DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.02.001

焦痂毒性提取物 D_1 对肝线粒体呼吸链的抑制位点*

陈宗荣 楼淑芬 (第三军基大学预防医学系复合伤研究室) 630038

摘 要 本文报告焦痂提取物中可溶于乙酸乙酯的毒性组含 D_1 对大鼠肝线粒体呼吸链的抑制位点;用还原型辅酶Ⅰ(NADPH)在各呼吸态氧化还原变化观察 D_1 对线粒体体磷酸化位点1通过电子流的影响。D_1 不阻滞电子流通过位点1,D_1 亦不影响辅酶Ⅰ(NADP):四甲基对苯醌还原酶(Duroquinone reductase)活力。用四甲基氢醌(duroquinol)作为电子供体,细胞色素c为电子受体可直接测试位点2的功能状态,D_1 能抑制duroquinol:细胞色素C还原酶(cytochrome c reductase)活力,其抑制程度与 D_1 浓度有关,位点2中的电子载体细胞色素b的氧化还原状态不被 D_1 所抑制,D_1 可造成细胞色素 c_1 移过性氧化过程,说明其还原侧有短暂的抑制,四甲基对苯胺(TMPD)及2,6-二氯靛酚(DCIP)旁路试验表明 D_1 在位点2内有两处抑制点;一处在细胞色素 c_1 的还原侧,一处在细胞色素b的还原侧;其性质及确切部位尚待进一步研究。

关键词 灼伤;线粒体;呼吸链*;磷酸化位点*

中图法分类号 R644

重度烧伤后鼠肝线粒体呼吸功能受到严重抑制[1],我室过去工作已证明乙酸乙酯从烧伤焦痂中提取的组分 D_1 可抑制鼠肝线粒体呼吸功能[2]。此种抑制伴有呼吸链的损害,且其部位很可能在 bc_1 complex中[3],本文旨在进一步探索 D_1 在线粒体呼吸链上的损害位点。

1 材料与方法

成年Wistar大鼠,体重220~250 g,以5 kw溴钨灯照射造成占体表面积20%的Ⅱ度烧伤[1]。伤后第7天取焦痂提出可溶于乙酸乙酯的毒性成份 D_1[2]。健康大鼠活杀后取肝脏制成含蛋白量为40 mg·ml^{-1}的0.25 mol·L^{-1}蔗糖液线粒体悬液,用上海中国科学院植物生理研究所制作的氧电极测线粒体呼吸耗氧率[1],凡呼吸控制率在4以上者方用于实验。

1.1 NADH:Duroquinone reductase 活力

以NADH氧化偶合duroquinone还原测定此酶活力[4]。反应介质内含200 mmol·L^{-1}蔗糖,50 mmol·L^{-1} KCl,3 mmol·L^{-1} HEPES(pH7.1),3 mmol·L^{-1} KH_2PO_4,2 mmol·L^{-1} $MgCl_2$,0.5 mmol·L^{-1} EGTA,2 mg线粒体蛋白,反应体积3 ml,反应温度25℃。将线粒体在25℃温育2 min加入 D_1(5 mg·ml^{-1})0.1 ml,6 min后加入25 mmol·L^{-1}谷氨酸钠+苹果酸钠,0.4 nmol抗霉素A·mg^{-1}线粒体蛋白,0.1 mmol·L^{-1} KCN,然后加入0.1 μmol·L^{-1} FCCP(氰化羰酰氟苯腙)。加入0.3 μmol·L^{-1} duroquinone以启动反应,在240~374 nm观察NADH的氧化还原过程。

1.2 NAD(P)H、细胞色素b、c的氧化还原状态[4]

反应介质内含180mmol·L^{-1}蔗糖,40mmol·L^{-1} KCl,3 mmol·L^{-1} HEPES(pH7.1),1 mmol·L^{-1} EGTA,3 mg线粒体蛋白,反应体积3 ml,反应温度25℃,其它实验条件见正文。

