

# 镉、铜对非洲鲫鱼肝线粒体 功能影响的初步研究\*

刘克强

(中国科学院海洋研究所)

本实验以在海水中培养的非洲鲫鱼(*Tilapia mossambica*)为试验材料,采用氧电极法测定氯化镉、硫酸铜对鱼肝线粒体(离体)呼吸控制率(RCR)和氧化磷酸化效率(ADP/O)的影响,以探讨重金属毒物对海洋生物的致毒机理以及了解对其体内各种生化过程所起的作用。

## 一、材料与方 法

试验用非洲鲫鱼,在海水中放养2—3周。每次试验用10尾,平均体长约10厘米,试验前停食一天。

1. 线粒体制备<sup>[1,2]</sup>:剥开鱼腹迅速取出肝脏,置于预冷的0—4℃生理盐水和分离介质(含300mM蔗糖,10mM tris-HCl缓冲液,pH为7.2)中,洗去污血,吸去表面溶液。称重后立即置于预冷研钵内剪碎,加入适量分离介质和少许石英砂迅速均匀地研磨2分钟。匀浆液在MSE18型冷冻离心机上于0—4℃,2000转/分,离心10分钟。上清液用11000转/分离心10分钟后,沉淀用分离介质洗涤一次,然后用分离介质制成线粒体悬液,保存于0—4℃冰水浴中,备实验用。

2. 线粒体活性测定:参照 Lessler 等人的方法<sup>[3]</sup>,采用氧电极法。使用国产CY-2型测氧仪和大型长图平衡记录仪自记系统。鱼肝线粒体活性由呼吸控制率(RCR)和氧化磷酸化效率(ADP/O)来测定。反应介质含有:20mM KCl;10mM磷酸钾缓冲液,pH为7.2;5mM MgCl<sub>2</sub>;225mM蔗糖。反应总体积为5毫升。鱼肝线粒体悬液加入量为100微升(约

含线粒体蛋白6毫克)。底物为琥珀酸钠,pH为7.2。ADP钠盐新鲜配制,pH为7.2。反应温度为30℃。不同浓度的氯化镉、硫酸铜(指最终浓度)和线粒体共同保温2分钟后开始测定。反应开始时反应介质氧浓度以237毫微克分子计算。

线粒体反应室用有机玻璃制成,采用密闭系统。鱼肝线粒体蛋白浓度按folin-酚法,用国产751G分光光度计在500nm处测定。

3. 化学试剂:实验中使用的化学试剂均为分析纯,国内产品。ADP钠盐为中科院上海生理化学研究所东风试剂厂生产,纯度为80%以上。所用试剂均由重蒸水配制。

## 二、结果与讨论

正常鱼肝线粒体呼吸控制率和氧化磷酸化

表1 不同CdCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>浓度对鱼肝线粒体功能的影响

毒物名称	最终浓度 (ppm)	抑 制 (%)	
		RCR	ADP/O
CdCl <sub>2</sub>	0.5	33.3	32.7
	1.0	45.7	38.7
	8.0	100	100
CuSO <sub>4</sub>	0.5	无明显抑制	无明显抑制
	1.0	无明显抑制	无明显抑制
	5.0	56.5	70.9
	10.0	100	100

