

L-苹果酸对大鼠转运蛋白及抗氧化酶基因表达的影响

曾晓琮^{1,2}, 吴军林², 肖春², 吴清平², 徐明芳¹, 张菊梅^{2,*}

(1.暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510006; 2.广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070)

摘要: 对12月龄SD大鼠给予L-苹果酸30d后, 采用含有SYBR Green I的Real Time RT-PCR法, 对肝脏和心脏线粒体苹果酸天冬氨酸穿梭中的两种转运蛋白(天冬氨酸谷氨酸转运蛋白(AGC)与 α -酮戊二酸苹果酸转运蛋白(OMC))以及两种抗氧化酶(过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px))的基因表达进行检测, 以研究L-苹果酸增强线粒体抗氧化作用的分子生物学机制。结果表明: 苹果酸组中大鼠心肌细胞AGC、OMC、CAT、GSH-Px的mRNA表达量分别是空白对照组的1.25、1.39、1.12、1.01倍。苹果酸组中大鼠肝脏细胞AGC、OMC、CAT、GSH-Px的mRNA表达量分别是空白对照组的1.33、1.02、1.25、0.94倍。由此推测, L-苹果酸可能通过促进苹果酸天冬氨酸穿梭蛋白以及抗氧化酶的基因表达, 实现提高线粒体的抗氧化作用。

关键词: 线粒体抗氧化; 苹果酸-天冬氨酸穿梭; 实时反转录聚合酶链式反应

Effect of L-malate on Gene Expression of Carrier Proteins and Antioxidant Enzymes in Rats

ZENG Xiao-cong^{1,2}, WU Jun-lin², XIAO Chun², WU Qing-ping², XU Ming-fang¹, ZHANG Ju-mei^{2,*}

(1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510006, China;

2. State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Joint Development), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: To investigate the antioxidant mechanism of L-malate on mitochondria, real time RT-PCR was used to analyze the gene expressions of two carrier proteins (AGC and OMC) in the inner membrane and two antioxidant enzymes (CAT and GSH-Px) related to the malate-aspartate shuttle in rat liver and heart mitochondria. The mRNA expressions of these proteins were examined by real time RT-PCR in hearts and livers of SD rats treated with L-malate. The results indicated that the mRNA expressions of AGC, OMC, CAT and GSH-Px in the heart of rats treated with L-malate were 1.25, 1.39, 1.12, 1.01 times as much as those in the control group. The mRNA expression of AGC, OMC, CAT and GSH-Px in the liver of rats treated with L-malate was 1.33, 1.02, 1.25, 0.94 times as much as those in the control group. These results imply that L-malate might increase the antioxidant capacity of mitochondria by enhancing the mRNA expression of the proteins involved in the malate-aspartate shuttle and the antioxidant enzymes.

Key words: mitochondria antioxidant capacity; malate-aspartate shuttle; real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR)

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0276-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323056

L-苹果酸是生物糖代谢过程中产生的重要有机酸, 在1967年被美国食品和药品管理局登记确认为一种安全、无毒、无害、可食用的有机酸。线粒体是维持细胞以至整个机体生理活动的能源基础, 存在于几乎所有

组织细胞内。已有研究报道了L-苹果酸能减少线粒体的氧化损伤和提高机体的抗氧化能力^[1]。动物实验^[1-2]证明了老年大鼠经灌胃L-苹果酸溶液后的肝脏和心肌细胞内活性氧(ROS)含量及丙二醛(MDA)水平均明显低于老年

收稿日期: 2013-07-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000762); 广州市珠江科技新星专项(2013J220079)

作者简介: 曾晓琮(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品与发酵工程。E-mail: 13920741@qq.com

*通信作者: 张菊梅(1968—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为食品安全与监测。E-mail: zhangjm926@126.com