2 结果

2.1 D_1 对电子流通过磷酸化位点1的影响[5]

2.1.1 D_1 对NAD(P)H氧化还原状态的影响:向反应体系中加线粒体3 mg,在340~374 nm处观察氧化还原变化,在呼吸第1态时向反应系统中加鱼藤酮(1 mg·ml^{-1})5 μl,在340~374 nm处NADPH吸光值增加,曲线上行,表示NADPH处于较还原状态;加入抗霉素A后,吸光值无变化,如在加鱼藤酮之前加 D_1(5 mg·ml^{-1})40 μl,NADPH呈较轻程度还原,再加鱼藤酮则进一步还原(图1a)。

用谷氨酸钠+苹果酸钠各5 mmol·L^{-1}向NADPH提供电子(呼吸第4态),NADPH还原,再加入 D_1 可导致进一步还原(图1b)。

以FCCP(1 mmol·L^{-1})1 μl产生脱偶联呼吸,曲线迅速下行,NADPH呈氧化状态,加入鱼藤酮可使之回至还原状态,D_1 亦可产生轻度还原(图1c)。

从以上3组实验可以看出 D_1 对底物传至NADPH的电子流无阻滞作用,加入FCCP后NADPH氧化,再加入 D_1 又呈还原状态,说明 D_1 可阻滞阻电子流通过NADPH下传,即 D_1 对电子流通过磷酸化位点1以后的节段有一定阻滞作用。

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Fig 1 a

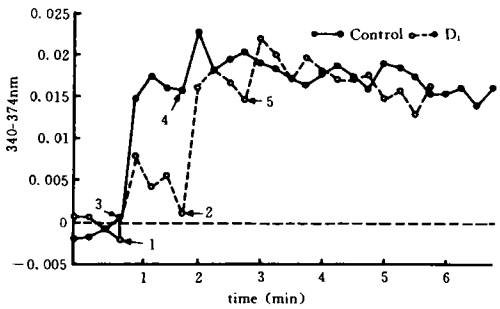


Fig 1 b

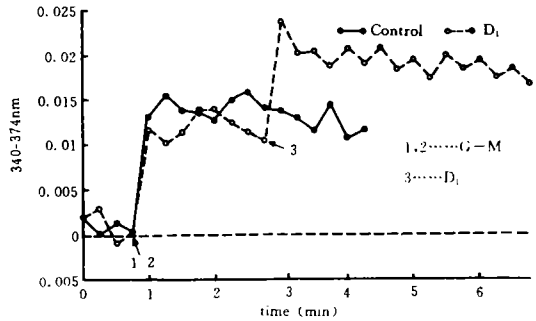


Fig 1 c

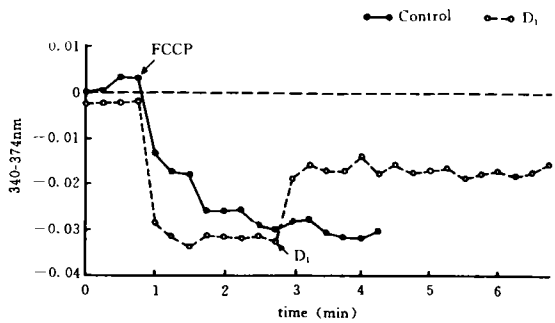


图 1 D_1 对 NADPH 氧化还原状态的作用

Fig 1 Effects of D_1 on redox state of NADPH.

(a)Redox state in state 1; (b)Redox state in state 4; (c)Redox state in FCCP-stimulated respiration. The incubation system contained 0.225 mol/L sucrose, 15 mmol/L KCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 15 mmol/L KH_2PO_4, 50 mmol/L Tris(pH7.5), 1 mmol/L EDTA. Volume 3.0 ml, Temperature 25℃, Wave length pair 340 ~ 374 nm. Mitochondrial protein 3 mg. Where indicated, 4 μmol/L rotenone, 0.2 nmol antimycin A/mg protein, D_1(5 mg/ml) 0.1 ml, glutamate+malate (5 mmol/L each), and 0.3 μmol/L FCCP were added.