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第893号。

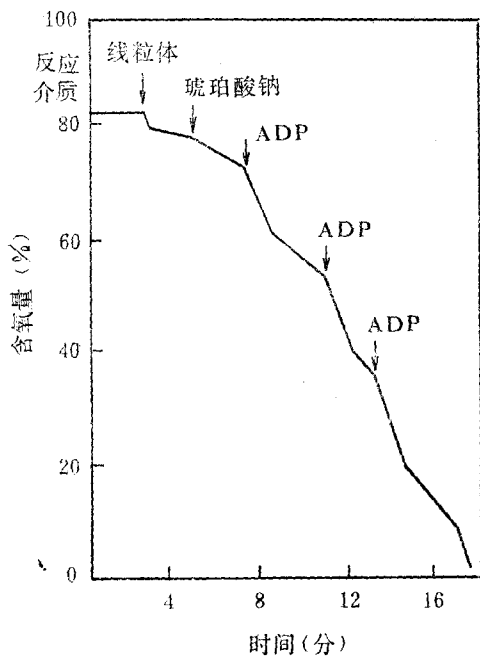


图1 鱼肝线粒体RCR和ADP/O比值的测定

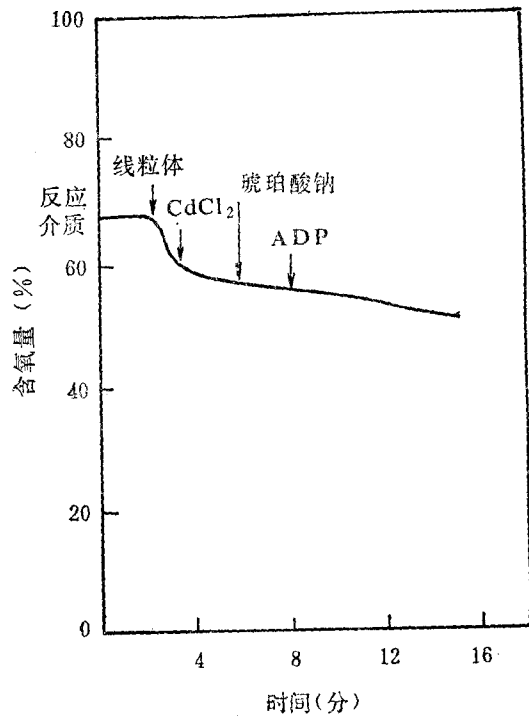


图3 8.0ppm氯化镉对鱼肝线粒体 RCR和ADP/O的影响

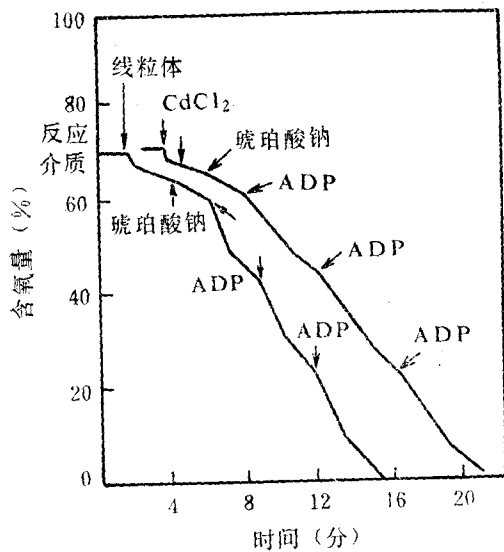


图2 1.0ppm氯化镉对鱼肝线粒体 RCR和ADP/O的影响

效率测定结果, RCR 为 3.0 左右, ADP/O 为 1.50 左右, 见图 1。不同浓度的氯化镉和硫酸铜对鱼肝线粒体功能影响见表 1。

从表 1 可以看出, 氯化镉对鱼肝线粒体氧化磷酸化有明显的抑制作用。0.5ppm 可以使鱼肝线粒体氧化磷酸化部分解偶联, RCR 和 ADP/O 分别下降 33.3% 和 32.7% 左右;

