌注;活性氧

[中图分类号] R361.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)06-880-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20190617

Effect of mitochondrial complex activity on heart hypoxia-reoxygenation in high-fat-diet mice model

Zhu Shichao, Shao Yongfeng*

Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to detect the effect of mitochondria from high fat diet mice heart, and the effects of hypoxia-reoxygenation. **Methods:** A total of 12 2-week-old mice (male, C57B6) were randomly divided into high-fat-diet (HFD, $n=6$) group and control (CTR, $n=6$) group, and they were fed with high fat diet and normal diet respectively for 20 weeks. Hearts were used to isolate pure mitochondria. After the oxygen used up in the chamber, the mitochondria were subjected to 30 minutes of hypoxia-reoxygenation to simulate ischemia-reperfusion. Mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) was measured using oxygen monitor system. Mitochondrial complex enzyme activity was assessed using microplate colorimetric assay kit. Reactive oxygen species (ROS) was measured by fluorimeter. **Results:** The mitochondrial OCR was greater in HFD group compared to that of CTR group ($P < 0.05$). Similarly, mito-complex II activity was significantly increased in HFD group compared to that of CTR group ($P < 0.05$). Furthermore, reoxygenation of purified mitochondria following 30 min hypoxia transiently increased OCR, with significantly higher increase in HFD group. Pre-treatment of mito-complex II inhibitor, malonate diminished reoxygenation-induced OCR increase in both groups. The similar tendency was also detected in ROS. **Conclusion:** Mito-complex II activity was totally enhanced in the HFD model, which could be involved in the injury of hypoxia-reoxygenation (which simulated ischemia-reperfusion) in heart.

[Key words] hypoxia-reoxygenation; mitochondria; complex II; ischemia-reperfusion; ROS

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05):880-883]

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20151590)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: shaoyongfeng2010@sliyun.com

根据世界卫生组织的最新数据统计,心血管疾病仍是世界范围内最主要的疾病之一,而心肌缺血再灌注损伤引起的心肌梗死,仍然是疾病治疗过程

和治疗后最重要的死亡原因,其损伤受到多种机制同时调控。越来越多的研究表明心肌线粒体的功能改变与心肌损伤密切相关^[1]。心肌线粒体功能异常引起的呼吸链异常、细胞凋亡、活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生均是引起损伤的途径。有国外最新研究显示,线粒体复合体 II (也被称为琥珀酸脱氢酶)的可逆性抑制剂——丙二酸盐的使用,可以有效减少心肌线粒体的 ROS 产生,从而减轻缺血再灌注引起的损伤^[2-3]。另一方面,高脂血症作为心血管疾病的重要诱因^[4],对于心肌线粒体的影响也一直是研究的重点^[5],已知高脂环境会引起线粒体的功能异常,对于线粒体参与调控的细胞凋亡、ATP 产生等都有重要影响^[5-7],但是对于复合体 II 和缺血再灌注损伤的具体影响和调控研究较为少见。本研究拟测定心肌线粒体复合体 II 在高脂环境下的功能变化以及其在心脏缺氧/复氧损伤(模拟缺血再灌注)中可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

12 只 SPF 级雄性 C57BL6 小鼠,2 周龄,体重(8.5 ± 0.7)g,英国曼彻斯特大学动物研究中心提供。动物高脂饮食饲料(D12492,60%脂肪,20%碳水化合物,20%蛋白质,Research Diet 公司,美国)。

线粒体复合体 I 和 II 活性检测试剂盒(Ab109908、Ab109721,Abcam 公司,美国),氧浓度检测探针(Instech 公司,美国),荧光分光光度计(PTI 公司,美国)。所有线粒体反应所需的基本代谢底物和抑制剂等均购于美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立

12 只 2 周龄小鼠随机分为对照组($n=6$)和高脂饮食组($n=6$),小鼠经适应性喂养 1 周后,对照组饲喂正常饮食,高脂饮食组饲喂高脂饮食。试验期间小鼠自由饮水和进食,每周记录体重。喂养 20 周后,断颈法处死小鼠,解剖取出心脏,用于提取线粒体。

