

冷暴露对中缅树鼩肝脏、膈肌和心肌 线粒体呼吸的影响

谢静 王颖 练销 王政昆*

(云南师范大学生命科学学院, 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 昆明 650092)

摘要: 在4℃急性冷暴露(1 h, 4 h, 8 h, 24 h)和持续冷暴露(7 d, 14 d, 28 d)条件下, 测定中缅树鼩膈肌、心肌和肝脏的线粒体状态Ⅲ呼吸、状态Ⅳ呼吸、呼吸控制率(RCR)、线粒体蛋白含量以及肝脏线粒体P/O值的变化。结果表明: 肝脏线粒体状态Ⅲ、状态Ⅳ呼吸随着低温处理时间的延长, 呼吸速率均极显著增加, 在28 d后分别增加了132.9%、124.4% ($P < 0.01$), RCR与对照比较, 在8 h和7 d组分别显著增加了35.8%和48.4% ($P < 0.05$), 线粒体蛋白含量也极显著增加, 在28 d后增加了104.7% ($P < 0.01$), P/O值在整个低温处理过程中呈下降趋势, 在28 d后降低了40.2%, 达到极显著水平 ($P < 0.01$); 膈肌线粒体状态Ⅲ呼吸在整个低温处理期间没有显著变化, 状态Ⅳ呼吸在28 d达到极显著增加 ($P < 0.01$, 64.9%), RCR在28 d后显著降低 ($P < 0.05$, 42.1%), 线粒体蛋白只有4 h组有极显著增加 ($P < 0.01$, 45.2%); 心肌的状态Ⅲ呼吸在8 h组有着极显著的增加 ($P < 0.01$, 54.7%), 状态Ⅳ呼吸随着低温处理时间的增加而显著增加, 28 d后增加了94.7% ($P < 0.01$), RCR在28 d后降低37.8% ($P < 0.01$), 线粒体蛋白表现出先下降再上升的趋势, 8 h组下降37.8% ($P < 0.01$), 28 d增加25.2% ($P < 0.05$)。说明中缅树鼩在冷胁迫的条件下肝脏线粒体呼吸能力显著增强, 主要表现为状态Ⅳ呼吸即质子漏产热的显著增强, 膈肌和心肌的线粒体呼吸也具有一定的适应性变化, 补偿了冷胁迫条件下中缅树鼩增加的能量需求, 是中缅树鼩在冷胁迫中重要的适应对策。

关键词: 低温; 中缅树鼩; 膈肌; 心肌; 肝脏; 线粒体呼吸; 质子漏

中图分类号: Q494

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050(2008)02-0157-08

Effects of cold exposure on mitochondrial respiration of liver, diaphragm and cardiac muscle in tree shrews (*Tupaia belangeri*)

XIE Jing, WANG Ying, LIAN Xiao, WANG Zhengkun*

(School of Life Science of Yunnan Normal University, Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy Ministry of Education, Kunming 650092, China)

Abstract: The state III respiratory ability, state IV respiratory ability, respiration control ratio (RCR), total protein content and mitochondrial protein contents of liver, diaphragm and cardiac muscle in tree shrews (*Tupaia belangeri*) were measured during acute cold exposure for 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, and prolonged cold exposure for 7 days, 21 days and 28 days. The state III respiratory ability, state IV respiratory ability were measured by oxygen electrodes and the total protein content and mitochondrial protein contents were measured by Lowry method. The liver mitochondrial state III and IV respiratory ability both greatly increased with prolonged cold exposure, 132.9% and 124.4% ($P < 0.01$) respectively increased after 28 d. Compared to the controls, RCR increased by 35.8% and 48.4% ($P < 0.05$) in the 8 h and 7 d groups and the content of mitochondrial protein also increased by 104.66% ($P < 0.01$) while the P/O value showed a decreasing trend during the whole cold exposure process, showing a very significant level after 28 d, decreasing by 40.2% ($P < 0.01$). The respiration of the diaphragm muscle mitochondrial state III did not change evidently during the cold exposure process, however, the state IV respiration increased by 54.7% ($P < 0.01$) while RCR decreased by 42.1% ($P < 0.05$) and the mitochondrial protein increased by 45.2% ($P < 0.01$) only in the 4 h group. The state III respiration of the cardiac muscle mitochondria increased by 54.7% ($P < 0.01$) in the 8 h group and the state IV respiration significantly increased 94.7% by the cold exposure ($P < 0.01$), while RCR decreased by 37.8% ($P < 0.01$) and the content of

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30260021, 30560026); 云南省重点应用项目

作者简介: 谢静(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事动物生理生态学研究。

收稿日期: 2007-05-24; **修回日期:** 2008-01-18

* 通讯作者, corresponding author, Email: wz_k930@yahoo.com.cn

mitochondrial protein showed a trend that increased at first and decreased later and the 8 h group decreased by 37.8% ($P < 0.01$), and increased by 25.2% ($P < 0.05$) after 28 d. The mitochondrial respiration of liver was significantly enhanced during the cold stress incorporating that the increase of proton leakage and there was some adaptive change in the mitochondria respiration of diaphragm muscle and cardiac muscle also, which compensated for the increasing energy requirements to some degree under the cold condition. These were important strategies for *tupaia belangeri* to adapt to the cold.

