

线粒体呼吸链电子漏与质子漏的相互作用

—— 电子漏引起质子漏

刘树森 焦选茂

(中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

王孝铭 张 力

(哈尔滨医科大学病理生理教研室, 哈尔滨 150086)

摘要 通过对心肌缺血再灌损伤(内源产生 O_2^- 作用)和黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统与离体心肌线粒体保温(外源 O_2^- 作用)两个方面的实验证明, 无论外源 O_2^- 或是缺血再灌产生的内源 O_2^- 对线粒体的损伤作用主要都表现于: (1)降低呼吸链的质子转运活性, 加大质子漏和降低 $H^+/2e$ 比值; (2)降低能化态跨膜电位差. O_2^- 的损伤作用对上述诸参数的影响都表现了量效关系和时效关系. O_2^- 对电子传递活性和静息态跨膜电位无明显影响.

3, 4-二羟基苯基乳酸盐具有清除氧自由基作用, 对缺血再灌产生的内源 O_2^- 和黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统产生的外源 O_2^- 对心肌线粒体的能化态跨膜电位和质子转运活性及 $H^+/2e$ 比的损伤都有保护作用.

以上实验结果, 不但证明心肌线粒体缺血再灌早期损伤的机制可能主要与 O_2^- 对 H^+ 跨膜转运的损伤和增加质子回漏有关, 而且也对线粒体呼吸链的电子漏(O_2^- 生成)引起质子漏的假设提供了实验支持.

关键词 线粒体 超氧阴离子自由基 跨膜电位 $H^+/2e$ 比 质子漏

自 1968 年 McCord 与 Fridovich 发现生物组织中广泛存在清除超氧阴离子自由基(O_2^-)的超氧化物歧化酶(SOD)以来, 生物体内存在内源性氧自由基才得到大量实验证据. 心肌中氧自由基的来源有几个方面, 包括心肌血管内皮细胞的黄嘌呤氧化酶系统(X/XO); 心肌线粒体的呼吸链以及血管内嗜中性粒细胞, 但其产生的起始氧自由基均为超氧阴离子自由基 O_2^- . 线粒体作为心肌能量代谢的主要场所, 对细胞生命活动起着重要作用. 已知哺乳动物消耗氧的 90% 以上被线粒体所利用, 在生理条件下, 从脱氢酶反应中, 电子由氢裂解出来, 通过呼吸链传递到 O_2 的途中, 并非全部电子都能沿呼吸链传递, 最终在细胞色素 C 氧化酶上以 4 电子还原 O_2 生成两分子水, 而是在途中“漏出”部分单电子, 直接与氧形成 O_2^- . 这一部分氧的单价还原形成 O_2^- 现象称为电子单价泄漏(electron univalent leak)或简称电子漏(electron leak).

呼吸链的电子漏是生物体中氧自由基(O_2^-)的恒定的主要来源,其生物化学意义是自由基生物学的重要课题之一^[2]。有实验表明,在心肌缺血/再灌注的病理损伤过程中,在心肌缺血/再给氧时,线粒体耗氧增加也使 O_2^- 产生量增加,同时线粒体能量转换功能也受损伤,表现为ATP生成量减少等^[3],但 O_2^- 在呼吸链反应中的产生机制及对线粒体功能损伤的作用机制都不清楚。

我们实验室的研究证明,心肌缺血/再灌注早期的损伤在于线粒体质子转位发生变化,呼吸链复合物I+II和复合物II+III的 $H^+/2e$ 比下降^[4]。最近,刘树森、黄健平提出呼吸链电子漏与质子漏的相互作用与氧化磷酸化能量分配与调控机制的假设,认为电子漏产生的 O_2^- 可能与膜表面的高能 H^+ 形成 HO_2^+ 的跨膜而引起线粒体的质子漏,因而 O_2^- 具有内源质子载体的作用¹⁾。本文观察外源的 O_2^- 产生对线粒体能化前后跨膜电位($\Delta\psi$)和质子转位的影响,以探讨呼吸链的电子漏(O_2^- 的生成)与质子漏的相互关系,同时与心肌缺血/再灌损伤中产生的 O_2^- 的损伤作用进行比较,结果证明 O_2^- 在线粒体能量转换中的作用机制与 H^+ 漏的增加有关。从而有利于支持电子漏导致质子漏的假想。

