

呼吸链电子传递与线粒体内膜流动性

冯元怡 程德基 林克椿

(北京医科大学, 生物物理教研室)

提 要

本文报告用稳态荧光各向异性研究呼吸链底物氧化启动电子传递时线粒体内膜的流动性变化。结果表明呼吸链底物使内膜流动性增大, 磷脂分子脂酰链的活动度增加(从 2 位碳到 12 位碳)。FCCP (p-trifluoromethoxycarbonylcyanide phenylhydrazine) 取消 H^+ 梯度时底物仍可使内膜流动性增加, 提示流动性的增加与底物氧化启动的电子沿呼吸链的传递过程密切相关。

生物膜的流动性对许多与膜相关的功能活动的调节具有重要意义。在线粒体内膜, 电子传递过程与呼吸链成分的运动密切相关^[1]。膜蛋白的运动依赖膜脂的流动性, 因此研究电子沿呼吸链传递时内膜磷脂分子的动力学特征对于了解氧化磷酸化过程的实现是十分重要的。我们已报道呼吸链底物和抑制剂对线粒体内膜流动性的影响^[2]。本文进一步研究在底物作用下线粒体内膜流动性变化在脂双层不同深度的表现以及在解偶联剂取消 H^+ 梯度时加入底物对内膜流动性的影响。

膜上含有带巯基的蛋白, 为了确定巯基蛋白部位, 用 N-3 苣 NEM 标记的红细胞膜进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳扫描图谱见图 2, 从图 2 中可见, N-3 苣 NEM 结合在区带 1、2 及 3 的部位上。区带 1, 2 是红细胞膜收缩蛋白, 也是膜骨架的主要组成成份, 对维持细胞膜形态起重要作用。在区带 3 有血型糖蛋白、阴离子通道及乙酰胆碱脂酶等。Robert 等人^[8]用汞试剂——对二氯汞苯磺酸封闭巯基后, K^+ 渗透性增加, 溶血度明显增高, 这也证明溶血与巯基有关。巯基在膜上的作用是多方面的, 涉及到酶的活性、膜的通透性等, 故用高铁卟啉氧化膜上巯基可直接影响膜的结构与功能, 最终造

材 料 与 方 法

1. 试剂 DPH (1, 6-Diphenyl 1, 3, 5-hexatriene)、TMPD (N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine)、FCCP、HEPES 均系 Sigma 产品, 2-, 6-, 9-, 12-(9-蒎甲酰)硬脂酸 (2-, 6-, 9-, 12-AS) 系 molecular probes 产品。毛地黄皂苷系杭州第一制药厂产品。其余试剂均系北京化工厂产品。

2. 线粒体内膜的制备 据参考文献 [3] 所述方法自大鼠肝脏提取线粒体, 再用毛地黄皂

成膜破溶。

参 考 文 献

- [1] Joel, K. et al.: *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3173, 1973.
- [2] 潘华珍等: 《生物化学与生物物理进展》, 2, 34, 1984.
- [3] Rose, H. G.: *Journal lipid Research*, 6, 528, 1965.
- [4] Dodge, Z. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963.
- [5] Lowry, O. H.: *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265, 1951.
- [6] 荣康泰: 未发表资料。
- [7] Fairbanks, G.: *Biochemistry*, 10, 2606, 1971.
- [8] Robert, M.: *Journal of physiology*, 69, 185, 1967.

[本文于 1986 年 8 月 1 日收到]

昔除去外膜,得到称为 mitoplast 的内膜制品,悬浮于 HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 缓冲液(含 0.225M 甘露醇, 0.075M 蔗糖, 0.002M HEPES, pH7.4) 中,以琥珀酸为底物,此线粒体内膜显示出良好的耗氧功能。依 [4] 方法测定膜蛋白。

