

线粒体体外代谢热动力学研究*

刘 义 谢昌礼 屈松生 邓凤姣¹ 郭 煜¹
(武汉大学化学系, ¹ 生命科学院, 武汉 430072)

关键词: 鱼肝线粒体, 微量热法, 热动力学

线粒体是细胞重要的细胞器之一, 有细胞的“能源工厂”之称. 因为线粒体内有许多酶, 是特殊的酶催化氧化反应的场所^[1], 所有动、植物细胞的线粒体都能通过各种营养物的氧化而产生“富能”物质 ATP. 采用一定的技术可将线粒体从细胞中分离出来, 分离出来的线粒体中的酶系统还有一定的活性, 而且线粒体内也有一定的营养物质, 这样酶系统就能利用这些营养物进行代谢, 从而释放出一定的能量. 我们用微量热法对两种鱼肝脏线粒体进行了测量, 发现线粒体代谢过程分四个阶段: 停滞期、活性恢复期、稳定期、活性衰减期. 在活性恢复期和活性衰减期, 其代谢热谱曲线呈“S”型, 即线粒体在这两个时期, 其代谢活性变化呈“S”型. 描述“S”型曲线的一个最经典的方程就是 Logistic 方程^[2], 于是我们可以得到

$$dP/dt = k_m P(1 - SP) \quad (1)$$

k_m 为线粒体代谢的速率常数, P 为 t 时刻的热功率; S 为限制性因子. 由 (1) 式可得

$$\frac{dP}{P(1 - SP)} = k_m dt \quad (2)$$

$$\ln \frac{P}{1 - SP} = k_m t + \ln \frac{P_0}{1 - SP_0} \quad (\text{当 } t=0 \text{ 时, } P = P_0) \quad (3)$$

要使 (3) 式成立, 则

$$\frac{P}{1 - SP} > 0, \text{ 即 } 1 - SP > 0$$

所以 $S < 1/P_{\max}$, 即 $0 \leq S < 1/P_{\max}$. 当 $S=0$ 时, 方程 (3) 即变为对数方程.

在 0 至 $1/P_{\max}$ 之间取 S 值, 用计算机进行循环计算, 得到不同 S 值时的相关系数 R , 选择 R 值最佳时的 S 值, 即可确定线粒体代谢的速率常数 k_m .

这个代谢模型的建立, 对进一步研究线粒体体外代谢动力学、代谢机理、能量代谢与机能等方面可能有一定意义.

1 材料和方法

1.1 材料

从武汉集贸市场购得鳊鱼 (*Aristichthys nobilis*) 和鲃鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*), 每尾 1.5kg 左右. 卵巢发育约为 II 期.

1.2 仪器

LKB₂₂₇₇ 生物活性检测系统 (瑞典造), 配有 LKB₂₂₁₉ 外水循环和 LKB₂₂₁₀ 二通道记录仪. 可以同时测定两种线粒体热谱, 选用的实验模式是安瓿法.

1.3 方法

方法与文献 [3] 相同. 取 2g 活体肝, 用生理盐水冲洗除去血液, 剪碎加入分离介质 (蔗糖 $0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-HCl $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.5). 匀浆, 然后以低速 ($3500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10min) 离心 2 次, 弃去沉淀物, 取上清液再离心 ($3500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20min) 3 次. 其上清液以高速离心 ($10000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10min) 2 次. 弃去上清液, 其沉淀为线粒体, 再加分离介质悬浮, 最后定量为 4mL 即得每毫升含 0.5g 肝中提取的线粒体 (上述操作在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$, 无菌条件下进行).

取 1mL 制备好的线粒体悬浮液, 放到 3mL 安瓿测量瓶中, 密封. 另取 1mL 无菌蒸馏水于另一测量瓶中, 作为参比. 实验温度为 $25.0000\pm 0.0001^{\circ}\text{C}$.

2 结果与讨论

对鳊鱼和鲃鱼肝脏线粒体进行测量, 所得的代谢热谱如图 1 和 2 所示.

