

# 铜对肉鸡肝细胞线粒体膜通透性及呼吸的影响

曹华斌, 苏荣胜, 李和平, 郭剑英, 李成梅, 唐兆新

(华南农业大学 兽医学院 临床兽医系, 广东 广州 510642)

**摘要:** 为进一步了解铜对生物体的生物学效应, 选用硫酸铜作为铜源, 向即时分离的肉鸡肝细胞线粒体培养液内加入终浓度分别为 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  的铜(以铜计), 孵育 10 min 后, 观察肝细胞线粒体膜通透性及呼吸的变化。结果显示, 铜对线粒体膜通透性转换孔有较显著的影响, 造成线粒体不同程度的肿胀, 表现为线粒体悬液在 540 nm 处的吸光值下降, 且铜浓度越高, 吸光值下降越明显, 在孵育 6 min 后 3 种浓度的吸光值下降百分比差异显著 ( $P < 0.05$ )。随着铜浓度的升高, 线粒体呼吸逐渐减弱, RCR、P/O、OPR 均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 这些变化可能是微量元素铜对生物机体产生毒害作用的本质原因之一。

**关键词:** 铜; 线粒体; 线粒体膜通透性转换孔; 呼吸

## Effects of copper on membrane permeability and respiration of mitochondria from broiler hepatocyte

CAO Hua-bin, SU Rong-sheng, LI He-ping, GUO Jian-ying, LI Cheng-mei, TANG Zhao-xin

(Department of Clinical Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, South China

Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** To further understand the biologic functions of copper in animals, using copper ( ) sulfate anhydrous as the source of copper, mitochondrial permeability and respiration were observed after incubating the mitochondria which was freshly isolated from broiler hepatocyte with 5, 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  of final concentration copper for 10 min, respectively. The effect of copper on the mitochondrial permeability transition pore was significant, resulting in swelling of mitochondria to some degree which was manifested by decrease of absorbance at 540 nm and the absorbance decreased dramatically with increase of copper concentration. After incubating for 6 min, the percentage of absorbance decrease among the above 3 concentrations was significant ( $P < 0.05$ ). Similarly, the respiration of mitochondria worn off with increase of copper concentration, and the values of RCR, P/O and OPR decreased significantly correspondingly ( $P < 0.05$ ). The results showed that these changes may represent one of the essential reasons of copper poison in organisms.

**Key words:** copper; mitochondria; mitochondrial permeability transition pore; respiration

19 世纪时人们已开始认识到了铜对生物体的重要性, 到 20 世纪初, 铜被确认为动物体的必需微量元素之一, 并通过大量的研究证实, 铜在生物体的正常生长发育中发挥着广泛的生物学效应<sup>[1]</sup>。但是, 其作用机理大部分还是基于较宏观的推断与概括, 真正从生物细胞、亚细胞或分子水平评估铜的生物学功能在国内尚未见报道, 但在国外则有较多研究。线粒体是细胞内主要的能量形成所在, 也是对

各种损伤最为敏感的细胞器之一, 所以无论在生理上或病理上都具有十分重要的意义。研究表明, 体细胞的生死开关——线粒体膜通透性转变孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的开放导致细胞色素 c、凋亡因子 (AIF)、 $\text{Ca}^{2+}$  释放到细胞质中, 激活凋亡蛋白家族的主要成员胱冬肽酶, 或独立破坏核内染色质, 或作用于其他  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性蛋白, 从而使整个细胞的结构遭到破坏和功能紊乱。

收稿日期: 2006-11-09; 修回日期: 2007-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671550)

作者简介: 曹华斌 (1979 - ), 男, 江西樟树人, 博士生。唐兆新为通讯作者, E-mail: tangzhaoxin@hotmail.com

铜可造成生物体细胞产生活性氧的能力加强,促使体细胞DNA的裂解,从而过早地凋亡<sup>[2]</sup>,并可增加线粒体膜通透性转换孔对其他化学物质的敏感性,造成线粒体基质的钙超载,膜通透性增加,继而促使线粒体肿胀、死亡<sup>[3]</sup>。Krumschnabel等<sup>[4]</sup>,Nawaz等<sup>[5]</sup>在缺铜饮食造成心肌肥厚的动物模型中发现,铜在心肌细胞线粒体ATP合成过程中有重要的作用,可使ATP合成受阻或减少,最终影响线粒体正常的呼吸链反应,造成心肌供氧不足,影响正常的生命活动<sup>[6]</sup>。笔者基于国外的研究现状,使用不同剂量的铜,在体外对肉鸡肝细胞线粒体进行孵育,观察其对线粒体膜通透性转换孔和呼吸的影响,为进一步分析铜对生物体亚细胞结构的作用提供科学依据,以为深层次地探讨铜的生物学特性奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

