

钾离子对醋酸棉酚体外抑制钠、钾三磷酸腺苷酶的作用*

毕晓峰 郑云娟 梁端 杨惠芬 (中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

提要 醋酸棉酚体外抑制钠、钾三磷酸腺苷酶的作用快而明显, 降低药物浓度可使酶活力及时得到改善, 醋酸棉酚的抑酶作用是可逆的。K⁺对醋酸棉酚的抑酶作用有拮抗, 动力学(双倒数作图分析)结果表明其作用方式为非竞争性, 近似反竞争性。

关键词 棉酚; 钠、钾三磷酸腺苷酶; 钾; 非竞争性抑制

临床上醋酸棉酚引起的低钾软瘫可以用钾盐防治⁽¹⁾, 动物实验中醋酸棉酚对豚鼠肾皮质钠、钾三磷酸腺苷酶(Na⁺, K⁺-ATPase)的抑制作用受饮食中钾含量的影响, 饲喂低钾饮食者抑酶作用明显, 富钾饮食者抑酶作用被延缓且轻⁽²⁾。本文报道醋酸棉酚在试管中对Na⁺, K⁺-ATPase抑制作用的特点, 以及K⁺对它的影响和动力学研究的结果。

材 料 和 方 法

Na⁺, K⁺-ATPase 的制备⁽³⁻⁵⁾ 成年豚鼠断头处死, 取得肾皮质用1号糖溶液(蔗糖0.25 M; EDTA 5 mM; L-组氨酸 5 mM; 二巯基苏糖醇 10 mM)制成10%的匀浆, 经双层纱布过滤的滤液置磁力搅拌器上的冰浴中, 慢慢加入等容积的碘化钠混合液(内含: 碘化钠3.96 M; 半胱氨酸 50 mM; MgCl₂ 5 mM; ATP-Na₂ 3 mM; EDTA 5 mM; pH 7.5), 持续搅拌30 min, 加入三倍匀浆体积的水(pH 7.5), 用10⁴×g离心30 min, 弃上清液, 用原容积量的2号糖溶液(蔗糖0.25 M, 去氧胆酸钠0.1%)洗涤两次, 离心速率同前, 最终沉淀悬浮在1号糖溶液中, 蛋白浓度约为2 mg/ml, -20℃保存。酶活力的测定方法同前⁽²⁾。

结 果

醋酸棉酚对 Na⁺, K⁺-ATPase 的抑制作用

在Na⁺100 mM, Mg⁺⁺ 5 mM, K⁺10 mM, Tris-ATP 5 mM, Tris-HCl 50 mM的反应条件下, 将酶蛋白在37℃预先温育15 min。按酶稀释法⁽⁶⁾, 用缓冲液将酶蛋白稀释一倍, 保持离子, 底物的浓度不变, 其中一管加醋酸棉酚(20 μg/ml), 另一管不加药物为对照。每隔15 min测定酶的活力。如表1所示, 醋酸棉酚对Na⁺, K⁺-ATPase的抑制作用即刻出现, 由于药物对酶的抑制, 使其酶反应的速率(斜率), 与对照管相比有明显下降(p<0.05)。

醋酸棉酚抑酶作用的可逆性 用酶稀释法, 在上述离子, 底物浓度下, 将酶蛋白和醋酸棉酚(第1管为10 μg/ml, 第2, 3管为100 μg/ml)放一起, 37℃预先温育15 min后, 用缓冲液把酶蛋白稀释10倍, 保持离子和底物的浓度以及第1, 3管的药物浓度不变, 而第2管的药物浓度从100降为10 μg/ml。实验结果表明, 降低醋酸棉酚的浓度, 酶活力明显恢复, 反应速率(斜率)可趋向接近第1管。第3管中酶活力受较高浓度醋酸棉酚的作用, 酶活力未见恢复, 酶反应速率与上述两管有明显差异, p值均小于0.01。清楚看出醋酸棉酚对Na⁺, K⁺-ATPase的抑制是可逆的。

