

研究工作

大鼠心肌细胞线粒体辅酶 Q 含量的动态分析

范崇竹* 张殿清 于维汉 于波 张洪印 王毓梅

(哈尔滨医科大学克山病研究所)

(哈尔滨市卫生防疫站)

提 要

用高效液相色谱法 (HPLC) 测定了大鼠心肌组织和心肌线粒体 CoQ 同系物的含量,并动态地分析了心肌线粒体摄取外源性 CoQ₁₀ 后的代谢变化。结果表明,线粒体中 CoQ 同系物总量约占心肌全匀浆的 19.49%; 外源性的 CoQ₁₀ 能够为线粒体所摄取。

辅酶 Q (Coenzyme Q, CoQ) 是脂溶性醌类化合物,又名泛醌 (Ubiquinone, UQ), 是细胞线粒体氧化磷酸化呼吸链的有机组分之一。CoQ 参与 ATP 生成,对细胞的能量代谢具有直接影响。近些年用于心肌保护收到一定效果,有关机理正在深入研究中。

据报道,缺血、缺氧性心脏病及多种心脏疾患都伴有 CoQ 缺乏^[1]。补充外源性 CoQ 则能明显改善心肌代谢,显著减轻心肌损害程度^[2]。近年,我们曾用 CoQ₁₀ 防治云南小儿亚急性克山病的充血性心力衰竭收到明显疗效^[3],说明 CoQ 有改善心肌代谢的作用。

为了深入了解 CoQ 参与心肌线粒体代谢的复杂方式,揭示和阐明 CoQ 对缺血、缺氧等坏死性心肌疾病的保护机理,本实验采用 HPLC 法^[4]测定了正常大鼠心肌组织和心肌线粒体 CoQ 同系物的含量,并动态分析了心肌线粒体摄取外源性 CoQ 的代谢变化。

材 料 与 方 法

实验动物和预处理

选用 Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半,体重 200—243g,随机分成两组。CoQ₁₀ 组 50 只,

经尾静脉注射 CoQ₁₀ (日本エーザイ株式会社提供 0.25% CoQ₁₀ 溶液) 20mg/kg 体重;对照组 30 只,其中 20 只经尾静脉注射 0.85% NaCl 溶液 1ml/只。两组于注射后按即刻、1、2、4、8、12、16、24、36 和 48 小时分十批处死,取心脏分离线粒体备用;剩余的 10 只大鼠不经处理,处死后取心脏制备心肌匀浆待用。

心肌线粒体制备

参照 Fleischer 等^[5]的方法分离心肌线粒体。

心肌线粒体 CoQ 同系物的提取

参照阿部皓一等^[4]的方法进行,并作了部分改进,见另文^[6]。

心肌线粒体蛋白含量测定

参照 Lowry 法^[7]进行;线粒体 CoQ 同系物含量单位以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (线粒体蛋白) 计算;心肌匀浆中 CoQ 同系物含量单位以 $\mu\text{g}/\text{g}$ (湿重心肌) 计算。

CoQ 标准品 (Sigma) CoQ₈、CoQ₉ 和 CoQ₁₀ 的分离色谱见图 1; 心肌匀浆和心肌线粒体中的 CoQ₈、CoQ₉ 和 CoQ₁₀ 的分离色谱

* 现在中国科学院上海生理研究所。

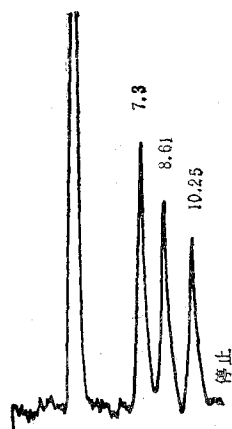


图1 CoQ 标准品 CoQ_8 , CoQ_9 和 CoQ_{10} 色谱图

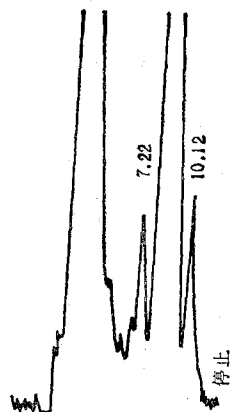


图2 心肌匀浆色谱图 (CoQ_9 : 8.63min)