2.1.2 D_1 对 NADPH:Duroquinone reducatase 活力的影响：加入 duroquinone 后，在 340～374 nm 处吸收值下降，随即反跳至原来的还原状态，提示一短暂的氧化过程，D_1 加强了此过程，仍说明D_1的抑制点是在磷酸化位点1以后的节段上(图2)。

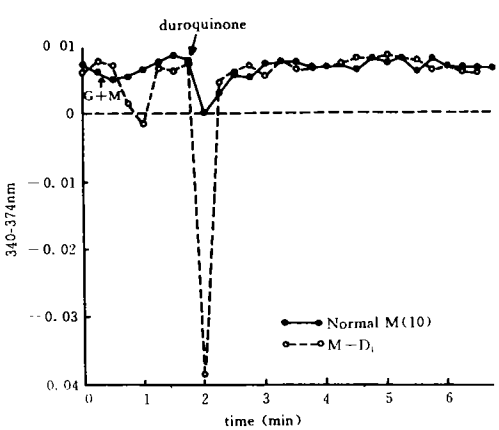


图 2 D_1 对 NANH-Duroquinoe 还原酶活力的作用

Fig 2 Effects of D_1 on NADH: Duroquinone reductase activity.

The incubation system was as described in materials and methods with addition of antimycin A (0.4 nmol/mg protein), KCN (0.1 mmol/L) and FCCP (0.1 μmol/L). 0.3 μmol duroquinone was added as electron acceptor.

2.2 D_1 对电子流通过磷酸化位点 2 的影响

前文报导过 D_1 能抑制位点 1 及位点 2 底物氧化[2]，上述实验已证明抑制点不在位点 1 及位点 3[3]，则对底物氧化所产生电子流的抑制部位必在位点 2 即 Q——细胞色素 c 节段中。

Duroquinol: Cytochrome c reductase activity 测定：以 duroquinol 为电子供体，Cyt. c 为电子受体可观察电子流通过位点 2 是否受到抑制，按 Nelsen 法用四氢硼化钠($NaBH_4$)还原 duroquinone，使成为 duroquinol[6]，每日重新还原一次。反应介质与测耗氧量所用者相同，用线粒体 8 mg(0.1 ml)与等体积磷酸盐缓冲液(pH7.4)在 25℃温育 6 min 后加鱼藤酮 4 μmol·L^{-1}，duroquinol 0.5 mmol·L^{-1}及 FCCP 1.0 μmol·L^{-1}。记录脱偶联呼吸耗氧率作为对照值，换用等体积D_1(0.25，0.5，0.75，1.0，1.5 mg·ml^{-1})与线粒体 25℃温育 6 min 后进行实验，以能否抑制 duroquinol 的氧化作为鉴别 bc_1 complex(位点 2)是否受 D_1 抑制的重要指标，共进行了 3 次实验，加入 duroquinol 后耗氧量不高，加入 FCCP 后耗氧量明显增加，预先将线粒体与不同浓度 D_1 在 25℃温育 6 min 后进行实验，FCCP 刺激呼吸耗氧率随D_1浓度增加而急剧下降，呈明显抑制(图3，表1)。

表 1 D_1 对 Duroquinol：细胞色素 c 还原酶活力的作用

Tab 1 Effects of D_1 on Duroquinol: cytochrome c reductase activity

No. Expt	RCR	Rate of Inhibition (%) Concentration of D_1 (mg·ml^{-1})				
		0.25	0.5	0.75	1.0	1.5
1	5.1	5.7	35.2	37.6	55.8	75.0
2	4.4	14.3	31.7	47.6	50.8	60.3
3	4.3	25.0	63.2	64.6	68.8	74.3

※: Rate of oxygen consumption of the PBS control as 100%

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

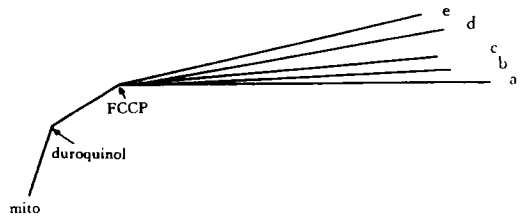


图 3　D_1 对 Duroquinol-细胞色素 c 还原酶活力的作用

Fig 3　Effects of D_1 on duroquinol: cytochrome c reductase.