体重1.5~2.0 kg的4周龄雄性科宝肉鸡6只购自深圳某种鸡场。

### 1.2 主要试剂和仪器

琥珀酸钠购自Sigma公司;考马斯亮蓝为Amresco公司产品;羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、3-N-吗啉丙烷磺酸(Mops)、乙二醇四乙酸酯(EGTA)等试剂均为国产分析纯。5804R型高速大容量冷冻离心机为德国Eppendorf公司生产;K5424型组织匀浆器为美国Glascol公司生产;UV-VIS 8500型分光光度计为上海天美科学仪器有限公司生产;5300A型溶氧仪为Oroboros Oxygraph公司生产。

### 1.3 主要试剂的配制

分离缓冲液:220 mmol/L D-甘露醇+70 mmol/L 蔗糖+2 mmol/L HEPES+1 mmol/L EGTA+0.5 mg/mL BSA, pH 7.4 (KOH);分离缓冲液:220 mmol/L D-甘露醇+70 mmol/L 蔗糖+2 mmol/L HEPES+0.5 g/L BSA, pH 7.0 (KOH);分离孵育液:220 mmol/L D-甘露醇+70 mmol/L 蔗糖+2 mmol/L HEPES, pH 7.0 (KOH);考马斯亮蓝G250染色液:100 mg 考马斯亮蓝G250溶解于50 mL 950 mL/L的乙醇中,加入85 mL/L的磷酸100 mL,加水稀释至1 L;PTP测定介质:213 mmol/L的D-甘露醇+70 mmol/L 蔗糖+3 mmol/L HEPES, pH 7.4 (KOH);PTP混合液:0.1 mol/L 琥珀酸钠+1.5 mmol/L 鱼藤酮, pH 7.4 (KOH),溶剂为PTP测定介质;线粒体呼吸反应介质:80 mmol/L KCl+50 mmol/L Mops+5 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ +1 mmol/L EGTA+1 g/L BSA, pH 7.0

(KOH)。

### 1.4 肝细胞线粒体的分离

参照Takeyama等<sup>[7]</sup>介绍的方法进行。肝细胞线粒体蛋白浓度的测定采用考马斯亮蓝法,孵育液稀释成3 g/L。值得注意的是:线粒体在室温时易失活,因此,以上操作过程均要求在冰浴中进行。

### 1.5 肝细胞线粒体膜通透性的测定

参照Krumschnabel等<sup>[4]</sup>、He等<sup>[8]</sup>介绍的方法进行。选540 nm波长扫描程序,设置扫描时间为2400 s,吸光值为0~1.5。紫外分光光度计预热30 min后,用3 mL测定介质调零,将300  $\mu\text{L}$ 线粒体加入2670  $\mu\text{L}$ 测定介质中,再加入PTP混合液30  $\mu\text{L}$ ,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 min,以3 mL测定介质作为对照,测定孵育后的含300  $\mu\text{L}$ 线粒体的测定介质的吸光值;测定 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 对线粒体膜通透性的影响时,步骤同上,只是在25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 min后加入相应量的 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ ,但要保证测定液总量的一致(3 mL)。数据的采集方法:设开始吸光度为 $A_0$ ,即时吸光度为 $A_{\min}$ , $A\% = (A_0 - A_{\min}) / A_0$ ,计算在第1、6、16、20 min时间点上的吸光度下降百分比。

