

医学科学学术会议资料

第五届国际生物化学会议

专题讨论

細胞内呼吸：磷酸化与非磷酸化反应

1962

中国医学科学院科学情报研究室

第五屆國際生物化學會議

專 題 討 論

細胞內呼吸：磷酸化與非磷酸化反應

1951年8月10—16日於莫斯科

譯 者

黃俊華 張馥華

吳鍾浩 陳月明

(中國醫學科學院對外聯絡室)

校 者

黎璧瑩

(中國醫學科學院科學情報研究室)

第五屆國際生物化學會議

專題討論

細胞內呼吸：磷酸化與非磷酸化反應

目 錄

1. 氧化磷酸化再造系統.....	(1)
2. 完整細胞中呼吸成份的反應.....	(9)
3. 細胞色素氧化酶.....	(15)
4. 脊椎動物各個進化階段腦內的氧化磷酸化作用.....	(31)
5. 論氧化作用與磷酸化作用偶聯的調節作用.....	(39)
6. 呼吸鏈中 DPN-H 脫氫酶的分离和特性.....	(50)
7. 結晶型細胞色素 b_2 (酵母的乳酸脫氫酶) 中黃素和正鐵血紅素的相互作用.....	(61)
8. 心臟細胞成份中可溶性 DPN-H 脫氫酶的比較.....	(71)
9. 氧化磷酸化作用被硝基苯酚解離的機制.....	(86)
10. 硫基與氧化磷酸化反應和二硝基苯酚解離作用的关系.....	(111)
11. 維生素 K-還原酶的特性及其在細呼吸中可能發生的作用.....	(117)
12. 磷酸化作用與電子傳遞偶聯時的中間酶促因素.....	(122)
13. 氧化磷酸化過程中的中間產物的性質.....	(136)
14. 應用快速反應分光光度測定法對硫辛酸脫氫酶反應機制的研究.....	(145)
15. 維生素 K_1 酶促還原時所生成的中間產物在氧化磷酸化中可能呈現的作用.....	(158)
16. 生物氧化中的吡啶核苷酸.....	(172)
17. 對 Убихинон (Ubiquinone 輔酶 Q) 在電子傳遞和氧化磷酸化作用中可能呈現的功能的研究.....	(179)
18. 呼吸鏈的成份與 ATP、ADP 磷酸鹽和解離劑相互作用的直接分光光度測定.....	(193)
19. 線粒體內與 ATP 有关的氧化還原反應.....	(226)
20. 氧化磷酸化作用的解離劑和特異抑制劑的作用機制.....	(240)
21. 電子傳遞和電子傳遞鏈各個部份的磷酸化在調節線粒體膨脹上的作用.....	(246)

氧化磷酸化再造系統

E. Racker, M. E. Pullman, H. S. Penefsky,
M. Silverman

美国紐約市公共卫生研究所

用机械方法破坏的綫粒体可分成一个微粒部分和两个可溶蛋白质成分，所有这三个部分都是氧化磷酸化作用所必須的。磷酸化作用与被微粒部分催化的呼吸发生偶联时必須有。其中一种可溶成分催化被二硝基苯酚激活的三磷酸腺苷的水解。

本文对氧化磷酸化再造系統的三个成分的特性作了描述。

用机械方法将中心綫粒体搗碎，随后在 26000g 下进行远心分离，便可得到一种不含綫粒体的上清液制品。該制品能催化氧化磷酸化作用，在 105000g 下远心分离，可以分成两个氧化磷酸化所必需的成分：微粒部分（沉淀物 I），它可以催化沒有磷酸化的氧化作用，和磷酸化所必須的可溶成分（偶联因子 I）。随后沉淀物 I 经过超声波处理还可以分成微粒部分（沉淀物 II）和可溶成分（偶联因子 II）。沉淀物 II 催化氧化作用，而两个可溶性偶联因子却是磷酸化作用所需要的物质。

本文的目的是把氧化磷酸化各个成分的特性(1—4)和我們實驗室最近得到的某些結果加以綜述。

沉 淀 物 I

作用物的特異性 沉淀物 I 是一种紅褐色胶样沉淀物，它催化琥珀酸盐、 β -羟基丁酸和异檸檬酸盐的氧化，但如果沒有偶联因子 I，这些过程不能与磷酸化作用偶合。假如不加入谷氨酸脫氢酶，谷氨酸盐就不能被微粒氧化。异檸檬酸盐是唯一的与吡啶核苷酸結合的基质，在沒加入抑制呼吸的 DPN 时，亦能被氧化。另一方面，加入的

