

汞、铅对非洲鲫鱼肝线粒体 功能影响的初步研究*

刘克强

(中国科学院海洋研究所)

为了研究和探讨重金属毒物对海洋生物的致毒机理及其对生物体内各种生化过程的影响,继镉、铜对非洲鲫鱼肝线粒体功能影响的研究之后,本实验继续以非洲鲫鱼 (*Tilapia mossambica*) 为实验材料,采用氧电极法测定了氯化汞、硝酸铅对鱼肝线粒体(离体)呼吸控制率和氧化磷酸化效率的影响。

一、材料与方法

试验用非洲鲫鱼,在海水中放养14—21天。每次实验用10尾,平均体长10cm左右,试验前停食一天。

1. 线粒体制备^[1,2]: 剥开鱼腹迅速取出肝脏,置于预冷的0—4℃生理盐水和分离介质(含300mM蔗糖,10mM tris-盐酸缓冲液, pH为7.2)中,洗去污血,吸去表面液体。称重后立即剪碎,以每克肝组织加入5—6毫升预冷的上述分离介质,在玻璃匀浆器内匀浆。匀浆液在MSE 18型冷冻离心机上(0—4℃),以2000转/分离心10分钟。上清液再以11000转/分离心10分钟后,沉淀用分离介质洗涤一次。然后用分离介质制成线粒体悬液,保存于0—4℃冰水浴中,备用。

2. 线粒体活性测定: 采用氧电极法^[3]。使用国产CY-2型测氧仪和大型长图平衡记录仪自记系统。鱼肝线粒体活性由呼吸控制率

(RCR)和氧化磷酸化效率(ADP/O)来测定。反应介质含有: 20mM氯化钾; 10mM磷

酸钾缓冲液, pH为7.2; 5mM氯化镁; 225mM蔗糖。反应总体积为二毫升。鱼肝线粒体悬液加入量为100微升(约含线粒体蛋白3毫克左右)。底物琥珀酸钠, pH为7.2。ADP钠盐新鲜配制, pH为7.2。反应温度为30℃。不同浓度的氯化汞、硝酸铅(指最终浓度)和线粒体,共同保温二分钟后开始测定。反应开始时,反应介质氧浓度以237毫微克分子计算。

线粒体反应室用有机玻璃制成,采用密闭系统。鱼肝线粒体蛋白浓度按双缩尿法,用国产XG-125分光光度计在540nm处测定。

3. 化学试剂: 实验所使用的化学试剂均为分析纯,国内产品。ADP钠盐为上海生物化学研究所东风生化试剂厂生产,纯度为80%以上。所用试剂均由重蒸水配制。

二、结果与讨论

正常鱼肝线粒体呼吸控制率和氧化磷酸化效率测定结果如图1。RCR为3.0左右,ADP/O为1.50左右。不同浓度氯化汞和硝酸铅对鱼肝线粒体功能的影响见表1。

从表1可以看出,氯化汞对鱼肝线粒体呼吸控制率和氧化磷酸化效率有较明显的影响: 2.5ppm可以使鱼肝线粒体RCR和ADP/O分别下降36.7%和29.3%左右(图2),氧化磷

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1174号。

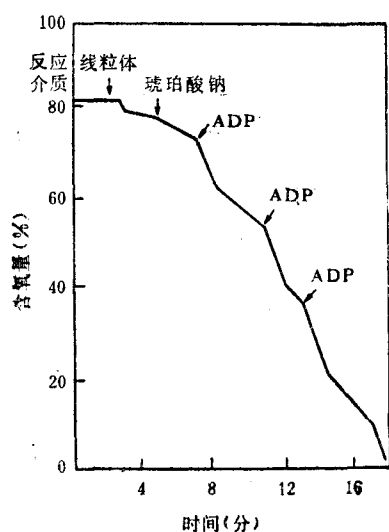


图1 鱼肝线粒体RCR和ADP/O比值的测定

表1 不同氯化汞和硝酸铅对鱼肝线粒体功能的影响

毒物名称	最终浓度 (ppm)	抑制 (%)	
		RCR	ADP/O
氯化汞	2.5	36.7	29.3
	6.25	57.1	51.0
	12.5	100	100
硝酸铅	2.5	无明显抑制	无明显抑制
	6.25	22.1	26.1
	25	28.6	28.4

酸化部分解偶联;在ADP存在的条件下,当氯化汞的浓度为6.25ppm时,可以观察到明显刺激呼吸过程,但磷酸化受到了抑制,氧化磷酸化解偶联;12.5ppm氯化汞,可以观察到线粒体内源底物引起的呼吸及底物琥珀酸的氧化,但加入ADP时则看不到刺激呼吸过程,氧化磷酸化作用完全被抑制(图3)。硝酸铅对鱼肝线粒体功能的影响是轻微的:当硝酸铅的浓度为2.5ppm时,对鱼肝线粒体RCR和ADP/O没有明显影响;6.25ppm硝酸铅使线粒体RCR和ADP/O分别下降22.1%和26.1%左右;当硝酸铅的浓度为25ppm时,只使鱼肝线粒体RCR和ADP/O分别下降28.6%和28.4%左右,氧化磷酸化部分解偶联(图4)。

