

绿豆线粒体呼吸链在不同电子传递途径中的电子漏

傅爱根, 罗广华*, 王爱国

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 绿豆线粒体的呼吸链在氧化不同底物时有不同的呼吸速率和电子漏速率, 但是 O_2^-/O_2 比值较稳定。呼吸链部位 II 的抑制剂抗霉素 A 对 α -酮戊二酸、琥珀酸及苹果酸为底物时的电子漏速率和 O_2^-/O_2 比值都有明显的促进作用, 说明电子漏发生的位点可能在抗霉素 A 的抑制点之前。呼吸链在氧化外源 NADH 时, 线粒体所产生的电子漏对氰化物、鱼藤酮、抗霉素 A 及 SHAM 都不敏感, 而对钙离子的螯合剂 EGTA 显著敏感, 因此, 依赖于钙离子的 NADH 脱氢酶可能是线粒体产生电子漏的另一个位点。电子漏速率及 O_2^-/O_2 比值和线粒体的能量状态密切相关, 在相同条件下状态 4 电子漏速率及 O_2^-/O_2 比值均高于状态 3 的。氰化物和 SHAM 对呼吸链的电子漏有抑制作用, 说明电子漏可能与交替途径有关。

关键词: 线粒体; 呼吸代谢多条途径; 电子传递链; 电子漏; 超氧阴离子

中图分类号: Q945.19

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2000)02-0097-07

ELECTRON LEAKAGE THROUGH VARIOUS ELECTRON TRANSPORT PATHWAYS IN MUNG BEAN MITOCHONDRIA

FU Ai-gen, LUO Guang-hua*, WANG Ai-guo

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Electron leakage rate and respiratory rate were studied with mung bean mitochondria. Succinate, NADH, α -ketoglutarate, malate and NADH were strongly effective in supporting mitochondrial respiratory rate and electron leakage rate. The ratio of electron leakage rate and respiratory rate (O_2^-/O_2) were not markedly different when different substrates were utilized in mung bean mitochondria. Electron leakage rate was promoted and respiratory rate was inhibited by antimycin-A when succinate, α -ketoglutarate and malate, not NADH, were oxidized. It seemed that the site of electron leakage in mitochondrial electron transport chain located before the site of antimycin-A block. When oxidized exogenous NADH, mitochondrial electron leakage was insensitive to CN^- , rotenone, antimycin-A and SHAM, but EGTA, a Ca^{2+} chelator, was obviously effective in inhibiting electron leakage. It suggested that Ca^{2+} -dependent NADH dehydrogenase on the outside of

收稿日期: 1999-06-02

基金项目: 国家自然科学基金(39670072); 广东省自然科学基金(960471)资助项目

* 通讯作者 Corresponding author

mitochondrial inner membrane was one source of electron leakage in mung bean mitochondria. Electron leakage rate and O_2^-/O_2 are closely related with mitochondrial energetic state. Mung bean mitochondria in state 4 presented a higher electron leakage rate and a higher O_2^-/O_2 as compared to those in state 3. Apart from exogenous NADH oxidation, both CN⁻ and SHAM presented inhibitive effects on electron leakage, and these indicated that electron leakage was possibly related with alternative pathway.

Key words: Mitochondria; Multiple pathways of respiratory; Electron transport chain; Electron leakage; Superoxide anion

