

序列已经研究清楚,但底物结合位点仍不确定^[7].我们的结果对于研究 T_4 多核苷酸激酶的作用机制可以提供一些有用的信息.近来带氨基的寡聚核苷酸应用越来越广泛,而用同位素进行标记是有用的测定方法.因此,研究氨基对于寡核苷酸5'或3'标记的影响也具有实际的意义.

参 考 文 献

- 1 祁国荣,曹功杰,竺来发等.中山大学学报,1985;2:65
- 2 Van de Sande J H, Bilsker M. Biochemistry, 1973; 12: 5056
- 3 Reddy M V, Randerath K. Carcinogenesis, 1986; 12: 1543
- 4 Lillehaug J R, Kleppe K. Biochemistry, 1975; 14: 1221
- 5 Weinfeld M, Soderlind K M, Buchko G W. Nucleic Acid Res, 1993; 21: 621
- 6 Weinfeld M, Liuzzi M, Paterson M. J Biol Chem, 1989; 264: 6364
- 7 Medgley C A, Murray N E. EMBO J, 1985; 4: 2695

Influence of the Amino-Space Modification of

a Base in an Oligonucleotide on the Activity of T_4 Polynucleotide Kinase. Zhang Xiaolan, Lu Changde, Qi Guorong (Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract It was found that the presence of an amino-space modifying thymidine in an oligonucleotide interfered the transfer reaction of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP by T_4 polynucleotide kinase. When this modified thymidine located in the middle of oligonucleotide, 50% activity of T_4 polynucleotide kinase was inhibited. When this modified thymidine located at the 5'-terminus, only 2% activity remained. Comparatively, those modifications did not affect the activity of T_4 RNA ligase.

Key words T_4 polynucleotide kinase, oligonucleotide, amino-space, 5'-terminus labeling

苯并噻唑醌类化合物对呼吸链酶系的抑制作用*

吕 斌 刘翠华

(华中师范大学有机合成研究所, 武汉 430070)

尚贺勇 徐建兴

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 合成了2-氯-5-正十二硫烷基-6-甲基-4,7-苯并噻唑醌(2-Cl-DMMDBT)和2-氯-5-正丁烷基-6-甲基-4,7-苯并噻唑醌(2-Cl-BAMDBT)两种化合物,研究了它们对线粒体呼吸链酶系的抑制作用.结果表明:2-Cl-DMMDBT和2-Cl-BAMDBT对琥珀酸氧化酶及泛醌氧化酶的电子传递活性均表现一定的抑制作用,而对细胞色素氧化酶无作用,说明二者的抑制作用发生在泛醌反应区.二者对NADH氧化酶的抑制行为略有不同,2-Cl-DMMDBT是一个逐渐加强的过程,最终可致酶活性完全抑制,而2-Cl-BAMDBT则表现为瞬间抑制.比较了2-Cl-DMMDBT和2-Cl-BAMDBT对琥珀酸氧化酶的抑制能力,长侧链的2-Cl-DMMDBT比短侧链的2-Cl-BAMDBT抑制能力强很多.

关键词 呼吸链, 抑制剂, 苯并噻唑醌

呼吸链抑制剂是研究呼吸链电子传递机制的分子工具,已知的呼吸链抑制剂多为酶专一性单位点抑制剂,如抑制复合物I的鱼藤酮

(rotenone),抑制复合物II的噻吩甲酰三氟丙

* 国家自然科学基金和湖北省自然科学基金共同资助.
收稿日期:1994-12-20,修回日期:1995-03-02

酮 (TTFA), 抑制复合物 III 抗霉素 A (antimycin A) 等等, 都曾对呼吸链电子传递体的顺序排列分析做出过重要贡献, 至今仍然广泛应用于线粒体功能研究工作中. Antimycin A 对复合物 III 抑制作用机制的研究使对电子传递链的认识从线性机制发展到循环机制^[1]. 在循环机制中泛醌的两步还原过程是机制的核心. 泛醌作为呼吸链中唯一的非蛋白电子载体, 处在 3 个酶之间从复合物 I 或 II 接受电子再传递给复合物 III, 其作用机制相当复杂而且远未搞清楚. Mitchell 的泛醌循环 (Q-cycle) 假说^[2]提出之后, 泛醌作用机理的研究就成为生物能力学研究的中心问题之一. 泛醌结合蛋白理论^[3]的提出是泛醌作用机理研究的一个重要进展, 这一理论认为 3 个催化泛醌反应的酶复合物 I、II 和 III 均有自己的泛醌结合蛋白, 泛醌是结合在蛋白上而行使电子传递功能的. 从酶学观点看, 泛醌结合蛋白显然是泛醌反应催化中心的组成部分. 因此, 从泛醌反应抑制机制的角度研究泛醌作用机理是一个值得探讨的方向, 最近发现的多位点型泛醌反应抑制剂^[4~6]是研究 3 个催化泛醌反应酶的催化中心结构的有力工具. 1973 年 Friedman 等^[7]合成了 2-氯-5-正十一烷基-6-羟基苯并噻唑醌 (UHDBT), Roberts 等^[8]于 1978 年肯定了 UHDBT 对呼吸链的 NADH 氧化酶和琥珀酸氧化酶的抑制作用.