3. 荧光探针标记

DPH 标记: 详见前文[2]。

n-AS (n-(9-anthroyloxy) stearic acid) 标记: 按 [5] 方法将 2-, 6-AS 和 9-, 12-AS 分别以 0.25mg/ml 和 1mg/ml 浓度溶于乙醇,在线粒体内膜悬液中(蛋白浓度为 5mg/ml) 分别按每毫克蛋白加入 2-, 6-AS 10 μ l, 9-, 12-AS 2 μ l 混匀,室温 (25 $^{\circ}$ C) 静置 30 分钟后稀释 10 倍。

4. 荧光各向异性测量 取经标记的线粒体内膜悬液 2 ml (蛋白浓度为 0.5 mg/ml), 于 25 $^{\circ}$ C 在 Hitachi MPF-4 型荧光分光光度计上进行荧光各向异性测量。

荧光分子的发射特性取决于其所处环境的分子构型和动力学特征。当荧光分子插入膜内某一区域时,此区域的动力学变化可通过发射参数的测量而表现。利用不同取向的荧光探针分子对偏振光不同的吸收和发射特性,通过对荧光各向异性 (fluorescence anisotropy) 的测量,可了解标记在膜上的荧光探针分子由于旋转运动导致的取向改变程度,借以反映膜脂分子的运动状态^[6]。各向异性越大,说明膜脂分子的活动度越小,即流动性越小,反之则流动性大。各向异性按以下公式计算:

$$r = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}}$$

式中 I_{vv} 表示起偏器和检偏器光轴均在垂直方向上的荧光强度,而 I_{vh} 则表示起偏器光轴在垂直方向,而检偏器光轴在水平方向时的荧光强度。 $G = I_{hv}/I_{hh}$, 为校正因子,即为起偏器光轴在垂直方向,而检偏器光轴在水平方向时的荧光强度与起偏器、检偏器光轴均在水平方向时的荧光强度之比。

实验结果

图 1、图 2 分别为 DPH 和 2-, 6-, 9-, 12-AS 标记线粒体内膜的荧光激发光谱和荧光发射光谱。根据光谱特性,选择合适的激发波长和发射波长测定荧光各向异性。对 DPH 标记的制品激发波长选用 362nm, 发射波长选用 432nm, 对 n-AS 标记者选用 390nm 和 450nm 分别为激发和发射波长。

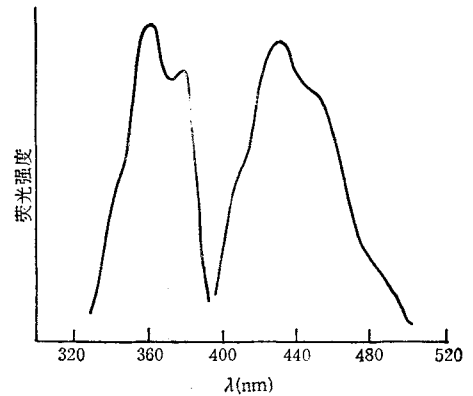


图 1 DPH 标记线粒体内膜荧光光谱

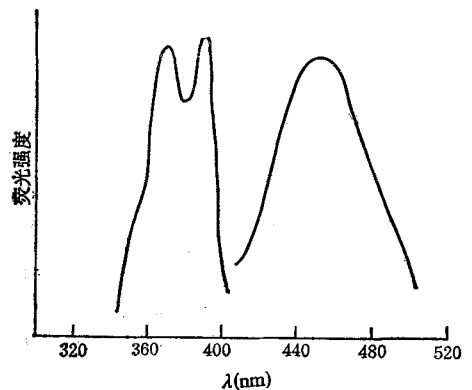


图 2 n-AS 标记线粒体内膜荧光光谱

1. 呼吸链底物对线粒体内膜流动性的影响 在经 DPH 标记的线粒体内膜悬液中分别加入不同部位氧化、启动电子传递的呼吸链底物,结果表明无论是苹果酸和谷氨酸 (2.5mmol/L)、琥珀酸 (5mmol/L) 还是抗坏血酸 (0.5mmol/L, 以 TMPD 为电子介体) 的加入均导致荧光各向异性值的降低 (表 1),表明电子沿呼吸链传递过程中线粒体内膜流动性增大。