0.5 mmol/L druoquinol, 0.3 μmol/L FCCP
a: PBS control; b: D_1 0.25 mg/ml; C: D_1 0.5 mg/ml; d: D_1 1.0 mg/ml; e: D_1 1.5 mg/ml. Oxygen consumption rate (ng atom O/min/mg protein): a: 237.1, b: 223.6, c: 153.6, d: 104.9, e: 59.2

2.3　D_1 对线粒体电子载体氧化还原状态的影响

2.3.1　细胞色素 b 的氧化还原状态[4]：反应介质与测呼吸氧耗量者相同，3 mg 线粒体悬液先与等体积 D_1（5 mg·ml^{-1}）在0℃孵育10 min，对照实验用磷酸盐缓冲液(pH7.4)，波长为430～410 nm。

对照实验结果：加入琥珀酸钠后细胞色素 b 缓缓还原，经8.5 min 才达顶点，加入0.3 μmol·L^{-1} FCCP 则细胞色素 b 迅速氧化，然后再缓缓还原，但未达原来的程度。在预先加入 D_1 实验中，加入琥珀酸钠后，细胞色素 b 迅速还原，仅5 min 即达顶点，其还原幅度与对照实验无异，4次实验结果相同(图4)。

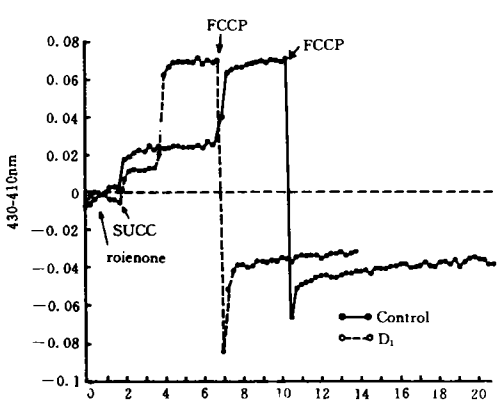


图4　D_1 对细胞色素 b 氧化还原状态的作用

Fig 4　Effect of D_1 on redox state of cytochrome b.

The incubation system was as that in the determination of rate of oxygen consumption. Where indicated, rotenone 4 μmol/L, succinate 2.5 mmol/L, and FCCP 0.3 μmol/L were added. Mitochondrial protein 3 mg. Volume 2.5 ml. Temperature 25℃. Wavelength pair: 430～410 nm.

2.3.2　细胞色素 c_1 的氧化还原状态[4]：反应介质组成见图5说明。波长为553～541 nm，加琥珀酸钠后，电子传至细胞色素 c_1 使之还原；加 KCN 阻断电子后传至细胞色素 aa_3，细胞色素 c_1 进一步还原，如在加琥珀酸钠后加入 D_1，则细胞色素 c_1 迅速氧化，表示在细胞色素 c_1 的还原侧发生了抑制，但此抑制为移过性的，细胞色素 c_1 迅即回到还原状态。再次加入 D_1 又可导致一个短暂的氧化过程。将加入 KCN（抑制点在细胞色素 c 与细胞色素 aa_3 之间）及加入 D_1 后的图形画成复合图，则其差别更为清楚(图5)。

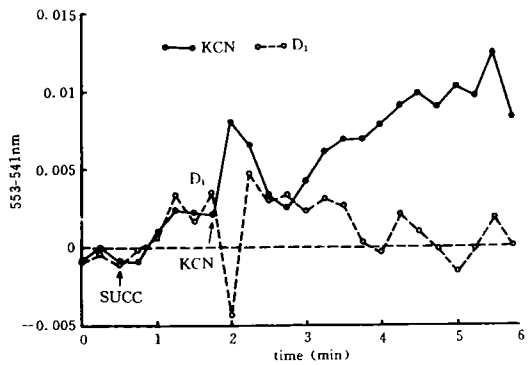


图5　D_1 及 KCN 对细胞色素 c_1 氧化还原状态的作用

Fig 5　Effect of D_1 and KCN on the redox state of cytochrome c_1.