K⁺对醋酸棉酚抑制 Na⁺, K⁺-ATPase 活力的影响 从图1可以看到: 在低K⁺(0.5 mM)时Na⁺, K⁺-ATPase对醋酸棉酚的抑制作用较为敏感, 抑制50%酶活力所用的药物浓度为21.3±2.7 μg/ml(95%可信限), 如果增加K⁺的浓度到10 mM, 药物对酶的抑制作用明显减弱, 抑制50%酶活力所用的药物浓度需增加到27.4±3.3 μg/ml(95%可信限), 比前者增加20%左右, 两者无交叉重叠, 说明钾浓度的增加虽不改变醋酸棉酚抑酶剂量效应曲线的斜率(p>0.05), 但使整个曲线右移, 表明K⁺拮抗醋酸棉酚的抑酶作用是肯定的,

1982年1月14日收稿 1983年8月17日修回

* 本文在金荫昌教授指导下完成

Tab 1. Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity ($\mu\text{mol P}_i/\text{mg Pr/h}$) by gossypol acetic acid during incubation for 45 min. $\bar{x} \pm \text{SD}$

Tube	0 min	15 min	30 min	45 min	Slope
Control	3.9 ± 0.6	8.4 ± 1.4	10.9 ± 2.0	13.3 ± 2.2	0.17 ± 0.03
Gossypol	$3.9 \pm 0.6^*$	$7.0 \pm 1.4^*$	$8.2 \pm 1.8^{**}$	$9.6 \pm 2.0^{**}$	$0.09 \pm 0.03^{**}$

Note: After preincubating Na^+, K^+ -ATPase for 15 min in Na^+ 100 mM; K^+ 10 mM; Mg^{++} 5 mM; Tris-ATP 5 mM; Tris-HCl 50 mM, enzymes were diluted in buffer solution to make the concentrations of gossypol at 0 and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the 2 tubes, respectively. * $p > 0.05$, ** $p < 0.01$

Tab 2. Reversal of the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase ($\mu\text{mol P}_i/\text{mg Pr/h}$) by gossypol. $\bar{x} \pm \text{SD}$

Concentrations of gossypol ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Time of incubation (min)				Slope
	0	15	30	45	
10	3.9 ± 0.09	11.2 ± 1.4	14.0 ± 1.5	17.4 ± 1.1	0.21 ± 0.08
100 \rightarrow 10	2.5 ± 0.5	7.9 ± 1.1	9.8 ± 0.6	11.2 ± 1.5	$0.11 \pm 0.02^{**}$
100	2.5 ± 0.5	5.5 ± 2.0	5.5 ± 2.0	5.3 ± 1.3	$0.004 \pm 0.002^{**}$

Note: After preincubating Na^+, K^+ -ATPase for 15 min with gossypol: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the 1st tube, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the 2nd and 3rd tubes, the enzymes were diluted in buffer solution to make the concentrations of gossypol at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the 1st and 2nd tubes, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the 3rd tube, respectively. ** $p < 0.01$

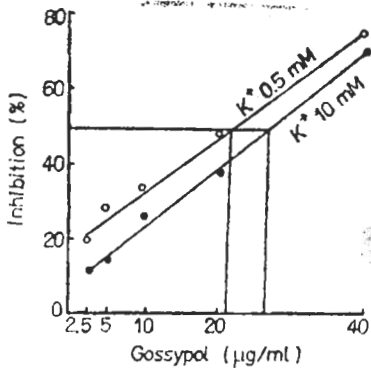


Fig 1. Effect of K^+ on gossypol inhibition of Na^+, K^+ -ATPase. With K^+ 0.5 or 10 mM, the enzymes were incubated with gossypol 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to estimate the median inhibiting dose (IC_{50}).

