

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

第六章 生物氧化

制作：杨焯 审校：李洪

(2009年4月)

一、内容提示：

(一) 生物氧化的概念：

营养物质在生物体内氧化生成水、 CO_2 并释放能量的过程称为生物氧化 (biological oxidation)。生物氧化分为三个阶段：第一阶段由蛋白质、脂类、糖类等生物分子分别分解生成氨基酸、脂肪酸、葡萄糖等构件分子；第二阶段由大部分氨基酸、葡萄糖、脂肪酸和甘油经一系列反应生成乙酰 CoA；第三阶段由乙酰 CoA 进入三羧酸循环和氧化磷酸化彻底氧化分解并生成大量 ATP，这是糖、脂、蛋白质分解供能的共同通路。

(二) 呼吸链与氧化磷酸化：

1. 呼吸链的组成：

生物体内大多数代谢物的氧化比较复杂，它们在代谢中脱下氢经若干线粒体内膜上的递氢体、递电子体有规律地传递，最后与激活的氧结合成水。这些按一定顺序排列在线粒体内膜上的递氢体和递电子体构成的链式体系就是呼吸链 (respiratory chain)。呼吸链由 NAD^+ 、黄素酶类、铁硫蛋白、辅酶 Q 和细胞色素 (cytochrome) 五类组份组成，大部分以蛋白质复合物的形式存在。呼吸链包括 NADH 氧化呼吸链和琥珀酸氧化呼吸链两条链式反应体系。

2. 氧化磷酸化：

代谢物脱下的氢经过呼吸链的传递并最终与氧化合生成水，其氧化过程与 ADP 生成 ATP 的磷酸化过程偶联在一起，称这种能量生成的方式为氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)。一对氢经过氧化磷酸化，大多数是经过 NADH 氧化呼吸链产生 2.5 分子 ATP，少数情况下通过琥珀酸氧化呼吸链产生 1.5 分子 ATP。氧化磷酸化的偶联部位在 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 和 CoQ 之间、CoQ 和 Cytc 之间、Cytaa₃ 和 O_2 之间共三个，可通过各氧化还原对间的电位差或借助 P/O 比值来确定。

氧化磷酸化偶联的机制有广泛事实支持的假说是化学渗透假说 (chemiosmotic hypothesis)。它认为电子传递的结果是将 H^+ 从线粒体内膜基质“泵”到膜外液体中，于是形成一个跨内膜的 H^+ 梯度和电位梯度，此梯度中所含的渗透能正是促使 ATP 生成所需的能量。当膜外的 H^+ 通过 ATP 合酶的质子通道进入膜内时，这一能量促使该酶被激活，从而催化 ADP 与 P_i 缩合生成 ATP。

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

3. 影响氧化磷酸化的因素:

影响氧化磷酸化的因素有 ADP 水平比值、甲状腺激素等。其抑制剂分为氧化磷酸化解偶联剂 (2,4-二硝基苯酚), 呼吸链抑制剂 (第一位点抑制剂: 粉蝶霉素 A、鱼藤酮、异戊巴比妥; 第二位点抑制剂: 抗霉素 A、二巯基丙醇; 第三位点抑制剂: H_2S 、 CO 、 CN^- 、 N_3^-) 和 ATP 合酶抑制剂 (寡霉素、二环己基碳二亚胺) 三类。

(三) 底物水平磷酸化:

在代谢反应中, 由于分子内化学能的重新排布, 在底物分子中形成高能键, 并由底物将此高能键转移给 ADP 生成 ATP, 这种能量的生成方式称为底物水平磷酸化 (substrate level phosphorylation), 它是 ATP 生成的另一种方式。人体内仅有三个反应可进行底物水平磷酸化。

(四) 高能化合物与 ATP 循环:

通过生物氧化产生的能量储存在高能化合物里。严格地说, 并没有高能化合物或含高能键的物质存在, 但这已被惯用。所谓高能化合物是指含有一个或多个特殊形式化学键的化合物, 水解时有较大负自由能的变化。一个化学键水解产生的自由能在 $-5 \sim -20\text{kJ/mol}$ ($-1 \sim -5 \text{ kcal/mol}$) 的可以认为是低能键或普通键; 自由能在 $-21 \sim -60 \text{ kJ/mol}$ ($-5 \sim -15 \text{ kcal/mol}$) 的就可以认为是高能键。

所有高能化合物中, 除酰基 CoA、SAM 外都含有磷酸基团。高能磷酸键的构成有 4 种类型: 磷酸酐、混合酐、烯醇磷酸、磷酸胍类。高能键水解时释放大量能量, 最根本的原因似乎是水解时产生的带电荷基团的离子化作用。高能化合物保留的能量约占总能量的 40%。能量保留方式是通过若干特殊反应, 把高能化合物的形式与生物氧化过程偶联起来。

底物水平磷酸化和氧化磷酸化使储存在代谢物中的化学能释放出来, 使 ADP 生成 ATP, 以 ATP 中高能磷酸键的形式储存。ATP 是生命活动中能量释放、储存和利用的中心, 所有生命活动所需能量均由 ATP 直接提供。在这些过程中, ATP 提供能量用于生物合成、肌肉收缩、信息传递、离子转运等生命活动过程, 本身则被水解成 $\text{ADP}+\text{P}_i$ 或 $\text{AMP}+\text{PP}_i$; 而另一方面, ADP 与 P_i 通过氧化磷酸化重新合成 ATP, 这就构成了生物体内能量转换的最基本方式, 即 ATP 循环。

(五) 线粒体外 NADH 的穿梭

线粒体外产生的 NADH 须由 α -磷酸甘油穿梭作用 (glycerophosphate shuttle) 或苹果酸-天冬氨酸穿梭作用 (malate-aspartate shuttle) 进入线粒体后方能氧化利用。 α -磷酸甘油穿梭主要存在于脑和骨骼肌, 一对氢经该穿梭作用进入线粒体后, 经琥珀酸氧化呼吸链产生 1.5 分子 ATP。苹果酸-天冬氨酸穿梭主要

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

存在于肝和心肌中，一对氢经该穿梭作用进入线粒体后，经 NADH 氧化呼吸链产生 2.5 分子 ATP。

二、重点解析：

(一) 生物体内 ATP 的生成方式：

1. 底物水平磷酸化：

底物水平磷酸化 (substrate level phosphorylation) 是指直接将底物分子中的高能键转变为 ATP 末端的高能磷酸键的过程。常见的底物水平磷酸化反应有三个：① 1,3-二磷酸甘油酸在磷酸甘油酸激酶作用下生成 3-磷酸甘油酸和 1 分子 ATP，此反应在胞液中进行；② 磷酸烯醇式丙酮酸由丙酮酸激酶催化生成丙酮酸和 1 分子 ATP，此反应也在胞液中进行；③ 琥珀酰 CoA 由琥珀酰 CoA 硫激酶催化生成琥珀酸和 1 分子 GTP，此反应在线粒体中进行。

2. 氧化磷酸化：

氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 是氢的氧化与 ADP 的磷酸化相偶联的一种 ATP 生成方式，即在电子传递过程中释放出能量并用于 ATP 合成，它是机体能量生成的主要方式。