表 1 底物加入对 DPH 标记线粒体内膜流动性的影响

	荧光各向异性 (均值±标准差)	实验 例数	t 检验 P 值
对 照	0.125 ± 0.009	12	<0.005
加入谷氨酸与苹果酸	0.115 ± 0.006	12	
对 照	0.116 ± 0.003	12	<0.001
加入琥珀酸	0.101 ± 0.003	12	
对 照	0.114 ± 0.006	10	<0.001
加入抗坏血酸	0.101 ± 0.007	10	

2-、6-、9-、12-AS 为在脂酰链不同部位的碳原子上带有发荧光的葱基团的硬脂酸。做为荧光探针,在它们插入膜脂双层时,结合在不同部位碳原子上的荧光基团进入脂双层的不同深度,因此通过对荧光各向异性的测量可反映膜脂双层不同深度的流动性。亦即 2-AS 反映膜脂表层流动性,而 12-AS 则反映近脂双层中心处的流动性^[7]。

在分别经 2-、6-、9-、12-AS 标记的线粒体内膜悬液中加入呼吸链底物琥珀酸(5mmol/L),比较底物加入前后的荧光各向异性数值,结果表明,经各探针标记的线粒体内膜在加入底物后荧光各向异性数值有所减小(表 2)

表 2 底物加入对 n-AS 标记线粒体内膜流动性的影响

	荧光各向异性(均值±标准差)		实验 例数	t 检验 P 值
	对 照	加入琥珀酸		
2-AS	0.130±0.003	0.122±0.004	12	<0.001
6-AS	0.126±0.002	0.116±0.003	15	<0.001
9-AS	0.149±0.005	0.130±0.002	10	<0.001
12-AS	0.129±0.005	0.108±0.003	10	<0.001

2. 在解偶联剂存在的条件下底物加入对线粒体内膜流动性的影响 底物氧化启动电子传递,同时发生 H⁺ 的定向转运,形成质子跨膜电化学梯度 Δμ_{H⁺}。它包括跨膜电位和膜内外 pH 差两部分,其中膜电位对膜脂流动性会产生影响^[8]。FCCP 是一种解偶联剂,它可做为 H⁺ 载体取消形成的 H⁺ 电化学梯度,而并不影响电子传递的进行。观察在 FCCP 作用之下(加入 1mg/ml FCCP 10μl)底物的加入对线粒体内膜

流动性的影响,发现在 FCCP 存在时底物琥珀酸的加入仍可使内膜流动性增加(表 3)。

表 3 FCCP 存在时底物加入对线粒体内膜流动性的影响

	探针	荧光各向异性 (均值±标准差)	实验 例数	t 检验 P 值
对 照	DPH	0.109 ± 0.005	18	<0.002
加入琥珀酸		0.104 ± 0.004	18	

讨 论

线粒体内膜是液晶态的双层结构^[9,10],它几乎不含胆固醇,而含有约 20% 的心磷脂,其中 90% 的脂肪酸链都是不饱和的^[11]。内膜蛋白虽为内膜总重量的 75%,但电子传递氧化还原酶系及 ATP 酶等大多数跨膜蛋白嵌入脂双层疏水区的部分却只占很小的比例(17—30%)^[1]。再加上内膜含有可做为流动性调节剂的辅酶 Q^[12],这些因素都使得线粒体内膜具有较大的流动性。线粒体内膜的流动性在其功能活动过程中发生变化。我们观察到线粒体内膜在呼吸链底物加入后流动性有所增大。Mutet 等人在线粒体内膜与琥珀酸保温后于 5℃ 测量观察到内膜流动性增加^[13],他们把这种现象归之于膜蛋白的运动。根据本实验结果,苹果酸和谷氨酸、琥珀酸、抗坏血酸这些分别从呼吸链的三个不同部位启动电子传递的底物均能引起线粒体内膜流动性增加。我们认为这种流动性的增加与底物氧化启动的电子传递过程密切相关。电子传递过程中内膜流动性增大的原因,我们在 [2] 文中已有讨论。根据呼吸链抑制剂对内膜流动性的影响,我们推测呼吸链成分的氧化还原状态会影响膜脂的流动性^[2]。显然,蛋白-脂相互作用可能在膜脂流动性增大的过程中起着重要作用。呼吸链复合物是线粒体内膜的主要蛋白成分。众所周知,这些复合物均要求心磷脂与之结合才能表现其活性。它们都属于内膜固有蛋白,跨膜嵌于脂双层中,因此与内膜磷脂分子之间必然存在较强的相互作用。本实验中以一套 n-(9-葱甲酰)硬脂酸为探针,结果表明底物加入后膜脂流动性从脂双层表层到中心部位