万方数据

对照组, 苹果酸组中老年大鼠肝组织的总超氧化物歧化酶(TSOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽(GSH)及线粒体呼吸链 NADH 脱氢酶、NADH-细胞色素C氧化还原酶、细胞色素C氧化酶的酶活力均明显高于老年对照组。由于L-苹果酸是苹果酸天冬氨酸(MAS)的组成部分, MAS主要存在于肝和心脏中^[3], 对于转移细胞质中的还原当量(NADH)进入线粒体和ATP的可持续产生以及糖异生起到重要的作用^[4], 如图1所示^[3], 胞质中的NADH在脱氢酶的作用下, 使草酰乙酸还原成苹果酸, 后者通过线粒体内膜上的 α -酮戊二酸苹果酸转运蛋白(OMC)进入基质, 在基质脱氢酶的作用下重新生成草酰乙酸和 NADH, NADH 进入电子呼吸链生成ATP, 而基质内生成的草酰乙酸经谷草转氨酶的作用生成天冬氨酸, 后者经天冬氨酸谷氨酸转运蛋白(AGC)转运出基质再转变成草酰乙酸, 继续进行穿梭。所以本研究拟采用含SYBR Green I的Real Time RT-PCR法, 在外源给予大鼠一定剂量的L-苹果酸溶液后, 对大鼠肝脏和心脏MAS中两种位于线粒体内膜的转运蛋白: AGC和OMC以及两种抗氧化酶过氧化氢酶(CAT)和GSH-Px的基因表达进行检测, 旨在为探索L-苹果酸增强线粒体抗氧化作用的分子生物学机制提供依据。

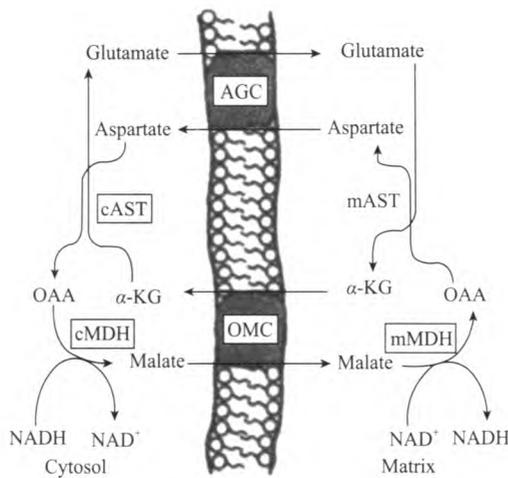


图1 苹果酸天冬氨酸穿梭示意图
Fig.1 Schematic of malate aspartate shuttle

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

SPF级SD种雌性大鼠, 12月龄(体质量300~400g), 由广东省疾病预防控制中心提供。动物实验室: SPF级, 合格书粤检证2001C059, 室温(22±0.5)℃; 湿度60%~80%。

颗粒饲料由广东省疾病预防控制中心提供。

L-苹果酸(经HPLC检验纯度在99.9%以上) 广东

环凯微生物科技有限公司; 动物组织总RNA提取试剂盒(DP431) 北京天根生化科技有限公司; Prime Script™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)(RR037A)、SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)(DRR420A) 日本TaKaRa公司; 所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

MASstercycle Eppendorf Realplex Real-time PCR仪 德国Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与给样

实验大鼠在实验室条件下观察1周后, 根据体质量和血清MDA值分组方法将24只SD大鼠分为空白对照组和受试物组(0.630g L-苹果酸/(kg·d), 以体质量计), 每组各12只动物, 组间的体质量和血清MDA值差异不显著。空白对照组每天给予生理盐水, 受试物组按照剂量每天上午给予L-苹果酸溶液一次。L-苹果酸用纯净水溶解, NaOH调pH7.2后配成剂量所需浓度, 连续灌胃30d后进行实验。

1.2.2 总RNA提取

大鼠于末次给予L-苹果酸溶液30min后, 脱椎处死, 迅速取肝脏和心脏, 每份肝脏或心脏样品加入裂解液, 用微量匀浆器PRO200研磨均匀, 按照北京天根生化科技有限公司提供的动物组织总RNA提取试剂盒(DP431)操作说明, 提取大鼠肝脏和心脏总RNA, RNA溶于无核酸酶水中, 取样用紫外分光光度计测 A_{260nm}/A_{280nm} 值, 剩下的存放于-80℃冰箱备用。

1.2.3 反转录cDNA第一链

cDNA第一链的合成采用反转录试剂盒PrimeScript™ RT Reagent Kit(Perfect Real Time)(RR037A)进行反转录。反转录程序为, 37℃、15min(反转录反应); 85℃、5s(反转录酶的失活反应)。

1.2.4 含SYBR Green I的real-time PCR

表1 SYBR real-time PCR反应所用到的引物序列
Table 1 Sequences of the primers in SYBR real-time PCR

