

# 有机锡对海洋附着生物的防污机理研究\*

## I. 三苯基氯化锡<sup>1)</sup>对藤壶线粒体的影响

施奠族 吴厚余 朱谨钊

(中国科学院海洋研究所)

以有机锡为主的防污涂料是一类有效的涂料<sup>[4,5]</sup>。十几年前,在第二届国际污染和防污会议上介绍有机锡类防污涂料时,就有人注意到其防污机理问题<sup>[2]</sup>,但至今尚未看到有关报道。

纹藤壶 (*Balanus amphitrite amphitrite* Darwin) 是我国沿海船底及其他海上设施为害最严重的附着生物之一<sup>[1]</sup>,是很有代表性的实验材料。我们在有机锡类防污涂料中选用效能较好的 TPTC<sup>[5,3)4)</sup>,就其对纹藤壶的防污机理作了初步研究。

搞清楚防污机理对于合理使用防污涂料以及进一步提高防污效能都具有重要意义。本文从生化功能和形态结构两个方面阐述了 TPTC 对藤壶线粒体的影响。

### 材料和方法

实验用纹藤壶采于停泊青岛中港的船体或船厂的修理船只。当海水温度在 22°C 以上时,将采集的藤壶直接用于实验,在低于 22°C 水温的季节,将捕获的藤壶在室内通气、投饵、逐步升温饲养一段时间后再用,实验前 4 小时停食并换水一次。

**线粒体制备** 离体实验时,取藤壶的蔓足和内脏团置于冰浴中,先后经预冷的生理盐水及 0.3M 蔗糖提取液(内含 EDTA-Na<sub>2</sub>, 0.001M; Tris-HCl 缓冲液, 0.01M; pH7.2)<sup>6)</sup>洗涤后,立刻称重、剪碎,再用 5—6 倍 (V/W) 的同一蔗糖提取液于玻璃匀浆器中匀浆 1 分钟 (4000 转/分)。匀浆液在 MSE 18 型冷冻离心机上 0—2°C, 2000 转/分,离心 10 分钟,弃沉淀。上清液用 11,000 转/分离心 10 分钟后,将其沉淀用同一蔗糖提取液洗一次,同法再经 10,000 转/分离心 10 分钟,即得到线粒体沉淀,最后将该沉淀悬浮于上述蔗糖提取液中用作活力测定。

活体实验时先把实验材料分为二个组,实验组的藤壶培养于含一定浓度 TPTC 的海水中,在 28°C 恒温放置 4 小时后取出,经充分洗涤后用上述同样方法提取其线粒体。对

\* 中国科学院海洋研究所调查报告第 632 号。本文摘要曾于 1978 年 10 月在中国海洋湖沼学会学术年会上讨论过。本刊编辑部收到稿件日期: 1980 年 3 月 20 日。

电镜观察由中国科学院上海生理研究所电镜组协助进行,特此致谢。

- 1) 以下简称 TPTC (即 Triphenyltin chloride)。
- 2) 参见娄康后等, 1962。有机毒型防污漆海港试验报告。
- 3) 中国科学院海洋研究所药物筛选组, 1974。防污毒料筛选总结。
- 4) 参见国家海洋局三所 302 组, 1974。船底有机防污毒的筛选。
- 5) 天津油漆厂, 中国科学院海洋研究所。L-10 长效防污涂料实验小结。
- 6) EDTA-Na<sub>2</sub>: 乙二胺四乙酸二钠; Tris: 三羟甲基氨基甲烷。