Key words: Cold exposure; Liver; Muscle; Mitochondrial respiration; *Tupaia belangeri*; Proton leak

线粒体与细胞水平的能量代谢密切相关,主要负责将底物氧化并将能量储存在高能磷酸键中。线粒体呼吸分为四种状态,在状态Ⅳ呼吸过程中,质子不通过 ATP 合成酶而是直接通过质子传递体返回到线粒体内膜基质形成质子回漏的无效回路,这一过程就称为线粒体质子泄漏 (mitochondrial proton leak) (Porter, 2001),通常采用线粒体状态Ⅳ呼吸速率来反映质子泄漏的状态 (Bouillaud *et al.*, 2001)。质子泄漏产生的能量主要以热的形式释放 (Silva, 1995),使线粒体进行解偶联呼吸。在细胞的能量消耗过程中,很大一部分是由于线粒体质子泄漏所引起的 (Porter, 2001),而且在肝脏 (Nobes *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1990; Harper and Brand, 1993; Brand *et al.*, 1993)、骨骼肌 (Rolfe and Brand, 1996)、肾脏 (Krauss *et al.*, 1999)、胸腺细胞 (Porter *et al.*, 1999) 和脑组织 (Krauss *et al.*, 1999) 中都发现质子漏的存在。研究表明,肝脏线粒体的质子漏可以独自承担基础代谢率 (Basal metabolic rate; BMR) 的 5% (Brand *et al.*, 2000),而离体骨骼肌线粒体中的质子漏特征与肝脏和其他组织中的质子漏十分相似,表明肌肉质子漏也是 BMR 的重要贡献者,甚至高于肝脏,占到了基础代谢率的 15% (Brand *et al.*, 2000; Rolfe and Brand, 1996)。Rolfe 等 (1997) 认为心脏中质子漏对 BMR 的贡献约占 5% ~ 10%,从脑、肾分离出的线粒体中也发现了质子漏,推测各种组织中线粒体质子漏就可能共同承担了 BMR 的 25% ~ 30% (Brand *et al.*, 2000)。

中缅树鼯 (*Tupaia belangeri*) 属攀鼯目 (Scandentia) 树鼯科 (Tupaiaidae) 动物,主要分布于东南亚、印度、锡金、尼泊尔、缅甸、以及我国广西南部及海南岛等,为东洋界特有小型哺乳动物,中缅树鼯是该科中分布最广和分布纬度最高的一个种;我国云南、四川和贵州西南部很可能为该种分布北限,主要栖息地为温湿的阔叶林或针阔混交林 (王应祥, 1991)。本实验室以往的研究表明,分布于该过渡地带的中缅树鼯,其生理适应性

显示出了一定的过渡特征,同时又表现出一定的差异性 (王政昆等, 1994, 1995, 1996, 1999, 2000; 张武先等, 2001, 2002)。为了进一步了解线粒体质子漏对中缅树鼯冷适应产热的意义,我们选择了膈肌、心肌和肝脏组织作为测定对象,测定其在急性冷暴露和持续冷驯化状态下线粒体状态Ⅲ呼吸和状态Ⅳ呼吸的变化情况,探讨各组织解偶联呼吸与低温胁迫时间的关系,进而了解低温胁迫中 3 种组织线粒体的质子漏产热特征,为进一步研究低温胁迫下中缅树鼯这一低纬度小型哺乳动物的产热模式积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 动物处理

实验动物于 2006 年 9 月捕自云南省昆明市禄劝县屏山镇 (北纬 $25^{\circ}25'$ ~ $26^{\circ}22'$, 东经 $102^{\circ}13'$ ~ $102^{\circ}57'$) 附近灌丛中 (海拔 1 679 m), 动物捕回后单笼饲养, $12 \sim 14^{\circ}\text{C}$ 室温条件下适应 3 d, 光照 12L:12D, 此为 0 d 对照组。冷暴露组分 1 h, 4 h, 8 h, 1 d, 7 d, 14, 28 d 共 7 组, 每组 8 只动物, 在环境温度 $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光照 12L:12D、无巢材条件下单笼饲养。

实验动物均为非繁殖期成年个体,实验组与对照组中尽量雌雄各半,饲养地点为云南师范大学生命科学学院动物学实验室。

1.2 组织线粒体的制备

动物用断颈法处死后,迅速取出肝脏、心脏及膈肌。按照 Cannon 和 Lindberg (1979)、李庆芬等 (1994) 和王政昆等 (1995) 介绍的方法,将肝脏在冰浴中剪碎,加 5 倍体积 (W/V) 肝脏提取液,手动匀浆; 2 000 g, 4°C 离心 7 min, 弃沉淀; 取上清于 10 000 g, 4°C 离心 10 min, 弃上清; 将沉淀用适量提取液悬浮至 10 000 g, 4°C 离心 10 min, 弃上清; 所得沉淀即为线粒体,加适量提取液溶解,即可用于测定呼吸活性。心肌和膈肌线粒体的制备参照 Oufara 等 (1987) 和 Goglia 等 (1993) 的方法进行,离心同上。

1.3 线粒体呼吸活性测定

采用 CHLOTOLAB2 氧电极 (Hansatech Instruments Lab) 测定线粒体状态Ⅳ呼吸, 加5 $\mu\text{mol ADP}$ 测定状态Ⅲ呼吸和 P/O 值 (王政昆等, 1996); 呼吸底物为琥珀酸, 反应杯总体积为2 ml, 反应温度为 30℃。

蛋白质定量采用 Folin-Phenol 法, 以牛血清白蛋白为标准。

1.4 统计分析

数据采用 SPSS for Windows 10.0 统计软件包进行分析处理, 首先对相同冷暴露时间下, 连续测定两次以上的指标进行重复测量方差分析 (Repeated Measures), 结果显示均无显著性差异 ($P > 0.05$), 再采用单因子方差分析 (One-way ANOVA)。结果均以平均数 \pm SE 表示。

2 结果

2.1 线粒体状态Ⅲ呼吸

低温8 h组、24 h组、7 d组、14 d组和28 d组的中缅树鼩肝脏线粒体状态Ⅲ呼吸与对照组比较有极显著增加 ($P < 0.01$, 分别增加 40.5%、59.6%、102.9%、106.8% 和 132.9%)。不同时间冷暴露组的膈肌线粒体状态Ⅲ呼吸与对照组的比较没有明显变化 ($P > 0.05$)。低温处理8 h组的心肌线粒体状态Ⅲ呼吸与对照组比较有极显著的增加 ($P < 0.01$, 增加 54.7%)。(图 1)