### 1.6 线粒体呼吸功能的测定

采用Clark氧电极法。电极反应器中加入反应介质和鱼藤酮(终浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ ),总体积为3 mL,反应体系35 $^{\circ}\text{C}$ 预保温10 min,加入线粒体200  $\mu\text{L}$ ,以琥珀酸钠(终浓度为10 mmol/L)启动态呼吸,等呼吸曲线斜率稳定后(约2 min),加入10 mmol/L的二磷酸腺苷(ADP)50  $\mu\text{L}$ 启动态呼吸,ADP耗完转入态呼吸。态与态呼吸耗氧速度之比即为呼吸控制率(respiration control rate, RCR), $\text{RCR} = \text{ST3} / \text{ST4}$ ;磷氧比( $\text{P/O}$ )= $\text{ADP}$ 浓度/态呼吸耗氧量;氧化磷酸化效率(oxidative phosphorylation rate, OPR)=态呼吸 $\times$ 磷氧比。

### 1.7 数据处理

应用JMP和SPSS统计分析软件计算各组不同时间的平均值和标准误差,通过Ducans新复极差检验法(DMRT法)比较各组间和组内的差异。

## 2 结果

### 2.1 铜对肝细胞线粒体膜通透性的影响

在线粒体膜通透性反应液中分别加入 $\text{Cu}^{2+}$ (10  $\mu\text{mol/L}$ )和 $\text{Ca}^{2+}$ (10  $\mu\text{mol/L}$ ),都会促使线粒体膜通透性增加,表现为线粒体悬液在540 nm处吸光值随着培养时间的延长逐渐下降(见图1),其中 $\text{Cu}^{2+}$ (10  $\mu\text{mol/L}$ )的影响更为明显,在6 min之后 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 的吸光度下降百分比差异显著( $P < 0.05$ );

不同浓度的铜(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 孵育肝细胞线粒体 10 min 后,线粒体膜通透性的变化为随着铜浓度的升高,线粒体膜通透性逐渐增加,吸光值下降明显,在 6 min 之后三者的吸光度下降百分比差异显著 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

2.2 铜对线粒体呼吸功能的影响

用终浓度为 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  的铜离子孵育线

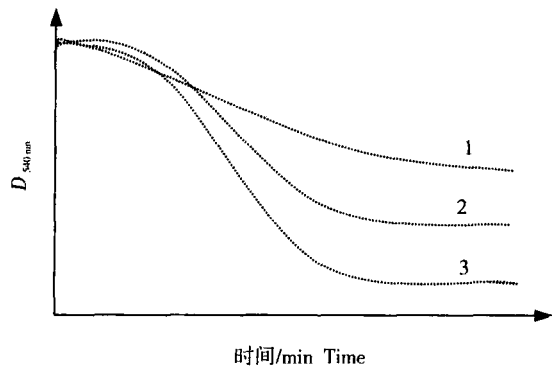


图 1  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对肝细胞线粒体膜通透性影响的比较  
Fig.1 Comparison of between influences of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  on MPTP

1、2、3:分别为对照、加  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  的线粒体  
1,2,3:The mitochondria of control ,with  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  ,respectively

表 2 不同浓度铜孵育线粒体的各项呼吸指数 ( $n = 6$ )

Table 2 The respiratory indexes (RI) after adding  $\text{Cu}^{2+}$  of different concentrations

呼吸指数 RI	0 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}^{2+}$	5 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}^{2+}$	10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}^{2+}$	20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}^{2+}$
P/O	0.0328 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.0307 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	0.0235 $\pm$ 0.010 <sup>c</sup>	0.0182 $\pm$ 0.002 <sup>d</sup>
RCR	3.7836 $\pm$ 0.132 <sup>a</sup>	3.3846 $\pm$ 0.232 <sup>b</sup>	2.1857 $\pm$ 0.143 <sup>c</sup>	1.9301 $\pm$ 0.242 <sup>d</sup>
OPR	453.2674 $\pm$ 15.13 <sup>a</sup>	411.9674 $\pm$ 12.13 <sup>b</sup>	374.9055 $\pm$ 10.13 <sup>c</sup>	345.3173 $\pm$ 9.13 <sup>d</sup>