1 材料和方法

1.1 化学试剂

牛血清白蛋白(BSA,无脂肪酸),黄嘌呤(Xanthine),鱼藤酮(Rotenone),Rhodamine 123均为美国Sigma Co.产品;黄嘌呤氧化酶为中国科学院上海生物化学研究所东风生化技术公司产品;氰化钾为北京化工厂产品,铁氰化钾($K_3Fe(CN)_6$)为北京红星化工厂产品,实验中所用其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌线粒体的制备 健康雄性SD大鼠由中国科学院动物研究所实验动物饲养室提供,体重220~300 g,断头后迅速取心。用电动均浆器制成心肌匀浆,差速离心分级分离线粒体。分离液为250 mmol/L Sucrose, 2 mmol/L Hepes, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 mg/mL BSA, pH 7.4。分离操作均在0~4℃条件下进行。线粒体悬液蛋白质含量用双缩脲法测定。

1.2.2 心肌线粒体跨膜电位差的定量测定 根据文献[5],用中国科学院动物研究所细胞室建立的荧光探针流动透析装置来定量测定线粒体静息态和能化态时跨膜电位差($\Delta\psi$),阳离子荧光染料Rh123作为探针,实验所用浓度对线粒体无明显毒性^[6]。线粒体的能化产生 $\Delta\psi$ 导致Rh123进入线粒体引起荧光淬灭,去能化则使其荧光强度回升。0.5 mL反应介质(225 mmol/L Sucrose, 20 mmol/L KCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L K^+-Pi , 2 mmol/L Tris- Cl^- , pH 7.4)中先加2 μ mol/L Rotenone和0.4 μ mol/L Rh123,待描记平衡后,再加入0.8 μ mol/L的Rh123,再扫描平衡,作用标定荧光基准。然后加入0.5 mg的心肌线粒体,由于存在静息态跨膜电位差使Rh123荧光淬灭,当荧光强度平衡后加入1 mmol/L的琥珀酸,出现与能化态膜电位差相关的荧光强度降低,描记至平衡后为止。当加入X/XO体系时,先加入0.08 mmol/L的黄嘌呤,而不同浓度的黄嘌呤氧化酶在线粒体后加入,流动透析液成分与反应

1) 刘树森,黄健平. 活性氧与线粒体氧化磷酸化的相互关系:有关电子漏与质子漏问题的探讨. 全国第三届自由基生物学讨论会论文集. 北京:中国生物物理学会自由基与医学专业委员会, 1991

介质同,温度 25℃,激发波长 500 nm,发射波长 525 nm. 跨膜电位差按 Nernst 方程计算.

1.2.3 质子转位和 $H^+/2e$ 比值的测定 采用铁氰化钾脉冲测定线粒体呼吸链复合体 II+III 的电子传递质子转位^[4]. 测定体系内含有 220 mmol/L Mannitol, 70 mmol/L Sucrose, 2 mmol/L Hepes, 50 mmol/L KCl, 4 mmol/L $MgCl_2$, 2 μ mol/L Rotenone, 2 mmol/L KCN, 5 mmol/L succinate, pH 7.35~7.40. 反应温度为 25℃. 总体积 7 mL, 其中 3 mL 用于测定电子传递速率, 加入 1 μ mol/L 人工电子受体 $K_3Fe(CN)_6$ 后的还原速度来标定电子传递速率; 4 mL 用于测定质子泵出速度, 用丹麦 PHM84 Radiometer 精密 pH 计测定, 用浓度为 0.103 55N 标准酸进行浓度标定.

1.2.4 心肌缺血/再灌损伤对线粒体的跨膜电位差和 $H^+/2e$ 比的影响及 3, 4 二羟基苯乳酸盐的保护作用 心肌缺血/再灌及线粒体 $H^+/2e$ 比测定按我们前文^[4]方法和条件下进行. 跨膜电位差的测量方法见图 1. 反应中, 3, 4-二羟基苯乳酸盐处理见表 1 和后文中的图 6, 7.