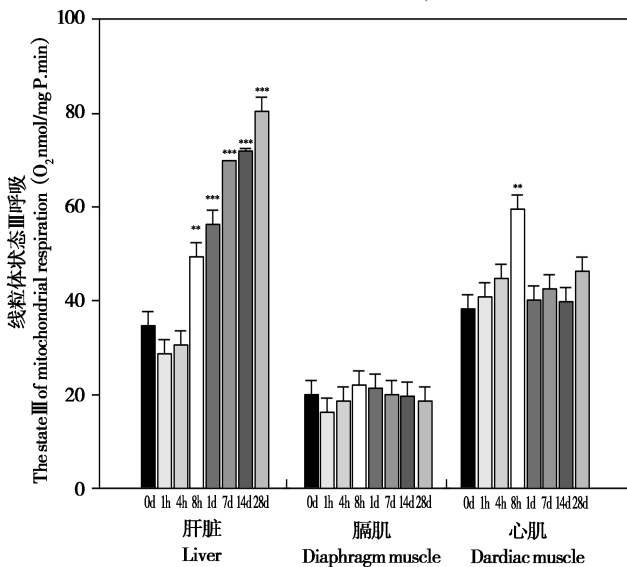


图 1 低温处理对中缅树鼩各组织线粒体状态Ⅲ呼吸的影响。

与对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Fig. 1 The effects of cold exposure on state III of mitochondrial respiration of some tissue in tree shrews. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

*** $P < 0.001$, compared with control

2.2 线粒体状态Ⅳ呼吸

肝脏线粒体状态Ⅳ呼吸在低温处理过程中呈现先下降后上升的趋势, 其中24 h组、7 d组、14 d组和28 d组与对照组比较有极显著增加 ($P < 0.01$, 分别增加 38.1%、39.5%、102.4% 和 124.4%)。低温处理8 h组、14 d组、28 d组的膈肌线粒体状态Ⅳ呼吸与对照组比较有显著增加 ($P < 0.05$, 分别增加 58.7%、32.9% 和 64.9%)。线粒体状态Ⅳ呼吸中, 低温处理4 h组、8 h组、24 h组、7 d组、14 d组和28 d组与对照组比较均有极显著增加 ($P < 0.01$, 增加 60.4%、86.2%、60.6%、76.5%、78.9% 和 94.7%) (图 2)。

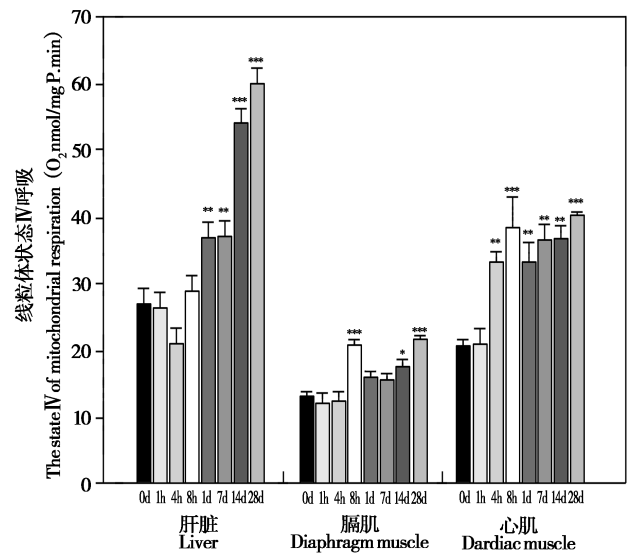


图 2 低温处理对中缅树鼩各组织线粒体状态Ⅳ呼吸的影响。

与对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Fig. 2 The effects of cold exposure on state IV of mitochondrial respiration of some tissue in tree shrews. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

*** $P < 0.001$, compared with control

2.3 线粒体呼吸控制率

肝脏线粒体呼吸控制率变化有波动, 其中低温处理8 h组与对照比较增加 35.8% ($P < 0.05$), 低温处理7 d组与对照组比较极显著增加 48.4% ($P < 0.01$)。膈肌线粒体呼吸控制率低温处理8 h组和低温处理28 d组与对照组比较分别降低 30% 和 42% ($P < 0.05$)。心肌线粒体呼吸控制率在急性低温处理阶段 (0 ~ 24 h) 波动很大, 其中低温处理1 h组和24 h组与对照比较分别下降 14.6% 和 33.5% ($P < 0.01$); 在持续低温处理中, 低温处理7 d、14 d、28 d组与对照组比较有极显著下降 ($P < 0.01$, 下降 36.8%、42.2% 和 37.84%) (图 3)。

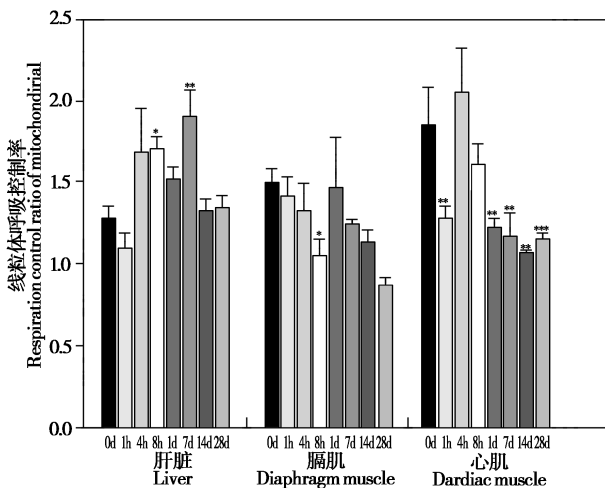


图3 低温处理对中缅树鼩各组织线粒体呼吸控制率的影响。

与对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.000$

Fig. 3 The effects of cold exposure on RCR of mitochondrial respiration of some tissue in tree shrews. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, compared with control