线粒体呼吸链在传递电子过程中并不是所有的电子都沿着呼吸链传递体顺次运行, 最终在细胞色素 C 氧化酶上, 以四个电子还原 O_2 生成两分子水, 而是在传递过程中有部分单电子“漏出”, 直接对氧进行单电子还原形成超氧阴离子 (O_2^-), 此现象称为“电子漏”(electron leakage)^[1]。参与线粒体呼吸代谢的 O_2 约有 1%–2% 转变为 O_2^- , 每天每个线粒体产生 O_2^- 可达 10^7 个, 线粒体的电子漏是生物体活性氧的重要来源^[2]。已知动物线粒体产生电子漏的部位是复合物 I 和复合物 II^[3,4]。植物线粒体与动物线粒体的电子传递链有很多不同^[5,6], 正如汤佩松指出的, 植物线粒体的电子传递存在多条路径^[7], 那么电子漏是否亦有多条路径呢? 目前对植物线粒体电子漏的研究还不多^[8–10]。根据植物线粒体的多条途径: 1. 以 α -酮戊二酸为底物, 电子传递经复合物 I、复合物 III 和复合物 IV; 2. 以琥珀酸为底物, 电子传递经复合物 II、III、IV; 3. 以苹果酸为底物的内源 NADH 氧化, 此途径的特点是不为鱼藤酮控制, 似乎 NADH 是绕过 FMN 及 Fe-S, 而由另一种黄素蛋白, 直接通过 UQ 而传递下去; 4. 外源 NADH 的氧化。本文用不同底物和抑制剂研究线粒体在不同能量状态下几条电子传递路径的电子漏速率, 以探讨电子漏在电子传递链上发生的机制。

1 材料和方法

材料 绿豆 (*Phaseolus radiatus* L.) 黄化幼苗下胚轴。

线粒体分离 按 Neubrger 方法^[11], 1 kg 下胚轴加入 2 L 研磨介质(含 0.3 mol/L 甘露醇, 50 mmol/L HEPES pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L 巯基乙醇, 0.1% (w/v) BSA, 0.5% (w/v) PVP), 快速匀浆, 纱布过滤, 滤液 $1500 \times g$ 离心 15 min, 清液 $10000 \times g$ 离心 15 min, 沉淀悬浮在 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH 7.2 (含 0.3 mmol/L 甘露醇, 1 mmol/L EDTA, 0.1% (w/v) BSA) 的介质中, $1200 \times g$ 离心 10 min, 清液 $10000 \times g$ 离心 15 min, 沉淀为线粒体。所有操作在 0–4 °C 下进行。

呼吸速率的测定 按李德耀、叶济宇的方法^[12], 以 O_2 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein 表示。

呼吸状态的建立 按 Chance-Williams 方法^[13]。

电子漏速率的测定 按王爱国方法^[14], 以 O_2^- nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein 表示。

2 实验结果

2.1 呼吸链以 α -酮戊二酸为底物时的电子漏

绿豆线粒体的电子传递链以 α -酮戊二酸为底物时的呼吸速率和电子漏速率以及各种抑制剂

的影响如表 1。线粒体呼吸在状态 3 时, 鱼藤酮(部位 I 的抑制剂)对 α -酮戊二酸氧化的抑制作用为 70.6%, 抗霉素 A (部位 II 的抑制剂) 为 75.5%, CN^- (部位 III 的抑制剂) 为 75.5%, 而 SHAM (水杨基氧肟酸, 抗氰呼吸末端氧化酶的抑制剂) 只有 11.73%; 状态 4 时, 鱼藤酮对 α -酮戊二酸氧化的抑制为 38.16%, 抗霉素 A 为 42.44%, CN^- 为 43.51%, 只有 SHAM 在状态 4 时的抑制高于状态 3 的。SHAM + CN^- 共同作用几乎可完全抑制在状态 3 和状态 4 时的呼吸作用。

表 1 α -酮戊二酸为底物时的呼吸速率及电子漏速率Table 1 Respiratory rate and electron leakage rate with α -ketoglutarate as substrate

抑制剂 Inhibitor	呼吸速率 Respiratory rate (O_2 nmol $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$)		电子漏速率 Electron leakage rate (O_2^- nmol $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$)		O_2^-/O_2 (%)	
	State 状态 3	状态 4	状态 3	状态 4	状态 3	状态 4
	对照 Control	14.73	6.55	0.31	2.22	2.1
Rotenone	4.33	4.05	0.05	0.71	1.1	17.5
Antimycin A	3.61	3.77	1.02	2.53	28.2	67.1
CN^-	3.61	3.70	0.07	0.58	2.2	15.7
SHAM	13.01	3.33	0.27	1.02	2.1	30.6
CN^- + SHAM	1.44	1.17	0.01	0.04	0.7	3.4