照组的藤壶养于正常的海水中,其余条件相同。

**氧化磷酸化测定** 线粒体的氧化速率以检压法测定。反应液总体积为 2.2 毫升,一般含有以下基本成分(以微克分子计):  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 50; 葡萄糖, 40; ATP, 5; EDTA, 2; Tris-HCl 缓冲液 (pH7.2), 20;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5; 己糖激酶溶液, 0.3 毫升(过量); 下列氧化底物之一:  $\alpha$ -甘油磷酸钠, 80; 丙酮酸钠, 80; 琥珀酸钠, 80; 线粒体悬浮液, 0.5 毫升。保温时间, 30 分钟(平衡 5 分钟); 反应温度  $28^\circ\text{C}$ ; 反应瓶气相, 空气; 反应终止时迅速加入 30% 三氯醋酸 0.3 毫升。然后离心, 用上清液测定其无机磷酸盐的含量。磷酸化速率根据在反应时间内无机磷酸盐的减少量求得。空白对照在加入线粒体和己糖激酶前即加入三氯醋酸。内源呼吸和磷酸化反应为零或极为微弱。

无机磷测定按 Summer (1944) 的方法<sup>[7]</sup>。

线粒体的蛋白浓度用双缩脲法测定<sup>[2]</sup>。以牛血清白蛋白作标准。

己糖激酶用刘树森<sup>[8]</sup>改良的 Sols 方法从新鲜啤酒酵母中制取。

**化学试剂** TPTC 由大连油漆厂提供, 纯度 99%, 以丙酮乙醇作溶剂, 再用重蒸水配之, 其浓度用 TPTC 测定法标定<sup>[1]</sup>。ATP 钠盐为中国科学院生化研究所产品, 生化试剂; Tris 为英国 B. D. H. 产品; 其余试剂均系分析纯级, 用重蒸水配之。

**线粒体电泳样品制备** 对照藤壶和经含  $\text{TPTC} 6.7 \times 10^{-6}\text{M}$  海水养殖 4 小时的藤壶, 经充分洗涤后, 迅速取其蔓足收缩肌, 用 3% 戊二醛预固定 2 小时后, 再以 2% 锇酸固定 2 小时, 以乙醇丙酮系统脱水, Epon812 渗透包埋。在 LKB 超薄切片机上制成超薄切片, 最后用 2.3% 柠檬酸铅染色。日立 H-500 型电镜观察。

## 结果和讨论

### 1. 藤壶线粒体对不同底物的氧化磷酸化作用

鉴于生物体的线粒体对于不同底物的氧化和磷酸化的能力不等, 因此我们测了三种不同底物, 其结果见表 1。

表 1 藤壶线粒体对不同底物的氧化磷酸化作用

氧化底物	$\Delta\text{O}$ (微克原子)	$\Delta\text{P}$ (微克分子)	P/O*
琥珀酸钠	22.00	23.40	1.04
$\alpha$ -甘油磷酸钠	14.00	19.80	1.41
丙酮酸钠	4.00	0.00	0.00

\* P/O = 无机磷的酯化 ( $\Delta\text{P}$ , 微克分子)/氧的吸收 ( $\Delta\text{O}$ , 微克原子)。

测定条件见“材料和方法”。

表 1 表明, 在本实验条件下, 藤壶线粒体对底物琥珀酸钠有较强的氧化和磷酸化能力, 因此在以后的毒理实验中, 均选用琥珀酸钠作为底物。

1) 参见赵洪儒等, 1967。三苯基氯化锡渗出率测定。

## 2. TPTC 对藤壶线粒体氧化磷酸化的影响

比较藤壶线粒体在离体条件下,不同浓度的 TPTC 对其氧化磷酸化的影响,结果见表 2。

表 2 不同 TPTC 浓度对线粒体氧化磷酸化的影响\*

	$\Delta O$ (微克原子)	$\Delta P$ (微克分子)	P/O
对 照	20.7	27.0	1.3
$1.9 \times 10^{-4} M$ TPTC (最终浓度)	9.6	0.0	0.0
抑 制	54%	100%	—
对 照	22.0	26.0	1.2
$1.2 \times 10^{-4} M$ TPTC <sup>1</sup> (最终浓度)	12.2	0.0	0.0
抑 制	45%	100%	—
对 照	30.7	31.0	1.0
$6 \times 10^{-5} M$ TPTC (最终浓度)	19.3	0.0	0.0
抑 制	37%	100%	—
对 照	21.8	26.0	1.2
$6 \times 10^{-6} M$ TPTC (最终浓度)	21.8	27.0	1.2
抑 制	无抑制	无抑制	—