1.2.2 线粒体分离

使用差速离心法从组织中提取线粒体。将新鲜分离的心脏组织用 Wash-Buffer 清洗干净后充分研磨,溶于线粒体分离缓冲液(Isolation-Buffer),使用高速离心机在 4 °C 条件下按照 1 000 g 离心 10 min 取上清,12 000 g 离心 15 min 取沉淀,12 000 g 离心 15 min 取沉淀,最终得到纯净的线粒体。

1.2.3 线粒体缺氧/复氧模拟心脏缺血再灌注

在密闭容器内加入提纯线粒体和呼吸链所需的底物(丙酮酸盐、苹果酸盐、谷氨酸盐、ADP、琥珀酸盐),待线粒体耗尽氧气,即氧气浓度为 0 后等待 30 min 模拟心脏缺血,再通入足量氧气模拟心脏再灌注。

1.2.4 线粒体耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)测量

将 0.02 mg 线粒体溶于 OCR-Buffer(210 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L 磷酸二氢钾、10 mmol/L 3-吗啉丙磺酸,pH=7.4),并加入到密封的反应机器内,依次加入线粒体呼吸链所需的底物,氧气浓度探针检测并记录氧气浓度从 19.6%(室温,标准大气压下缓冲液内的氧气浓度)到 0 的全过程,用于计算平均 OCR。

1.2.5 线粒体复合体活性测量

采用荧光比色法,测量线粒体复合体 I 和复合体 II 的酶活性。在小孔内分别加入适量的样本和特异性的显色剂后,使用分光光度计测量吸光度(OD)值并计算。

1.2.6 线粒体 ROS 产生速率的测量

采用荧光分光光度计(激发光 555 nm,发射光 581 nm)测量 ROS 产生速率。将 0.01 mg 的线粒体溶于 Incubation-Buffer(125 mmol/L 氯化钾、4 mmol/L 磷酸二氢钾、14 mmol/L 氯化钠、20 mmol/L HEPES、1 mmol/L 氯化镁、0.2% 无脂肪酸 BSA、0.02 mmol/L EGTA,pH=7.2),加入石英比色皿内,放入机器暗箱内等待温度稳定至 37 °C 后,加入 4 U/mL 的辣根过氧化物酶和 10 μmol/L 的显色剂 Amplex Red。之后依次加入线粒体呼吸链所需的底物,记录此时的反应斜率,即为 ROS 产生速率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠心肌线粒体复合体活性及 OCR 变化

分别用两组小鼠的心脏提取线粒体,进行线粒体复合体 I 和复合体 II 的活性检测,发现高脂饮食组的线粒体复合体 I 活性略有下降,而复合体 II 的活性明显升高($P < 0.05$)。与线粒体复合体 II 活性变化趋势相同,高脂饮食组的 OCR 与对照组比较明显升高($P < 0.05$,图 1)。