DPN 可以促进异柠檬酸盐的氧化,但是,即使有偶联因子存在,也不会同时发生磷酸化作用。与再生 DPN-H 的氧化相反(例如:有 β -羟基丁酸或谷氨酸盐和谷氨酸脱氢酶存在时),加入的 DPN-H 迅速氧化,但不伴随有磷酸化作用。抗坏血酸盐不被完整的线粒体氧化,也不为沉淀物 I 氧化。但是,当有催化量的外加细胞色素 C 存在时,抗坏血酸盐很容易被沉淀物 I 氧化。但此时并没有磷酸化作用发生。其他一些作用物,如 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、苹果酸盐和脯氨酸,即使有 DPN 和偶联因子 I 存在,也不被沉淀物 I 所氧化。

收得率与稳定性 从 300 毫克线粒体(蛋白质)中通常可以获得 40—60 毫克沉淀物 I 的蛋白质。沉淀物 I 在 -20°C 下至少可以保存四周。将偶联因子 I 加到这些微粒中,使 P:O 比值随着微粒制品储藏时间的增加而逐渐降低。反复冷冻和解冻能加速活性的降低。但是,在冷冻状态下保存了数月的牛心线粒体中,可以获得活性非常高的沉淀物 I 制品。在新鲜的沉淀物 I 制品中,通常呈现某些残留的磷酸化作用,但在 -20°C 下保存 24 小时以后,这种磷酸化作用便完全消失或降到最低水平。

抑制物 沉淀物 I 对琥珀酸盐的氧化对抗霉素 A、氰酸钾、叠氮化钠、p-氯汞基苯酸盐和二氢维生素 K₂ 二磷酸盐等化合物敏感。无论有无偶联因子 I、无机磷和接受磷酸盐的体系(己糖磷酸激酶和葡萄糖)存在,氧化作用均不会被破坏。因此它被看成是一个“结合不紧密”的系统(5, 6)。DNP (0.5 微克分子)不影响呼吸。

偶联因子 I

酶的性质 精制的偶联因子 I 制品催化被 DNP 所激发的 ATP 的分解。以前曾经有报告提到,ATP 酶和偶联活性都在同一蛋白质内。经过各种处理以后,如冷藏,加温或透析,两种活性同时被破坏。ATP 末端磷酸盐的特殊水解取决于 Mg^{++} , 并显著地被反应产物-ADP 所抑制。在有丙酮酸磷酸激酶存在时,ADP 同时被磷酸烯醇式丙酮酸再磷酸化,可以妨碍抑制作用的发生。再生 ATP 体系根据不同的测定条件(时间、酶浓度等等),可使 ATP 的水解增加 50—300%。加入 DNP

时, ATP 的水解继续增加60%左右。其他的三磷酸腺苷(ITP, UTP, GTP)能被酶分解,但是 DNP 不能促进这些反应。ADP 抑制 ATP 和 ITP 的水解, IDP 则没有这种抑制作用。使氧化磷酸化作用分开的许多物质能抑制三磷酸腺苷酶的活性,如三碘甲腺氨酸, 双香豆酚, Chlorpromazine, 叠氮化物和二氢维生素 K₁二磷酸盐。使氧化磷酸化作用分开的胆红素(7), 浓度在0.32微克分子时能抑制 ATP 酶的活性。胆红素不是非偶联剂, 也不抑制 ATP 酶。早先研究过的许多物质中(2,3)只有五氯代苯酚和 DNP 能激活酶的活性。其他一些硝基酚衍生物(承蒙 John Taggart 博士慷慨地提供参考), 如表 1 所见, 具有类似的作用, 虽然这种作用不甚明显。叠氮化合物和胍的作用值得特别注意, 因为这些物质在沒有 DNP 时也能很有效地抑制 ATP 的解离。例如, 有这些物质存在时, 二硝基苯酚的促进作用能增高2—3倍。其他一些二价的阳离子, 如 Mn^{++} , Ca^{++} , Co^{++} 或 Fe^{++} , 能代替 Mg^{++} 作酶的激活剂, 但 DNP 能在 Mg^{++} 存在时才有显著的促进作用。

表 1 酚类化合物对 ATP 酶的影响
(对照为 100)