基因		引物序列	扩增片段/bp	参考文献
GAPDH	Forward	5'-CGCCAGTAGACTCCACGAC-3'	476	[6]
	Reverse	5'-GCAAGTTC AACGGCACAG-3'		
OMC	Forward	5'-CTGGCTGGGATGGGTGCT-3'	211	[7]
	Reverse	5'-CAAGGCGAGTAGTGGTGTAGGTG-3'		
AGC	Forward	5'-CTTGTATGGTGGCGTTC-3'	255	[7]
	Reverse	5'-GTCTTGGCATTGTCTCGTTG-3'		
CAT	Forward	5'-TATTGCCGTCCGATTCTC-3'	402	[6]
	Reverse	5'-ATGCCCTGGTCAGTCTTG-3'		
GSH-Px	Forward	5'-CTCACCCGCTCTTTACCTT-3'	158	[6]
	Reverse	5'-AACACCCTGCGACCTACC-3'		

PCR 反应采用SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)(DRR420A)试剂盒。通过PCR反应生成双链DNA, SYBR Green I与双链DNA结合发出荧光, 通过检测PCR反应液中的荧光信号强度, 可以对目的基因进行准确定

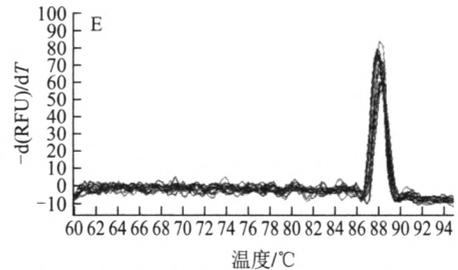
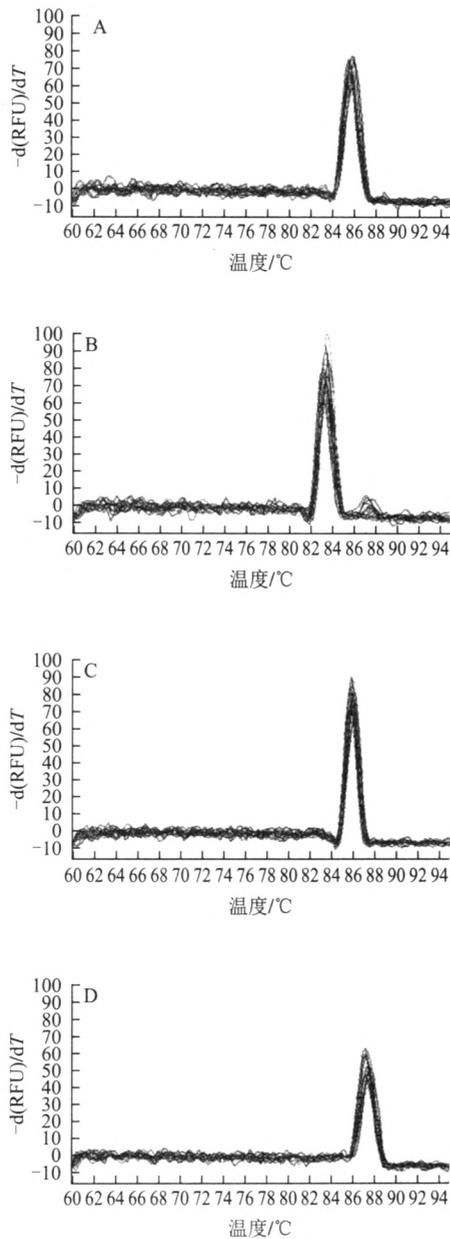
量。PCR程序为：95℃变性5s，55℃退火/延伸20s，共40个循环。AGC、OMC、CAT、GSH-Px和管家基因GADPH的引物序列见表1。相对基因表达的每份样品做两次重复。PCR反应每份样品做两次重复。相对基因表达的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，参照Livak等^[5]的方法。

1.2.5 数据统计方法

各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据间的差异性比较采用t检验，显著性差异以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为标准。以上数据分析均采用SPSS 10.0软件完成。

2 结果与分析

2.1 大鼠心肌细胞和肝脏细胞的GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px的溶解曲线及扩增曲线分析



