

绿豆子叶线粒体发育过程中腺苷酸的变化及其对细胞能量代谢的影响

刘存德 沈全光 阎田

(中国科学院植物研究所,北京100044)

摘 要

本文研究了绿豆子叶线粒体发育过程中腺苷酸能荷 (AEC) 的变化及其和细胞能量状态的关系。观察到吸胀 2 小时的绿豆子叶线粒体发育不完全,吸胀 12 小时线粒体内膜出现明显的内嵴。随着线粒体完整性的增加, H^+ -ATPase 的活性明显增大,细胞的 ATP 水平也明显提高, AMP 水平下降, AEC 值剧增,但此时线粒体本身的腺苷酸水平及 AEC 值变化不大。经 $1 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ 和 $5 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ DNP 处理的子叶,细胞中 ATP 含量大大降低, AMP 增多, AEC 随之下降,而线粒体的腺苷酸及 AEC 仍然保持恒定,腺苷酸激酶 (AK) 的活性不但 不受 DNP 的抑制,反比对照增加约 50%。线粒体能量状态的维持可能受 AK 的调节。

关键词 线粒体;发育; H^+ -ATPase; 腺苷酸;腺苷酸能荷 (AEC); 腺苷酸激酶 (AK)

细胞在呼吸时由葡萄糖降解释放出的能量除一部份以热量形式耗散外,其余能量的 91% 通过线粒体转变成 ATP, 并输送到线粒体以外,供细胞生活需要。线粒体的能量转换, 运输及其对细胞能量状况的调节是生物力能学研究所关心的问题^[10]。我们在前文中曾报告了种子吸胀到一定程度,腺苷酸能荷值 (AEC) 高于 0.5 时种子才能萌发^[2]。我们还观察到,随着种子的吸胀,子叶细胞中的线粒体不断完整,线粒体的功能也逐渐显现出来^[3]。由此推想在种子吸水的过程中能荷的上升可能由线粒体的能量状态来调节。本文旨在探索线粒体发育过程中能量状态的变化及其和细胞能量代谢的关系。

材 料 和 方 法

以去皮的绿豆子叶为材料,在 25°C 中定量供水进行吸胀。吸胀时间依实验设计要求而定。

(一) 线粒体发育的电镜观察

将吸胀 2 和 12 小时的绿豆子叶用 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液 (pH7.2) 固定 32 小时,然后用 2% 四氧化锇固定 6 小时,脱水后包埋于 EPON812 环氧树脂中,在 45°C 和 60°C 下聚合 48 小时,用 LKB 超薄切片机切片。以乙酸双氧铀和柠檬酸铝双重染色。在 JEM-100CX 电子显微镜下观察,并拍照。

(二) 线粒体 H^+ -ATPase 转能活性的测定

线粒体制备与前文相同^[3]。酶反应介质为: 0.3mol/l 甘露醇、10m mol/l KH_2PO_4 、10m mol/l KCl、5m mol/l $MgCl_2$ 、10m mol/l Tris、pH7.2。底物用 NADH 和苹果酸,其最终浓度分别为 1m mol/l 和 10m mol/l, 磷酸化受体 (ADP) 用 2.5×10^{-7} mol/l, 反应用 0.1ml 线粒体起动,在 25℃ 反应 1 分钟,然后用荧光素-荧光素酶法测定 ATP 的生成量作为 H^+ -ATPase 转能活性的定量。活性以每分钟每 1mg 线粒体蛋白转化 ADP 为 ATP 的量来计算。以在反应介质中含有浓度为 1×10^{-4} mol/l DNP 为对照,以减除本底。

(三) 子叶及其线粒体中腺苷酸组分的制备及测定

取不同吸胀时间的子叶 0.2g,按前文报道的方法进行腺苷酸组分的提取^[1]。制备液应用荧光素-荧光素酶法在发光仪上进行 ATP 含量的测定,ADP 和 AMP 分别用 PK 和 PK 加 MK 使之转化成 ATP 后测定,按 Atkinson(1977) 公式计算腺苷酸能荷值。

线粒体腺苷酸制备: 由 2.5g 去皮绿豆子叶获得的线粒体,加入 5ml 磷酸缓冲液 (pH7.2), 加热至 100℃, 提取 5 分钟后,在 10000g 离心 10 分钟,上清液用作腺苷酸库不同组分的分析。