传递氢或电子的系统由 NAD^+ -CoQ 还原酶 (NADH 脱氢酶)、琥珀酸-CoQ 还原酶 (琥珀酸脱氢酶)、CoQ-细胞色素 c 还原酶、细胞色素 c 氧化酶及 CoQ、Cyt c 构成，由这几种酶复合体的辅助因子构成了传递链。根据其组分可知，呼吸链由作为递氢体的 NAD^+ 、FMN、FAD 以及作为递电子体的 CoQ、细胞色素类及铁硫簇等构成。它们在电子传递链中的排列顺序是根据它们的氧化还原电势大小而定的。可分为两条呼吸链：① NADH 氧化呼吸链。其递氢体和递电子体的顺序为： $\text{NAD}^+ \rightarrow [\text{FMN}-(\text{Fe-S})] \rightarrow \text{CoQ} \rightarrow \text{Cyt b} \rightarrow \text{Cyt c}_1 \rightarrow \text{Cyt c} \rightarrow \text{Cyt aa}_3 \rightarrow \text{O}_2$ 。② 琥珀酸氧化呼吸链。其递氢体和递电子体的顺序为： $[\text{FAD}-(\text{Fe-S})] \rightarrow \text{CoQ} \rightarrow \text{Cyt b} \rightarrow \text{Cyt c}_1 \rightarrow \text{Cyt c} \rightarrow \text{Cyt aa}_3 \rightarrow \text{O}_2$ 。

通过测定氧化还原对间的电位差或借助 P/O 比值的测定，已证明电子传递链中有三个部位可以大量释放自由能以供 ADP 磷酸化生成 ATP，即氧化-磷酸化的偶联部位。部位 I 在 NADH 与辅酶 Q 之间，部位 II 在辅酶 Q 与细胞色素 c 之间，部位 III 在细胞色素 aa_3 与 O_2 之间。故 1 对氢经 NADH 氧化呼吸链可有三个偶联部位释放大量的自由能，即可净生成 2.5 分子 ATP；而 1 对氢经琥珀酸氧化呼吸链则只有两个偶联部位释放大量的自由能，故仅净生成 1.5 分子 ATP。

(二) 呼吸链各组分的排列顺序：

体内能量生成的主要途径是借助呼吸链将氧化与磷酸化偶联在一起。呼吸链实际上是指一个很复杂的偶联酶促反应系统，这个系统存在于线粒体内膜，在物理上和化学上都连接得很紧密，能完成一系

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

列化学反应 $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + 1/2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$ 。根据氧化和还原是失去或获得电子这一事实，任何促进生物氧化过程的系统都必然与电子的流动与输送有关，加上这个系统涉及到一个偶联序列，即一条反应“链”，故称为电子传递链。又因该偶联系列反应总是与氧的摄取有关，即与呼吸有关，故又称为呼吸链。

呼吸链各组分排列顺序的确定依据的是两方面的实验结果。第一，呼吸链各组分是按照它们的氧化-还原电位的准确顺序而依次出现于呼吸链上的，每一氧化-还原电位是用分离出来的各个组分通过实验测定出来的。第二，根据从分离出来的完整线粒体的实验中得出的结论。将线粒体放在含有过量底物而缺氧的小杯内，在此情况下，所有的组分都迅速变为还原状态。然后，逐渐少量地加入已被空气饱和的缓冲溶液，目的是缓慢地导入氧。每个组分的氧化次序是，先由细胞色素 aa_3 开始，依次进行，最后到达 NADH。用分光光度法可以获得组分是否被氧化的证据。

三、知识扩展：

(一) ATP 合酶的分子结构与催化机理：

ATP 合酶 (ATP synthase) 位于线粒体内膜的基质侧。在电镜下，观察到 ATP 合酶由三部分组成，即头部、柄部和基底部，因而常被称为三分子体 (triplet)。1960 年，Racker 首先用快速机械振荡的方法，使三分子体的头部脱落而分离到水溶性的酶，命名为 F_1 (ATP 合酶)。目前已知， F_1 是一种分子量约 40 万道尔顿的球状蛋白，由五种不同的亚基构成九聚体 ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$)。其中， α 亚基具有变构调节作用， β 亚基可催化 ATP 的合成反应，其余亚基则参与形成质子通道。 F_0 即为嵌于线粒体内膜的基底部，一般认为其主要作为质子通道，在质子由线粒体内膜外侧向内侧转移时，质子先经过此通道，再经柄部到达头部。大肠杆菌的 F_0 部是由 a、b、c 三种亚基组成的多聚体 ($\text{a}_1\text{b}_2\text{c}_n$)，c 亚基的数目不一。