The reaction media consisted of sucrose 200 mmol/L, KCl 50 mmol/L, HEPES 3 mmol/L (pH7.4), EGTA 0.5 mmol/L, potassium phosphate buffer 3 mmol/L, $MgCl_2$ 2 mmol/L. Mitochondrial protein 3 mg. Volume 3 ml. Temperature 25℃. Where indicated, succinate 2.5 mmol/L, KCN 10 mmol/L were added. Wave length pair 553～541 nm.

2.4　D_1 对电子流通过 AA 阻滞的旁路途径的影响[7]

2.4.1　TMPD 旁路：测试的反应系统与测呼吸者相同，氧电极曲线稳定后加0.3 μmol·L^{-1} FCCP，氧耗量迅速增加，此时加入 D_1 可见到明显抑制；加入0.1 mmol·L^{-1} TMPD 可得到轻度缓解，在加入 FCCP 后如加入0.2 mmol·mg protein^{-1} 抗霉素 A，可产生重度抑制，加入 TMPD 可得一定程度缓解，若再加 D_1，又可加重抑制(图6，表2)。

2.4.2　DCIP 旁路：测试反应系统与测呼吸者相同，4 μmol·L^{-1} 鱼藤酮，0.3 μmol·L^{-1} FCCP，及0.2 nmol AA·mgprot^{-1} 对于呼吸耗氧率的影响幅度较前述者为小，加入5 mmol·L^{-1} ASC 及50 μmol·L^{-1} DCIP 后，耗氧量明显增加，再加3 mmol·L^{-1} 琥珀酸钠耗氧量进一步增加，如在加入 ASC+DCIP 后加 D_1（5 mg·ml^{-1}）0.1 ml 则出现轻度抑制，随后加琥珀酸钠引起的耗氧量增加幅度亦略有减少(图7)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 D_1对TMPD旁路的作用

Tab 2 Effects of D_1 on TMPD bypass

No. Expt	Rate of Inhibition (%)							
	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	D_1-TMPD
FCCP	0		0	0	0	0	0	
D_1	50.9		46.5	40.6	41.4	43.5	44.6	14.8
TMPD	15.8		42.3	31.3	29.3	30.4	29.8	
FCCP	0	0	0	0	0	0		
AA	58.4	76.7	73.3	74.6	76.1	78.1	72.9	42.9
TMPD	11.1	0	40.0	39.7	48.2	40.7	30.0	23.2
D_1	47.2	33.3	58.3	46.0	68.2	66.0	53.2	

※:Rate of oxygen consumption of FCCP-stimulated respiration as 100%

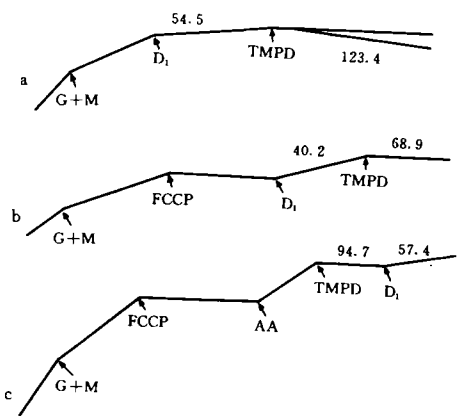


图6 对抗霉素A阻滞TMPD旁路作用

Fig 6 Bypass of the antimycin block by TMPD.

The inoubation system was as in the determination of oxygen consumption rate. Where indicated, TMPD 0.1 mmol/L, antimycin 0.5 μmol/mg protein, glutamate + malate (2.5 mmol/L each) were added. The numbers were rates of oxygen consumption in ng atome O/min/mg protein.