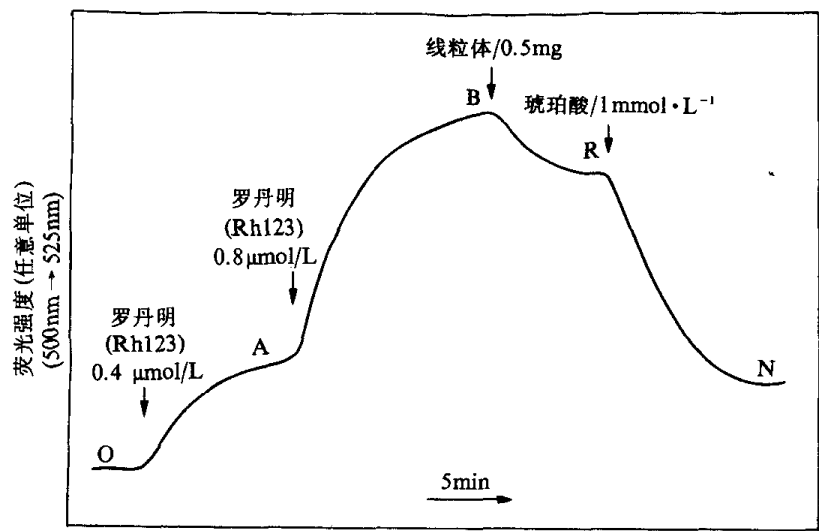


图 1 罗丹明 123 流动透析法测定大鼠心肌线粒体静息态和能化态跨膜电位
实验条件见正文, 线粒体能化态由琥珀酸氧化建立

表 1 3, 4-二羟基苯乳酸盐对 O_2^- 降低大鼠心肌线粒体跨膜电位差的保护作用^{a)}

	<i>n</i>	$\Delta\psi_R/mV$	$\Delta\psi_E/mV$	<i>p</i>
对照	4	133.6±6.3	205.5±3.9	
X/XO	4	133.5±8.9	185.9±4.4 ^{b)}	<0.01
DHPL	4	131.0±7.2	195.4±3.9 ^{c)}	<0.05

a) 0.5 mL 反应介质含有 225 mmol/L 蔗糖, 20 mmol/L KCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L K^+/Pi , 2 mmol/L Tris-HCl, 0.08 mmol/L 黄嘌呤(X), 1.938 mu/mL 黄嘌呤氧化酶(XO), 及 1 mg/mL 线粒体蛋白, 25℃温育 10 min. 3, 4-二羟基苯乳酸盐(DHPL)浓度为 4 μ mol/L. 线粒体能化态由琥珀酸氧化建立

b) 与对照比较
c) 与 X/XO 比较

所有上述试验均重复 4 次, 经标准误差统计处理.

2 实验结果

2.1 线粒体静息态跨膜电位差 $\Delta\psi_R$ 及能化态跨膜电位差 $\Delta\psi_E$ 的测量

通常线粒体膜的跨膜电位差有下述3种来源: (1)呼吸链或 H^+ -ATPase 质子泵产生的能化态跨膜电位差; (2)生物膜对离子的通透性的差异而产生的扩散电位, 但是在线粒体中由于有平衡离子的补偿, 扩散电位存在是瞬息的, (3)在线粒体膜中, 当膜对平衡离子完全不通透的情况下, 线粒体膜内部蛋白及磷脂头部的固定的负电荷就会形成“静态 Donnan 电位”这是第三种^[6]. 由于线粒体处于内负外正的电荷状态, 当线粒体加入到已平衡的透析池中后, 一定量的 Rh123 进入线粒体, 出现荧光强度降低, 此代表能化前静息态膜电位差 $(\Delta\psi)_R$, 按 Nernst 方程:

$$\Delta\psi_R = 59 \times \lg[(C_R \times 500/0.95) \div (1.2 - C_R)],$$

其中 C_R 为静息态线粒体中 Rh123 的浓度, $C_R = 0.8 \div (B - A) \times (B - R)$ (见图 1), 当加入琥珀酸后使线粒体处于能化态时建立了质子电化学梯度, 因而 Rh123 进入量进一步增大, 出现荧光强度的进一步降低, 此代表能化态的膜电位差 $(\Delta\psi)_E$, 其计算公式为:

$$(\Delta\psi)_E = 59 \times \lg[(1.2 - C_N) \times 500/0.95/C_N],$$

C_N 为能化态介质中 Rh123 的浓度, $C_N = 0.4 \div (A - O) \times (N - O)$.