本文在苯并噻唑醌环的 5 位上引入了硫烷基或烷氨基合成了 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT, 研究了这两个苯并噻唑醌类化合物对呼吸链酶系的抑制作用, 发现它们对呼吸链电子传递的抑制作用与泛醌反应有关.

1 材料和方法

2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 均是未见报道的新化合物, 由本实验室合成, 其合成方法和物理化学性质另行发表.

心肌制剂按文献^[9]方法从猪心肌中制备, 活力测定用北京 304 医院生产的 OBM-3 型测氧仪在 30℃ 恒温条件下进行. 反应

液含 50 mmol/L pH7.4 的磷酸缓冲液, 0.1 mmol/L EDTA, 反应体积 2.5 ml. 向反应液中加入 40 mmol/L 琥珀酸钠作电子供体可用于测定琥珀酸氧化酶活力; 加入 3 mmol/L 新配制的 NADH 作电子供体可用于测定 NADH 氧化酶活力; 加入 2.5 μ mol/L Q_2H_2 作电子供体可用于测定泛醌氧化酶活力; 细胞色素 c 氧化酶活力是在 25 mmol/L pH7.8 的 Tris-HAc 缓冲液中进行, 反应总体积 2.5 ml. 加入 N, N, N', N'-四甲基对苯二胺 (TMPD) 0.7 mmol/L 和抗坏血酸 7 mg 以及细胞色素 c 5 μ mol/L 作为电子供体.

辅酶 Q_2 是按文献^[10]的方法在本实验室合成的, 还原型 Q_2 是在铂-碳催化下小心通 H_2 还原而成. 细胞色素 c (cytochrome c Type III)、NADH 和琥珀酸钠盐 (succinate) 为 Sigma 公司产品, 其他试剂为北京化工厂分析纯产品.

2 结 果

2.1 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对心肌制剂酶活力的抑制作用

图 1 显示了 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对心肌制剂的琥珀酸氧化酶、泛醌氧化酶和细胞色素 c 氧化酶活力的抑制行为.

结果表明两类化合物对电子从琥珀酸到氧和从泛醌到氧的传递均表现抑制作用, 而且抑制作用在抑制剂加入的瞬间即刻表现出来. 而对细胞色素 c 氧化酶活性没有任何抑制作用, 说明两个化合物的抑制作用部位在细胞色素 c 之前的泛醌区域.

2.2 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对 NADH 氧化酶活力的抑制作用

图 2 表明 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对电子从 NADH 到氧的传递活性也都有抑制作用, 不过动力学行为不同, 2-Cl-DMMDBT 加入体系后抑制作用不马上出现而是有一个逐渐加强的过程, 最终可以达到几乎完全的抑制, 而 2-Cl-BAMDBT 的抑制作用则是瞬间发生的.