A. GADPH; B.AGC; C.OMC; D.CAT; E.GSH-Px; RFU.相对荧光单位; T.温度。图2同。

图2 大鼠心肌细胞GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px的溶解曲线
Fig.2 Melting curves of different target genes in rat cardiac myocytes

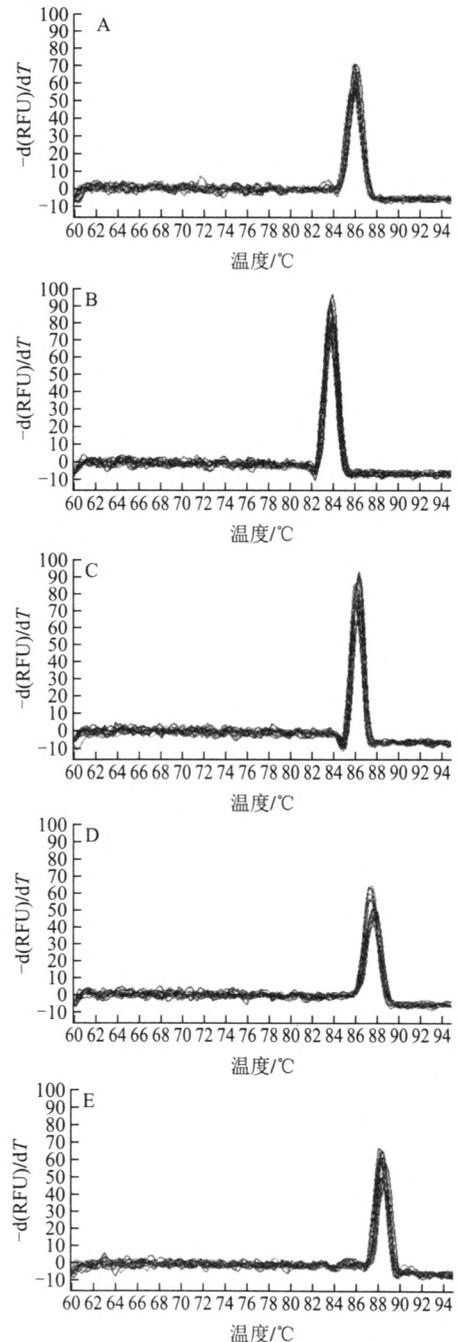


图3 大鼠肝脏细胞GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px的溶解曲线
Fig.3 Melting curves of different target genes in rat livers

图2~3分别是大鼠心肌细胞和肝脏细胞GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px的溶解曲线,显示大鼠心肌细胞和肝脏细胞的GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px基因在82~90℃均有一个单一的峰,表明实验特异性扩增了大鼠心肌细胞和肝脏细胞中的GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px^[8]。

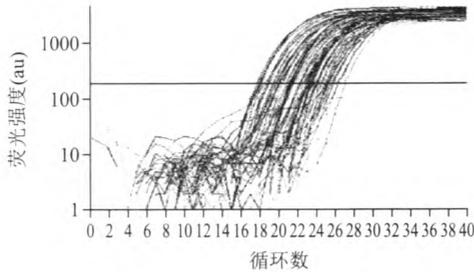


图4 大鼠心肌细胞GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px的扩增曲线
Fig.4 Reaction curves for GADPH, AGC, OMC, CAT and GSH-Px genes from rat cardiac myocytes

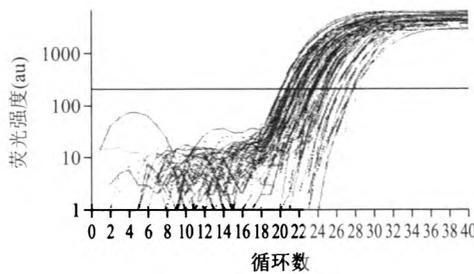


图5 大鼠肝脏细胞GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px的扩增曲线
Fig.5 Melting curves of GADPH, AGC, OMC, CAT and GSH-Px in rat livers

图4~5分别是大鼠心肌细胞和肝脏细胞的GADPH、AGC、OMC、CAT和GSH-Px的扩增曲线,显示出相似的扩增曲线形状,说明了目的基因和内参基因的扩增效率比较一致,可采用相对定量分析中的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据的统计分析^[9-10]。