图 1 是利用荧光流动透析法测定的线粒体的跨膜电位差的典型试验. 线粒体静息态跨膜电位差大约在 120 mV 左右, 而能化态建立的跨膜电位差为 208 mV, 其差值约 88 mV.

2.2 外源 O_2^- 对心肌线粒体跨膜电位的作用

2.2.1 O_2^- 对线粒体琥珀酸氧化前后的跨膜电位的作用及其浓度效应 在图 2 实验中, 反应体系中底物黄嘌呤过量 (0.08 mmol/L) 时, 黄嘌呤氧化酶浓度逐渐增加, O_2^- 产生浓度相应增加, 当孵育时间固定为 10 min 时, 随着体系中黄嘌呤氧化酶浓度的增大, 线粒体静息态跨膜电位 $(\Delta\psi)_R$ 保持不变 (曲线 2), 但能化态跨膜电位差 $\Delta - \Delta$, $(\Delta\psi)_E$ (曲线 1) 明显下降, 在黄嘌呤氧化酶浓度为 15.5 $\mu\text{u/mL}$ 时, 由对照 10 min 时的 210 mV, 下降到 $(172.0 \pm 6.8) \text{ mV}$. 若减去静息态

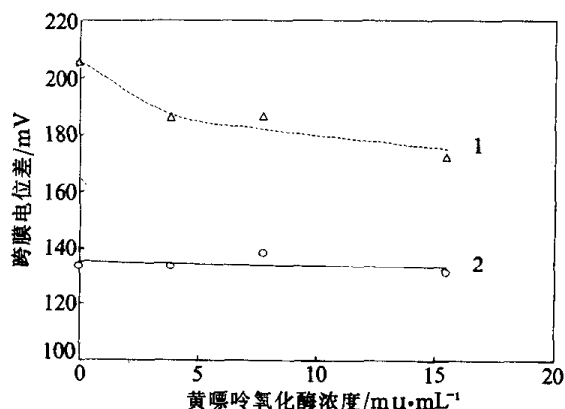


图2 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统产生的超氧阴离子自由基对大鼠心肌线粒体静息态 (曲线 2) 和能化态 (曲线 1) 跨膜电位的影响——浓度效应

实验条件同图 1, 黄嘌呤浓度如图中所示

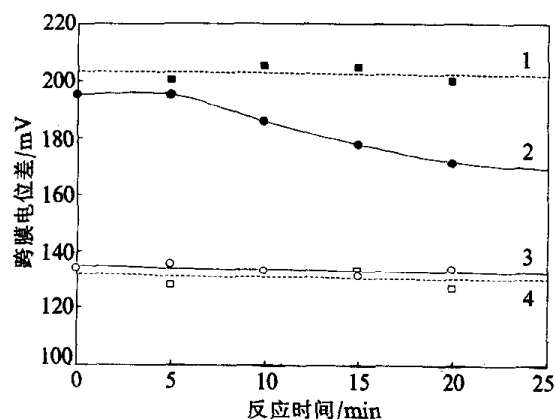


图3 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统产生的超氧阴离子自由基对大鼠心肌线粒体静息态 (曲线 3) 和能化态 (曲线 2) 跨膜电位的影响——时间效应

实验条件同图 1, 温育时间如图中所示; 曲线 4 和曲线 1 分别为未加 O_2^- 产生体系的对照实验中线粒体静息态和能化态跨膜电位差

跨膜电位差,则实际下降 50% 多,说明 O_2^- 主要影响能化态跨膜电位差 $\Delta\psi_E$.