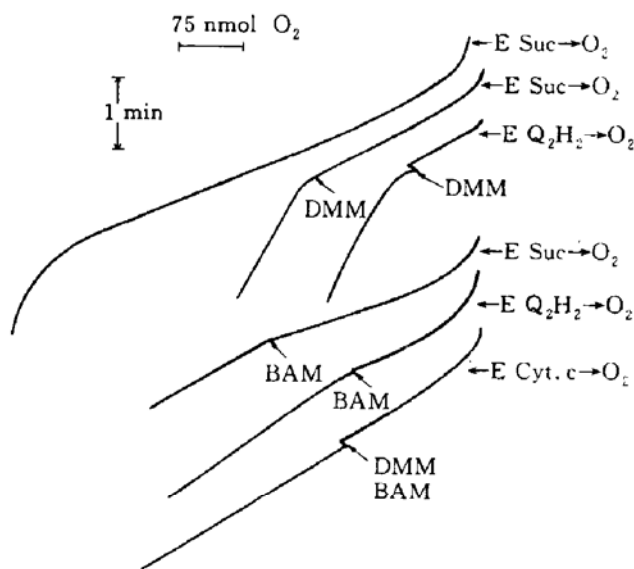


图1 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对心肌制剂各段电子传递活力的抑制作用

Suc $\rightarrow$ O₂: 电子从琥珀酸到氧的传递, 即琥珀酸氧化酶活性; Q₂H₂ $\rightarrow$ O₂: 电子从泛醌到氧的传递, 即氢醌氧化酶活性; Cyt c $\rightarrow$ O₂: 电子从细胞色素 c 到氧的传递, 即细胞色素氧化酶活性; E $\rightarrow$: 加入酶 (心肌制剂) 的时刻; DMM $\rightarrow$ 和 BAM $\rightarrow$: 加入抑制剂的时刻。

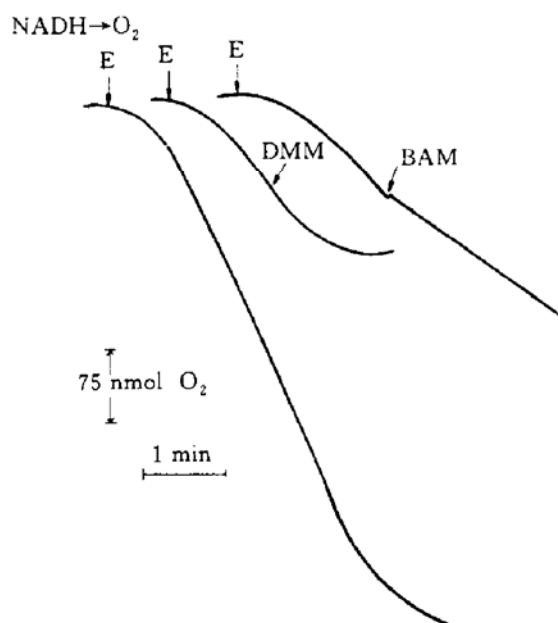


图2 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对心肌制剂 NADH 氧化酶活力的抑制作用

NADH $\rightarrow$ O₂: 电子从 NADH 到氧的传递活性; E $\rightarrow$: 加入酶 (心肌制剂) 的时刻; DMM $\rightarrow$ 和 BAM $\rightarrow$: 加入抑制剂的时刻。

2.3 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对琥珀酸氧化酶活性的抑制作用曲线

图3 是不同浓度 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对琥珀酸氧化酶活性的抑制作用曲线, 两条曲线均表明约只有一半的酶活力可以被明显抑制, 而且抑制作用表现为明显的两相, 先是一个快相然后跟着一个慢相。2-Cl-DMMDBT 的快相约抑制一半的酶活力, 另一半表现为很慢的抑制过程。而 2-Cl-BAMDBT 抑制作用曲线的快相很短, 主要是慢相, 最终也可抑制约一半的酶活性。如用酶活力达 50% 抑制时的半抑制浓度比较, 2-Cl-DMMDBT 是 8.5 $\mu\text{mol/L}$ 而 2-Cl-BAMDBT 为 100 $\mu\text{mol/L}$, 2-Cl-DMMDBT 比 2-Cl-BAMDBT 抑制能力强十几倍。很多琥珀酸泛醌还原酶的抑制剂如 TTFA 和 3-硝基-N-甲基水杨酰胺等作用于醌反应部位的抑制剂, 都表现类似的不完全抑制作用。由于醌区域存在电子漏现象, 即它的还原中间物半醌自由基可通过自氧化过程引起氧分子单电子还原生成超氧阴离子自由基^[11], 这一电子漏引起的耗氧和链内电子传递的耗氧具有不同的性质, 这种电子漏机制很可能是抑制不完全的原因, 快相抑制很可能是对链内电子传递起作用的结果。