化 合 物	0.01微克分子	0.1 微克分子	1 微克分子
2,4-二硝基苯酚	100	130	165
五氯代苯酚	161 [△]	95	0
邻位硝基苯酚	—	117	119
对位硝基苯酚	—	117	139
2-氨基-4-硝基苯酚	—	113	117
2,4-二硝基-1-萘酚	113	117	76 ^{△△}
2,4-二硝基-6-环基苯酚	96	83	19 ^{△△}
2,4-二硝基-6-联苯酚	104	100	57 ^{△△}

△ 在 0.05 微克分子时测定

△△ 在 0.5 微克分子时测定

收得率与稳定性 从10克牛心线粒体蛋白质中, 可以得到30—60毫克精制的 ATP 酶(特异的酶活性为: 60—70 毫微克分子解离的

ATP/分钟/毫克)。酶在2克分子硫酸铵中呈悬浮状时相当稳定。保存在2°C时,头几天活性一般约降低20%,随后至少在三个星期以内几乎没有什么变化。在有4毫克分子ATP或200毫克分子硫酸铵时,酶溶液在室温下非常稳定。为了在透析时得到充分的保护,必需有ATP或硫酸铵。酶在低温下不稳定,这问题将在下面讨论。

物理性质 对精制的偶联因子I的物理性质进行了研究(与Dr. R. C. Warner合作)。在超速离心机上出现了一个对称峰,电泳时在淀粉部分有一个单一的带。蛋白质的沉降系数为8.67,分子量为284,000。ATP水解的酶变率在30°C时约为20,000,而在氧化磷酸化过程中无机磷酸化作用的酶变率在30°C时大约为2000—4000。在温度超过65°C时,蛋白质很快变性。在有4毫克分子ATP存在时,ATP酶活性和偶联活性不发生热变性(在65°C下两分钟内)。

发面酵母的ATP酶 由发面酵母提纯的ATP酶,其特性与牛心的ATP酶极为相似(8),它可以被DNP及再生ATP系统激变。用离心法在蔗糖梯度中所测出的分子量与牛心酶的分子量相近似。至今尚未能发现酵母酶与心脏线粒体沉淀物I有偶联作用,因为酵母制剂中

表 2 低温对牛心的与酵母的 ATP 酶的抑制
作用和甘油的防护作用

培 育 的 温 度 °C	甘 油 浓 度 %	牛心 ATP 酶	酵母 ATP 酶
		毫克分子解离的 ATP, 分钟/毫克	
2	0	3.5	0
2	5	—	0.13
2	10	26.9	0.73
2	20	54.5	3.5
2	30	54.2	—
2	50	57.2	—
25	0	48.3	3.6

附註: 将酶溶液(约300微克/毫升)培育在表中所列温度中一小时, 然后测定ATP酶的活性。

有解离的因子存在。

对低温的不稳定性 将偶联因子 I 的蛋白质溶液置于冰浴器中，ATP 酶的活性与偶联活性便消失。如表 2 所指出，20% 的甘油能完全防止低温对牛心 ATP 酶和酵母 ATP 酶的抑制作用。甘油的浓度较低时只能起部分的防护作用。20% 的甘油还能防止低温对偶联活性的抑制作用。其他各种基质，包括 ATP 和 Mg^{++} ，没有这种作用。可以被低温抑制的酶，在紫外光中的吸收光谱与活性蛋白质的吸收光谱基本上一致，但是当有 20% 的甘油存在时，发现光谱有些不同。光谱上的这些差别对抑制过程有什么意义还未明了。

沉淀物 II

一般的特性 有两种特性使沉淀物 II 区别于沉淀物 I。沉淀物 II 催化琥珀酸盐与 β -羟基丁酸的氧化不发生磷酸化作用，但是与沉淀物 I 相反，加入偶联因子 I 本身不能使磷酸化作用与氧化过程偶联，而必须要加入第二种可溶蛋白质（偶联因子 II）才能促使这个过程进行。沉淀物 II 的第二个性质是它的不稳定性。在比较短的时间内就可看到它对偶联因子的反应逐渐减弱（表 3）。沉淀物 II，从加入 ATP、谷胱甘肽、 Mg^{++} 、蔗糖和琥珀酸能使它稳定这一点来讲，与 Linnane 和 Titchener(9) 两氏用超声波振动线粒体的方法所获得的亚线粒体微粒相似。悬浮在含有这些稳定剂介质中的沉淀物 II，在有两种可溶因子存在的条件下，至少在 20°C 储存一周以后，仍可维持住 P:O 的比例（见表 3）。