如图 2 所示, 在低 K^+ (0.5 mM) 条件下, 酶蛋白和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的醋酸棉酚一起温育 10 min, 及时补钾到 10 mM, 与始终保持 K^+ 为 0.5 或 10 mM 者相比, 在低 K^+ 条件下被药物抑制的酶活力, 包括酶反应速率可见恢复, 接近正常反应条件 (10 mM K^+) 时的酶反应速率。不补 K^+ 者酶活力与酶反应速率不见恢复, 与前者比有明显差别 ($p < 0.01$)。

K^+ 拮抗醋酸棉酚抑酶作用的动力学分析 为了解 K^+ 拮抗醋酸棉酚抑酶作用的方式, 比

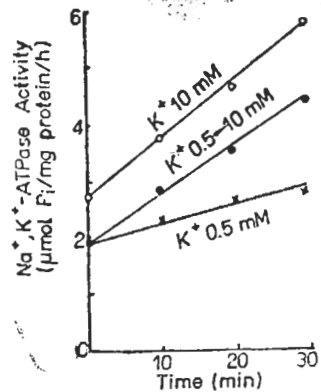


Fig 2. Inhibitory effect of gossypol on Na^+, K^+ -ATPase antagonized by K^+ . After preincubating Na^+, K^+ -ATPase for 15 min with gossypol 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and K^+ (10 mM in the 1st tube, 0.5 mM in the 2nd and 3rd tubes), the enzymes were diluted to make the concentrations of K^+ at 10 mM in the 1st and 2nd tubes, 0.5 mM in the 3rd tube.

较不同浓度 K^+ (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mM) 和醋酸棉酚 (5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 时酶的活力。双倒数作图显示, K^+ 对醋酸棉酚的抑酶作用有拮抗 (见图 3 右下方), 其作用方式不属竞争性, 而近乎反竞争型。随着醋酸棉酚浓度的增加, 钾在酶反应中的 K_m 值逐渐变小, K^+ 和酶的亲合力增加。

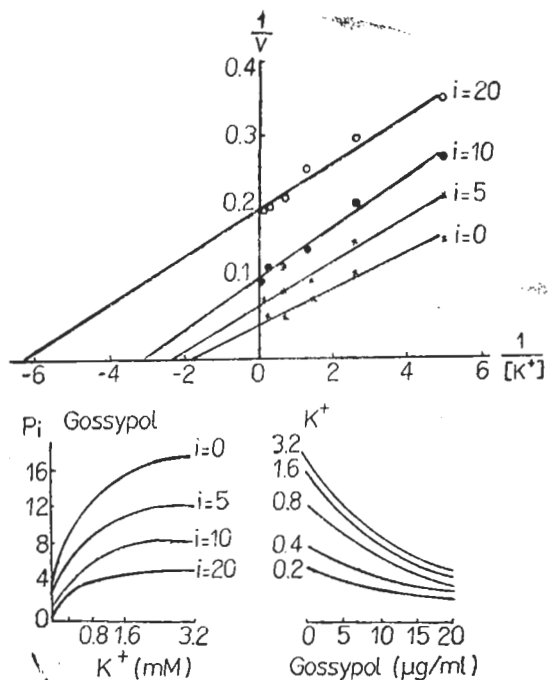


Fig 3. Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase by gossypol (0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$), and the antagonism by K^+ (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mM).

讨 论

本文结果显示醋酸棉酚体外抑制 Na^+, K^+ -ATPase 的作用既快又明显, 减低药物浓度或增加 K^+ 浓度, 均可改善已抑制的酶活力, 与以往临床、动物实验的结果一致。动力学实验结果表明醋酸棉酚和哇巴因对 Na^+, K^+ -ATPase 的作用方式不同。有报道⁽⁷⁾哇巴因对酶的抑制, 在低钾时 ($< 5.0 \text{ mM}$) 与 K^+ 呈竞争性拮抗, 高钾时 ($> 5.0 \text{ mM}$) 为非竞争型。也有人认为哇巴因的受点与细胞膜外 K^+ 的受点相同或者有部分交迭, 或者就在 K^+ 受点的周围^(8,9)。本实验在 K^+ 浓度小于 5.0 mM 时, 曾发现 K^+ 对醋酸棉酚的拮抗并不是竞争性的, 而近乎反竞争型。结果表明, 在没有醋酸棉酚存在时, K^+ 作为配基参与 Na^+, K^+ -ATPase 对 ATP 的水解过程,