3 讨论与结论

在生命科学高速发展的今天,人们开始从生物膜的角度重新认识疾病的发生与发展,探索各种生物膜与疾病的相互关系已成为当今生命科学发展的一个崭新领域,也是对传统的膜病理学的重要补充和发展<sup>[9]</sup>。线粒体膜内外的各种物质进出线粒体的通道被称之为 MPTP,是线粒体内外信息交流的中心枢纽,其开放状态指示着线粒体正常功能的发挥与否。国内外大量的研究表明,细胞核的变化是细胞凋亡的表现形式,细胞质中线粒体的变化也是细胞凋亡病理改变的重要部分,且更能反映细胞凋亡的严重程度。线粒体膜通透性的改变是许多凋亡通路的关键<sup>[10]</sup>,可导致线粒体电子传递链与氧化磷酸化解偶联、ATP 合成下降、线粒体内膜电位丧失、 $\text{Ca}^{2+}$  外流、细胞内活性氧分子 (ROS) 增多、凋亡诱

导因子和细胞色素 C (Cyt C) 释放,从而发生细胞凋亡<sup>[6,11]</sup>。细胞发生凋亡时,线粒体发生一系列密切相关的变化,其中以线粒体膜通透性的改变最为表观和直接。线粒体损伤时,可造成线粒体膜通透性增加,表现为用光学技术检测的吸光值下降。

表 1 不同浓度铜孵育线粒体后各时间点的膜吸光值下降百分比 ( $n = 6$ )

Table 1 The percentage of absorbance decreasing after adding  $\text{Cu}^{2+}$  of different concentrations %

时间 / min Time	0 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}^{2+}$	5 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}^{2+}$	10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}^{2+}$	20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}^{2+}$
1	0.37 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	2.12 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
6	1.37 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	9.95 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	13.19 $\pm$ 0.45 <sup>c</sup>	20.98 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
16	3.34 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	28.85 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>	32.27 $\pm$ 0.37 <sup>d</sup>	41.02 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>
20	5.06 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	35.47 $\pm$ 0.39 <sup>c</sup>	37.91 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>	43.79 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>

表中同一列及同一行标有不同字母的数据间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下表同

The difference between data with the different small letter within a column and a line is significant ( $P < 0.05$ ). The same as follows

导因子和细胞色素 C (Cyt C) 释放,从而发生细胞凋亡<sup>[6,11]</sup>。细胞发生凋亡时,线粒体发生一系列密切相关的变化,其中以线粒体膜通透性的改变最为表观和直接。线粒体损伤时,可造成线粒体膜通透性增加,表现为用光学技术检测的吸光值下降。

具有氧化还原活性的金属离子铜 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 通过 Feton 反应能产生大量的  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{OH} \cdot$ ,而  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{OH} \cdot$  能进一步诱发线粒体膜蛋白去极化,引起内膜电位的下降,导致线粒体膜的通透性发生改变<sup>[2,12]</sup>。事实上,通道开放是一种极端的抗氧化机制,它不但能导致与呼吸作用有关的能量产生受到完全的破坏,而且废除了呼吸作用的其他功能,如代谢物质的转换,因此它有可能是在活性氧大量产生,特别是在短时间内大量产生的极端条件下的保护措施。显然在一些更为极端的条件下,即使利用通道开放的防御体系也无法阻止细胞内过氧化产物的积

累,这时细胞只有通过细胞凋亡途径来排除线粒体内的活性氧(ROS)<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,由于线粒体内抗氧化剂和各种清除自由基的酶的存在,在反应刚开始的一段时间内,线粒体膜的通透性变化不是很大,随着反应的不断进行,线粒体内自由基清除剂的活性和含量都不断减少,导致自由基的含量增加,大大提高了线粒体内的自由基水平,引起线粒体膜通透性转换孔迅速开放,吸光度下降,且随着铜离子浓度的升高,影响增大,吸光度下降越明显。