偶联因子 II

偶联因子 II 至今还只能做到部分提纯，这主要是因为测定的条件不足以使结果复制，这是由于沉淀物 II 的变异性取决于偶联因子 II 的原故。从被超声波破坏的沉淀物 I 中获得的可溶性部分，经用 Linnane 和 Titchener 两氏(9)从被超声波破坏的线粒体中提取可溶性偶联蛋白质的方法提纯后具有偶联因子 II 的活性（表 4）。因而很可能，和 Litchener 因子与偶联因子 II 属于同一性质的物质，它

I 不同的, 是沒有 ATP 酶的活性。

表 3 有稳定作用的混合物对沉淀物 II 的影响

日数	呼 吸 微克原子 O / 分钟 / 毫克蛋白质	磷 的 消 耗 量 微克分子 / 分 / 毫克蛋白质	P:O
实验 I. 在沒有稳定作用混合物的条件下保存沉淀物 II			
0	0.254	0.125	0.49
2	0.253	0.086	0.35
3	0.195	0.047	0.25
4	0.242	0.049	0.20
5	0.229	0.029	0.13
8	0.210	0.020	0.10
实验 II. 加入了稳定作用混合物的条件下保存沉淀物 II			
0	0.306	0.125	0.40
2	0.273	0.123	0.46
7	0.250	0.114	0.46

表 4 偶联因子 I、II 对与沉淀物 II 起氧化磷酸化作用的影响

用经过超声波处理后未曾提純的沉淀物 I 提取物作为分离偶联因子 II 的原始材料。用 Linnane 和 Titchener 氏的方法 (a) 通过精脲阶段进行提純。为此大約需要 200—300 微克的純因子。偶联因子 I 的用量較多 (120 微克)。

加 入 的 物 质	P: O
沒有加入任何物质	0
因子 I	0.06
因子 II (未經提純的)	0.09
因子 I + 因子 II (未經提純的)	0.66
因子 I + 因子 II (純的)	0.64

再造系統——氧化磷酸化作用与各种代謝反应

前面提到的牛心线粒体亚线粒体微粒只有在加入相应的可溶性因子时，才能催化氧化磷酸化作用。虽然已經确定，与 DPN 結合的作用物的氧化，与琥珀酸盐的氧化一样，能提高磷酸化作用，但是應該指出，无论采用那种作用物 $P:O$ 值均不超过 0.9。由于用琥珀酸盐时，于完整线粒体的 $P:O$ 值接近 2，用与 DPN 結合的作用物时 $P:O$ 接近 3，因而，可能在机械破坏线粒体后，呼吸鏈上的磷酸化作用只有一段保持完整。現有的材料指出，这一段位于細胞色素 b 和 c 之間，因为用細胞色素 C 作为电子的最終受体时，与琥珀酸盐氧化作用偶联的磷酸化，至少为用氧作受体时所得数值的 75%。

Golpa-Boonstra 和 Slater(10)指出，还原型甲萘醌(維生素 K_2)的氧化作用是与线粒体内的磷酸化作用偶联的。在再造系統方面(沉淀物 I 和偶联因子 I)也进行了类似的观察。还原型甲萘醌的氧化，与所有其他作用物一样，依赖于因子 I。想发现对苯二酚磷酸盐参与这一反应的尝试至今尚未成功。

再造系統及其各个成分是研究局部反应和交换反应最方便的对象。已經确定，无机 P^{32} -ATP 的交换取决于沉淀物 II 和整个可溶部分的存在。分析 C^{14} -ADP-ATP 的交换比較困难，因为微粒中有腺苷盐激酶，但是，精制的偶联因子 I 既沒有 C^{14} -ADP-ATP 的交换，也沒有 $H_2^{18}O$ -磷酸盐的交换。但是應該指出，用精制的 ATP 酶未能发现 ADP-ATP 的交换反应，并不能否定有中間的 P-酶存在。在另一篇文章(11)中詳細地論述了 ATP 迅速被精制的偶联因子 I 水解；在很大程度上，是由于分离过程中蛋白质变性造成。因此，与线粒体結構結合在一起的偶联因子，其特性与溶液中酶的特性不同，这是完全可能的。根据这个观点，曾研究了在各种条件下 ADP-ATP 交换反应的催化問題。非常有意思的，是线粒体中有一种蛋白质，它几乎完全抑制三磷酸腺苷酶的活性，但不破坏氧化磷酸化作用。有关該抑制剂的詳細材料将在另一篇文章(12)中討論。