2.4 线粒体蛋白含量

中缅树鼩肝脏线粒体蛋白含量在急性低温处理阶段有下降趋势，而低温处理14 d组和28 d组与对照组比较有极显著增加 ($P < 0.01$ ，分别增加151.2%和104.7%)。隔肌线粒体蛋白含量的变化总体上比较稳定，只是低温处理4 h组与对照组比较有极显著增加 ($P < 0.01$ ，增加45.2%)。心肌线粒体蛋白含量在低温处理1 h组、8 h组与对照组比较有显著下降 ($P < 0.05$ ，分别下降23.4%和37.1%)；随着低温处理时间的延长，蛋白含量逐渐增加，低温处理28 d组与对照组比较有显著增加 ($P < 0.05$ ，增加25.2%)。(图4)

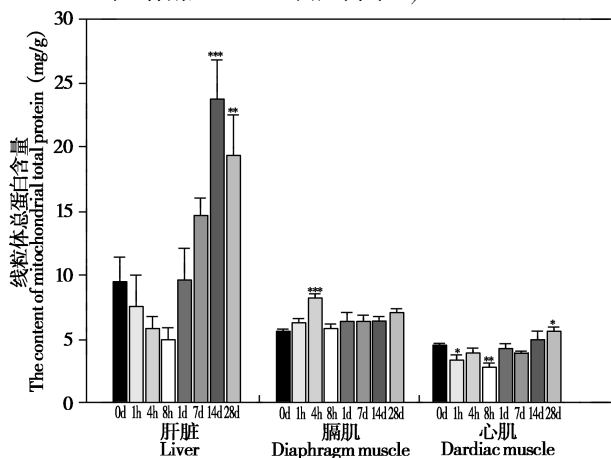


图4 低温处理对中缅树鼩各组织线粒体总蛋白含量的影响。

与对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Fig. 4 The effects of cold exposure on mitochondrial protein of some tissue in tree shrews. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, compared with control

2.5 肝脏线粒体呼吸 P/O 值

中缅树鼩肝脏线粒体呼吸 P/O 值在整个低温处理过程中呈下降趋势，其中低温处理8 h组、24 h组、7 d组、14 d组和低温处理28 d组与对照组比较分别下降20.7%、17.9%、21.0%、35.4%和40.2% ($P < 0.01$) (图5)。

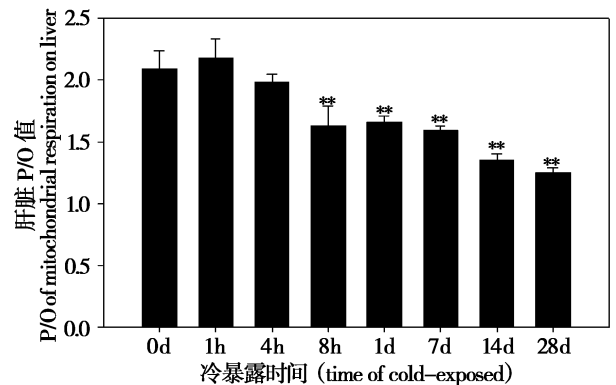


图5 低温处理对中缅树鼩肝脏线粒体呼吸 P/O 的影响。与对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Fig. 5 The effects of cold exposure on P/O of mitochondrial respiration of liver in tree shrews. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with control

3 讨论

线粒体是哺乳动物耗氧的主要部位，但在氧化过程中释放出的能量并不能全部转移到 ATP 中，有部分能量以热量的形式释放，出现线粒体质子泄漏 (mitochondrial proton leak)，称为解偶联呼吸 (Rolfe *et al.*, 1994, 1999; Bouillaud, 2001)。质子漏可能对哺乳动物的体温调节有着重要的贡献 (Brand *et al.*, 1991)，进一步的研究发现，在所有的动物中，质子漏都占到了代谢率的20%~25%。有研究证实质子泄漏与基础代谢率显著相关 ($r = 0.75$) (Brookes *et al.*, 1998)，可能对基础代谢率有着重要的贡献 (Jeff and Kevin, 1999)。Porter 和 Brand (1995) 比较了一系列不同身体大小的动物肝细胞中质子泄漏占整个耗氧速率的比例，结果发现随着个体大小的增加，肝细胞的耗氧速率增加，同时发现质子漏的速率也随之增加，它在肝细胞整体耗氧的体系中，比例几乎稳定在25%左右。因此，从变温动物到恒温动物中，质子漏在基础代谢率中占据的比例都是相似的 (Jeff and Kevin, 1999)。当恒温动物 (Himms-Hagen, 1990) 受到低温胁迫时，骨骼肌和褐色脂肪组织 (Brown adi-

pose tissue, BAT) 的产热作用均有显著增强, 以维持动物的体温 (Silva, 1995)。肝脏的产热能力对小型哺乳动物具有重要的作用, 动物的基础代谢率 (basal metabolic rate, BMR) 中大约有 20% ~ 25% 来自肝脏 (Argyropoulos, 2002)。低温诱导的产热增强与线粒体的解偶联呼吸相关 (Harper and Brand, 1993), Oufara 等 (1988) 在北方小沙鼠 (*Gerbillus campestris*) 冷驯化实验中还发现, 肝脏线粒体状态 IV 呼吸当以琥珀酸为底物时, 无论单位呼吸能力还是总呼吸能力, 冷驯化组明显增加, 而根田鼠 (*Microtus oeconomus*) 的状态 IV 呼吸 5℃ 驯化组明显高于 23℃ 对照组 (王德华等, 1996)。