线粒体基质中有 Pi 和 ADP 存在时,呼吸链电子才能以最大速率在完整的线粒体中进行传递,如果缺乏 ADP,则不出现磷酸化,称之为 态呼吸;如向系统中加入 ADP,耗氧量便急剧增至最大,ADP 磷酸化为 ATP,称之为 态呼吸。这种由 ADP 浓度控制电子传递速率的现象称为呼吸控制,RCR 是指 态呼吸与 态呼吸之比。OPR 和 RCR 是线粒体活性和功能状态的主要指标。其中 OPR 反映线粒体的完整性及其功能状态。完整的线粒体的呼吸控制率较高,而损伤或功能发生障碍的线粒体较低。本研究结果表明,用铜离子终浓度为 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  的硫酸铜孵育线粒体,P/O,RCR,OPR 与对照组相比,均显著降低( $P < 0.05$ ),且铜的浓度越高,影响越大。表明线粒体内膜电子传递速度下降,ADP 对电子传递链电子传递的控制程度降低,反映氧化磷酸化过程在一定程度上的脱偶联,线粒体呼吸功能及能量代谢障碍,ATP 生成减少。

铜对线粒体膜通透性转换孔和线粒体呼吸均有较显著的影响,造成线粒体不同程度的肿胀,呼吸功能减弱,且随着铜浓度的升高,MPTP 和呼吸的变化均很明显。这些变化可能是微量元素铜对生物机体产生毒害作用的内在原因之一。

## 参考文献(References)

- [1] 侯国庆,梁秀龄,陈嵘.体外培养 Wilson 病患者肝细胞铜转运研究[J].中山医科大学学报,2000,21(5):330-333.  
HOU Guo-qing,LIANG Xiuling,CHEN Rong. Research on conveying of hepatocyte from Wilson patient *in vitro* culture [J]. *Academic Journal of Sun Yat-sen University of Medical Sciences*, 2000, 21(5): 330-333. (in Chinese)
- [2] CASSARINO D S, PARKS J K, PARKER W D, *et al.* The parkinsonian neurotoxin MPP<sup>+</sup> opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome C in isolated mitochondrial via an oxidative mechanism [J]. *Biochim Bio*  
*phys Acta*, 1999, 1453(1): 49-62.
- [3] DING W X, SHEN H M, ONG C N. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2000, 32(3): 547-555.
- [4] KRUMSCHNABEL G, MANZL C, BERGER C, *et al.* Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 209(1): 62-73.
- [5] NAWAZ M, MANZL C, KRUMSCHNABEL G. *In vitro* toxicity of copper, cadmium, and chromium to isolated hepatocytes from carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2005, 75(4): 652-661.
- [6] GREEN D R, REED J C. Mitochondria and apoptosis [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1390-1312.
- [7] TAKEYAMA N, MIKI S, HIRAKAWA A, *et al.* Role of the mitochondria permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2002, 274(1): 16-24.
- [8] HE L, LEMASTERS J J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores a new paradigm of pore structure and function [J]. *FEBS Lett*, 2002, 512(123): 1-7.
- [9] 金惠铭,卢键.细胞分子病理生理学[M].昆明:云南科技出版社,1997.  
JIN Hui-ming, LU Jian. *Pathologic Physiology of Cell-molecular* [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1997. (in Chinese)
- [10] MARZO I, BRENNER C, ZAMZAMI N, *et al.* The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspase and bcl-2-related proteins [J]. *Exp Med*, 1998, 187(8): 1261-1271.
- [11] MEDEIROS D J. Role of copper in mitochondrial biogenesis via interaction with ATP synthase and cytochrome c oxidase [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2002, 34(5): 389-395.
- [12] 杨福愉.蛋白质跨线粒体膜的运送[J].生物化学与生物物理学报,1999,31(4):353-356.  
YANG Fu-yu. Progress in protein translation across mitochondrial membrane [J]. *Acta of Biochimica et Biophysica Sinica*, 1999, 31(4): 353-356. (in Chinese)
- [13] GARCIA N, ZAZUETA Z, CARRILLO R, *et al.* Copper sensitizes the mitochondrial permeability transition to carboxyatractyloside and oleate [J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 209(1/2): 119-123.
- [14] 邱小忠,陈瑗,周玫.线粒体氧应激损伤的防御体系[J].生命的化学,2001,21(2):141-143.  
QIU Xiao-zhong, CHEN Yuan, ZHOU Mei. Defense system of oxidative stress impairment in mitochondria [J]. *Chemistry of Life*, 2001, 21(2): 141-143. (in Chinese)

(责任编辑 左翠萍)