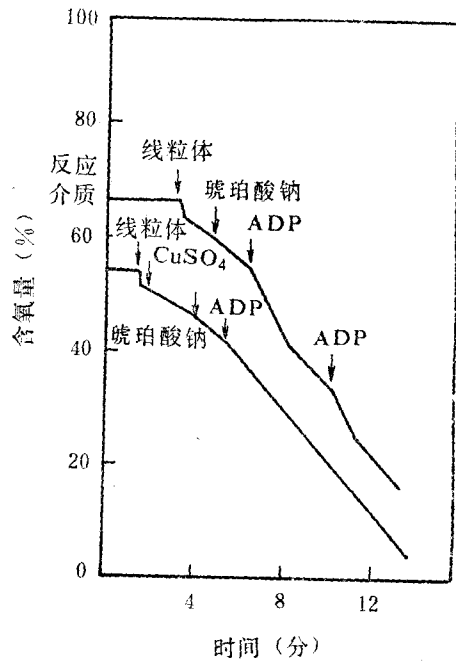


图4 5.0ppm硫酸铜对鱼肝线粒体 RCR和ADP/O的影响

1.0ppm 氯化镉对鱼肝线粒体毒性作用增强, RCR和ADP/O分别下降了45.7%和38.7%左

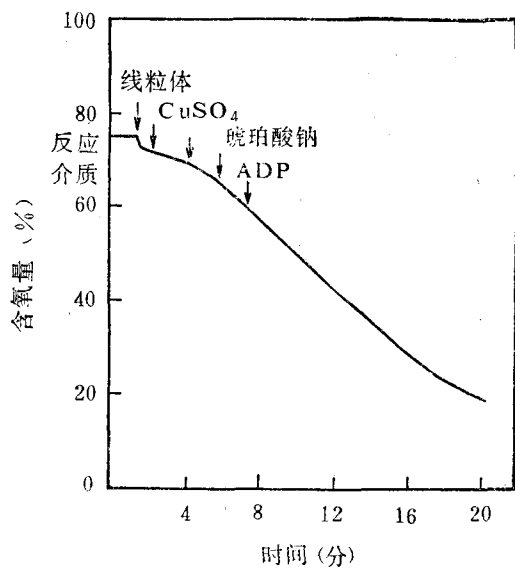


图5 10.0ppm硫酸铜对鱼肝线粒体 RCR和ADP/O的影响

右(图2);当氯化镉的浓度增加到8.0ppm时,底物的氧化和线粒体的氧化磷酸化作用均完全被抑制(图3)。0.5ppm和1.0ppm硫酸铜对鱼肝线粒体氧化磷酸化没有明显的抑制作用;5.0ppm硫酸铜对鱼肝线粒体有明显的抑制作用,加入ADP时可以观察到刺激呼吸过程,但磷酸化作用受到抑制,氧化磷酸化解偶联,见图4;10.0ppm硫酸铜则抑制底物的后期氧化,鱼肝线粒体氧化磷酸化完全解偶联,见图5。

上述结果表明,重金属镉、铜对鱼肝线粒体功能是有影响的,而镉对其影响是明显的。受镉和铜的毒性作用,反映鱼肝线粒体功能状

态的RCR和ADP/O都程度不同地有明显下降。随着毒物浓度的增加,对鱼肝线粒体氧化磷酸化抑制作用增强,从部分解偶联到完全解偶联。线粒体是重要的细胞器,是细胞的主要呼吸场所和换能器,它主要通过氧化磷酸化作用获得能量,以供细胞的各种活动和生物机体的需要。由于镉、铜对线粒体氧化磷酸化的抑制作用,影响了ATP的合成,从而可能影响和干扰细胞的能量代谢及各种活动,导致生物机体代谢受阻。

重金属镉、铜对鱼肝线粒体毒性作用,可能是由于 $Cd^{++}$ 和 $Cu^{++}$ 能抑制线粒体中氧化磷酸化酶系,并与这些酶中的-SH结合使其失去活性,致使氧化磷酸化作用受到破坏。

#### 主要参考文献

- (1) 施奠族、吴厚余、朱谨钊, 1981. 有机锡对海洋附着生物的防污机理研究 I. 三苯基氯化锡对藤壶线粒体的影响. 海洋与湖沼12(5):422—426.
- (2) 伍钦荣等, 1962. 氧化磷酸化作用的研究 1,2,4-二硝基苯酚对琥珀酸氧化的激活和抑制. 生物化学与生物物理学报 2:276—285.
- (3) Lessler, M. A., & C. P. Brierley. 1963. Oxyg electrode measurements in biochemical analysis. Methods of Biochem. Analysis, 17. Interscience Publishers a Division of John Wiley and Sons, New York, London, Sydney Toronto. pp. 1—27.

### THE EFFECT OF CADMIUM CHLORIDE AND COPPER SULFATE ON THE FUNCTION OF LIVER MITOCHONDRIA OF *TILAPIA MOSSAMBICA*

Liu Keqiang

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

#### Abstract

Cadium chloride and copper sulfate were used separately at different concentrations as toxic agent on the liver mitochondria of *Tilapia mossambica in vitro*. The degree of coupling of oxidative phosphorylation-respiratory control and ADP/O ratios of the liver mitochondria were examined by oxygen electrode measurements.

In cases where sodium succinate was used as substrate, owing to inhibition of 1ppm cadmium chloride and 5ppm copper sulfate on liver mitochondria, RCR and ADP/O ratio were decreased obviously.