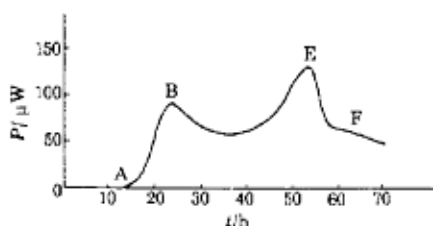


图 1 鳊鱼肝脏线粒体热谱

Fig.1 Thermogram of aristicthys nobilis liver mitochondria

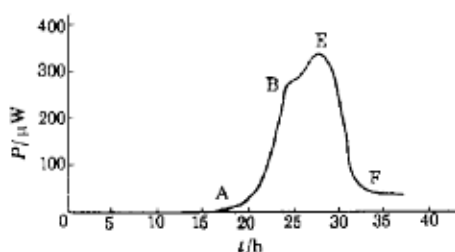


图 2 鲃鱼肝脏线粒体热谱

Fig.2 Thermogram of hypophthalmichthys molitrix liver mitochondria

对此两个热谱中的活性恢复期和衰减期按方程 (3) 用计算机进行循环计算和线性拟合, 所得结果如表 1 和 2 所示.

在量热实验的同时, 我们对线粒体进行了 Janus green B 染色检查. 发现线粒体在整个实验过程中, 处于代谢状态.

在线粒体量热实验中, 所提供的氧气是极其有限的, 安瓿中的环境并不是其代谢的最适条件. 由于其代谢是在限制性条件下进行, 受各种限制条件的影响, 其活性的变化往往是呈“S”型曲线, 而不是指数曲线, 所以我们应按 Logistic 方程建立其代谢过程的热动力学方程, 从而得到线粒体代谢过程的热动力学参数. 此动力学方程的建立, 对我们进一步研究线粒体代谢有重要意义.

我们在实验中, 只给线粒体提供了一定的渗透压、合适 pH 及温度, 所以当线粒体利用完了自身营养物质及测试瓶中氧气后, 就趋于死亡. 如果能改进方法, 选用一种线粒体可利用的物质作介质, 提供充足的氧气, 使线粒体生长更长时间, 就可能对线粒体内氧化代谢、电子传递等进行更深入研究. 特别是可以研究电子传递及氧化磷酸化的阻断剂对线粒体产热的影响, 这将具

有重要理论意义.

表 1 不同 S 值时的 R
Table 1 Correlation coefficient R at different S

Phase of metabolism	Aristichthys nobilis mitochondria		Hypophthalmichthys molitrix mitochondria	
	$10^3 S/\mu W^{-1}$	R	$10^3 S/\mu W^{-1}$	R
Activity recovery phase (AB)	0	0.99203	0.0	0.99451
	8	0.99958	2.0	0.99943
	9	0.99985*	2.1	0.99947*
	10	0.99951	2.2	0.99946
Activity decline phase (EF)	0	-0.99420	0.0	-0.97991
	0.2	-0.99432	2.3	-0.98982
	0.3	-0.99439*	2.4	-0.98988*
	0.4	-0.99428	2.5	-0.98974

* optimum correlation coefficient R

表 2 不同时期的动力学方程和 k_m
Table 2 Kinetic equations and k_m of different phase

Fish	Phase	Kinetic equation	k_m/h^{-1}
Aristichthys nobilis	recovery	$\ln \frac{P}{1-0.009P} = 0.7105t - 9.48$	0.7105
	decline	$\ln \frac{P}{1-0.0093P} = -0.1732t + 14.30$	-0.1732
Hypophthalmichthys molitrix	recovery	$\ln \frac{P}{1-0.0021P} = 0.8066t - 12.87$	0.8066
	decline	$\ln \frac{P}{1-0.0021P} = -0.8231t + 30.87$	-0.8231

参 考 文 献

- 1 李静涵. 线粒体. 北京: 北京大学出版社, 1988, p.169
- 2 崔启武, 刘家冈等. 生物种群增长的营养动力学. 北京: 科学出版社, 1991, pp.75-76
- 3 邓凤姣, 顾 贫, 何毛贤等. 武汉大学学报(自然科学版), 1994(5):123

Thermokinetic Study of Mitochondrial External Metabolism

Liu Yi Xie Changli Qu Songsheng Deng Fengjiao¹ Quo Yu¹

(Department of Chemistry, ¹ School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract The thermograms of mitochondrial metabolism of two kinds of fishes have been determined. From the thermograms, a thermokinetic equation $\ln \frac{P}{1-SP} = k_m \cdot t + \ln \frac{P_0}{1-SP_0}$ could be established for the mitochondrial metabolism. From this equation, the rate constants of activity recovery and activity decline were calculated. This equation is very significant for the study of mitochondrial metabolism.

Keywords: Fish liver mitochondria, Microcalorimetry, Thermokinetics