2.2.2 O_2^- 对线粒体跨膜电位差作用及其时间效应 图 3 实验中,黄嘌呤氧化酶的浓度固定为 3.9 $\mu\text{mol/mL}$ 和过量黄嘌呤底物的条件下, O_2^- 产生系统同线粒体共孵育时间对膜的影响.随着反应时间的延长,线粒体静息态跨膜电位也没有明显改变(曲线 3),但能化态的跨膜电位有明显下降(曲线 2),20 min 时下降率 50% 以上,但在未加 O_2^- 产生体系的对照线粒体中,静息态跨膜电位差和能化态跨膜电位差(曲线 4, 1)均未见随孵育时间延长而变化.本组实验也说明 O_2^- 主要是影响线粒体能化态的跨膜电位差 $\Delta\psi_E$.

2.2.3 3, 4-二羟基苯乳酸盐(丹参素)对 O_2^- 损伤线粒体跨膜电位作用的保护作用 在这组试验中,观察了 O_2^- 对线粒体膜电位的损伤的时间和浓度效应及 3, 4-二羟基苯乳酸盐的保护作用.黄嘌呤氧化酶浓度为 3.9 $\mu\text{mol/mL}$,孵育时间 10 min,与对照组比较, O_2^- 与线粒体反应 10 min,即可见到能化后跨膜电位差 $\Delta\psi_E$ 明显降低 ($p < 0.01$),加入丹参素的保护组,能化后跨膜电位差 $\Delta\psi_E$ 与 O_2^- 处理组比较明显升高 ($p < 0.05$),说明丹参素在 4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下对 O_2^- 损伤能化后跨膜电位的作用有保护与恢复作用,结果见表 1.

2.3 O_2^- 对心肌线粒体呼吸链质子转位的作用

上述试验结果证明外源 O_2^- 主要是使线粒体由琥珀酸氧化建立的能化态跨膜电位差降低,而对静息态膜电位无影响,提示 O_2^- 可能作用于呼吸链电子传递及其偶联的 H^+ 转位,因此,我们又进一步研究 O_2^- 对线粒体质子转位和 $H^+/2e$ 比的作用,以观察 O_2^- 是否对呼吸链电子传递活性与质子转位之间的偶联的影响.

2.3.1 O_2^- 对线粒体呼吸链质子转位和 $H^+/2e$ 比的作用及其浓度效应 图 4 说明,当反应时间为 20 min 时和反应系统中黄嘌呤浓度为 0.08 mmol/L 的条件下,随着黄嘌呤氧化酶浓度的增加,质子泵出速度(曲线 1)和 $H^+/2e$ 比值明显逐步下降,但是呼吸链 II+III 复合体电子传递速度仍基本不变(曲线 2),仅在体系中黄嘌呤氧化酶增至 31.0 $\mu\text{mol/mL}$ 时,才略有下降.说明 O_2^- 主要是影响质子的跨膜转移而不影响电子传递活性,因此导致电子传递-质子转移之间的偶联被破坏.

2.3.2 O_2^- 对心肌线粒体质子转位及 $H^+/2e$ 比的作用及其时间效应 图 5 实验是在固定黄嘌呤氧化酶浓度和过量黄嘌呤底物的条件下,观察 O_2^- 对线粒体作用的时间效应.结果说明随着孵育时间的增加,未加 X/XO 的对照组心肌线粒体的电子传递与质子转移活性在保温 40 min 内均无变化(曲线 1, 2).但有 X/XO 时质子泵出速率明显下降(曲线 4),电子传递速度在孵育 40 min 内下降很小(曲线 3),因而 $H^+/2e$ 比也随反应时间增加而迅速下降,但 40 min 反应后,电子转移才开始略有下降.这一组试验也说明 O_2^- 仍主要是降低 H^+ 跨膜速率,而较少影响呼吸链 II+III 复合物的电子传递速率,证明 O_2^- 主要影响质子跨膜而导致破坏电子传递与质子转移之间的偶联,因而降低了 $H^+/2e$ 比和能化态跨膜电位差(图 2, 图 3).