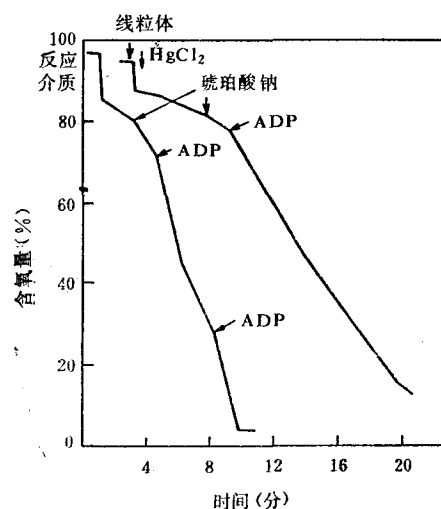


图2 2.5ppm氯化汞对鱼肝线粒体RCR和ADP/O的影响

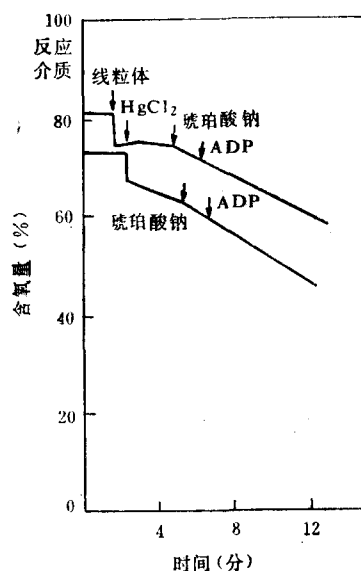


图3 12.5ppm氯化汞对鱼肝线粒体RCR和ADP/O的影响

试验结果表明,氯化汞对鱼肝线粒体功能影响是明显的。受氯化汞的毒性作用,反映鱼肝线粒体功能状态的呼吸控制率和氧化磷酸化效率都在不同程度上有明显下降。随着毒物浓度的增加,对鱼肝线粒体氧化磷酸化抑制作用增强,从部分解偶联到完全解偶联。硝酸铅对鱼肝线粒体功能影响是轻微的,但是也能导致轻微的破坏作用。线粒体是重要的细胞器,主要通过其氧化磷酸化作用,形成生命活动的重

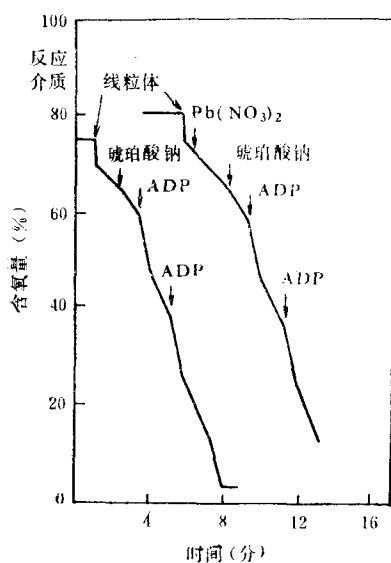


图4 25ppm硝酸铅对鱼肝线粒体
RCR和ADP/O的影响

要物质 ATP, 以供给细胞进行各种活动的能量。如, 主动运转机制、酶反应、肌肉收缩、神经活动、物质的吸收和合成等。由于汞、铅

对氧化磷酸化的抑制作用, 影响ATP的合成, 从而干扰和影响细胞的能量代谢和各种活动, 导致生物机体代谢障碍。

重金属汞、铅对鱼肝线粒体的毒性作用, 可能是由于 Hg^{++} 和 Pb^{++} 与线粒体酶系中的一SH结合并使之失去活性, 从而使氧化磷酸化作用受到破坏。

主要参考文献

- (1) 施奠族、吴厚余、朱谨钊, 1981。有机锡对海洋附着生物的防污机理研究 1. 三苯基氯化锡对藤壶线粒体的影响。海洋与湖沼12(5):422—426。
- (2) 伍钦荣等, 1962。氧化磷酸化作用的研究 1. 2,4-二硝基苯酚对琥珀酸氧化的激活和抑制。生物化学与生物物理学报2:276—285。
- (3) Lessler, M. A., & C. P. Brierley, 1969. Oxygen electrode measurements in biochemical analysis. Methods of Biochem. Analysis, 17. Interscience Publishers a division of John Wiley and Sons, New York. London. Sydney. Toronto. pp. 1—27.

THE EFFECT OF MERCURIC CHLORIDE AND LEAD NITRATE ON THE FUNCTION OF LIVER MITOCHONDRIA OF *TILAPIA MOSSAMBICA*

Liu Keqiang

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

Abstract

Mercuric chloride and lead nitrate were used separately at different concentrations as toxic agent on the liver mitochondria of *Tilapia mossambica* in vitro. The degree of coupling of oxidative phosphorylation-respiratory control and ADP/O ratios of the liver mitochondria were examined by oxygen electrode measurements.

In cases where sodium succinate was used as substrate, owing to inhibition of 2.5 ppm mercuric chloride on liver mitochondria, RCR and ADP/O ratios decreased markedly.