保持一定的 K_m 值。若有醋酸棉酚存在时, K^+ 和酶的复合物 ($\text{K}^+ \cdot \text{E}$) 与药物结合成新的不活动的复合物 ($\text{K}^+ \cdot \text{E} \cdot \text{D}$), 改变了原来 K^+ 在酶反应中的 K_m 值。药物浓度愈大, K^+ 的 K_m 值愈小, K^+ 和酶的亲和力愈大, 新的复合物愈不活动, 酶水解 ATP 为无机磷的能力愈小。相反, 增加 K^+ 浓度可以减小药物对酶的抑制。醋酸棉酚抑制 Na^+, K^+ -ATPase 的机制何在? 看来与它化学结构的内在特性有关, 含有多个醛基和羟基的醋酸棉酚易与赖氨酸的游离氨基酸结合成单聚、双聚、三聚和四聚体⁽¹⁰⁾, 以形成不活动的复合物, 或改变了膜蛋白的特性和构型, 从而降低了酶的活力。详细机理尚待进一步研究, 或许放射受体结合分析可以提供更有价值的资料。

致谢 实验数据承蒙我所电子计算机室祝庆麟讲师和统计室高润泉教授协助处理, 动力学结果分析得到生化室李世谔教授的指导。

参 考 文 献

- 1 Qian SZ, Jing GW, Wu XY, Xu Y, Li YQ, Zhou ZH. *Chin Med J* 1980; 93: 477
- 2 Bi XF, Zheng YJ, Yang HF, Zhang ZR. *Sci Sin* 1981; 24: 573
- 3 Pitts BJR, Schwartz A. *Biochim Biophys Acta* 1975; 401: 184
- 4 Akera T, Ku D, Tobin T, Brody TM. *Mol Pharmacol* 1976; 12: 101
- 5 Choi YR, Akera T. *Biochim Biophys Acta* 1978; 508: 313
- 6 Peters T, Raben RH, Wassermann O. *Eur J Pharmacol* 1974; 26: 166
- 7 Akera T, Brody TM. *Mol Pharmacol* 1969; 5: 601
- 8 Hoffman JF, Joseph F. *Am J Med* 1966; 41: 666
- 9 Shou JC. *Physiol Rev* 1965; 45: 596
- 10 Lyman CM. *Arch Biochim Biophys* 1959; 84: 486

ANTAGONISM BY POTASSIUM TO THE INHIBITORY EFFECT OF GOSSYPOL ON Na^+, K^+ -ATPase *IN VITRO**

BI Xiao-feng, ZHENG Yun-juan, LIANG Duan, YANG Hui-fen

(*Inst Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*)

ABSTRACT This paper reports the following characteristics of the inhibitory effect of gossypol acetic acid on Na^+, K^+ -ATPase activity *in vitro*:

1. Gossypol acetic acid 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibited Na^+, K^+ -ATPase rapidly and obviously.

2. Inhibitory effects of gossypol (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on Na^+, K^+ -ATPase was reversed by decreasing the concentration of gossypol to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or increasing that of K^+ (from 0.5 to

10 mM).

3. The inhibition for K^+ against gossypol on Na^+, K^+ -ATPase appeared to be non-competitive.

KEY WORDS gossypol; Na^+, K^+ -ATPase; potassium; non-competitive inhibition

* This work was completed under the guidance of Prof JIN Yinchang.