2.2 L-苹果酸对老年大鼠心肌细胞和肝脏细胞中AGC、OMC、CAT、GSH-Px的mRNA表达规律的影响

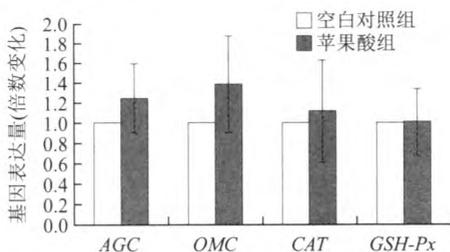


图6 L-苹果酸对大鼠心肌细胞中AGC、OMC、CAT、GSH-Px mRNA表达的作用
Fig.6 mRNA expression levels of AGC, OMC, CAT and GSH-Px in hearts of rats treated with and without L-malate

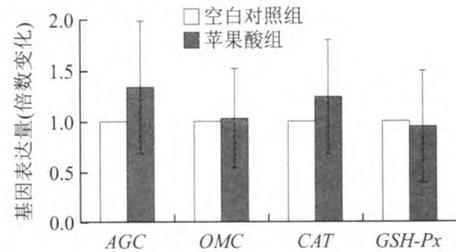


图7 L-苹果酸对大鼠肝脏细胞中AGC、OMC、CAT和GSH-Px mRNA表达的作用

Fig.7 mRNA expression levels of AGC, OMC, CAT and GSH-Px in livers of rats treated with and without L-malate

由图6、7可知,通过比较L-苹果酸组与空白对照组大鼠心脏和肝组织中AGC、OMC、CAT、GSH-Px的mRNA的相对表达量来判断L-苹果酸是否增强或抑制AGC、OMC、CAT、GSH-Px的基因转录。图6显示,L-苹果酸均能上调大鼠心肌细胞中AGC、OMC、CAT、GSH-Px的mRNA的表达,苹果酸组中AGC、OMC、CAT、GSH-Px的mRNA表达量分别是空白对照组的1.25、1.39、1.12、1.01倍。图7显示,L-苹果酸能上调大鼠肝脏细胞中AGC、OMC、CAT的mRNA的表达,其中在苹果酸组中AGC、OMC、CAT的mRNA表达量是空白对照组的1.33、1.02、1.25倍,而GSH-Px在苹果酸组中的mRNA表达为空白对照组的0.94倍。

3 讨论

随着对线粒体分子生物学的深入研究,发现其结构、功能上有许多增龄性变化(衰老)^[11-12],可能引起机体自由基平衡的破坏,逐步导致全身性生理功能的下降^[13]。研究者据此提出线粒体衰老学说,为阐明衰老的分子机理提供了新的理论^[12]。机体衰老的一个重要标志是最大有氧工作能力的下降,表现在最大摄氧量随年龄的降低。其中,线粒体年龄依赖性的氧利用能力的降低、功能下降可能是重要的限制因素之一。人体及动物实验都表明,线粒体功能随年龄增加而下降^[14-15]。

大量实验已证实体外补充抗氧化剂,可使线粒体产生适应变化,包括线粒体体积和数目增加,酶合成增加,活性提高,从而提高氧化磷酸化功能^[16]。补充苹果酸可提高机体的有氧代谢水平,增进有氧工作能力^[17-18]。且线粒体呼吸作用的加强均可由儿茶酚胺、胰高血糖素和运动引起,在这几种情况下线粒体内苹果酸的浓度同时都升高^[19-20]。Agbanyo等^[21]通过观察发现苹果酸是使线粒体产生ATP的驱动力,从而推测呼吸作用的加强由苹果酸介导。Bobileva-Guarriero等^[20]给大鼠注射了少量苹果酸盐,发现肝脏线粒体中苹果酸盐浓度上升,柠檬酸盐、 α -酮戊二酸和琥珀酸盐的氧化率上升,小剂量补充外源性苹果酸,可提高线粒体苹果酸浓度,既节省基质

中的苹果酸,又促进线粒体内的穿梭机理,从底物的供给和能量的转移两个方面推动了线粒体的活动。当ATP的需求增加时,就同时存在对苹果酸需求的增加^[22]。而高能物质ATP由定位于线粒体内膜的呼吸链一系列酶促反应生成。Wu Junlin等^[1]则证明了L-苹果酸降低老年大鼠ROS水平是通过增加线粒体电子传递链的效率及提高基础能量代谢效率实现的。众多的实验均表明了L-苹果酸提高线粒体功能与L-苹果酸增强线粒体抗氧化能有关。