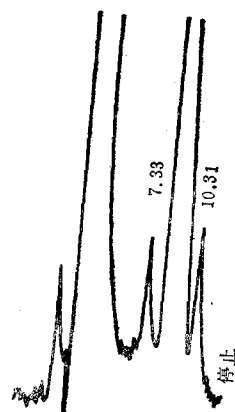


图3 线粒体色谱图 (CoQ_9 : 8.59min)

图见图2和图3。

结 果

正常 Wistar 大鼠心肌组织和心肌线粒体 CoQ_8 、 CoQ_9 和 CoQ_{10} 的 HPLC 分析结果见

表1。

心肌组织和线粒体中 CoQ 同系物三者的含量比例依次为 0.04:1:0.09 和 0.05:1:0.08; 其中均以 CoQ_9 含量占绝对优势; 线粒体中的总含量约占心肌匀浆的 19.49%。

表1 心肌匀浆和心肌线粒体中 CoQ 含量分析结果

No.	$\mu\text{g/g}$ 湿重心肌			$\mu\text{g/mg}$ 线粒体总蛋白			$\mu\text{g/mg}$ 线粒体蛋白		
	CoQ_8	CoQ_9	CoQ_{10}	CoQ_8	CoQ_9	CoQ_{10}	CoQ_8	CoQ_9	CoQ_{10}
1	6.84	130.19	10.70	1.75	36.98	1.99	0.19	4.00	0.22
2	7.83	176.73	17.67	1.85	27.79	2.72	0.15	2.18	0.21
3	7.47	161.66	15.69	1.80	24.51	2.58	0.15	2.00	0.21
4	8.86	192.14	17.38	1.70	38.01	2.38	0.11	2.52	0.22
5	8.28	178.32	16.68	1.70	36.78	2.19	0.17	3.73	0.24
6	8.38	181.79	16.38	1.50	23.13	2.52	0.14	2.23	0.24
7	8.42	197.59	18.38	2.00	31.04	2.89	0.17	2.69	0.25
8	8.06	194.46	16.80	2.13	30.95	2.78	0.18	2.68	0.24
9	8.20	196.01	17.14	1.75	48.11	2.94	0.14	3.80	0.23
10	5.75	155.81	15.50	1.60	47.31	3.88	0.10	2.87	0.24
CoQ_8 : 7.81 ± 0.92				1.79 ± 0.17			0.14 ± 0.05		
CoQ_9 : 176.49 ± 21.66				34.46 ± 0.17			2.87 ± 0.69		
CoQ_{10} : 16.23 ± 2.14				2.79 ± 0.55			0.23 ± 0.01		

$n = 30$

给大鼠静脉注射 CoQ_{10} 20mg/kg 体重后, 对心肌线粒体中 CoQ_{10} 含量进行了不连续动态测定, 结果见表2。

结果说明, 外源性 CoQ_{10} 给大鼠静脉注射后能够进入心肌线粒体, 12 小时达高峰, 48 小时接近注射前水平。

表2 注射外源性 CoQ₁₀ 后心肌线粒体中该物质含量变化的动态分析

按时间 (h) 分组	CoQ ₁₀ $\mu\text{g}/\text{mg}$ 线粒体蛋白		P 值
	CoQ ₁₀ 组 ($\bar{x} \pm SD$)	对照组 ($\bar{x} \pm SD$)	
0	0.23 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04	$P > 0.05$
1	0.22 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.03	$P > 0.05$
2	0.26 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04	$P < 0.05$
4	0.38 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.05	$P < 0.05$
8	0.65 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.03	$P < 0.01$
12	0.66 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.02	$P < 0.01$
16	0.61 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.03	$P < 0.01$
24	0.29 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.03	$P < 0.05$
36	0.27 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.04	$P < 0.05$
48	0.25 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.06	$P > 0.05$