\* 实验条件同前。不同批量所制备线粒体其比活力略有差异,但同一浓度组的实验所用为同一批量的线粒体。数据为两次以上的平均值。

从表 2 结果可以看出 TPTC 对藤壶线粒体的氧化磷酸化反应有强烈的抑制作用。当 TPTC 浓度为  $1.9 \times 10^{-4} M$  时,能将线粒体的氧化作用抑制 54%,而磷酸化作用则全部受抑制。随着 TPTC 浓度的下降,线粒体的抑制作用也逐渐降低,在 TPTC 为  $1.2 \times 10^{-4} M$  时氧化抑制降低到 45%,而磷酸化反应仍然为全部抑制。而当 TPTC 低于  $6 \times 10^{-6} M$  时,无论对线粒体的氧化作用或者磷酸化作用均无影响。由此看来,TPTC 对线粒体的偶联磷酸化反应要更为敏感,有可能是起解耦联的作用,这有待进一步实验证实。

由于 TPTC 是用乙醇丙酮作溶剂配制的,因此我们做了乙醇和丙酮对离体线粒体氧化磷酸化的对照实验。当乙醇丙酮的最终浓度为 0.38% 时(相当于 TPTC  $1.2 \times 10^{-4} M$  时乙醇丙酮的含量),对线粒体的氧化作用无影响,对磷酸化略有抑制作用。但当其浓度降低到 0.29% 时,对线粒体的氧化和磷酸化均无抑制,反而略有促进作用。而 TPTC 为  $6 \times 10^{-5} M$  时所含的乙醇丙酮浓度仅 0.10%,由此看来对线粒体的磷酸化抑制是由于 TPTC 本身作用的结果。

为了证实藤壶在正常生活情况下受 TPTC 的影响,我们做了用不同浓度 TPTC 对活体藤壶的处理。参照离体实验的结果,先找出一个适宜浓度的 TPTC 海水溶液,把藤

壶养于其中,经 28℃ 恒温 4 小时养殖后,看到藤壶出现明显中毒症状,具体反应为其蔓足收缩显著减慢,每分钟约为 60 次左右,为其正常时的一半次数。此时把藤壶取出,经正常海水充分洗涤后按上述方法提取线粒体,试验结果列于表 3。

表 3 整体藤壶经不同 TPTC 浓度处理后对其线粒体氧化磷酸化的影响\*

	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Q <sub>P</sub>	P/O
对 照	47.4 (2)	5.0	1.2
6.7×10 <sup>-6</sup> M TPTC	35.0	0.5	—
抑 制	26.3%	90%	—
对 照	31.2 (4)	5.7	1.5
2×10 <sup>-7</sup> M TPTC	33.2	5.7	1.5
抑 制	无 抑 制	无 抑 制	—

\* 表中数值为平均数,括弧内数字为实验次数。

Q<sub>O<sub>2</sub></sub> = 微升氧的吸收/毫克线粒体蛋白/小时。

Q<sub>P</sub> = 微克分子无机磷的酯化/毫克线粒体蛋白/小时。

综合表 2 和表 3 的结果可以看出,无论是离体实验或者是活体实验,都说明了 TPTC 对藤壶线粒体的氧化磷酸化反应有抑制作用,而对于磷酸化反应的抑制更为强烈。由于两组的实验条件不同,不能用具体数字来比较,但两者都表示了一趋势。

