

分离时间对线粒体活性的影响

赵君庸 贾锡安 洪建设 李丽华

(西安医科大学)

研究者总希望得到结构完整、活性较高的线粒体制品,但分离过程中影响因素颇多^[1],稍不注意就会使这种娇脆的亚细胞器活性下降。其中,分离时间对线粒体活性的影响虽已提出,但专文报告不多,笔者对此进行一些观察,现报告如下。

材 料 和 方 法

一、实验动物及分组 S. D 种大鼠,雌雄各半,体重 60 ± 8 克。随机分成 A、B 组。A 组活杀、开胸取心后,立即快速分离线粒体并测定活性,分离时间为 1 小时;B 组取心脏后,将其在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 生理盐水中放置 30 分钟,然后缓慢分离并测定活性,分离时间为 2 小时半。

二、试剂及仪器 DL-苹果酸钠,上海试剂二厂。ADP- Na_2 , Serva 产品。HSC-20 R 高速冷冻离心机,图们离心机厂。CY-JT 测氧仪及氧电极,北京永祥分析仪器厂。

三、线粒体分离 参照 Gazzotti 方法,稍加修改^[2,3]。分离介质为 180 m mol/L KCl , $10 \text{ m mol/L EDTA-Tris}$, $10 \text{ m mol/L Tris-HCl}$, pH 7.4。悬浮介质为 180 m mol/L KCl , $10 \text{ m mol/L Tris-HCl}$, pH 7.4。线粒体蛋白平均含量 150 mg/ml 。

四、线粒体活性鉴定 反应介质 (120 m mol/L KCl , $5 \text{ m mol/L Tris-HCl}$, $15 \text{ m mol/L KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4) 2.5 ml , 以 60 m mol/L 苹果酸 $30 \mu\text{l}$ 为底物,加线粒体悬浮液 0.15 ml , 50 m mol/L ADP $20 \mu\text{l}$ 。反应温度 28°C 。测氧仪测定呼吸状态 3、呼吸状态 4、结合 ADP 用量计算呼吸控制率及磷氧比值。

结 果

一、线粒体呼吸状态 3 (S_3) 和呼吸状态 4 (S_4)

B 组 S_3 非常显著的低于 A 组, S_4 也显著低于 A 组。

表 1 两组大鼠心肌线粒体 S_3 、 S_4 测定结果

	动物数	$S_3(\bar{X} \pm SD)$	$S_4(\bar{X} \pm SD)$
A 组	10	425.88 ± 11.45	160.52 ± 10.35
B 组	10	375.18 ± 13.61	150.40 ± 7.80
		$P < 0.001$	$P < 0.05$

见表 1。

二、线粒体呼吸控制率 (RCR) 两组比较无显著差异,见表 2:

表 2 两组大鼠心肌线粒体 RCR 测定结果

	动物数	RCR ($\bar{X} \pm SD$)
A 组	10	2.66 ± 0.11
B 组	10	2.51 ± 0.10
		$P > 0.05$

三、线粒体磷氧比值 (P/O) 两组比较无显著差异,见表 3:

表 3 两组大鼠心肌线粒体 P/O 测定结果

	动物数	P/O ($\bar{X} \pm SD$)
A 组	10	3.01 ± 0.17
B 组	10	2.91 ± 0.35
		$P > 0.05$

讨 论

一、线粒体分离过程大致可分为破碎细胞、分离线粒体及活性鉴定三步,每步均手续繁杂、要求严格。心肌、骨骼肌韧性较大,剪碎、匀浆和离心皆颇费时间。本文提示,分离时间延长,对线粒体活性影响甚大。

二、延长分离时间主要导致 S_3 值非常显著地下降, S_4 也显著下降,而 RCR 及 P/O 值无明显变化。似乎提示,随分离时间延长,线粒体的氧利用率明显下降。ADP 存在时线粒体呼吸活跃,耗氧剧增^[4],故影响最明显。RCR 及 P/O 值反映线粒体偶联功能及结构受损程度,似乎提示分离时间长短对线粒体此两方面影响不大。推测 S_3 和 S_4 下降可能系离体细胞线粒体中递氢递电子酶类活性随分离时间延长而下降所致。故在线粒体研究中,应注意使各样品组间及各样品间的线粒体分离时间尽量缩短,并保持一致。同时应寻求不明显影响线粒体活性之保存方法,即如几天,甚至几小时,这对采样现场缺乏立即分离、检测手段的研究,无疑是急需的。