MAS在转移还原当量中起到关键的作用,很多研究观察了体内MAS受阻或抑制时对能量代谢途径的影响。Eto等^[23]的研究证实了NADH穿梭的重要性。该研究发现在缺乏NADH穿梭的情况下,胰岛素刺激糖分解和ATP生成的作用不能实现。Barron等^[24]的研究发现,抑制MAS将造成胞浆NADH/NAD⁺比值升高,表明苹果酸天冬氨酸穿梭对于维持细胞正常还原状态、决定有氧代谢和乳酸生成途径以及线粒体呼吸作用均起到重要作用。Mitchell等^[25]证明,由MAS调控的线粒体和胞质之间的代谢平衡对于小鼠的胚泡进化和怀孕的活性很重要。MAS对于早期胚胎细胞的碳水化合物的控制,以确保乳酸的代谢能作为维持生长的一种能量来源是很关键的。

AGC和OMC是MAS的两种重要的转运蛋白。AGC作为一个电势驱动(electrogenically driven)蛋白,是苹果酸天冬氨酸穿梭代谢的限速步骤^[26-27],其活性由线粒体内膜势能决定。MAS的调控已经被证明是在线粒体内膜蛋白OMC和AGC的水平上^[4,28]。朱瑞娟等^[4]通过real time PCR证明了高原鼯鼠通过上调AGC的表达,提高了苹果酸-天冬氨酸在细胞质和线粒体之间的穿梭效率。Scholz等^[29]证明了苹果酸天冬氨酸穿梭能力的下降是由OMC基因表达的下降所调控的。吴军林等^[7]通过半定量RT-PCR实验证明L-苹果酸能促进TCA循环及苹果酸天冬氨酸穿梭,并且L-苹果酸能明显提高大鼠肝脏细胞中AGC的mRNA表达量。本实验通过含SYBR Green I的Real Time RT-PCR技术发现,虽然所得结果差异性不显著,但不论是在大鼠心脏还是在肝脏中,苹果酸组中AGC的mRNA表达均有高于空白对照组的趋势,在大鼠心肌细胞中,OMC在苹果酸组中的表达量也有高于空白对照组的趋势。而OMC在大鼠肝脏中的表达量与空白对照组比较并没有多大变化则与吴军林等^[7]一致。本实验苹果酸组AGC的mRNA的表达量与空白对照组之间没有显著性差异,推测是由于采用了与前人不同的实验方法而产生。即便如此,本实验为探索L-苹果酸增强线粒体抗氧化作用的分子生物学机制采用了real time PCR的方法亦是可行的。此外,本研究对CAT和GSH-Px两种抗氧化酶的基因表达进行了检测,发现苹果酸组中CAT的mRNA表达均上调,而GSH-Px的mRNA表达与空白对照组并无太大变化。由此说明

L-苹果酸可能通过上调AGC、OMC基因及抗氧化酶CAT基因的表达,提高线粒体的抗氧化作用。

本研究没有测定L-苹果酸对大鼠心脏和肝脏中苹果酸-天冬氨酸的穿梭能力以及对线粒体膜电位的影响,如果能进一步探讨L-苹果酸在AGC、OMC的mRNA表达水平与苹果酸-天冬氨酸的穿梭能力及线粒体膜电位的关系,则将进一步阐明L-苹果酸对线粒体抗氧化的作用机制,有关这方面的研究则需要开展更深入的工作。

参考文献:

- [1] WU Junlin, WU Qingping, PENG Yunping, et al. Effects of L-malate on mitochondrial oxidoreductases in liver of aged rats[J]. *Physiological Research*, 2011, 60: 329-336.
- [2] WU Junlin, WU Qingping, HUANG Junming, et al. Effects of L-malate on physical stamina and activities of enzymes related to the malate-aspartate shuttle in liver of mice[J]. *Physiological Research*, 2007, 56: 213-220.
- [3] SCHOLZ T D, TENEYCK C J, SCHUTTE B C. Thyroid hormone regulation of the NADH shuttles in liver and cardiac mitochondria[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2000, 2(1): 1-10.
- [4] 朱瑞娟, 饶鑫峰, 魏登邦, 等. 高原鼯鼠和高原鼠兔肝脏苹果酸天冬氨酸穿梭系统的功能差异[J]. *生理学报*, 2012, 64(2): 177-186.
- [5] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [6] LI Hui, JIANG Tao, LIN Yifeng, et al. HGF Protects rat mesangial cells from high glucose-mediated oxidative stress[J]. *American Journal of Nephrology*, 2006, 26: 519-530.
- [7] 吴军林, 吴清平, 韦明肯, 等. L-苹果酸对苹果酸天冬氨酸穿梭转运蛋白及酶基因表达的作用研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(11): 229-232.
- [8] 朱华, 吴耀生. 实时荧光定量PCR检测三七SS基因表达的初步实践[J]. *广西植物*, 2008, 28(5): 703-707.
- [9] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method[J]. *Nature Protocol*, 2006, 3(6): 1101-1108.
- [10] RUI Shi, CHIANG V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR[J]. *Bio Techniques*, 2005, 39: 519-525.
- [11] WALLACE D C. Disease of the mitochondrial DNA[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1992, 61: 1175-1212.
- [12] LINNANE A W, MARZUKI S, OZAWA T, et al. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases[J]. *Lancet*, 1989, 25: 642-645.
- [13] ESTERBAUER H, ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes[J]. *Free Radic Biol Med*, 1991, 11(1): 81-128.
- [14] OZAWA T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging[J]. *Physiological Reviews*, 1997, 77: 425-464.
- [15] TROUNCE I, BYRNE E, MARZUKI S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing[J]. *Lancet*, 1989, 1: 637-639.
- [16] ARIVAZHAGAN P, RAMANATHAN K, PANNEERSELVAM C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2001, 138(2): 189-198.
- [17] BENDAHAN D, MATTEI J P, GHATTAS B, et al. Citrulline/malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle[J]. *British Journal of Sports Medicine*, 2002, 36(4): 282-289.

- [18] 梅郁, 张纆. *L*-苹果酸代谢与运动[J]. 中国运动医学杂志, 2005, 24(4): 509-511.
- [19] BOBYLEVA-GUARRIERO V, WEHBIE R S, LARDY H A. The Role of malate in hormone-induced enhancement of mitochondrial respiration[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 245(2): 477-482.
- [20] BOBYLEVA-GUARRIERO V, LARDY H A. The role of malate in exercise-induced enhancement of mitochondrial respiration[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 245(2): 270-276.
- [21] AGBANYO F R, MOSES G, TAYLOR N F. *L*-malate transport and proton symport in vesicles prepared from *Pseudomonas putida*[J]. Biochemistry and Cell Biology, 1986, 64(11): 1190-1199.
- [22] GUY E A, JORGE D F. Management of fibromyalgia: rationale for the use of magnesium and malic acid[J]. Journal of Nutritional and Environmental Medicine, 1992, 3: 49-59.
- [23] ETO K, SUGA S, WAKUI M, et al. NADH shuttle system regulates K (ATP) channel-dependent pathway and steps distal to cytosolic Ca(2⁺) concentration elevation in glucose-induced insulin secretion[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(36): 386-392.
- [24] BARRON J T, GU Liping, PARRILLO J E. Malate-aspartate shuttle, cytoplasmic NADH redox potential, and energetics in vascular smooth muscle[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1998, 30(8): 1571-1579.
- [25] MITCHELL M, CASHMAN K S, GARDNER D K, et al. Disruption of mitochondrial malate-aspartate shuttle activity in mouse blastocysts impairs viability and fetal growth[J]. Biology of Reproduction, 2009, 80(2): 295-301.
- [26] KUNZ W S, DAVIS E J. Control of reversible intracellular transfer of reducing potential[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1991, 284: 40-46.
- [27] LANOUE K F, TISCHLER M E. Electrogenic characteristics of the mitochondrial glutamate-aspartate antiporter[J]. Journal of Biological Chemistry, 1974, 249: 7522-7528.
- [28] SCHOLZ T D, GRIER B L, THOMPSON G S, et al. Developmental regulation of the α -glycerophosphate shuttle in porcine myocardium[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1997, 29: 1605-1613.
- [29] SCHOLZ T D, KOPPENHAFFER S L, TENNEYCK C J, et al. Ontogeny of malate-aspartate shuttle capacity and gene expression in cardiac mitochondria[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 1998, 274: C780-C788.