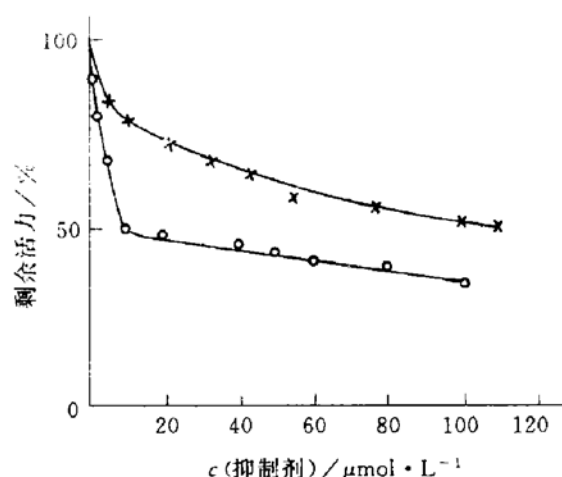


图3 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对心肌制剂琥珀酸氧化酶活力的抑制浓度曲线

○—○: 2-Cl-DMMDBT 的抑制; ×—×: 2-Cl-BAMDBT 的抑制。

3 讨 论

以上实验结果表明两种苯并噻唑酮的类似物都表现对呼吸链酶系有抑制作用, 而且它们的作用位点都在细胞色素 c 之前的泛醌区段。但由于两个化合物 5-位取代基不同, 一个是硫烷基, 一个是烷氨基, 而烷氨基-NHR 上的氢原子可与 4-位醌基的氧原子形成氢键 (图 4), 因此其抑制作用性质也就有所不同。差别主要表现在对 NADH 氧化酶的抑制行为上, 硫烷基取代物 2-Cl-DMMDBT 的抑制作用有一个渐进增强的过程, 而烷氨基取代物 2-Cl-BAMDBT 的作用是瞬间发生的。这一差别的物理意义还有待进一步研究, 琥珀酸氧化酶对这两个化合物反应的差别不像 NADH 氧化酶那样敏感, 这两个酶的不同之处在于其催化泛醌还原的部分即琥珀酸泛醌还原酶和 NADH 泛醌还原酶是不同的, 或许 NADH 泛醌还原酶催化醌还原比琥珀酸泛醌还原酶对醌的 4-位醌基更敏感。琥珀酸氧化酶对两个抑制剂的抑制浓度曲线也很不一样, 而且 2-Cl-DMMDBT 的抑制活性比 2-Cl-BAMDBT 强很多, 对琥珀酸氧化酶活性的半抑制浓度 2-Cl-DMMDBT 为 $8.5 \mu\text{mol/L}$ 而 2-Cl-BAMDBT 为 $100 \mu\text{mol/L}$, 两者相差十几倍。这种差别除了两个抑制剂的 5-位取代基不同之外还与两个疏水侧链的长度不同有关, 2-Cl-DMMDBT 的疏水性比 2-Cl-BAMDBT 强, 所以 2-Cl-DMMDBT 抑制能力强也说明抑制位点可能在较疏水的膜区。

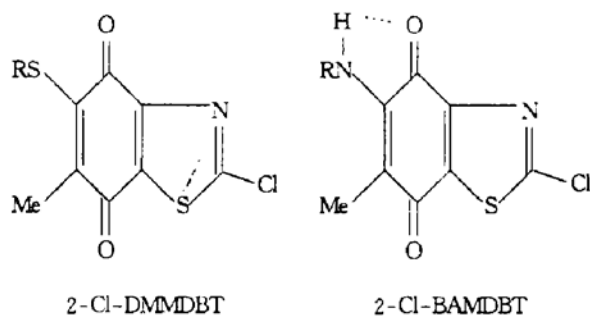


图 4 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 的化学结构

参 考 文 献

- 1 Wikstrom M K F, Berden J A. *Biochim Biophys Acta*, 1972; **283**: 403
- 2 Mitchell P. *J Thor Biol*, 1976; **62**: 327
- 3 Yu C A, Yu L. *Biochim Biophys Acta*, 1981; **639**: 99
- 4 徐建兴, 肖 燕, 古练权等. *生物化学与生物物理学报*, 1991; **23** (6): 513
- 5 Liu C, Xu J X, Gu L Q *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1991; **1057**: 373
- 6 Xu J X, Xiao Y, Wang Y H *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1993; **1142**: 83
- 7 Friedman M D, Storter P L. *J Med Chem*, 1973; **16** (11): 1314
- 8 Roberts H, Choo W M. *Arch Biochem Biophys*, 1978; **191**: 306
- 9 King T E. *J Biol Chem*, 1961; **236**: 2342
- 10 Shunk C H. *J Am Chem Soc*, 1958; **80**: 4753
- 11 Henry J F, Alberto B. In: Rryor W A ed. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press, 1982; **5**: 65