由于在沉淀物中发现有明显的 ATP 酶的活性，因而对沉淀物 I

在不加入偶联因子 I 时不能使磷酸化作用与氧化作用偶合的說法，似乎难以理解。曾經估計过，可能出現沒有偶联因子活性的第二种 ATP 酶的活性。但是，进一步将沉淀物 I 捣碎和提純可溶部分，得到的制品既具有 ATP 酶的活性，又具有与偶联因子 I 活性相应的活性。因此，比較可能的是，偶联因子可能与微粒相結合，而結合的方式可能妨碍它参与細胞色素 b 与 c 之間的磷酸化作用。这种說法很可以用于解釋前面提到的 ATP 水解酶变率与无机磷酸化作用之間存在的矛盾。此外，水解活性完全能被线粒体抑制剂所抑制，但这种抑制作用不影响磷酸化过程。这种发现，以及从前已經討論过的其他一些发现都証实了这种观点：ATP 酶的活性是酶受到损伤的表现。

最后應該說明，把线粒体分成磷酸化所必須的可溶成分和不溶成分，使我們在研究氧化磷酸化作用的机制时又得到了一个有力的工具。

(黃俊华譯 黎璧瑩校)

文 献

1. M. E. Pullman, H. Penefsky, E. Racker. Arch. Biochem. Biophys., 1958, 76, 227.
2. M. E. Pullman, H. S. Penefsky, A. Datta, E. Racker. J. Biol. Chem., 1960, 235, 3322.
3. H. S. Penefsky, M. E. Pullman, A. Datta, E. Racker. J. Biol. Chem., 1960, 235, 3330.
4. M. E. Pullman, H. S. Penefsky, E. Racker. In First IUB/IUBS Joint Symposium, Biological Structure and Function, Stockholm, 1961.
5. F. L. Hoch, F. Lipmann. Proc. Nat. Acad. Sci., 1954, 40, 909.
6. L. F. Remmert, A. L. Lehninger. Proc. Nat. Acad. Sci., 1959, 45, 1.
7. R. Zetterström, L. Ernster. Nature, 1956, 178, 1335.
8. E. Racker, Jr. W. E. Pricer. Неопубликованные данные.
9. A. W. Linnane, E. B. Titchener. Biochim. et Biophys. Acta, 1960, 39, 469.
10. J. P. Colpa-Boonstra, E. C. Slater. Biochim. et Biophys. Acta, 1958, 27, 122.
11. A. Racker. Advances in Enzymology. В печати.
12. M. E. Pullman, E. R. Garber. Proc. Intern. Congr. Biochem. (Moscow). В печати.

完整細胞中呼吸成分的反应

B. Hess

德意志联邦共和国, 海德堡大学, 医学院化学实验室

艾氏腹水癌細胞的呼吸成分能被加入的葡萄糖激活。这个化合物对氧化磷酸化作用的影响不是直接的, 而是通过葡萄糖磷酸化时放出的 ADP 发生影响的。有一碘醋酸盐存在时也可以看到葡萄糖的作用。除葡萄糖外, 利用 2-脱氧葡萄糖也可以得到同样的结果。经过一定时间以后, 即相当于 ATP 一个周期以后, 呼吸速度和葡萄糖的消耗速度显著减慢。这种速度的减慢对解离因子敏感, 但对一碘醋酸盐不敏感。2-脱氧葡萄糖也可以使速度减慢。有些重要的材料证明, 葡萄糖消耗速度减慢是由于线粒体内 ATP 的贮藏量有限所致。由此, 调节 ATP 水平与线粒体的代谢状态有关的可逆连系, 其化学机制(由 ADP 控制的氧化磷酸化作用)限制了細胞对葡萄糖的消耗。

琥珀酸盐在艾氏腹水癌細胞的各种呼吸反应中, 可以作为这些細胞的吡啶核苷酸的还原剂。加入琥珀酸盐时, 耗氧速度稍加快, 而 ATP/ADP 的总比值下降。DPN 的还原作用对线粒体的衰老, 解离因子, 巴比土酸盐和丙二酸盐敏感。可以认为, 线粒体内 ATP-ADP 的比值高, 保证了还原的等价物通过还原脱磷酸作用(与氧化磷酸化作用相反的过程)传递给吡啶核苷酸。这种电子的保存方法具有重要的生理学意义, 对同化的組織特别有意义。它再一次显示了細胞代謝具有高能效果。

这里所描述的各种呼吸反应, 除了已知的巴斯德和 Crabtree 氏效应以外, 还揭示了細胞代謝中間产物之間存在着严格被控制的相互作用。这种相互作用的机制, 可利用細胞浆内和参与呼吸鏈的化合物的反应加以测定。