关于线粒体质子漏的机制还没有完全研究清楚, 然而, 线粒体内膜上的脂质成分和解偶联蛋白 (uncoupling protein, UCP) 起到了很重要的作用, 虽然近来有文献报道认为 UCPs 在质子漏中的作用并不是很大 (Himms-Hagen and Harper, 2001; Stuart *et al.*, 2001; Echtay *et al.*, 2003; Nedergaard and Cannon, 2003; Schrauwen *et al.*, 2003)。目前发现的解偶联蛋白有 UCP1、UCP2、UCP3、UCP4 和 UCP5 等多种 (Ricquier and Bouillaud, 2000), 其中 UCP2 在动物体内分布广泛, UCP3 则主要分布于 BAT 和肌肉组织中 (Schrauwen *et al.*, 2002)。许多学者认为, UCP2 和 UCP3 可能是与质子漏相关的蛋白质 (Ricquier and Bouillaud, 2000; Porter, 2001; Schrauwen *et al.*, 2002)。

在急性低温处理阶段, 肝脏状态 III 呼吸在 8 h 以后随着冷暴露时间的增加有极显著增强; 而状态 IV 呼吸却有着明显的先下降再增加的趋势。这种变化可能与中缅树鼩生存的热带亚热带高原气候相适应, 4 h 左右短的冷刺激与日温差变化较大 (王应祥等, 1991) 的生存环境相似, 动物以颤抖性产热的方式来释放热量维持体温, 机体内部对冷胁迫没有产生急剧的生理反应; 但低温处理持续至 8 h 后, 机体对冷胁迫的生理生化反应开始加剧, 肌肉的颤抖性产热逐渐停止 (Nedergaard *et al.*, 2001), 原有的 ATP 不能满足机体正常生化反应的需要, 对热能的需求也增加, 因此肝脏状态 III、IV 呼吸速率均显著增强以增加产能和产热。低温处理 8 h 到 1 d 可能是中缅树鼩肝脏线粒体呼吸从急性冷适应到持续冷适应的一个过渡过程, 这与本实验室以前的初步研究结果相似 (王颖等, 2004)。

在持续低温处理过程中, 肝脏作为重要的产热器官 (Argyropoulos and Harper, 2002), 除了绝对

重量和相对重量都有显著提高 (王政昆等, 1996) 外, 低温处理 28 d 动物的状态 III、IV 呼吸较对照分别提高了 132.9% 和 124.4%, 而且与冷暴露时间呈显著的正相关, 这种变化也与中缅树鼩冷驯化条件下 BMR 的变化是一致的 (王政昆等, 1995b)。通常, 动物的 BMR 中大约 70% 来自内脏器官 (Claussen *et al.*, 1991), 其中肝脏占有极为重要的地位 (Brand *et al.*, 1991; Porter and Brand, 1993; Coutre and Hulbert, 1995), 其代谢产热作用约占 BMR 的 20% ~ 25% (Brand *et al.*, 1991)。因此, 冷暴露刺激中缅树鼩产热增加, 显然与肝脏线粒体氧化能力增强有关, 这与一些啮齿动物的结果相同, 如冷暴露导致大白鼠肝脏细胞的耗氧量增加 30% ~ 80% (Videla *et al.*, 1975); 圆睡鼠 (*Eliomys querinus*) 线粒体肝脏状态 IV 呼吸增加 85.9% (Lanni *et al.*, 1990); 北方小沙鼠增加 95.3% (Oufara *et al.*, 1987)。呼吸控制率 (RCR, 状态 III/状态 IV 呼吸) 定量描述了线粒体偶联呼吸状态 (Silva, 1995), 呈先下降后上升的变化, 这可能反映了机体对 ATP 及热量需求的变化, 而这两者都与跨膜势能相关, 即线粒体通过跨膜势能来驱动 ATP 合成或产热, 如果大量需求 ATP, 必然使状态 III 合成 ATP 速率提高, 这样使线粒体的跨膜势能降低, 从而使驱动质子漏的动力不足, 使质子漏的速率降低。这种相互调节机制, 能够保证机体不至于出现能量的浪费, 同时也提高了各种反应的速度和对各种刺激因子的敏感度 (Harper and Brand, 1993)。中缅树鼩肝脏线粒体蛋白含量也随着持续低温处理时间的增加而显著增加, 并且与冷驯化时间显著相关。冷驯化也能导致北方小沙鼠肝脏总蛋白 (Bourhim *et al.*, 1990) 和圆睡鼠线粒体蛋白 (Lanni *et al.*, 1990) 显著增加, 其中线粒体蛋白增加的比例都较总蛋白高, 这种变化与低温下 BMR 增加的幅度较高有关 (Lanni *et al.*, 1990)。中缅树鼩在持续低温处理过程中, 线粒体蛋白含量的变化趋势与其个体 BMR 变化也相符 (王政昆等, 1995b)。因此, 低温处理下中缅树鼩肝脏蛋白质含量增加, 尤其是线粒体蛋白质含量增加, 是增加产热作用的重要因素之一。

另外也有些小型哺乳动物具有不同的调节方式, 如冷胁迫对布氏田鼠 (*Lasiopodomys brandtii*) 肝脏线粒体状态 III 呼吸和状态 IV 呼吸没有显著影响 ($P > 0.05$) (李庆芬等, 1995); 低温处理对根田鼠肝脏线粒体蛋白含量的影响也不显著 ($P >$

0.05) (王德华等, 1996), 这些均与中缅树鼩不同, 可能是因为低温处理后这些北方典型小型哺乳动物 BMR 产热增加幅度明显低于中缅树鼩 (王政昆等, 1996), 它们主要依赖于 NST 来增加冷胁迫中的产热 (王德华等, 1996)。

因此, 在低温处理中, 中缅树鼩肝脏线粒体蛋白含量和线粒体氧化能力 (状态 IV、状态 III 呼吸) 显著增加, 质子漏产热能力增强, 从而导致 BMR 增加, 提高了动物抵抗低温的能力。

对中缅树鼩 BAT 持续低温处理组能量代谢的研究表明, 在持续低温处理阶段 BAT 出现增生, 非颤抖性产热加强, 但这种产热作用的增强却没有典型的北方物种强 (王政昆等, 1996), 而肌肉的产热能力很可能在动物适应低温中起到重要的作用, 这与肌肉在动物身体中所占的比例较大有关 (Claussen *et al.*, 1991)。

