

研究简报

有机锡对海洋附着生物的防污机理研究

III. 三苯基氯化锡¹⁾对藤壶线粒体 ATP 酶²⁾的影响*

朱谨钊 · 刘玉梅

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 本文为 TPTC 防污机理的进一步探讨, 报道了 Mg^{2+} 对藤壶线粒体 ATP 酶有激活作用, 适宜的 Mg^{2+} 浓度为 $6\mu\text{mol/ml}$ 。TPTC 对藤壶线粒体 ATP 酶有抑制作用, 情况与寡霉素类似。

前文曾从亚显微结构和生化测定两方面探讨了 TPTC 对藤壶的防污机理^[1], 报道了 TPTC 对藤壶线粒体的氧化磷酸化有强烈的抑制作用。由于氧化磷酸化反应是一个复杂多酶系统的共同作用, 因此究竟哪是 TPTC 的作用部位, 本文作了进一步的探讨。根据 TPTC 对磷酸化的抑制更为敏感的特性^[1], 我们测定了 TPTC 对藤壶线粒体 ATP 酶的影响, 发现 TPTC 对藤壶线粒体上的 ATP 酶有抑制作用, 另外藤壶线粒体上的 ATP 酶和一些哺乳动物心脏线粒体上的 ATP 酶一样, Mg^{2+} 对它有激活作用。

材料和方法

实验用藤壶为纹藤壶 (*Balanus amphitrite amphitrite* Darwin)
线粒体制备见文献[1]。

化学试剂 TPTC 由大连油漆厂提供, 纯度 99%, 以 1:1 (V/V) 丙酮乙醇作溶剂, 其浓度用 TPTC 测定法标定³⁾。ATP 钠盐为中国科学院生物化学研究所产品, 含量 90% 以上。寡霉素系美国 Sigma 产品(含寡霉素 a, b, c), 其他试剂均为分析纯级, 用重蒸水配制。

ATP 酶活力测定系统总体积为 1ml, 除注明者外一般含: Tris-HCl 缓冲液 $60\mu\text{mol}$, pH8.0; ATP $5\mu\text{mol}$; $MgCl_2$ $6\mu\text{mol}$; 含线粒体 4.5mg 蛋白左右。在 30°C 保温 20 分钟后加 30% 三氯醋酸 0.5ml。终止反应后, 离心, 取上清液, 用 Summer 方法测定释放的无机磷^[4]。对照试验先加三氯醋酸。酶活力表示为: $\mu\text{mol P/h/mg}$ 蛋白。

线粒体蛋白浓度用双缩脲法测定^[2]。以牛血清白蛋白作标准。

结果和讨论

1. Mg^{2+} 对藤壶线粒体 ATP 酶的激活作用

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1363 号。

收稿日期: 1985 年 4 月 3 日。

1) 以下简称 TPTC (即 Triphenyltin chloride)

2) 本文所提到的线粒体 ATP 酶为线粒体 ATP 酶复合体。

3) 赵洪儒等, 1967。三苯基氯化锡渗出率测定。

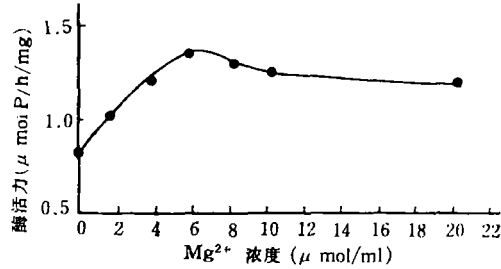


图 1 不同 Mg^{2+} 浓度对藤壶线粒体 ATP 酶的激活作用

许多金属离子都可对 ATP 酶有激活作用,一些哺乳动物的线粒体上的 ATP 酶均可用 Mg^{2+} 作激活剂^[3],我们测试了 Mg^{2+} 对藤壶线粒体 ATP 酶的作用,结果见图 1。

图 1 表明,当 Mg^{2+} 浓度低于 $6\mu\text{mol/ml}$ 时,ATP 酶的激活程度随着 Mg^{2+} 浓度的增大而递增,当 Mg^{2+} 浓度高于 $6\mu\text{mol/ml}$ 时,ATP 酶的活力反而有所下降,在我们的实验条件下,适宜的 Mg^{2+} 浓度为 $6\mu\text{mol/ml}$ 。

2. TPTC 对线粒体 ATP 酶的抑制作用

鉴于 TPTC 对藤壶线粒体的磷酸化作用的抑制远比对氧化作用的抑制敏感^[1]。因此我们在探讨 TPTC 的作用位置时,首先考虑有关磷酸化的问题,我们测定了 TPTC 对藤壶线粒体的 ATP 酶的影响,结果见表 1。

表 1 抑制剂对藤壶线粒体 ATP 酶的作用

TPTC (mol/L)*	寡霉素 (μg)	酶活力 ($\mu\text{mol/h/mg}$)	抑制率(%)
		21.6	
		22.1*	0
1.2×10^{-4}		9.9	54.2
5×10^{-4}		10.2	53.1
2.5×10^{-3}		9.6	55.2
5×10^{-3}		9.5	56.2
	2	9.9	55.2
	10	9.5	56.2
	40	9.0	58.3
1.2×10^{-4}	2	9.3	57.3