(四) 解联剂 (DNP) 处理

将去皮子叶直接置于 1×10^{-4} mol/l 或 5×10^{-4} mol/l DNP 中吸胀 24 小时,以不含 DNP 的蒸馏水为对照,在提取腺苷酸或制备线粒体之前先将子叶表面的 DNP 洗去。

(五) 线粒体中腺苷酸激酶 (E.C.2.7.4.3) (以下简称 AK) 活性测定

取分离的洗涤线粒体 0.1ml 加 Tritonx-100 处理去掉外膜。参照 Birkenhead 等^[7] (1982)的方法,在反应介质中含 100m mol/l HEPES-KOH 缓冲液(pH7.2), 0.3m mol/l NADH, 20m mol/l $MgCl_2$, 0.6m mol/l PEP, 10 单位的丙酮酸激酶 (sigma), 14 单位乳酸脱氢酶 (sigma), 0.5m mol/l AMP 和 0.5m mol/l ATP, 酶活性通过加入 AMP 前后活性之差计算,以加入 AK 的专一抑制剂 [p, p-di (adenosine-5) Pentaphosphate] 为对照,用岛津 UV-3000 分光光度计在 340nm 测吸收值的下降。酶活单位以每变化 0.1 OD. 所需时间的分之一,再乘 100 来确定。

(六) 线粒体蛋白质含量

用 Bradford^[5] (1976) 法测定,用牛血清蛋白作标准曲线。

结果和讨论

(一) 线粒体发育的电镜观察

吸胀 2 小时的绿豆子叶,线粒体内膜上未见内嵴出现,在衬质中只有一些电子密度较高的颗粒(图 1,A)。吸胀 12 小时的子叶线粒体内膜上有明显的内嵴出现(图 1B)。将两种不同吸胀时间的子叶线粒体同样放在电子显微镜(50000 倍)下观察,发现吸胀 12 小时的子叶,其线粒体明显大于吸胀 2 小时的。可见线粒体的发育不仅包含内膜结构的完善化,还包括线粒体体积的膨大。

(二) 线粒体 H^+ -ATPase 的转能活性

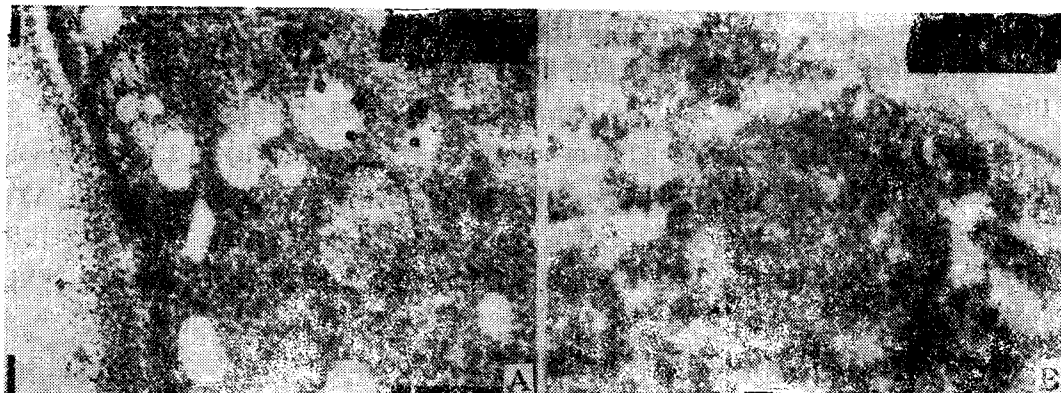


图1 吸胀不同时间的绿豆子叶线粒体的发育。×40000

A. 吸胀2小时 B. 吸胀12小时

Fig. 1 Mitochondrial development of mung bean cotyledon during different imbibing time. × 40000

A. Imbibed in water for 2 hours B. Imbibed in water for 12 hours

由图2可见,发育程度不同的线粒体 H⁺-ATPase 转能活性差异甚大,吸胀2小时的

子叶线粒体其 H⁺-ATPase 的转能活性比吸胀24小时的降低近1倍,无论以 NADH 或苹果酸作为底物其趋势均如此。值得注意的是以 NADH 为底物时其转能活性远高于苹果酸。这和我们¹³用氧电极测 P/D 的情况不同。