2.4 心肌缺血/再灌损伤对线粒体的跨膜电位差的影响

图 6 是缺血 20 min 和缺血 20 min 再灌 20 min 对离体大鼠心脏的心肌线粒体跨膜电位差的影响及丹参素的保护作用的试验结果.可以看出,单纯缺血(20 min)心肌线粒体的静息态跨膜电位差 $\Delta\psi_R$ 为 130 mV(图 6 中 1)左右,虽比对照组 125 mV 略为增高,而缺血再灌组却与缺血组基本上一致.说明单纯缺血(20 min)和缺血再灌(20 min)对心肌线粒体膜结构影响很小,但是,若以能化后的跨膜电位差 $\Delta\psi_E$ 作比较(图 6 中 2),虽然缺血组与对照组无差别,但

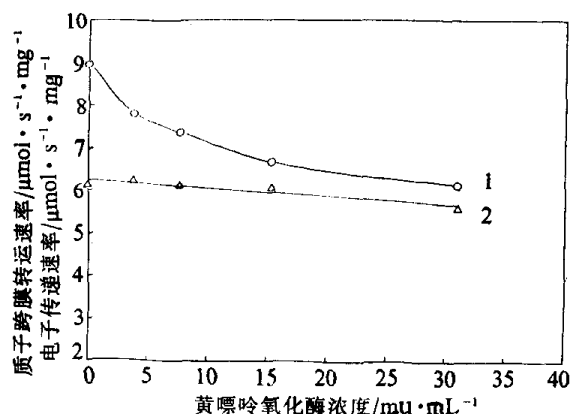


图4 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统产生的超氧阴离子自由基对大鼠心肌线粒体呼吸链复合体(II+III)电子传递(曲线2)和质子转移活性(曲线1)的影响——浓度效应

实验条件见正文,黄嘌呤浓度如图中所示

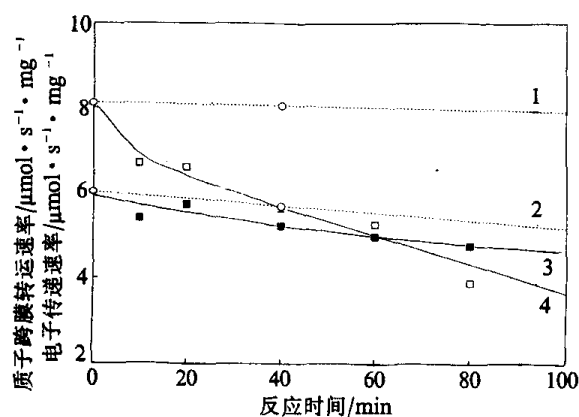


图5 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统产生的超氧阴离子自由基对大鼠心肌线粒体呼吸链复合体(II+III)电子传递(曲线3)和质子转移活性(曲线4)的影响——时间效应

实验条件同图4,温育时间如图中所示,曲线2和曲线1分别为对照体系中呼吸链复合体(II+III)电子传递和质子转移活性

缺血再灌注组却与对照组和缺血组均有较明显的下降(20%左右),文献中已有大量研究证明心肌缺血再灌注的损伤主要在于再灌注阶段由于氧自由基大量产生造成的损伤^[7],因此本组试验结果也进一步证明,与离体的外源 O_2^- 系统一样,由缺血/再灌注造成的线粒体本身产生的 O_2^- 损伤也主要表现在对能化态的跨膜电位差 $\Delta\psi_E$ 的损伤,图6结果还证明3,4-二羟基苯乳酸盐(丹参素)却有明显的保护作用。

图7结果是缺血20 min(曲线1)和缺血20 min再灌注20 min(曲线2)的心肌线粒体复合体II+III的电子传递和 H^+ 转位活性比的时间效应,也说明缺血再灌注中产生的 O_2^- 主要是破坏 H^+ 泵活性与电子传递的偶联,因而造成 $H^+/2e$ 比下降,而对电子传递活性影响较小,单纯缺血对心肌线粒体的 $H^+/2e$ 则无影响。