ATP 合酶的催化机理尚未完全明了。Beyer 根据酶的诱导契合学说，提出了结合变化机制。他认为 ATP 合酶的 β 亚基存在三种不同的构象，即疏松型 (L 型)、紧密结合型 (T 型) 和开放型 (O 型)。L 型的 β 亚基容易与 ADP 和 P_i 相结合，并在 α 亚基的参与下，使其构象转变为 T 型，然后利用质子回流的能量，催化合成 ATP。新合成的 ATP 与 β 亚基结合很牢固，需再利用质子回流的能量，使之转变为 O 型并释放出 ATP。释放了 ATP 的 β 亚基重新回复为原来的 L 型构象。由于 F_1 包含三对 $\alpha\beta$ 结构，而每次只能有一对 $\alpha\beta$ 结构发挥作用，因此这三对 $\alpha\beta$ 结构是依次合成 ATP 的。

(二) 化学渗透学说：

化学渗透学说是 1961 年由 Peter Mitchell 提出的，1978 年获诺贝尔化学奖。其基本要点是在线粒

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

体内膜形成了氧化还原祥 (redox loop)，即电子传递链的组分在内膜的基质面接受质子和电子，而当电子向下一组分传递时，则将质子释放到内膜的胞液面，从而在线粒体内膜两侧形成了质子梯度以贮存能量。当质子顺浓度梯度回流时，即驱动 ATP 合酶合成 ATP。

电子传递链在线粒体内膜共形成三个氧化还原祥。首先，FMN 接受由 NADH 提供的 2 个电子和 1 个氢原子，并从线粒体内膜基质面中获取 1 个质子，形成 FMNH₂。当 FMNH₂ 向下一组分传递时，只将 2 个电子传给铁硫蛋白，而将 2 个质子释放到内膜的胞液面。接着，铁硫蛋白将 2 个电子传递给 CoQ，后者从内膜的基质面获取 2 个质子而形成 CoQH₂。CoQH₂ 在内膜中自由移动，将 2 个质子释放到内膜的胞液面，并将 2 个电子向下传递给铁硫蛋白。此为第一个氧化还原祥，在复合体 I 内完成。当第二个氧化还原祥开始时，铁硫蛋白将 2 个电子传递给 CoQ，后者又从内膜的基质面获取 2 个质子而形成 CoQH₂。CoQH₂ 向下将 1 个电子传递给铁硫蛋白及 Cyt c₁，并将 2 个质子释放到内膜胞液侧；同时将另 1 个电子传递给 Cytb，并重传给 CoQ。形成的 CoQH₂ 可再将 2 个质子释放到内膜胞液侧，完成第二个氧化还原祥。该氧化还原祥在复合体 III 内进行。第三个氧化还原祥在复合体 IV 内进行，在 Cyt c 将电子传递给 Cyt aa₃ 的过程中，可再将 2 个质子释放到内膜胞液侧。因此，每经电子传递链传递一对氢原子，就可向内膜胞液面释放 10 个质子，从而在线粒体内膜两侧形成质子梯度。

(三) 急性一氧化碳中毒的机理：

一氧化碳 (CO) 是一种无色、无嗅、无刺激性的气体，比重 0.967，几乎不溶于水。当含碳物质在氧气中燃烧而供氧不足时，可产生一氧化碳。如短时间吸入高浓度的一氧化碳，或较长时间吸入低浓度的一氧化碳，均可导致急性一氧化碳中毒，俗称煤气中毒。

一氧化碳经呼吸道进入血液循环，首先与血红蛋白结合成碳氧血红蛋白。由于一氧化碳与血红蛋白的亲合力要比氧高 300 倍，因而可使体内大部分的血蛋白转变为碳氧血红蛋白，引起缺氧血症。同时，碳氧血红蛋白还能阻止氧合血红蛋白的解离和氧的释放，导致组织细胞持续缺氧。当一氧化碳浓度较高时，还可与细胞色素氧化酶的还原型铁相结合，直接阻断电子传递链，抑制细胞呼吸过程。