(三) 绿豆子叶吸胀过程中腺苷酸及能量状态的变化

从表1可见,在子叶吸胀过程中,三种腺苷酸有不同的变化。其中 ATP 含量上升较快,吸胀15小时为吸胀2小时的1.8倍;吸胀24小时为2小时的2.6倍;ADP的含量,吸胀15小时和24小时分别为2小时的1.49倍和1.43倍。相反,AMP的含量随着吸胀程度增加而大大降低,吸胀15小时比2小时降低29%,24小时比2小时降71%。AEC值随吸胀程度而增加,24小时为2小时的2倍,而腺苷酸库的容量在7—19%之间变动,这比ATP和AMP的变化幅度小得多。联系到上述 H⁺-ATPase 活性的变化(图2),可以认为,能荷上升是由于线粒体 ATP 合成能力的增加和 AMP 含量下降引起的。由此看来,在子

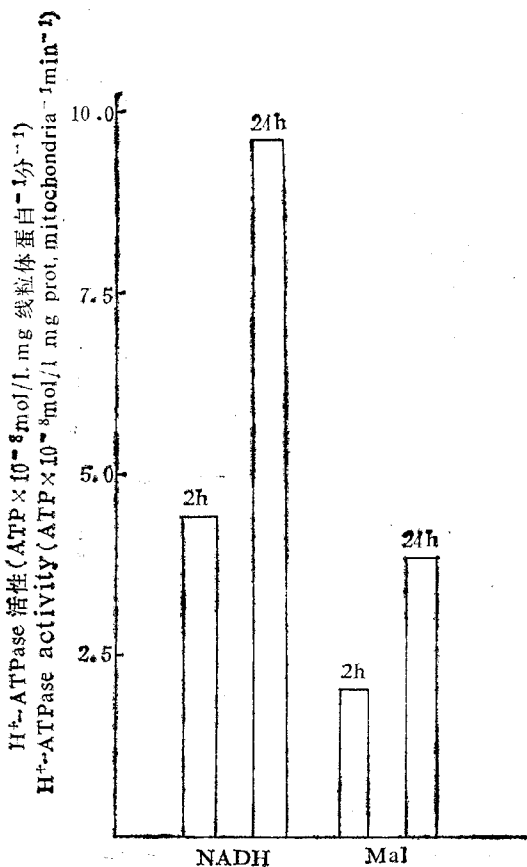


图2 线粒体发育过程中 H⁺-ATPase 的活性

Fig. 2 Activity of H⁺-ATPase at two phases of mitochondrial development

表 1 不同吸胀度的子叶腺苷酸及 AEC 的变化

Table 1. Changes of the adenosine nucleotide and the AEC in mung bean cotyledons with the different degree of imbibition

吸胀(小时) Imbibition (h)	ATP ADP AMP ($\times 10^{-9}$ mol/g 鲜重子叶) ($\times 10^{-9}$ mol/g · fr. wt. cotyleden)			Σ ANd	AEC
2	68	172	280	520	0.30
15	124	256	200	580	0.43
24	174	246	60	480	0.62

叶吸胀过程中,由于线粒体内膜逐渐完整化,线粒体转能活性提高,可能是组织中 AEC 上升的主要原因。

(四) 不同吸胀度子叶的线粒体能量状态的变化

表 2 的资料表明,由不同吸胀度的子叶制备的线粒体,ATP 增长比较缓慢,吸胀 15

表 2 不同吸胀度的子叶其线粒体腺苷酸及 AEC 变化

Table 2. Changes of the adenosine nucleotide and the AEC in mitochondria during the imbibition of cotyledons in different degrees

吸胀(小时) Imbibition (h)	ATP ADP AMP ($\times 10^{-11}$ mol/mg 蛋白线粒体) ($\times 10^{-11}$ mol/mg · prot · mit ochondria)			Σ ANd	AEC
2	0.120	0.390	0.450	0.960	0.33
15	0.195	0.255	0.420	0.870	0.37
24	0.150	0.330	0.120	0.600	0.53

小时的比 2 小时的高 1.6 倍,24 小时只比 2 小时高 1.25 倍;而 AMP 降低仍很剧烈,吸胀 24 小时的子叶线粒体的 AMP 比 2 小时的低 73.3%;能荷增加缓慢,这和完整细胞相比要低得多。吸胀 24 小时的子叶线粒体的 AEC 仅 0.53。

(五) DNP 对子叶及其线粒体能量状态的影响

用 1×10^{-4} mol/l 和 5×10^{-4} mol/l DNP 浸泡绿豆子叶 24 小时,测定三种腺苷酸含量的变化(表 3)表明,经 1×10^{-4} mol/l DNP 处理后,子叶的 ATP 含量比对照下降