从大量不同組織中分离出来的线粒体, 其呼吸鏈的成分能与多种

化学的化合物起反应，如作用物、腺核苷酸、磷酸盐、醌、解离因子及各种抑制剂。这些物质对呼吸速度的影响是通过它们的化学反应性及调节速度的能力进行研究的（本问题的引证材料请看[1]）。要了解细胞的动力学就应该阐明，这些物质中那些可以作为调节速度的中间物质而具有生理学的作用。因此必须研究完整细胞内呼吸酶的反应。我们在本文中介绍了一些研究工作的总结，作为这一类工作的结果。这些工作研究了化合物是怎样直接或间接地影响细胞的呼吸成分。这些化合物是葡萄糖、2 脱氧-D-葡萄糖和琥珀酸盐。

艾氏腹水癌细胞是最适合作这类研究的材料，因为它们生物学上较为稳定，其成分也比较均一。关于这些细胞的分离已有报导[2]。我们实验室和其他一些实验室[2—6]也曾发表过一些文章，讨论了这类细胞的酶的成分及一般的代谢。在我们的实验中，直接用分光光度测定法[7]、荧光测定法[8,9]和电流分析法[10]进行连续记录，以观察完整细胞内呼吸成分的快速反应。此外，还利用化学分析研究了中间产物变化的动力学[11]。

研究艾氏腹水癌细胞对加入葡萄糖的代谢反应时，我们发现代谢由内无状态转变为葡萄糖所诱导的状态。过渡时间约持续40秒。起初氧和葡萄糖消耗得很快，随后过渡接近结束时，葡萄糖的消耗和呼吸速度显著地受到抑制[12—14]。

加入葡萄糖后，在这个过渡状态期间所发生的代谢顺序，是从已糖磷酸激酶反应被激活开始的，6 磷酸葡萄糖与 ADP 的形成和葡萄糖与 ATP 的消失就是证明[11]。其时 6 磷酸葡萄糖沿着糖代谢的不同支路继续转变，而 ADP，由于它的平衡浓度增高，很快地便激活呼吸链上的电子，在一定区域上与呼吸链相互作用。利用白金微电极记录氧消耗量急剧增长，就可以观察这种相互作用的总效应。

为了进一步证明 ATP 是致活物质，曾用葡萄糖的类似物——2 脱氧- α -葡萄糖进行了研究。该物迅速被已糖磷酸激酶磷酸化。根据许多研究者的材料，它以 2 脱氧- α -6 磷酸葡萄糖的形式储积，同时不会进一步进行明显的代谢[15—17]。2 脱氧葡萄糖 (DOG) 与葡萄糖一样，进行磷酸化的同时，可以形成 ADP 的化学计算量，而 ADP 又

能加快呼吸的速度。

在加入醋酸碘的实验中，研究了糖酵解的中间产物与呼吸链的化合物相互作用的可能性。醋酸碘能使 3 磷酸甘油醛脱氢酶失去活性。按照我们的理论可以指出，有一碘醋酸盐(IAA)时葡萄糖对呼吸速度的影响不发生改变。同样，DOG 的作用也不取决于 IAA。在动力学的概念中可以把糖酵解的初期中间产物以及 Horecker 支路的作用物的直接作用除掉。1,3-二羟丙酮磷酸盐的转化非常缓慢(有 IAA 存在时其转化更明显)，这是为了可以用它们来阐明通过 α -甘油磷酸脂进行的细胞色素 b 还原(实际上其时看到的是细胞色素 b 的氧化)。应该指出， α -甘油磷酸脂脱氢酶的活性在这些细胞中是很低的[18]。

由于发现呼吸链上有“交叉点”(这是分离出的肝线粒体或腹水细胞线粒体对磷酸盐或 ADP 增加所呈现了的特有的反应)，因此出现了有关葡萄糖所诱导的 ADP 与呼吸成分相互作用问题的详细报导[19—21]。在这方面可以看到：

1. DPN-H , FAD-H_2 , 细胞色素 b 的氧化；2. 细胞色素 $c+c_1$ 和 a 的还原。

这些材料对磷酸盐与 ADP 作为能影响葡萄糖与氧之间的相互作用的介体方面，没有指出有什么区别。但是，众所周知，由于在葡萄糖磷酸化反应中没有磷酸盐释出；因而应该否定磷酸盐是激活细胞内呼吸的物质。此外还发现，再次加入低浓度葡萄糖，能再次激活和抑制呼吸的速度。最后发现，加入葡萄糖后，磷酸盐的浓度降低。假如磷酸盐有激活作用，上述情况与预期的动力学的效果就有矛盾。