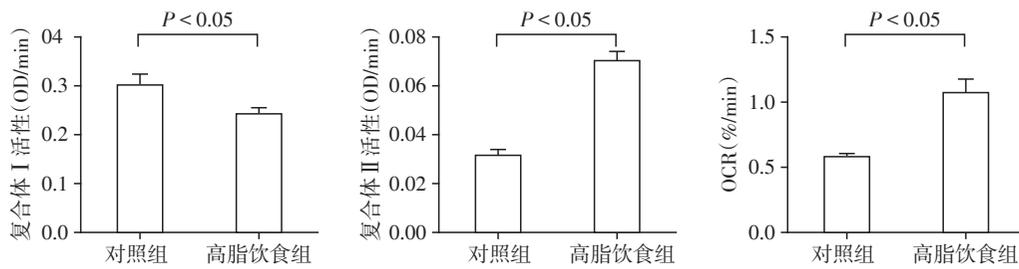


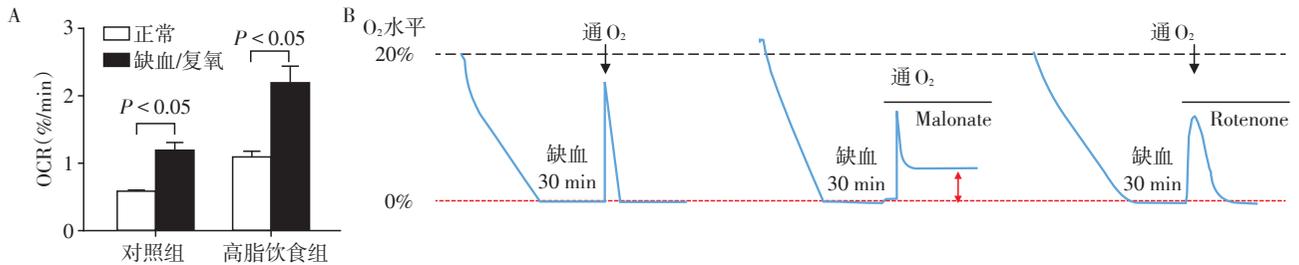
图1 两组小鼠心肌线粒体复合体 I、II 活性和 OCR 变化

Figure 1 Comparison of mito-complex I activity, mito-complex II activity and OCR

2.2 模拟缺血再灌注后两组小鼠心肌线粒体功能变化

测量线粒体 OCR 时,当密闭反应室内的氧气耗尽(即氧浓度达到 0)继续保持密封环境 30 min,之后再次通入足量氧气模拟缺血再灌注时线粒体周

围的氧浓度变化。发现两组线粒体的 OCR 均明显增高,且高脂饮食组增加更多($P < 0.05$,图 2A),且这样的 OCR 增加现象可以被线粒体复合体 II 抑制剂 Malonate 完全抑制,但不能被线粒体复合体 I 抑制剂 Rotenone 抑制(图 2B)。



Malonate:线粒体复合体 II 抑制剂;Rotenont:线粒体复合体 I 抑制剂。

图2 模拟心肌线粒体缺血再灌注过程中 OCR 的变化及复合体 II 和 I 抑制剂的影响

Figure 2 OCR changes after ischemia-reperfusion without and with mito-complex inhibitors

2.3 ROS 产生速率变化

在正常生理情况下,线粒体呼吸链所需的底物全部存在时,ROS 产量很小。但是当线粒体经过模拟缺血再灌注处理后,ROS 产生速率明显增加,且这种增加在加入线粒体复合体 II 抑制剂 Malonate 后被抑制。当使用左旋肉碱(可帮助线粒体外的游离脂肪酸进入线粒体内)与线粒体反应后,再灌注后的线粒体 ROS 产生速率进一步增加,且再次使用 Malonate 时抑制效果更加明显(图 3)。

3 讨论

国内外众多研究表明,心肌线粒体 ROS 的产生是心肌缺血再灌注损伤的重要机制^[1-2,8-10],而 ROS 大量产生的原因仍未十分明确。线粒体的反向电子传递(reverse electron transport)是目前最新的研究理论^[2,11],其主要内容为在缺血状态下,大量游离电子在线粒体复合体 II 附近聚集,由于缺乏氧气而无法由正常的氧化呼吸链方向,即向线粒体复合体 III 转移。当大量氧气突然出现时,游离的电子会瞬间向线粒体复合体 I 方向转移,并在复合体 I 处产生大量的 ROS 从而造成损伤。