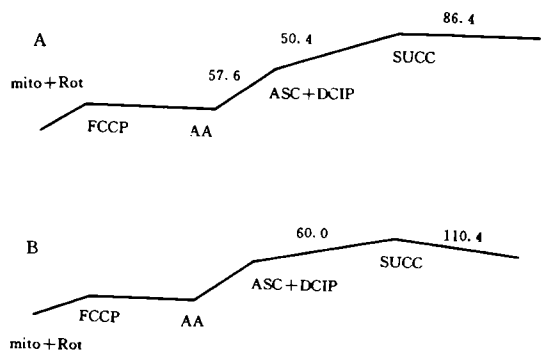


图7 对抗霉素A阻滞DCIP捷路作用

Fig 7 Inhibition of the DCIP-promoted bypass of the antimycin block.

A: Inhibition by D_1. B: Control. The incubation system was as in respiration rate determination. Where indicated, 4 μmol/L rotenone, 0.3 μmol/L FCCP, 0.3 nmol antimycin/mg protein, 5 mmol/L ascorbate and 50 μmol/L DCIP, 3 mmol/L succinate were added. The numbers were oxygen consumption in ng atoms O/min/mg protein.

3 讨论

前文已证明D_1对线粒体呼吸链有抑制及损害作用,复合物IV(细胞色素c氧化酶)未受损害;复合物Ⅰ及Ⅱ中的主要酶(NADH脱氢酶,琥珀酸脱氢酶)活力未受影响,认为损害部位很可能在复合物Ⅲ——bc_1 complex上[2,3],继续深入研究其损害部位有助于了解D_1损害线粒体呼吸链的机理。

本文首先就D_1对位点1电子流的状态进行了研究。无论D_1是在呼吸第1态(无底物,无ADP)或第4态(有底物,无ADP)均可使NADPH处于还原状态,且加FCCP后能产生一氧化过程,说明D_1并不抑制电子流通过位点1,但对于位点1以后的节段则有抑制作用。

测试位点2最直接的方法是以duroquinol为人工电子供体,以细胞色素c为电子受体的实验,此种设计可不考虑底物氧化障碍及Q池异常的情况,实验结果表明D_1有明显的抑制作用,故在排除了位点1及位点3之后,抑制部位可定位在点2,即bc_1 complex。

位点2内有3个氧化还原中心即细胞色素b、细胞色素c_1及硫铁中心(FeS),经分别测试后,发现细胞色素b氧化还原功能无损害,阻滞部位在细胞色素c_1的还原侧,其确切部位尚不清楚。

在AA阻滞时,电子流可通过二个旁路绕过阻滞点到细胞色素c,这就是TMPD旁路及DCIP旁路[8]。按照Q循环学说,通过呼吸链的电子流通路径不是线性的,在Q_{out}中心QH_2(还原型辅酶Q)通过两步给出

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质子及电子成为半醌自由基 $Q^{\cdot}$，这个电子通过硫铁中心，细胞色素 c_1 到细胞色素 c。第二步再释放一个电子而成为 Q，这个电子使细胞色素 b_{566}、b_{562} 还原，然后 b_{562} 再使 Q 还原为 QH_2，故实际上仅有一个电子传至细胞色素 c(图8)。

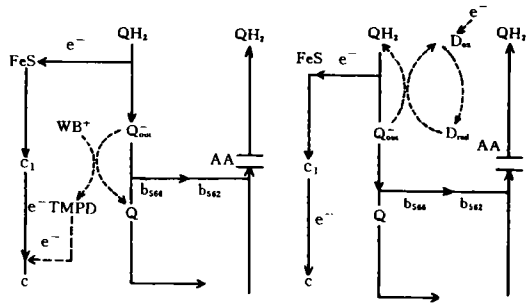


图8　对抗霉素 A 阻滞的 TMPD 及 DCIP 捷路的机理

Fig 8　Pathways of electron flow in (A) the TMPD and (B) the DCIP bypasses of the antimycin block.
(Alexander A. and Lehninger AL: BBA 1984;767: 120～129)