总结起来可以认为，这些实际材料证明，葡萄糖是通过它本身磷酸化时释出的 ADP 而促进呼吸链各段落上的氧化磷酸化作用的。

加入葡萄糖后约经过 40 秒钟的间歇时间，葡萄糖与氧的消耗速度便减慢，随后在较长时间內保持恒定。氧的消耗的抑制是 Crabtree 在 1929 年用测压方法观察到的[22]，现在把这种抑制称为“Crabtree 效应”。

在实验中获得了一些关于控制速度的化合物的本质的材料。在这些实验中观察到呼吸链成分有交叉现象，并且对在有抑制剂和没有抑

制剂的情况下，葡萄糖浓度改变的动力学亦进行了观察。这种交叉现象说明 ADP 和磷酸盐都是使呼吸速度受到抑制的原因。还可以指出，在有 IAA 存在时，加入葡萄糖与加入 DOG 一样，能使呼吸速度受到抑制。发现多次加入低浓度葡萄糖，经常能使呼吸速度再次加快或受到抑制。这些结果否定磷酸盐是控制速度的中间产物，而使人们有可能推测，应该在 ADP 的供应有限方面寻找抑制氧消耗的原因。

但是，众所周知，在加入葡萄糖以前细胞内磷酸盐的储备可能是不一样的，假如储备相当少，磷酸盐就可能成为抑制呼吸速度的一种因素。由于进入细胞内的每一个葡萄糖分子与磷酸盐两个分子相结合（相当于每克分子 DOG 与一克分子磷酸盐结合），假如加入高浓度的葡萄糖或 DOG，磷酸盐的储备就能被耗尽。因此控制呼吸速度因素的性质是取决于实验的和（或）生物学的条件的。当磷酸盐的储备耗尽时，ATP/ADP 的比值就应该小，但在我们的实验中并没有看到这种情况。

对葡萄糖浓度变化的动力学研究表明，葡萄糖消耗速度减慢是直接发生在氧消耗开始抑制以前。由于葡萄糖过剩，显然，ATP 对葡萄糖的磷酸化作用的供应有限，便会抑制葡萄糖的消耗，因此给呼吸链释出 ADP 的过程也受到了抑制。曾经不止一次地指出过，与 ATP 在线粒体内的滞留使 2 磷酸激酶反应的地方缺少 ATP。事实上从曾加入过葡萄糖的腹水癌细胞中分离出的线粒体，其 ATP 的含量很高，而对照实验却只含该量的三分之一。因此，在线粒体内进行氧化磷酸化时所形成的 ATP，并不完全用于葡萄糖的磷酸化，而是停留在线粒体内。由此，被调节的呼吸的速度亦决定了醌醇解的速度。至此，Meyerhof 和 Galiazkova [23] 以及 Lynen 和 Koenigsberger [24] 等提出的关于细胞 ATP 储备的空间定位概念直接得到了实验的证实。

由于代谢调节机制的作用结果取决于被调节的氧化磷酸化及细胞膜的完整性，因此很显然，无论是呼吸的抑制还是葡萄糖的磷酸化作用，对解离因子（巴比土酸盐）的作用和线粒体的衰老都是非常敏感的。

葡萄糖与氧相互作用的化学计量研究，加上呼吸速度的对照值，

都可以发现艾氏腹水癌細胞内磷酸化的效应很高[25]其他学者根据間接的材料也証实有这种特点[26,27]。

最后可以说，呼吸系統的状态調节糖酵解的磷酸化作用，并决定葡萄糖的消耗速度。

在完整細胞内，葡萄糖对呼吸鏈成分的作用不是直接的，而是通过ADP間接地发生作用的，琥珀酸盐則能直接还原呼吸色素，因此它能成为供給“还原脫磷酸作用”或“氧化磷酸化作用”的电子的来源。

不久以前曾經指出，在腎細胞或腹水癌細胞的线粒体中加入琥珀酸盐，能使細胞色素b，以及大量吡啶核苷酸还原。加入低浓度的ADP可使这些过程反逆[20,28]。此外还发现，加入ATP可以大大加强这种还原作用[29—32]。这些和其他一些材料說明，可以从动力学的观点把琥珀酸盐的还原特性看成是“还原脫磷酸化过程”[20]。