α -酮戊二酸为底物时的呼吸链电子漏速率在状态 3 时为 $0.31 \text{ O}_2^- \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$, 而在状态 4 时为 $2.22 \text{ O}_2^- \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$, 提高了 7.16 倍。鱼藤酮对状态 3 和状态 4 的电子漏速率抑制分别为 83.8% 和 68%。 CN^- 对状态 3 及状态 4 的电子漏抑制率各为 77.5% 和 73.8%。而抗霉素 A 使状态 3 时的电子漏速率提高 3.3 倍, 状态 4 时电子漏速率提高 1.14 倍。SHAM 对状态 3 的电子漏影响很小, 而对状态 4 时的电子漏有抑制作用。可以清楚地看到: 无论有或无抑制剂存在, 状态 4 的电子漏速率比状态 3 的提高很多。在状态 3, 只有抗霉素 A 存在时, O_2^-/O_2 比值较高 (28.2%), 其它情况下的 O_2^-/O_2 均不超过 3%。

2.2 呼吸链以琥珀酸为底物时的电子漏

琥珀酸是植物线粒体呼吸链常用的底物, 琥珀酸的氢传递不经 NAD, 而由 FAD 转到 UQ, 进入线粒体电子传递链, 生成两个 ATP。表 2 表明鱼藤酮对以琥珀酸为底物的呼吸作用几乎没有抑制, 而抗霉素 A 抑制状态 3 呼吸的 70.3% 及状态 4 呼吸的 6.5%, CN^- 能抑制状态 3 呼吸的 71.9% 及状态 4 呼吸的 31.4%; SHAM 可抑制状态 3 呼吸的 9.3% 及状态 4 呼吸的 41.2%。丙二酸(琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂)对琥珀酸的氧化有强烈的抑制作用(状态 3 时抑制 82.4%, 状态 4 时抑制 64.2%)。SHAM 和 CN^- 共同作用可完全抑制琥珀酸的氧化。所有抑制剂对呼吸作用的抑制都是状态 3 的大于状态 4 的, 唯有 SHAM 对状态 3 的抑制小于状态 4 的。

以琥珀酸为底物时, 状态 3 的电子漏速率为 $2.57 \text{ O}_2^- \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$, 状态 4 时为 $6.48 \text{ O}_2^- \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$, 状态 4 是状态 3 的 2.5 倍; 状态 3 时的 O_2^-/O_2 为 2.2%, 而状态 4 时的 O_2^-/O_2 为 17.7%。丙二酸对状态 3 和状态 4 时的电子漏均有明显的抑制(分别抑制 98%

和 97%)。鱼藤酮对状态 3 和状态 4 的电子漏均无明显的作用。抗霉素 A 在状态 3 可使电子漏的速率提高 2.1 倍, 状态 4 时电子漏稍有提高, 并使 \bar{O}_2/O_2 的值也显著提高。SHAM 和 CN^- 都可抑制状态 3 和状态 4 的电子漏速率。

表 2 琥珀酸为底物时的呼吸速率及电子漏速率

Table 2 Electron leakage rate and respiratory rate with succinate as substrate

抑制剂 Inhibitor	呼吸速率 Respiratory rate (O_2 nmol $min^{-1}mg^{-1}protein$)		电子漏速率 Electron leakage rate (\bar{O}_2 nmol $min^{-1}mg^{-1}protein$)		\bar{O}_2/O_2 (%)	
	State 状态 3	状态 4	状态 3	状态 4	状态 3	状态 4
	对照 Control	118.50	37.73	2.57	6.48	2.2
Rotenone	115.50	35.27	2.49	6.12	2.2	17.4
Antimycin A	35.15	27.75	5.42	7.12	15.4	25.7
CN^-	33.30	25.90	0.42	1.12	1.3	4.3
SHAM	107.50	22.2	2.78	5.12	2.5	23.1
Malonic acid	20.90	13.5	0.05	0.15	0.3	1.1
CN^- +SHAM	7.40	5.55	0.04	0.35	0.5	6.3