表 3 DNP 对子叶腺苷酸及 AEC 的影响(24 小时)

Table 3. Effect of DNP on the adenosine nucleotide and AEC of cotyledons

处理 Treatment	ATP ADP AMP ($\times 10^{-9}$ mol/g 鲜重子叶) ($\times 10^{-9}$ mol/g fr · wt cotyleden)			Σ ANd	AEC
CK	174	246	60	480	0.62
DNP1 $\times 10^{-4}$ mol/l	138	152	220	510	0.42
DNP5 $\times 10^{-4}$ mol/l	14	76	300	390	0.13

20.7%, 5×10^{-4} mol/l 处理下降 92.0%;此时 ADP 分别降低 38.2% 和 69.9%;而 AMP 却分别上升 3.7 倍和 5.0 倍。相应的 AEC 大幅度下降。这一结果表明,DNP 使转能活性明显下降,其程度随 DNP 浓度增加而加剧。

用同样浓度 DNP 浸泡的子叶制备的线粒体,ATP 没有明显下降,AMP 也无明

表 4 DNP 对线粒体腺苷酸及 AEC 的影响

Table 4 Effect of DNP on adenylates and AEC of mitochondria

处理 Treatment	ATP ($\times 10^{-11}$ mol/mg 蛋白·线粒体) ($\times 10^{-11}$ mol/mg prot. mitochondria)	ADP	AMP	Σ ANd	AEC
CK	0.282	1.482	0.354	2.118	0.48
DNP 1×10^{-4} mol/l	0.264	1.059	0.260	1.587	0.50
DNP 5×10^{-4} mol/l	0.300	0.846	0.441	1.587	0.40

显增加, AEC 保持比较稳定的状态(表 4), 其值均未超过 0.50。

(六) AK 的活性

此酶又称肌激酶 (MK), 它在二价镁离子存在下催化 $2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$ 的反应。

Birkenhead^[7](1982) 的报告指出, 该酶在大麦和小麦的叶绿体中占 40—50%, 在菠菜叶绿体中占 50—70%。在非绿色细胞中主要存在于线粒体中, 位于线粒体内外膜之间。从表 5 可见, 吸胀 24 小时的子叶线粒体 AK 的活性很高, 经 DNP 处理后活性不但受影响, 反而有明显的增加。以对照为 100, 用 1×10^{-4} mol/l DNP 处理的子叶线粒体为 157, 而 5×10^{-4} mol/l DNP 处理者为 122。

表 5 DNP 对 AK 活性的影响(吸胀 24 小时)

Table 5 Effect of DNP on the activity of mitochondrial adenylate kinase (imbibed for 24h)

处理 Treatment	活性($\text{U} \times \text{分}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 线粒体蛋白) Activity ($\text{U} \times \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ prot. mitochondria)	对照的百分比 CK percent
CK	233.3	100
DNP 1×10^{-4} mol/l	366.3	157
DNP 5×10^{-4} mol/l	283.5	122

这些结果表明, 子叶吸胀过程中随着线粒体发育程度的增长, 转能活性增加, ATP 含量提高, AMP 显著下降, 细胞的能荷值大大超过吸胀初期线粒体尚不完整的子叶。但是子叶吸胀度的增加并不明显改变线粒体本身的 ATP 含量和 AEC 值, 其趋势和 Sutton 等^[43](1978) 关于鼠肝线粒体发育时腺苷酸变化相似。这可能和线粒体合成的 ATP 向细胞溶质转移有关。Barbour 等^[6](1981) 报道, ATP-ADP 在细胞质和线粒体之间的交换受线粒体和细胞质中能量状态的影响。根据 Atkinson^[4](1977) 的观点: 组织中 AEC 值高于 0.5 时 ATP 利用占优势, 低于 0.5 时 ATP 合成占优势。推论, 线粒体能荷值保持较低水平有利于线粒体 ATPase 转能活性的维持。本研究结果还指出, 当用 DNP 处理子叶时, 对于完整细胞说来, ATP 水平和 AEC 值都大大下降, 而 AMP 明显上升, 这无疑是由于线粒体 ATPase 转能活性降低引起的。经 DNP 处理后的子叶, 其线粒体 AK 不受影响, 腺苷酸水平及 AEC 值均保持相对稳定。Rüdiger 等^[11](1982) 及 Stitt 等^[12](1982) 指出, AK 有调节小麦叶片中叶绿体, 细胞溶质和线粒体间腺苷酸分配的作用。Pradet^[9](1983) 等认为 AK 有维持细胞中三种腺苷酸平衡的作用^[9]。由此我们推论, 在解偶联剂 DNP 作用下, 虽然线粒体转能过程受抑制, 而线粒体能量状态却保持稳定, 可能