这种还原作用的生理学意义还不清楚。但是有一点是明确的，就是在受到ADP显著控制的呼吸系統内，还原型等价物将会由于ATP的潜能高而被保存下来。这个条件对象腹水癌細胞这样一些生长組織内的各种形式的同化作用都是非常有利的。

在有葡萄糖或无葡萄糖存在的时候，在有氧条件下試驗腹水癌对加入琥珀酸盐的反应时，发现吡啶核苷酸被还原得很快。这种現象在描記它的螢光动力学时可以看到。与此同时，呼吸速度稍有增加，ATP/ADP的比值稍有下降。吡啶核苷酸对加入琥珀酸的这种反应，对线粒体的衰老、巴比土酸盐、双香豆酚和丙二酸盐极为敏感。其他一些中間产物，如苹果酸、 α -酮戊二酸盐或谷氨酸盐都没有这种还原性质。这种观察証明，琥珀酸盐还原吡啶核苷酸是一与ATP有依存关系的过程。但是尚未明了，在这个过程中ATP是否被用来激活琥珀酸或还原DPN。在以前的一些报告中曾經指出过，有葡萄糖存在的时候，細胞内琥珀酸盐的儲量不大，并且細胞色素b首先是呈还原型(2)。此外，正如前面所提到的那样，被葡萄糖饱和的細胞内，ATP停留在线粒体上。因此，我們推測，ATP在线粒体内的浓度高，驱使琥珀酸盐的还原等价物去还原吡啶核苷酸。

(黃俊华譯 黎璧鑒校)

文 献

1. G. E. W. Wolstenholme, C. M. O' Connor. Regulation of Cell Metabolism. London, 1959.
2. B. Chance, B. Hess. J. Biol. Chem., 1959, 234, 2404.
3. O. Warburg, E. Hiepler. Z. Naturforsch., 1952, 7b, 193.
4. B. Chance, B. Hess. Science, 1959, 129, 700.
5. R. Wu, E. Racker. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1036.
6. Th. Bücher, M. Klingenberg. Angew. Chemie, 1958, 70, 552.
7. B. Chance. Science, 1954, 120, 767.
8. O. Warburg. Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin, 1948.
9. H. Theorell, A. P. Nygaard. Acta Chim. Scand., 1954, 8, 677.
10. B. Chance, G. R. Williams. J. Biol. Chim., 1959, 217, 333.
11. B. Hess, B. Chance. J. Biol. Chem., 1961, 236, a-neqara.
12. B. Chance, B. Hess. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1956, 63, 1009.
13. B. Hess, B. Chance. Naturwissensch., 1959, 46, 248.
14. B. Chance, B. Hess. J. Biol. Chem., 1959, 234, 2416.
15. F. B. Cramer, G. E. Woodward. J. Franklin Inst., 1952, 283, 354.
16. B. Hess. Über Regulationsmechanismen von Aszites-Tumor-Zellen und ihr Modell. Tagung Ges. f. Physiol. Chemie e. V. Berlin, 1959.
17. L. Kiesow. Z. f. Naturforsch., 1959, 14b, 492.
18. A. Dellbrück, H. Schumassek, K. Bartsch, Th. Bücher. Biochem. Z., 1959, 331, 297.
19. B. Chance, G. R. Williams. J. Biol. Chem., 1955, 217, 409.
20. B. Chance, B. Hess. J. Biol. Chem., 1959, 234, 2413.
21. B. Chance, B. Hess. J. Biol. Chem., 1959, 234, 2421.
22. H. G. Crabtree. Biochem. J., 1929, 23, 536.
23. O. Meyerhoff, N. Gellazkova. Arch. biochem., 1947, 12, 405.
24. E. Lynen, R. Koenigsberger. Justus Liebigs-Ann. Chem., 1951, 573, 60.
25. B. Hess, B. Chance. J. Biol. Chem., 1959, 234, 3031.
26. J. H. Quastel, I. J. Bickis. Nature, 1959, 183, 281.
27. P. Emmelot, C. J. Bos. Nature, 1959, 184, 2024.
28. B. Chance, G. Hollunger. Federation Proc., 1957, 16, 163.
29. B. Chance. Biochem. a. Biophys. Res. Comm., 1960, 3, 10.
30. B. Chance, B. Hagihara. Biochem. a. Biophys. Res. Comm., 1960, 3, 6.
31. B. Chance, B. Hagihara. Biochem. a. Biophys. Res. Comm., 1960, 3, 1.
32. M. Klingenberg, P. Schollmeier. Biochem. Z., 1960, 337, 335.