2.3 呼吸链以苹果酸为底物时内源 NADH 氧化途径的电子漏

根据植物呼吸代谢的多条路径学说, 植物线粒体呼吸链中存在一种对鱼藤酮不敏感的内源 NADH 氧化, 与动物内源 NADH 氧化不同, 它不经过 ATP 的第一个生成位点, 而是绕过 FMN 和 Fe-S, 由另一种黄素蛋白 (EP_2) 直接通过 UQ 而传递下去, 只生成二个 ATP。当以苹果酸为底物时, 这种对鱼藤酮不敏感的内源 NADH 氧化表现得最为明显^[10]。表 3 是以苹果酸为底物时线粒体的呼吸速率和电子漏速率。鱼藤酮对状态 3 的呼吸速率抑制 48.46%, 对状态 4 的抑制 22.69%, 比 α -酮戊二酸为底物时鱼藤酮的抑制低得多, 可见以苹果酸为底物时, 绿豆线粒体存在着对鱼藤酮不敏感的内源 NADH 的氧化。抗霉素 A 在状态 3 时对鱼藤酮不敏感的内源 NADH 氧化的抑制为 83.6%, 在状态 4 时为 62.66%; CN^- 在状态 3 的抑制为 84.87%, 在状态 4 为 66.46%; SHAM 对状态 3 的抑制为 55.19%, 对状态 4 为 59.42%; SHAM 和 CN^- 共同作用基本完全抑制这种呼吸。在鱼藤酮作用下, 绿豆线粒体以苹果酸为底物时状态 3 的电子漏速率

表 3 苹果酸为底物时的呼吸速率及电子漏速率

Table 3 Electron leakage rate and respiratory rate with malate as substrate

抑制剂 Inhibitor	呼吸速率 Respiratory rate (O_2 nmol $min^{-1}mg^{-1}protein$)		电子漏速率 Electron leakage rate (\bar{O}_2 nmol $min^{-1}mg^{-1}protein$)		\bar{O}_2/O_2 (%)	
	State 状态 3	状态 4	状态 3	状态 4	状态 3	状态 4
	对照 Control	67.21	30.80	1.50	5.03	2.2
Rotenone	34.64	23.81	0.97	3.12	2.8	13.1
Antimycin A	11.02	11.50	2.35	4.13	21.3	35.9
CN^-	10.17	10.33	0.11	2.12	1.1	20.5
SHAM	30.12	12.50	0.85	2.75	2.8	20.2
SHAM+ CN^-	3.12	1.12	0.05	0.05	1.6	4.5

为 $0.97 \text{ O}_2^- \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$, 状态 4 时的电子漏为 $3.12 \text{ O}_2^- \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$, 比状态 3 的大得多。状态 3 时的 O_2^-/O_2 为 2.2%, 状态 4 的为 16.3%。不管在状态 3 或状态 4, 抗霉素 A 都能促进内源 NADH 氧化产生的电子漏, 提高 O_2^-/O_2 比值。而 CN^- 和 SHAM 都降低电子漏产生速率, 但对 O_2^-/O_2 比值影响不明显。

2.4 呼吸链以外源 NADH 为底物时的电子漏

植物线粒体和动物线粒体有一个较为明显的差别, 就是植物线粒体能很好地利用外源 NADH 作为呼吸底物。在植物线粒体中外源 NADH 的氧化主要有二条途径: 一是经过线粒体内膜外表面的 NADH 脱氢酶进入电子传递链, 这是一条 Ca^{2+} 促进的途径; 二是经过外膜上的 NADH 脱氢酶进入电子链, 此途径依赖于 Cyt c。