(下转第 319 页)

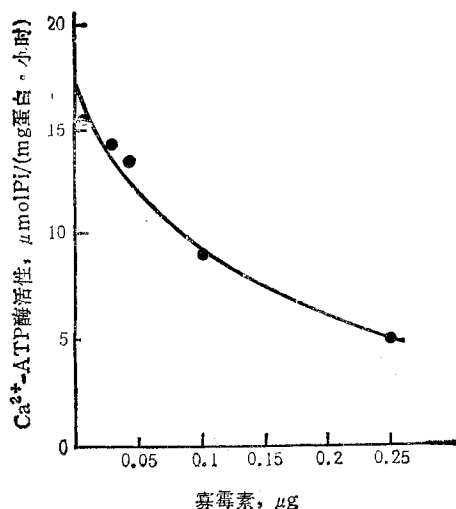


图6 寡霉素对 Ca^{2+} -ATP酶活性的影响

度和酶活性的双倒数作图,如图4所示,可算出底物ATP的 K_m 值为 2.1mmol/L 。

图5、6分别表示哇巴因和寡霉素对 Ca^{2+} -ATP酶活性的影响,结果未显示出哇巴因对该酶有何影响,而寡霉素的作用较为明显,当寡霉素的浓度为 $0.25\mu\text{g/ml}$ 时,酶活性被抑制一半。

实验结果清楚地表明,线粒体膜存在 Ca^{2+} -ATP酶并依赖其配体 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 而表现其活性,但配体浓度过高时,酶活性下降, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 最适浓度分别为 5mmol/L 、 0.1mmol/L 。 K^+ 对 Ca^{2+} -ATP酶影响较小,说明线粒体 Ca^{2+} -ATP酶对 K^+ 不敏感。哇巴因是 $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶的特异抑制剂,本实验结

果未表现哇巴因对ATP酶的抑制作用,说明在用本方法制备的线粒体 Ca^{2+} -ATP酶制备物中未混杂质膜 $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶,线粒体 Ca^{2+} -ATP酶对哇巴因不敏感。寡霉素是线粒体氧化磷酸化的解偶联剂,对线粒体有明显的毒性作用。本实验观察到寡霉素对线粒体 Ca^{2+} -ATP酶活性明显抑制,其 IC_{50} 为 $0.25\mu\text{g/ml}$,表明寡霉素不仅影响线粒体的产能过程,对线粒体膜 Ca^{2+} 转运也具有一定影响,可能抑制线粒体膜 Ca^{2+} 主动转运,从而影响线粒体对胞浆 Ca^{2+} 水平的调节,其作用机制和特性还有待进一步研究。

线粒体 Ca^{2+} -ATP酶的制备及活性测定操作简便,不需特殊设备,结果较为可靠,可作为研究线粒体 Ca^{2+} 转运的一项有用的指标。

参 考 文 献

- [1] Vasington, F. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2670.
- [2] Fiskum, G. et al.: *Feder. Proc.*, 1980, 39(7), 2432.
- [3] Lehninger, A. L.: *Supplement III to Circ. Res.*, 1974, Vol. 34 and 35, 83—90.
- [4] Joseph, G. et al.: *Circulation*, 1987, 75, (Suppl V), v-15.
- [5] Trotman, C. H. et al.: *Life Sci.*, 1985, 36(5), 427.
- [6] Dhalla, N. S. et al.: *Myocardial Injury, Advances In Experimental Medicine And Biology* VOL161 edited by John J. Spitzer, Plenum Press, New York, 1983, 305—316.
- [7] Green, D. E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 23, 516.
- [8] Fisk, C. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1925, 66, 375.
- [9] Skou, J. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 42, 6.

【本文于1988年5月18日收到】

(上接第320页)

参 考 文 献

- [1] 中科院生物物理所线粒体研究小组:《线粒体的分离与活性测定》,内部资料,1980,1—9。
- [2] 赵君庸等:《西安医科大学学报》,1987,8(3),258。
- [3] Gazzotti, P. et al.: *In Membrane Biochemistry*

(Carafioi, E. et al eds), New York, Springer-Verlag New York Inc. 1979, 61~76.

- [4] Estabrook, R. W.: *Methods in Enzymology*, Academic press Inc., New York, 1967, Vol. 10, 41—47.

【本文于1988年6月4日收到】