是 AK 的调节作用的结果。

参 考 文 献

- [1] 刘存德、沈全光、张家远、阎田, 1982: 植物组织中 ATP、ADP、AMP 量的测定及能荷指标。植物生理学通讯, (5): 26—31。
- [2] 沈全光、刘存德、张家远、阎田、阎隆飞、汤佩松, 1982: 腺苷酸库及能荷变化与白菜种子萌发的关系。植物学报, 24: 531—539。
- [3] 沈全光、刘存德、李守全、阎田、阎隆飞、汤佩松, 1985: 绿豆子叶吸胀过程中线粒体发育的研究。植物学报, 27: 882—489。
- [4] Atkinson, D. E., 1977: The adenylate energy charge in intact cells. In "Cellular Energy Metabolism and Its Regulation" (D. E. Atkinson ed), Academic Press, New York, pp. 201—245.
- [5] Bradford, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.*, 72: 248—254.
- [6] Barbour, R. L. and S. H. P. Chan, 1981: Characterization of the kinetics and mechanism of the mitochondrial ADP-ATP carrier. *J. B. C.*, 256: 1940—1948.
- [7] Birkenhead, K., D. Walker, and C. Foyer, 1982: The intracellular distribution of adenylate kinase in the leaves of spinach, wheat and barley. *Planta*, 156: 171—175.
- [8] Morohashi, Y., J. D. Bewley and E. C. Yeung, 1981: Biogenesis of mitochondria in imbibed peanut cotyledons II. Development of light and heavy mitochondria *Plant Physiol.*, 86: 318—323.
- [9] Predet, A. and P. Raymond, 1983: Adenine nucleotide ration and adenylate energy charge in energy metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34: 199—223.
- [10] Racher, E., 1976: A New Look at Mechanisms in Bioenergetics. Academic Press, New York, London, pp. 2—3.
- [11] Rüdiger, H., M. Goller, and H. Ziegler, 1982: Adenylate levels, energy charge, and phosphorylation potential during dark-light and light-dark transition in chloroplasts, mitochondria, and cytosol of mesophyll protoplasts from *Avena sativa* L. *Plant Physiol.*, 69: 448—455.
- [12] Stitt, M., R. McC. Lilley, and H. W. Heldt, 1982: Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts and mitochondria of wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol.*, 70: 971—977.
- [13] Sutton, R. and J. K. Pollak, 1978: The increasing adenine nucleotide concentration and the maturation of rat liver mitochondria during neonatal development. *Differentiation*, 12: 15—21.

CHANGES OF ADENINE NUCLEOTIDE IN THE COURSE OF MITOCHONDRIAL DEVELOPMENT OF MUNG BEAN COTYLEDON AND THEIR EFFECT ON CELLULAR ENERGY STATUS

Liu Cun-de, Shen Quan-guang and Yan Tian

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044*)

Abstract

The changes of adenine nucleotide and adenylate energy charge (AEC) during the development of mitochondria in imbibed mung bean cotyledons and the relationship between these changes and cellular energy status were studied. After cotyledons were imbibed in water for two hours, mitochondrial cristae were not observed, but for 12 hours, they appeared obviously on the inner membrane. With the structural integrity of the mitochondria, the functional mitochondria were gradually shown. For instance, the activity of H^+ -ATPase of cotyledons imbibed for 24 hours was about twice higher than that of 2 hours. The ATP content and the AEC value in the cotyledons imbibed for 24 hours increased sharply and the AMP decreased, but these were not observed in the mitochondria of the cotyledons imbibed either for 24 hours or 2 hours. When the cotyledons were imbibed in 1×10^{-4} mol/l or 5×10^{-4} mol/l DNP solution for 24 hours, the ATP and the AEC in the cells exhibited a rapid decrease, but in the mitochondria they remained constant. In the same DNP solution with cotyledons for 24 hours, the activity of mitochondrial adenylate kinase (AK) not only was not decreased but also increased by about 50% over the control. This result shows that the energy equilibration in the mitochondria seems likely to be regulated by adenylate kinase locating between inner and out membranes of the mitochondria.

Key words Mitochondrial development; H^+ -ATPase; Adenine nucleotide; Adenylate energy charge; Adenylate kinase