* 丙酮乙醇 (1:1, V/V) $10\mu\text{l}$

从表 1 可见,当 TPTC 的浓度为 $1.2 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 时 ATP 酶活力被抑制 54% 左右,以后虽然增大 TPTC 的浓度,但抑制率的变化并不大,这不大符合一般酶与抑制剂浓度变化的规律。我们在文献 [1] 中曾报道 $1.2 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 的 TPTC 能完全抑制线粒体的磷酸化作用,而在本实验中对 ATP 酶的抑制仅为 54% 左右,应该如何看待 TPTC 与这两种抑制之间的关系呢? 我们认为有以下两点值得提出讨论:

(1) 在氧化磷酸化反应中,磷酸化反应的测定是测在 ATP 形成过程中无机磷的减少,这一过程是在线粒体内部进行的有严格顺序的复杂反应,即由 ADP 磷酸化为 ATP 的反应必须是在线粒体内膜的 ATP 酶(也称 ATP 酶复合体)作用下进行,任何外源性的 ATP 酶均不能替代。而在本实验中,ATP 酶的测定是测底物 ATP 在 ATP 酶作用下的水解,即无机磷的增加,仅仅是磷酸化反应的逆反应。但

这两个反应的要求条件不同,其区别即在于磷酸化反应仅局限于线粒体上 ATP 酶复合体的作用;而对于 ATP 的水解,除线粒体上的 ATP 酶外,任何其他来源的 ATP 酶均具有水解它的作用。因此,如果线粒体制剂不纯,对磷酸化反应的测定影响不大,而对于线粒体 ATP 酶活力的测定则会有干扰。

(2) 线粒体 ATP 酶制剂的纯度问题。目前对线粒体的制备均采用差离心法,由于藤壶个体小,线粒体制剂需采用整体匀浆后再用差离心方法制备而成。因而,在我们所应用的制剂中不可避免地会夹有各种组织碎片,故有可能带进各种来源的 ATP 酶,这样本实验所测得的 ATP 酶活力就应该是各种来源的 ATP 酶共同作用的结果,而这些 ATP 酶之间存在着化学特性上的差异,特别是对抑制剂反应方面也存在着差异。因此,TPTC 对某来源的 ATP 酶有抑制作用,而对另一来源的 ATP 酶不抑制也完全是可能的。这就解释了为什么当 TPTC 抑制到一定程度后,再加大它的浓度也不能增加其抑制率的问题。为此,我们用线粒体 ATP 酶的专一性抑制剂寡霉素作对照,发现寡霉素浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对 ATP 酶的活力抑制为 55% 左右;随着寡霉素浓度的增大,一直到 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,ATP 酶的抑制率变化都不大,这说明在我们所测定的 ATP 酶中有部分 ATP 酶是不受寡霉素抑制的,而应该是属于非线粒体上的 ATP 酶。这情况与 TPTC 对 ATP 酶的抑制极为相似,证实了在上述线粒体制剂中,除含有线粒体 ATP 酶外还带有其他来源的 ATP 酶。

从表 1 中我们可以看到 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 寡霉素能抑制 55% 左右的 ATP 酶活力; $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 TPTC 能抑制 54% 左右的 ATP 酶活力。当这两种抑制剂加到一起共同作用时,对 ATP 酶活力的抑制仍然在 57% 左右,抑制率并没有明显地增加。说明这两类抑制剂所抑制的是同一类的 ATP 酶。寡霉素是公认的线粒体 ATP 酶的专一性抑制剂,因而 TPTC 所抑制的也正是线粒体上的 ATP 酶。我们再把寡霉素所抑制的 ATP 酶活力作 100% 的线粒体 ATP 酶活力计,则 $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ TPTC 所能抑制的线粒体 ATP 酶活力也正好是全抑制的水平。这样, TPTC 在该浓度下对 ATP 酶的抑制与对磷酸化作用的抑制也就一致了。

线粒体的磷酸化反应必需要有线粒体 ATP 酶的参与,如果其 ATP 酶受到抑制则必然会破坏线粒体的磷酸化作用,从而导致机体能量代谢的障碍。综合文献[1]及本研究结果可知, TPTC 的防污机理应该是由于 TPTC 抑制了线粒体的 ATP 酶而影响到氧化磷酸化作用,破坏了机体的能量代谢。

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—427。
- [2] 潘家秀、任梅轩、徐俊杰等, 1962。蛋白质化学研究技术。科学出版社,第 12 页。
- [3] 惠特克, P. A., S. M. 丹克著(林治焕等译)1982。线粒体结构、功能和组装。科学出版社,第 94 页。
- [4] Summer., J. B., 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100 (2601): 413—414.

**STUDIES ON THE MECHANISM OF MARINE FOULING
PREVENTION WITH ORGANOTIN COMPOUNDS***
**III. THE EFFECT OF TRIPHENYLTIN CHLORIDE ON THE
ATPase OF BARNACLE MITOCHONDRIA**

Zhu Jinzhao and Liu Yumei

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

In previous paper we discussed the mechanism of barnacle's mitochondria prevention with TPTC from fine structure examination and biochemical function test. It was reported that the Oxidative Phosphorylation of the mitochondrial were significantly inhibited by TPTC in vitro and in vivo.

In present paper we discuss the effect point of TPTC on Oxidative Phosphorylation. The activity of ATPase in freshly prepared barnacle mitochondria was found to be markedly activated by Mg^{2+} with an optimum concentration of $6 \mu\text{mol/ml}$. The ATPase of barnacle mitochondria was inhibited by TPTC.

* Contribution No. 1363 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.