The Inhibitory Effect of Dioxobenzothiazole Analogues on the Mitochondrial Respiratory Chain. Lu Bin, Liu Cuihua (*Institute of Organic Synthesis, Huazhong Normal University, Wuhan 430070, China*); Shang Heyong, Xu Jianxing (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract Two analogues of dioxobenzothiazole, 2-chloro-5-dodecylmercapto-6-methyl-4,7-dioxobenzothiazole (2-Cl-DMMDBT) and 2-chloro-5-butylamino-6-methyl-4,7-dioxobenzothiazole (2-Cl-BAMDBT), were synthesized. Their inhibitory properties on the enzymes of mitochondrial respiratory chain were studied in heart muscle preparation. Both of them show the inhibitory effect on the succinate oxidase, ubiquinol oxidase, NADH oxidase but not the cytochrome c oxidase. These results indicate that the inhibitory sites of both compounds are located on the area of ubiquinone reactions. The substitution of -SR and -NHR at 5-position of the benzothiazole

ring makes the two compounds of 2-Cl-DM-MDBT and 2-Cl-BAMDBT show different behavior on the inhibition of NADH-Q reductase. The stronger inhibitory effect of 2-Cl-DMMDBT than 2-Cl-BAMDBT is probably due to the longer hydrophobic side chain of 2-

Cl-DMMDBT, because the reactive sites of ubiquinone are all in the membrane of the mitochondria.

Key words respiratory chain, inhibitor, dioxobenzothiazole

酸枣仁总皂甙对缺氧-再给氧心肌细胞的保护作用

万华印 丁力¹⁾ 孔祥平 陈兴坚²⁾

(广州空军 458 医院肝病研究所, 广州 510602)

摘要 按 Laarse's 方法建立培养心肌细胞缺氧-再给氧(A-R)模型, 缺氧缺氧 60 min, 再给氧 30 min. 结果发现, 缺氧组心肌细胞 MDA 含量增加, SOD 活性降低, 细胞膜脂质流动性下降, 再给氧组上述改变加剧. 酸枣仁总皂甙(ZS)能剂量依赖性地显著降低心肌细胞 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 增加细胞膜脂质流动性. 证明 ZS 有明显抗心肌细胞缺氧-再给氧损伤作用.

关键词 酸枣仁总皂甙, 培养心肌细胞, 缺氧-再给氧, 丙二醛, 超氧化物歧化酶, 膜脂质流动性

心肌缺血(缺氧)-再灌注(给氧)损伤(ischemia/anoxia-reperfusion/reoxygenation, I-RI/A-RI)的研究是目前基础医学和临床医学中的一个重要课题, 酸枣仁总皂甙(total saponins of *semen Ziziphi spinosae*, ZS)曾被证实有抗大鼠心肌缺血^[1], 保护缺氧心肌细胞^[2]等作用, 但未见有关 ZS 抗脂质过氧化损伤的报道, 本实验以心肌细胞丙二醛含量, 超氧化物歧化酶活性及细胞膜脂质流动性为线索, 在细胞水平研究了 ZS 抗心肌 A-RI 作用.

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

ZS 由西安医科大学化学教研室提供; RPMI-1640 培养基, Hepes, 硫代巴比妥酸(TBA), 四乙氧基丙烷(TEP), 联大茴香胺(diamisidine), 荧光探针 1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯(DPH)及十二烷基磺酸钠(SDS)均为 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶为上海生化试剂采

购站进口分装产品(Difco 1:250); 超氧化物歧化酶(SOD)为上海生物化学研究所东风生化技术公司产品; 小牛血清为军事医学科学院产品; Vit E 为北京第二制药厂产品; 核黄素为河北制药厂产品; 余均为国产分析纯.

1.2 主要仪器

电热恒温培养箱, 岛津 RF-5000 型荧光分光光度计.

1.3 原代心肌细胞培养

参照文献[3], Wistar 大鼠乳鼠由第一军医大学动物中心提供, 细胞浓度为 10^9 个/L, 每个 10 ml 培养瓶接种细胞悬液 1 ml.

1.4 培养心肌细胞缺氧-再给氧损伤模型

参照 Laarse 等^[4]建立的方法, 缺氧 60 min, 再给氧 30 min.

¹⁾ 广州军区总医院超声诊断科, 广州 510010.

²⁾ 第一军医大学药理教研室, 广州 510515.

收稿日期: 1995-01-04, 修回日期: 1995-03-22