生物体是个统一的整体,其结构与功能应是密切相关的。在上述实验中,我们所得到的 TPTC 对藤壶线粒体生化功能的结果,理应在其亚显微结构上也有所反应,因此我们进行了电镜观察,结果见图版 I: 1—4。发现经 TPTC 处理后藤壶蔓足收缩肌的线粒体有异常现象——内嵴局部解体。这一现象与 Lehninger (1969)<sup>[5]</sup> 认为线粒体的电子传递链各组分及偶联磷酸化酶系主要分布在线粒体的内膜上的观点是相符的。

众所周知,线粒体是一种重要的换能器官,如同电力站一样,生物体通过其氧化磷酸化作用获得大量的能量以供机体活动所需,如果氧化磷酸化受阻,必然引起机体代谢的障碍。因此,通过上述实验,我们初步认为 TPTC 对藤壶的防污作用是与其对线粒体的氧化磷酸化作用有关。

### 参 考 文 献

- [1] 黄修明等, 1979. 船舰营运与附着生物的相互关系. 海洋与湖沼 10(1):82—89.
- [2] 潘家秀等, 1962. 蛋白质化学研究技术. 科学出版社, 第 12 页.
- [3] Deeks, A. S. et al., 1968. Tributyltin in methacrylate copolymers in antifouling paints. 2nd Inter. Congress on Marine Corrosion and Fouling, Athens Sept. pp. 549—555.
- [4] Evans, C. J., 1971. Organotin-based anti-fouling paints. *Corrosion Prevention & Control*, Feb. pp. 8—11.
- [5] Lehninger, A. L. 1969. The mitochondria: molecular organization. First Intern. Symp. Cell Biol. Cytopharmacol, Venice, July, pp. 7—11.
- [6] Sawyer, A. K., 1972. Organotin Compounds. Vol. 3. pp. 958—959. Marcel Dekker, INC., New York.
- [7] Summer, J. B., 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100 (2601): 413—414.
- [8] Лю Шу-сэнь., 1962. Пути образования аденозинтрифосфата и условия биосинтеза Ацетилхолина в мышечной ткани насекомых. Диссертация. Московский Государственный Университет.

**STUDIES ON THE MECHANISM OF MARINE FOULING  
PREVENTION WITH ORGANOTIN COMPOUNDS\***

**I. THE EFFECT OF TRIPHENYLTIN CHLORIDE ON THE MITOCHONDRIA  
IN CIRRI MUSCLE OF *BALANUS AMPHITRITE AMPHITRITE* DARWIN**