在急性低温处理阶段, 膈肌状态 III 呼吸变化趋势比较平缓, 因此其在低温处理条件下 ATP 的合成可能也比较稳定, 只是在低温处理初期有一定程度的波动, 这可能与低温处理初期动物心跳加速, 呼吸速率增强, 膈肌和心肌运动加剧有关。在 8 h 组中, 状态 IV 呼吸与对照比较极显著增加 ($P < 0.01$), 而呼吸控制率与对照比较有显著下降 ($P < 0.05$)。Rofle 等 (1999) 认为在骨骼肌中 UCP3 可以介导质子泄露产热; Ruben 等 (2001) 的实验表明低温暴露 24 h 可以使离体线粒体的跨膜势能降低和骨骼肌的 UCP3 的表达增加, 因此, 推测这种急性低温处理 8 h 组状态 IV 呼吸的增强可能也与低温刺激质子泄漏产热相关。

在持续低温处理阶段, 膈肌状态 IV 呼吸在低温处理 14 d 组出现显著增长 ($P < 0.05$), 28 d 时出现极显著的增长 ($P < 0.01$)。表明在持续的低温处理过程中, 膈肌在中缅树鼩的冷适应产热增加中起到一定作用, 为冷胁迫下中缅树鼩 BMR 增加提供基础。虽然膈肌在整个动物体中所占比例不大, 但作为与呼吸密切相关的器官, 其对于在冷环境中动物维持胸腔的温度起到一定作用。这可能与中缅树鼩持续低温处理中 NST 的产热活性较典型的北方啮齿类低 (王政昆等, 1996), 需要代偿性产热相关, 这种产热模式对于中缅树鼩这一热带亚热带小型哺乳动物的冷适应十分有益。

在实验啮齿动物中, 持续冷暴露对动物心血管系统也具有显著的影响 (Christopher, 1993)。在冷驯化的小白鼠中, NE 诱导的脉搏输出量及冠状动

脉血流量增加 (Hirata and Nagaska, 1981)。心脏细胞的肌红蛋白含量 (Christopher, 1993)、心肌细胞的耗氧显著增加 (Claussen *et al.*, 1991), 这些变化很可能与动物在低温下产热增加, 血液循环加速有密切关系 (Christopher, 1993)。中缅树鼩持续低温处理下, 心肌线粒体除了状态 IV 呼吸增强、线粒体蛋白含量增加等变化外, 心脏重量和细胞色素 C 氧化酶的活性也显著增强 (王政昆等, 1996)。Rofle 等 (1997) 认为心肌对于 BMR 增加的贡献约占 5% ~ 10%, 因此认为低温处理中缅树鼩心肌状态 IV 呼吸显著加强以及线粒体蛋白含量的增加, 可能与此阶段质子漏产热增强及其 BMR 增强相关。而王德华等 (1996) 对根田鼠的研究表明, 低温处理对于心肌线粒体蛋白含量的增加并不显著 ($P > 0.05$)。这可能仍然反映了中缅树鼩与典型北方小型哺乳动物在冷胁迫下产热模式的差异。

在急性低温处理和持续低温处理过程中, 肝脏、膈肌和心肌的状态 IV 呼吸与对照比较都有不同程度的增强, 这种变化可能与质子漏产热相关。研究表明质子漏广泛地分布于体内各种组织的线粒体中, 而质子漏产热占动物 BMR 的 20% ~ 30% (Fleury *et al.*, 1997), 这对于恒温动物维持体温的恒定具有普遍意义。同时, 由于中缅树鼩分布于云贵高原, 属于树鼩分布北限, 为典型的亚热带高原气候, 年温差小, 日温差大, 冬短无夏 (彭燕章等, 1991), 其终年经历的冷胁迫远远没有典型北方小型啮齿类多, 因此, 中缅树鼩对低温的适应对策也具有一定的特殊性。尤其在持续低温处理中, 与典型的北方物种相比, 中缅树鼩 BAT 非颤抖性产热能力的增加显著低于北方的小型哺乳类, 而 BMR 产热能力的增加却显著高于典型的北方小型哺乳动物 (王政昆等, 1996), 需要其他组织细胞的质子漏产热来满足 BMR 的这一增加。因此肝脏和肌肉冷胁迫下的产热能力可能高于典型的北方物种, 另外 Speakman 等 (2004) 的研究认为, 质子漏和增加的 BMR 能够使机体减少抗氧化物和衰老引起的损伤, 从而更好地适应环境和生存。

在低温处理过程中, 中缅树鼩 BAT 产热能力的提高明显低于北方小型啮齿动物, 不能满足机体对能量的需求, 而肝脏线粒体呼吸能力显著增强, 尤其是状态 IV 呼吸, 具体表现为质子漏产热的增强, 是中缅树鼩在冷胁迫中重要的适应对策, 膈肌和心肌的线粒体呼吸也具有一定的适应性变化, 产热的能力得到提高, 在一定程度上补偿了冷胁迫下

中缅甸树鼩增加的能量要求。

参考文献:

- Argyropoulos G, Harper M E. 2002. Molecular biology of thermoregulation invited review: uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol*, **92**: 2187 – 2198.
- Bouillaud F, Couplan E, Pecqueur C, Ricquier D. 2001. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *J Biochimica et Biophysica Acta*, **1504**: 107 – 119.
- Bourhim M, Barre H, Oufara S, Minaire Y, Chatonnet J, Cohen F, Rouanet J L. 1990. Increase in cytochrome oxidase capacity of BAT and other tissues in cold-acclimated gerbils. *Am J Physiol*, **258**: R1291 – R1298.
- Brand M D, Bishop T, Botulier R G. 2000. Mitochondrial proton conductance, standard metabolic rate and metabolic depression. In: Heldmaier G, Klingenspor M eds. *Life in the Cold*. Berlin: Springer, 413 – 430.
- Brand M D, Chien L F, Rolfe D F S. 1993. Regulation of oxidative phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, **21**: 757 – 762.
- Brand M D, Couture P, Else P L, Withers K W, Hulbert A J. 1991. Evolution of energy metabolism. *Biochem J*, **275**: 81 – 86.
- Brookes P S, Buckingham J A, Tenreiro A M, Hulbert A J, Brand M D. 1998. The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition—influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol*, **119B**: 325 – 334.
- Brown G C, Lakin-Thomas P L, Brand M D. 1990. Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *Eur J Biochem*, **192**: 355 – 362.
- Cannon B, Lindberg O. 1979. Mitochondria from adipose tissue: isolation and properties. In: Fleischer S, Packer L eds. *Methods in Enzymology*. In: Fleischer S, Packer L eds. New York: Academic Press, **55**: 65 – 78.
- Christopher J G. 1993. *Temperature Regulation in Laboratory Rodents*. Cambridge: Cambridge University Press, 1 – 276.
- Claussen T, Hardeveld C V, Everts M E. 1991. Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *J Physiol Review*, **71** (3): 733 – 773.
- Couture P, Hulbert A J. 1995. Relationship between body mass, tissue metabolic rate, and sodium pump activity in mammalian liver and kidney. *Am J Physiol*, **268**: 641 – 650.
- Echtay K S, Esteves T C, Pakay J L, Jakobsons M B, Lambert A J, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig A J, Wang S, Roebuck S J, Brand M D. 2003. A signaling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J*, **22**: 4103 – 4110.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meynueis C, Bouillaud F, Seldin M F, Surwit R S, Ricquier D, Warden C H. 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *J Nature Genet*, **15**: 269 – 273.
- Goglia F, Lanni A, Duchamp C, Rouanet J-L, Barre H. 1993. Effect of cold acclimation on oxidative capacity and respiratory properties of liver and muscle mitochondria in ducks (*Cairina moschata*). *Comp Biochem Physiol*, **106B** (1): 95 – 101.
- Harper M E, Brand M D. 1993. The quantitative contributions of mitochondrial proton leak and ATP turnover reactions to the changed respiration rates of hepatocytes isolated from rats of different thyroid status. *J Biol Chem*, **268** (20): 14850 – 14860.
- Himms-Hagen J. 1990. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J*, **4**: 2890 – 2898.
- Himms-Hagen J, Harper M E. 2001. Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *J Exp Biol Med (Maywood)*, **226**: 78 – 84.
- Hirata K, Nagasaka T. 1981. Calorigenic and cardiovascular responses to norepinephrine in anesthetized and unanesthetized control and cold-acclimated rats. *The Japanese Journal of Physiology*, **31** (3): 305 – 16.
- Jeff A, Kevin M. 1999. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **31** (5): 517 – 525.
- Krauss S, Buttgeriet F, Brand M D. 1999. Effects of the mitogen-activated protein kinase A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*, **1412**: 129 – 138.
- Lanni A, Martins R, Ambid L, Goglia F. 1990. Liver and brown fat mitochondrial response to cold in the garden dormouse (*Eliomys quercinus*). *Comp Biochem Physiol B*, **97** (4): 809 – 813.
- Li Q F, Huang C X, Liu X T. 1995. Effects of photoperiod and temperature on thermogenesis in Brandt's voles (*Microtus brandti*). *Acta Zool Sin*, **41** (4): 362 – 369. (in Chinese)
- Li Q F, Li N, Sun R Y. 1994. The adaptive thermogenesis of Brandt's voles (*Microtus brandti*) during cold exposure. *Acta Theriologica Sinica*, **14** (4): 286 – 293. (in Chinese)
- Nedergaard J, Cannon B. 2003. The “novel” “uncoupling” proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *J Exp Physiol*, **88**: 65 – 84.
- Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A. 2001. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *J Biochimica et Biophysica Acta*, **1504**: 82 – 106.
- Nobes C D, Brown G C, Olive P N, Brand M D. 1990. Non-ohmic proton conductance of the mitochondrial inner membrane in hepatocytes. *J Biol Chem*, **265**: 12903 – 12909.
- Oufara S, Barre H, Rouanet J-L, Chatonnet J. 1987. Adaptation to extreme ambient temperatures in cold-acclimated gerbils and mice. *Am J Physiol*, **253**: 39 – 45.
- Oufara S, Barre H, Rouanet J-L, Minaire Y. 1988. Great adaptability of brown adipose tissue mitochondria to extreme ambient temperatures in control and cold-acclimated gerbils as compared with mice. *Comp Biochem Physiol*, **90B**: 209 – 214.
- Porter R K, Brand M D. 1993. Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature*, **362** (15): 628 – 630.
- Porter R K, Brand M D. 1995. Cellular oxygen consumption depends on