$n = 50$

讨 论

采用 HPLC 法测定心肌 CoQ 同系物含量的报道见于八十年代初^[8-10]。本实验所测得的结果与文献报道基本一致,不同的是本文补充报告了大鼠心肌组织和心肌线粒体中的 CoQ₈ 含量,这在既往文献中未见提及。

大鼠心肌和线粒体中的 CoQ₈、CoQ₉ 和 CoQ₁₀ 同系物之间,依次比前者多一个异戊聚二烯侧链,其脂溶性渐增,亲水性递减,氧化还原电位不同。因此在呼吸链体系中,有可能构成“CoQ 循环传递电子”机制。另外,心肌组织和线粒体中均以 CoQ₉ 的含量最高,有可能反映了大鼠心肌线粒体氧化磷酸化的基本方式和特点。

据本实验结果分析,心肌线粒体中 CoQ 同系物总量约占心肌全匀浆总量的 19.49%。这

一结果对于既往一直认为 CoQ 在线粒体中发挥生物学效应的传统观念是一个冲击。目前除了对于 CoQ 参与呼吸链机制了解的比较多之外,对于其它方面的作用所知甚少。

给大鼠注射 CoQ₁₀ 后,线粒体的摄取和代谢速度均比较迅速,所得结果与藤田孟等^[11]采用 ¹⁴C-标记的 CoQ₁₀ 示踪实验基本相似。说明正常大鼠心肌线粒体氧化磷酸化过程对 CoQ 的需求是生理量的需求,超负荷有可能成为代谢上的负担;线粒体自身对 CoQ “容量”明显存在着调控机制。因而推测,补充外源性 CoQ 对多种心肌疾病改善作用的一种可能性是与其内源性 CoQ 的缺乏有直接关系。

参 考 文 献

- [1] 山上徹:《新薬と臨床》,1979,28,901。
- [2] Nakamura, Y. et al.: *Cardiovasc. Res.*, 1982, 14 (3), 132.
- [3] 于維漢:《生態學的營養學研究》,1984,8,65—73。
- [4] 阿部皓一,他:《ピタミ>》,1977,51(3),111。
- [5] Fleischer, S. et al.: *Methods in Enzymology* Vol. XXXI, Academic press, New York, San Francisco, London, 1974, P 299—305.
- [6] 范崇竹等:《中華物理醫學雜誌》,1988,10(1),32。
- [7] Lowry, O. H: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [8] Ikenoya, S. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, 29 (1), 158.
- [9] Folkers, K and Yamamura, Y: *Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q*, Vol.3 Elsevier/ North-Holland, Biomedical press, New York, 1981, P 53—66.
- [10] Katayama, K. et al.: *B. A. B. Research Commu.*, 1980, 95(3), 971.
- [11] 藤田孟,他:《応用薬理》,1972,6(4),695。

[本文于1988年10月4日收到]

(上接第437页)

- [7] Fahrenfort, J.: *Spectrochimica Acta*, 1961, 17, 705.
- [8] Quintard-Dorques, B. et al.: *J. Mol. Struct.*, 1986, 143, 411.
- [9] Fink, J. D., Gendreau, R. M.: *Anal. Biochem.*, 1984, 139(1), 140.
- [10] Jakobsen, R. J., Cornell, D. G.: *Appl. Spectrosc.*, 1986, 40(3), 318.
- [11] Popov, V. Ya. et al.: *Biofizika*, 1982, 27(4), 604.
- [12] Castillo, E. J. et al., *Biomaterials* (Guildford, Engl.), 1984, 5(4), 186.
- [13] Korolev, Yu. N., Cherkulaeva, L. N.: *Biofizika*, 1986, 31(2), 347.

[本文于1988年8月22日收到]