Alexander 报告[8]，AA 阻滞了细胞色素 b_{562} 向 Q 提供电子，故细胞色素 b 处于还原状态，此时若加入氧化型 TMPD(WB^+)，则电子使 WB^+ 还原，细胞色素 c 又使之氧化，电子传至细胞色素 c，循环不已，电子流可经此旁路绕过 AA 阻滞，如这个旁路有障碍，则阻滞点必在细胞色素 b 的还原侧，本实验中 D_1 可对 TMPD 旁路产生明显抑制，故在细胞色素 b 的还原侧必有阻滞，至于其确切部位尚待进一步研究。

AA 阻滞时，还原型 DCIP 给出电子，使 $Q^{\cdot}$ 得到电子成为 QH_2，QH_2 再释放一个电子，经 FeS 及细胞色素 c_1 到细胞色素 c，氧化型 DCIP 又从底物得到电子，循环不已，电子流亦可绕过 AA 阻滞部，而流至细胞色素 c，当 Q－FeS-细胞色素 c_1 节段有障碍时，电子不能通过。本实验中 D_1 可轻度抑制 DCIP 旁路，故不能排除 D_1 对 Q－FeS 或 FeS－细胞色素 c_1 节段亦有抑制作用，D_1 对细胞色素 c_1 的移过性抑制亦支持此种看法。

参考文献

1 陈宗荣，孟小明，王松保，等. 放射损伤复合烧伤大鼠线粒体呼吸功能障碍. 创伤杂志，1986，20：7～11

2 Chen ZR, Xiong Y, Wang SB, et al. Inhibition of mitochondrial respiratory function by an organic solvent extract able component from an extract of burn eschar. Burns, 1991, 17 (4): 282～287

3 陈宗荣，楼淑芬，舒崇湘，等. 焦痂毒性物质提取物 D_1 对大鼠肝线粒体呼吸链的损害. 第三军医大学学报，1993，16(1)：1～4

4 Ferrira J. Effect of butyrated hydroxyanisole on electron transport in rat liver mitochondria. Biochem Pharmacol, 1990, 40(4): 677～684

5 Fluoridi A, Castiglione S, Bianchi C. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by Rhein. Biochem Pharmacol, 1989, 38(5): 743～751

6 Nelsen D, Gellorfors Par. Characterization and resolution of complex Ⅰ from beef heart mitochondria. In: Methods in Enzymology. Vol 53S. Fleischer and L. Packer (eds) Academic Press Inc, 1978: 80～91

7 Fluoridi A, Lehninger AL. Action of the antitumor and antispermatogenic agent lonidamine on electron transport in Erlich ascites tumor mitochondira. Arch Biochem Biophys, 1983, 226(1): 73～83

8 Alexander A, Lehninger AL. Bypasses of the antimycin A block of mitochondrial electron transport in relation to ubisemiquinone function. Biochem Biophys Acta, 1984, 767: 120～129

(收稿：1993-05-22；修回：1993-11-09)

Site of inhibition of mitochondrial electron transpot by D_1, an organic solvent extractable component from burn eschar

Chen Zongrong, Lou Shufen (Section of Combined Injury Research, Department of Radiation Medicine, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract　The inhitory sites of D_1, a toxic extract from burn eschar with ethyl acetate, on the respiratory chain of liver mitochondria was determined in rats. The effect of D_1 on the electron transpot through phosphorylation site 1 was studied with the changes of NADPH redox state in various respiratory phases. It was found that D_1 did not interfere with the electron transport through site 1 or inhibit the activity of NADPH: duroquinone reductase. The phosphorylation site 2 was directly tested with duroquinol as an artificial electron

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

t.1984 Dec;dd(12):826-28 Prac

1993-06-28;修回.1993-11-20收稿.

变,显

系(箭头示来院

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net