- body mass. *Amer J Physiol*, **268**: R641 – R650.
- Porter R K, Joyce O J, Farmer M K. 1999. Indirect measurement of mitochondrial proton leak and its application. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **23** (6): S12 – S18.
- Porter R K. 2001. Mitochondrial proton leak: a role for uncoupling proteins 2 and 3. *J Biochimica et Biophysica Acta*, **1504**: 120 – 127.
- Ricquier D, Bouillaud F. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*, **345**: 161 – 179.
- Rolfe D F S, Brand M D. 1996. Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and standard metabolic rate. *Am J Physiol*, **270**: C1380 – C1389.
- Rolfe D F S, Brand M D. 1996. Proton leak and control of oxidative phosphorylation in perfused, resting rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, **1276** (1): 45 – 50.
- Rolfe D F S, Brown G C. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *J Physiol Rev*, **77** (3): 731 – 758.
- Rolfe D F S, Hulbert A J, Brand M D. 1994. Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *J Biochim Biophys Acta*, **1188**: 405 – 416.
- Rolfe D F S, Newman J M B, Buckingham J A. 1999. Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am J Physiol*, **276**: C692 – C699.
- Ruben A S, Maria J, Rolando B C. 2001. Cold-induced changes in the energy coupling and the UCP3 level in rodent skeletal muscles. *J Biochimica et Biophysica Acta*, **45044**: 1 – 9.
- Schrauwen P, Hoeks J, Schaart G, Kornips E, Binas B, Van De Vusse G J, Van Bilsen M, Luiken J J, Coort S L, Glatz J F, Saris W H, Hesselink M K. 2003. Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB J*, **17**: 2272 – 2274.
- Schrauwen P, Westerterp-Plantenga M S, Kornips E. 2002. The effect of mild cold exposure on UCP3 mRNA expression and UCP3 protein content in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**: 450 – 457.
- Silva J E. 1995. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *J Thyroid*, **5**: 481 – 492.
- Speakman J R, Talbot D A, Selman C, Snart S, McLaren J S, Redman P, Krol E, Jackson D M, Johnson M S, Brand M D. 2004. Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *J Aging Cell*, **3**: 87 – 95.
- Stuart J A, Cadenas S, Jekabsons M B, Roussel D, Brand M D. 2001. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *J Biochim Biophys Acta*, **1504**: 144 – 158.
- Videla L, Flattery K V, Sellers E A, Yisrael. 1975. Ethanol metabolism and liver oxidative capacity in cold acclimation. *J Pharmacol Exp Ther*, **192** (33): 575 – 582.
- Wang D H, Sun R Y, Wang Z W, Liu J S, Sun Z. 1996. Adaptive thermogenic properties during cold exposure in root voles (*Microtus oeconomus*). *Acta Zool Sin*, **42** (4): 368 – 376. (in Chinese)
- Wang Y, Wang Z K, Xu W J, Yang R R, Xu D X. 2004. The Effects of cold acclimation on mitochondrial respiration of liver in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Journal of Yunnan Normal University*, **24** (4): 53 – 56. (in Chinese)
- Wang Z K. 1996. Comparative study of adaptability thermogenesis of small mammals in tropical and subtropical at our country (Doctorate dissertation). *Beijing Normal University*, 14 – 79. (in Chinese)
- Wang Z K, Li Q F, Sun R Y. 1999. Effects of photoperiod and temperature on thermogenesis in the tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Acta Zool Sin*, **45** (3): 287 – 293. (in Chinese)
- Wang Z K, Li Q F, Sun R Y. 2000. Effects of exogenous melatonin on the adaptive thermogenesis in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Acta Zool Sin*, **46** (2): 154 – 159. (in Chinese)
- Wang Z K, Sun R Y, Li Q F. 1995. Characteristics of the nonshivering thermogenesis and cellular respiration in the tree shrews. *Zool Res*, **16** (3): 239 – 248. (in Chinese)
- Wang Z K, Sun R Y, Li Q F, Fang J M. 1994. Characteristics of the resting metabolic rate of the tree shrews. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, **30** (3): 408 – 414. (in Chinese)
- Zhang W X, Wang Z K, Nian Y K, Xu W J, Yao Z. 2001. The effects of cold acclimation on thermogenesis in tree Shrews (*Tupaia belangeri*). *Zool Res*, **22** (4): 287 – 291. (in Chinese)
- Zhang W X, Wang Z K, Xu W J, Yao Z, Nian Y K. 2002. The Effects of Cold Acclimation on the metabolism of energy in Tree Shrews (*Tupaia belangeri*). *Acta Theriologica Sinica*, **22** (2): 123 – 129. (in Chinese)
- 王应祥, 李崇云, 马世来. 1991. 树鼩的分类与生态. 树鼩生物学. 昆明: 云南科技出版社, 21 – 70.
- 王政昆, 孙儒泳, 李庆芬. 1995b. 中缅树鼩的非颤抖性产热及细胞呼吸特征. 动物学研究, **16** (3): 239 – 248.
- 王政昆, 孙儒泳, 李庆芬, 房继明. 1994. 中缅树鼩静止代谢率的研究. 北京师范大学学报 (自然科学版), **30** (3): 408 – 414.
- 王政昆, 李庆芬, 孙儒泳. 2000. 外源性褪黑激素对中缅树鼩适应性产热特征的影响. 动物学报, **46** (2): 154 – 159.
- 王政昆, 李庆芬, 孙儒泳. 1999. 光周期和温度对中缅树鼩产热能力的影响. 动物学报, **45** (3): 287 – 293.
- 王政昆. 1996. 我国热带亚热带小型兽类适应性产热对策的比较研究 (博士学位论文). 北京师范大学, 14 – 79.
- 王颖, 王政昆, 徐伟江, 杨仁尧, 许冬星. 2004. 冷驯化对中缅树鼩肝脏线粒体呼吸的影响. 云南师范大学学报, **24** (4): 53 – 56.
- 王德华, 孙儒泳, 王祖望, 柳劲松, 孙志. 1996. 根田鼠低温处理过程中的适应性产热特征. 动物学报, **42** (4): 368 – 376.
- 张武先, 王政昆, 念永坤, 徐伟江, 姚政. 2001. 冷驯化对中缅树鼩产热能力的影响. 动物学研究, **22** (4): 287 – 291.
- 张武先, 王政昆, 徐伟江, 姚政, 念永坤. 2002. 冷驯化对中缅树鼩能量代谢的影响. 兽类学报, **22** (2): 123 – 129.
- 李庆芬, 李宁, 孙儒泳. 1994. 布氏田鼠对低温的适应性产热. 兽类学报, **14** (4): 286 – 293.
- 李庆芬, 黄晨西, 刘小团. 1995. 光周期和温度对布氏田鼠产热的影响. 动物学报, **41** (4): 362 – 369.
- 彭燕章, 叶智章, 邹如金. 1991. 树鼩生物学. 昆明: 云南科技出版社, 1 – 12.