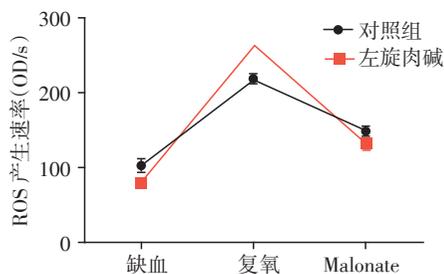


图3 模拟心肌线粒体缺血再灌注后 ROS 产生速率

Figure 3 The effect of ischemia-reperfusion on mitochondrial ROS

本研究在使用高脂模型小鼠时发现,线粒体氧化呼吸链的代谢活性明显增高(OCR 增高),线粒体复合体 II 的活性也同时呈现明显增高,这表明高脂脂肪酸代谢的环境刺激了复合体 II 的活性从而提高了线粒体呼吸链的氧化呼吸作用。而在线粒体水平模拟缺血再灌注的病理过程时,发现线粒体的耗氧率再次出现明显升高,且这种升高在高脂模型中

更加明显。增加的OCR可以被线粒体复合体Ⅱ的抑制剂完全抑制,却无法被复合体Ⅰ抑制剂抑制,证明了这种增加来自于复合体Ⅱ的作用。已有研究证明,线粒体复合体Ⅱ抑制剂可以减少ROS产生,减轻缺血再灌注对心肌的损伤^[2]。本研究进一步发现,无论是正常线粒体还是在高游离脂肪酸环境下的线粒体,ROS的产生均可被线粒体复合体Ⅱ抑制剂抑制,且在高游离脂肪酸环境下抑制效果更强。已有国外研究发现,缺血再灌注过程中会有大量琥珀酸盐在线粒体复合体Ⅱ附近聚集,这也是心肌线粒体在缺血再灌注时产生ROS的必要条件^[3,12-13]。因此,在高游离脂肪酸的环境下,线粒体复合体Ⅱ活性的增加及过量琥珀酸盐积聚,ROS产生速率会进一步增加,心肌缺血再灌注所受的损伤也会更大。这也说明高脂模型小鼠的心脏缺血再灌注损伤受线粒体复合体Ⅱ的活性调控。

综上所述,在高脂模型小鼠中,心肌线粒体复合体Ⅱ的活性会增加,同时线粒体氧化呼吸链的效率也会提升,导致心肌缺血再灌注时产生更多的ROS,从而引起更大损伤,但也会使线粒体复合体Ⅱ抑制剂减少损伤的作用更加有效。

[参考文献]

- [1] Bagheri F, Khor V, Alizadeh AM, et al. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: mechanisms and therapies[J]. *Life Sci*, 2016, 165(1):43-55
- [2] Valls-Lacalle L, Barba I, Miró-Casas E, et al. Selective inhibition of succinate dehydrogenase in reperfused myocardium with intracoronary malonate reduces infarct size[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2442-2455
- [3] Pell VR, Spiroski AM, Mulvey J, et al. Ischemic preconditioning protects against cardiac ischemia reperfusion injury without affecting succinate accumulation or oxidation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 123(1):88-91
- [4] Ortega FB, Lavie CJ, Blair SN. Obesity and cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2016, 118(11):1752-1770
- [5] de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, et al. Mitochondrial dysfunction in obesity[J]. *Life Sci*, 2018, 192(1):26-32
- [6] Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(5):1066-1077
- [7] Samniang B, Shinlapawittayatorn K, Chunchai T, et al. Vagus nerve stimulation improves cardiac function by preventing mitochondrial dysfunction in obese-insulin resistant rats[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:19749-19759
- [8] Chouchani ET, Pell VR, James AM, et al. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(2):254-263
- [9] Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia - reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117(1):76-89
- [10] 陆沁源,邵东华. 右美托咪啶预处理对缺血再灌注损伤大鼠心肌线粒体功能的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(10):1198-1201
- [11] Scialò F, Sriram A, Fernández-Ayala D, et al. Mitochondrial ROS produced via reverse electron transport extend animal lifespan[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(4):725-734
- [12] Andrienko TN, Pasdois P, Pereira GC, et al. The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 110(1):1-14
- [13] Wijermars LGM, Schaapherder AF, Kostidis S, et al. Succinate accumulation and ischemia-reperfusion injury: of mice but not men, a study in renal ischemia-reperfusion [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(9):2741-2746

[收稿日期] 2019-02-17