从表 4 可以看出, 以外源 NADH 为底物的呼吸速率远远高于以 α -酮戊二酸, 苹果酸或琥珀酸为底物时的呼吸速率。鱼藤酮对外源 NADH 的氧化只有轻微抑制, 可见外源和内源的 NADH 氧化有明显不同。抗霉素 A、 CN^- 及 Ca^{2+} 通道的阻断剂 EGTA 都不同程度地抑制 NADH 的氧化; SHAM 对外源 NADH 的氧化基本上没有抑制。在有 Cyt c 存在时, 用 EGTA、抗霉素 A 同时作用于以 NADH 为底物的线粒体, 内源的 NADH 氧化及依赖于 Ca^{2+} 的内膜外表面的 NADH 氧化均被抑制, 但它还有一定的呼吸, 此时的电子传递是通过外膜上的 NADH 脱氢酶进行。

表 4 外源 NADH 为底物的呼吸速率及电子漏速率

Table 4 Electron leakage rate and respiratory rate with exogenous NADH as substrate

抑制剂 Inhibitor	呼吸速率 Respiratory rate ($\text{O}_2^- \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$)		电子漏速率 Electron leakage rate ($\text{O}_2^- \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$)		O_2^-/O_2 (%)	
	State 状态 3	状态 4	状态 3	状态 4	状态 3	状态 4
	对照 Control	273.46	117.00	6.78	6.63	2.5
Rotenone	253.70	109.00	6.52	6.12	2.6	6.1
Antimycin A	55.12	61.40	7.13	7.03	12.9	11.4
CN^-	43.32	39.41	6.45	6.65	14.8	16.8
SHAM	244.15	50.41	6.78	6.84	2.7	13.5
SHAM+ CN^-	18.55	15.33	6.45	6.21	34.7	40.5
EGTA	39.53	33.07	1.03	1.02	2.6	3.1
EGTA+Antimycin A+Cyt c	58.66	51.33	2.45	2.13	4.2	4.1

从电子漏的速率来看, 以 NADH 为底物时的电子漏比其它底物存在时都大, 但以 NADH 为底物时的呼吸也高于别的底物。从 O_2^-/O_2 比值看, NADH 和别的底物的值差异不大。几种电子传递链的抑制剂对 NADH 为底物时的电子漏的影响不大, 但 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 在状态 3 和状态 4 时对电子漏的抑制作用都有较大的影响(约抑制 60%)。在螯合剂 EGTA、Cyt c、抗霉素 A 的同时作用下, 呼吸链电子漏速率较低。

3 讨论

α -酮戊二酸为底物的主电子传递途径中, 除抗霉素 A 外, 所有的呼吸抑制剂在抑制呼吸的同时也抑制了电子漏速率, 只有抗霉素 A 在抑制呼吸的同时提高了 O_2^-/O_2 的比值。在苹果酸为底

物时的对鱼藤酮不敏感的内源 NADH 氧化的电子传递途径以及在琥珀酸为底物时的电子传递途径亦如此, 说明在这三条电子传递途径中发生电子漏的位点应该在抗霉素 A 的阻抑位点之前, 这与动物线粒体电子漏的情况很相似。动物线粒体电子漏的部位一般认为是 UQ^[4], 植物中很可能也是 UQ (泛醌)。呼吸链氧化不同底物时, 电子漏的速率有很大差异, 其中以氧化外源的 NADH 时电子漏速率最大, 这与 Bonner^[9] 及王爱国^[8] 的实验结果相一致。不同的底物所导致的呼吸速率不一样, 但是几种底物氧化时的 O_2^-/O_2 没有太大的差异, 因此, O_2^-/O_2 的比值可能与底物的利用无关。王爱国^[8] 和 Rich^[10] 都推测位于线粒体内膜外表面的 NADH 脱氢酶可能是呼吸链电子漏的部位之一, 因为他们发现以 NADH 为底物的电子漏大于以琥珀酸为底物时的电子漏。植物线粒体氧化 NADH 的途径很多, NADH 的氧化并不总是经过内膜的 NADH 脱氢酶。在以 NADH 为底物时, 绿豆线粒体的电子漏速率对抗霉素 A、CN⁻、SHAM 及 ADP 都不敏感, 而 Ca²⁺ 螯合剂 EGTA 能抑制此时发生的电子漏, 表明依赖于 Ca²⁺ 的位于线粒体外膜的 NADH 脱氢酶极有可能是线粒体中发生电子漏的另一个位点, 内膜 NADH 脱氢酶是电子漏产生部位的可能性不大。