醋酸棉酚对红细胞膜功能的影响

符云峰 张世联 王 薇

(河北省医学科学院实验医学研究所生化研究室, 石家庄)

提 要

本文报道醋酸棉酚对人红细胞膜功能和完整性的影响。棉酚浓度高于 $50\mu\text{M}$ 可致红细胞溶血, $10\sim 40\mu\text{M}$ 可促进 K^+ 外逸。1—2% 牛血清白蛋白可以对抗这些效应。5— $10\mu\text{M}$ 棉酚明显抑制红细胞膜 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶活性, K_i 值 $6.0\mu\text{M}$ 。

材 料 及 方 法

血样本取自河北省血站, 所用化学试剂购自化学试剂商店。

血样本制备 新鲜肝素化血液经反复离心和洗涤, 悬浮在不含 K^+ 的介质中 (含 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 0.1mM EDTA 及 5mM 葡萄糖)。

红细胞膜制备 取上述分离的部分红细

棉酚是从棉籽油提取的一种多酚物质。经动物实验及健康成年男性试用, 具有极可靠的抗生育效果^[1]。但长期服用有可能出现低血钾^[2]、细胞内 K^+ 含量减低^[3] 及肌无力^[4] 等体内 K^+ 平衡失调的副作用。据推测, 这些副作用是棉酚对细胞膜结构成分损害的效应。本研究的目的就是要揭示棉酚的这类副作用的实质——对膜及膜功能的影响。为此取得的第一阶段结果报道如下。

均有所增大。这就意味着由于复合物氧化还原状态的改变, 通过蛋白和脂的相互作用, 使构成线粒体内膜的磷脂从极性基头部直至脂酰链的末端的运动状态都发生改变。

另外值得注意的一点是在底物氧化启动电子传递同时, H^+ 定向转运造成的膜电位可能会影响到膜脂的流动性。先于底物加入解偶联剂 FCCP 以取消 H^+ 梯度, 然后再加入底物仍可见膜脂流动性的增大, 提示底物引起的内膜流动性增加并非膜电位变化所致, 而是与底物启动的电子传递过程密切相关。

本文实验工作承复旦大学生物物理教研室提供荧光探针 2、6、9、12-AS, 谨此致谢。

参 考 文 献

[1] Hackenbrock, C. R.: *Trends, Biochem. Sci.*, 227, 613—626, 1981.

- [2] 程伯基等: 《生物化学杂志》, Vol. 2, No. 3, 37—43, 1986.
- [3] Shraitman, C. A. and Greenawalt, J. W.: *J. Cell. Biol.*, 38, 158—175, 1968.
- [4] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248—254, 1976.
- [5] Chance, B. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 54, 521—529, 1975.
- [6] Shinitzky, M. and Barenholz, Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, 515, 367—394, 1978.
- [7] Thulborn, K. R. and Saywer, W. H.: *Biochem. Biophys. Acta*, 511, 125—140, 1978.
- [8] O'Shea, P. S. et al.: *Biochem. J.*, 220, 795—801, 1984.
- [9] Hsia, J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 3412—3415, 1972.
- [10] De Kruijff, B. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 684, 47—52, 1982.
- [11] Daum, G.: *Biochem. Biophys. Acta*, 822, 1—42, 1985.
- [12] Fato, R. et al.: *FEBS Lett.*, 172, 6—10, 1984.
- [13] Mutet, C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 119, 854—859, 1984.

[本文于 1986 年 9 月 8 日收到]