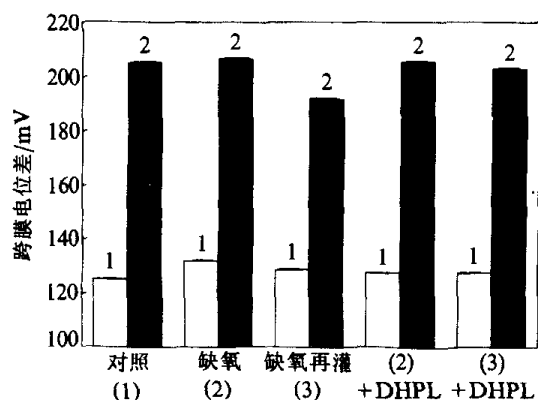


图6 缺血/再灌注对大鼠心肌线粒体静息态和能化态跨膜电位的影响及3,4-二羟基苯乳酸盐(DHPL)的保护作用

实验条件见正文,线粒体能化态由琥珀酸氧化建立

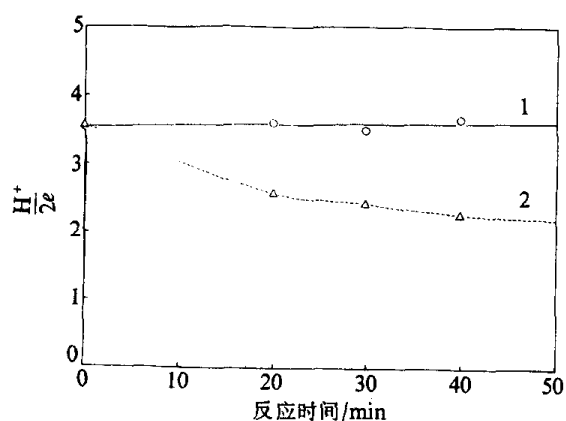


图7 缺血/再灌注对大鼠心肌线粒体呼吸链复合体(II+III) $H^+/2e$ 比的影响

实验条件见正文

3 讨论

本文图 2, 图 3 结果证明外源的 O_2^- 使心肌线粒体膜能化后跨膜电位差 $\Delta\psi_E$ 明显降低, 而不影响电子传递和静息态的跨膜电位 $\Delta\psi_R$, 说明 O_2^- 对膜脂和膜蛋白表面的电荷基团的影响很小. 图 4, 图 5, 结果进一步说明 O_2^- 对能化态跨膜电位的损伤主要原因是与线粒体质子泵活性受到 O_2^- 的影响有关, 因而导致 $H^+/2e$ 明显减小, 上述结果提示, O_2^- 的作用可能主要导致线粒体膜呼吸链质子泵 slipage 或 H^+ 的回漏增加, 但在 O_2^- 与线粒体长时间作用例如 40 min 以上(图 5)则可能影响呼吸链酶系的功能本身引起电子传递的轻微下降, 但此时质子转位活性的下降更大. 由于 O_2^- 是一种既能接受电子(氧化性)又能供给电子(还原性)的自由基, 可以发生自身歧化反应, 生成 H_2O_2 , 同时又兼具碱性, 可以接受 H^+ 形成氢过氧基(HO_2^-), 后者因为可以解离释放 H^+ , 又具酸的作用, O_2^- 与 H^+ 相互作用时可以与 $HO_2^- \leftrightarrow O_2^- + H^+$ 反应相平衡, 其 $pK_a = 4.8$, 因此, 在酸性条件下, HO_2^- 产生量增大. HO_2^- 比 O_2^- 具有更强的还原性与氧化性, 同时它的歧化反应常数也比 O_2^- 歧化反应常数为大^[7], 因此, 在线粒体态 4 呼吸时, 或在心肌缺血时, 由于产酸较多, O_2^- 易生成质子化的 HO_2^- , 容易透过膜, 可能是 O_2^- 引起质子回漏的原因之一. 由于线粒体的 H^+ 漏在调节能量转换分配和产热中具有重要作用, 而至今 H^+ 回漏的分子机制尚很不清楚^[8]. 因而本文实验结果支持线粒体电子传递中产生的 O_2^- 可能具有内源 H^+ 移位体的作用的假设¹⁾, 这是很有意义的. 我们实验室和其它作者的下述实验报道有利于支持上述推论是可能的: 我们曾证明, 琥珀酸氧化引起的线粒体膜表面 pH 下降 0.6pH 单位^[9]. 在线粒体内膜体的情况下, 琥珀酸氧化引起的态 4 呼吸或 ATP 水解反应的质子泵活可以导致线粒体内膜外表面的 pH 下降约 1 个 pH 单位^[10]. 已知态 4 呼吸时线粒体中 O_2^- 主要产生部位在 bc_1 复合体 b_{566} 或半醌^[11]. 这里 O_2^- 易于与外表面的高能 H^+ 相结合而产生易跨膜的 HO_2^- , 从而导致 H^+ 回漏. 因而在态 4 呼吸中产生 O_2^- ; 可能是一种内源 H^+ 移位体, 在维持态 4 呼吸和分配 $\Delta\mu H^+$ 能量中有某种生理意义.