Shi Dianzu Wu Houyu and Zhu Jinzhao

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

ABSTRACT

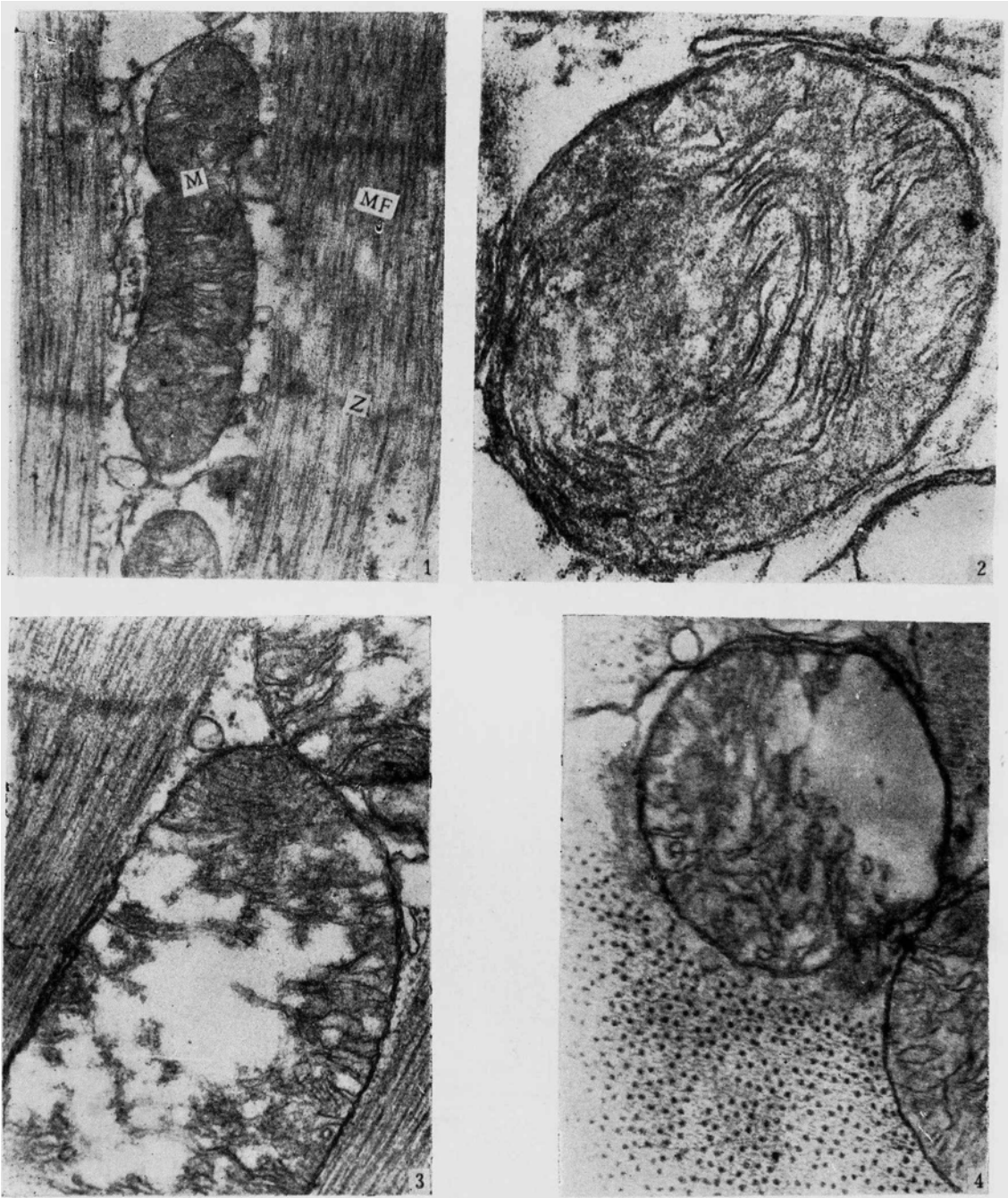
1. The mitochondrial suspensions prepared from the cirri muscle of barnacle were found to oxidize sodium succinate more rapidly than sodium glycerophosphate and sodium pyruvate.

2. The rates of oxidative phosphorylation of the mitochondria were significantly inhibited by TPTC in vitro and in vivo. In cases where sodium succinate was used as substrate, the inhibition of barnacle mitochondria on respiration and on phosphorylation caused by TPTC ( $1.9 \times 10^{-4} M$ ) in vitro were 54% and 100% respectively. Compared the mitochondria prepared from culturing sea water with TPTC ( $6.7 \times 10^{-6} M$ ) to the control, the activities of oxidation and phosphorylation lose 26.3% and 90% respectively.

3. An electron microscopic examination on the fine structure of cirri muscle mitochondria from toxical barnacle by TPTC shows crista being damaged.

---

\*Contribution No. 632 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.



1. 正常藤壶蔓足收缩肌纵切片，在肌肉纤维 (MF) 之间有大小不等的线粒体 (M)，各肌节以 (Z) 线分开，肌肉纤维中肌原纤维丝清晰可见(放大 30,000 倍)；
2. 正常藤壶蔓足收缩肌横切片(放大 70000 倍)，内嵴呈卷曲排列，密布于线粒体内部；
- 3, 4. 经 TPTC 处理后藤壶蔓足收缩肌的线粒体，可看到其异常现象——内嵴局部解体。(图 3 纵切，放大 80,000 倍；图 4 横切，放大 40,000 倍)