除外源 NADH 的氧化外, α -酮戊二酸、苹果酸和琥珀酸等电子传递途径中的电子漏和线粒体的能量状态密切相关。状态 4 的电子漏速率和 O_2^-/O_2 比值都明显高于状态 3 的。在状态 4 时, 线粒体能荷较高, 电子传递受阻, 电子链的各个组份处于能量较高的还原态, 电子容易丢失; 而在状态 3 时能荷较低, 电子链的各个组份都处于能量较低的氧化态^[15], 相对地电子较难丢失。除外源 NADH 的氧化外, CN⁻ 和 SHAM 对其它几种电子传递途径中的电子漏都有明显的影响, 可见交替途径和电子漏的产生亦有一定关系。Rustin^[16] 认为交替途径实际上是一种自由基代谢途径, 但从本实验结果看来, 交替途径中的电子漏只占交替途径中的一部分, 显然交替途径不能完全用电子漏来解释。

参考文献:

- [1] 刘树森, 焦选茂, 王孝铭, 等. 线粒体呼吸链电子漏与质子漏的相互作用—电子漏引起质子漏 [J]. 中国科学(B 辑), 1995, 25:596-603.
- [2] 曾昭惠, 张宗玉. 自由基对线粒体 DNA 的氧化损伤与衰老 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(5):429-432.
- [3] Turrens J F, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria [J]. Biochem J, 1980, 191:421-427.
- [4] Turrens J F, Alexander A, Lehninger A L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria [J]. Arch Biochem Biophys, 1985, 237:408-414.
- [5] Day D A, Douce R. Introduction [A]. In: Douce R, Day D A. Higher Plant Cell Respiration [M]. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Press, 1985, 1-4.
- [6] 梁峥. 植物线粒体抗氰电子传递链 [J]. 植物生理学通讯, 1985, 21(5):1-9.
- [7] 汤佩松. 植物线粒体中电子传递途径的改变和调节—再论呼吸代谢多条路线 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1978, (4): 18-26.
- [8] 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆下胚轴线粒体超氧化物自由基的产生效率 [J]. 植物生理学报, 1985, 12:148-153.
- [9] Boveris A, Sanchez R A, Beconi M T. Antimycin- and cyanide- resistant respiration and superoxide anion production in fresh and aged potato tuber mitochondria [J]. FEBS Lett, 1978, 92:333-341.
- [10] Rich P R, Bonner W D. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria [J]. Arch Biochem

Biophys, 1978, 188:206-213

- [11] Neubrger M. Large-scale preparation of washed mitochondria [A]. In: Douce R, Day D A. Higher Plant Cell Respiration [M]. Beilin, Heidelberg: Springer-Verlag Press, 1985, 9-12.
- [12] 李德耀, 叶济宇. 氧电极方法操作中的一些技术问题 [J]. 植物生理学通讯, 1986, 22:56-58.
- [13] Chance B, Willams G R. A simple and rapid assay on oxidative phosphorylation [J]. Nature, 1955, 175:1120-1124.
- [14] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系 [J]. 植物生理学通讯, 1990, 26:55-57.
- [15] Moore A L, Rich P R. Organization of the respiratory chain and oxidative phosphorylation [A]. In: Douce R, Day D A. Higher Plant Cell Respiration [M]. Beilin, Heidelberg: Springer-Verlag Press, 1985, 151-161.
- [16] Ruatin P, Dupont J, Lance C. Oxidative interactions between fatty acid peroxy radicals and quinones: possible involvement in cyanide-resistant electron transport in plant mitochondria [J]. Arch Biochem Biophys, 1983, 225:630-639.