已知 3, 4-二羟基苯乳酸盐(丹参素), 对 O_2^- 可能具有一定程度的清除作用, 因而在心肌缺血/再灌注损伤作用中对心肌细胞具有保护作用^[12]. 我们实验室在另一篇报道中证明, 在心肌缺血/再灌注时, 心肌线粒体和内膜体的 ATP 酶的合成速率下降, $H^+/2e$ 比值明显下降, 而丹参素具有保护作用恢复上述参数到对照水平^[13]. 本文这一组试验结果又证明丹参素有保护外源 O_2^- 对线粒体能化态跨膜电位损伤的作用, 从而说明氧自由基损伤在心肌缺血/再灌注损伤中占有重要地位, 而其损伤的分子机制可能主要在于破坏 H^+ 与电子之间的偶联, 导致对 H^+ 通透性的改变或质子漏增加, 因而影响 $\Delta\psi$ 的下降和 ATP 合成的减少.

综合以上实验结果说明, 无论是 O_2^- 的离体作用或是在缺血再灌注对心肌线粒体损伤的机制主要都与 O_2^- 对膜脂的损伤增加质子回漏有关, 因而为线粒体呼吸链的电子漏(O_2^- 生成)引起质子漏的假设提供了初步的实验支持.

参 考 文 献

- 1 Brunori M, Rotilio G. Biochemistry of Oxygen radical species. Methods Enzymol, 1984, 105: 22~35
- 2 Cross A R, Jones C T G. Enzymic mechanism of superoxide production. Biochem Biophys Acta, 1991, 1057(3): 281~298

1) 同 597 页脚注

- 3 Biveris A, Turrens J F. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, 1980, 191: 421~427
- 4 张 桦, 焦选茂, 刘树森等. 缺血/再灌注对大鼠心肌线粒体电子传递与质子泵出偶联的影响. *中国病理生理学杂志*, 1980, 9(5): 561~564
- 5 Emaus R K, Grunwald R, Lemasters J J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochem Biophys Acta*, 1986, 850: 436~448
- 6 Nicholls D G. *Bioenergetics: An Introduction to the Chemosmotic Theory*. London: AP Inc LTD, 1982. 33
- 7 Halliwall B, Gutteridge J M C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 1986: 1~85
- 8 Brand M D. The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochem Biophys Acta*, 1990, 1018(2/3): 128~133
- 9 连建平, 刘树森. 线粒体活化时膜表面电荷和表面 pH 的荧光测量. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21(5): 27~33
- 10 Liu S S, Xiong J W, Jiao X M. Evidence for ATP synthesis coupled with energizing protons on membrane surface of mitoplast upon succinate oxidation. in 7th European Bioenergetics Conference, EBEG Short Report, 1992, 7: 104
- 11 Nohl H, Stolze K. Is redox-cycling ubiquinone involved in mitochondria oxygen activation? *Free Radical Res Commun*, 1992, 16(6): 409~419
- 12 Liu S S, Wang X M. Molecular mechanism of ischemia-reperfusion injury to energy transduction in cardiac mitochondria. Plenary Lecture in International Symposium on Heart Research. Beijing, March, 1992. *北京医科大学学报*, 1992, 24(2): 48
- 13 Zhu S J, Wang X M, Jiao X M *et al.* The investigation of H⁺-ATPase synthesis and hydrolysis activity of rat myocardial mitochondria in myocardial ischemia/reperfusion injury. *北京医科大学学报*, 1992, 24(2): 15