

棉酚在体外抑制钠钾腺苷三磷酸酶的方式¹叶益新、毕晓峰²、郑云娟、杨惠芬 (中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

提要 棉酚和哇巴因体外合用, 对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制作用为相互拮抗。棉酚使 [^3H]哇巴因与其受点结合动力学的 K_d 和 B_{max} 值都明显减少; 地高辛使 K_d 值增大, B_{max} 值不变。 K^+ 可影响地高辛的抑制作用 (非竞争型), 但不影响棉酚的抑制作用。表明棉酚对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的作用位点不在地高辛的结合点上, 棉酚为反竞争型抑制, 而地高辛为竞争型抑制。

关键词 棉酚; 哇巴因; 地高辛; 反竞争型抑制; Na^+ , K^+ 腺苷三磷酸酶

棉酚能抑制肾细胞膜的 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力, 其抑酶性质是可逆的且近似反竞争型, K^+ 可拮抗这种作用^(1,2,3)。棉酚也能抑制 [^3H]哇巴因与其受点的结合⁽⁴⁾。本文用受体结合动力学方法, 观察棉酚对 [^3H]哇巴因与其受点结合动力学的影响, 并与地高辛比较, 同时用酶活力测定法, 观察棉酚与哇巴因体外合用的效应。以期研究棉酚对 Na^+ , K^+ -ATP 酶抑制作用位点和方式。

材 料 和 方 法

棉酚 醋酸棉酚(纯度 98-103%)10 mg, 用 2.5 ml 0.05 N 的 NaOH 溶解后加 7.5 ml 50 mM 的 Tris-HCl(含 5 mM EDTA)缓冲液, pH 7.45。再用缓冲液稀释。

Na^+ , K^+ -ATP 酶的制备 与前文⁽¹⁾基本相同。

酶活力测定 同前法⁽¹⁾

[^3H]哇巴因与其受点结合⁽⁴⁾ 反应液含 Na^+ 100 mM, Mg^{2+} 5 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM pH 7.45, 及一定浓度酶制备和 [^3H]哇巴因。实验管分别加入棉酚、地高辛和

K^+ 等, 温育 30 min 后, 加 Na_2ATP 5 mM 起反应。15 min 后用滤膜过滤法终止反应并分离结合和游离部分。滤膜经 80°C 烤 1 h 后, 投入闪烁杯中, 加 1 ml 乙二醇单甲醚, 振荡 15 min, 再加 10 ml 甲苯闪烁液, 上 Beckman 闪烁计数仪计数, 用外道比法校正棉酚的淬灭, 得到 dpm, 最后求出结合量。其中加 ATP 管为总结合, 无 ATP 管为非特异结合, 两者之差为特异性结合。实验管和对照管都为双管, 平行操作。经预初试验稳定后, 取连续三次以上实验的平均值, 按不同要求作图分析并作统计学处理。

结 果

棉酚和哇巴因合并用药效应 哇巴因 1 μM 和棉酚 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 合用及棉酚 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和哇巴因 0, 1, 2, 5, 10, 100 μM 合用(表 1)。平均抑制率用公式 $q = (E_{0+0} - E_0)/E_0$ ⁽⁵⁾ 求得 q 值全部小于 1。表明两者间的效应是相互拮抗的。

棉酚对 [^3H]哇巴因与其受点结合动力学的影响 当酶制备蛋白 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, [^3H]哇巴因 8, 32, 64, 128, 192, 256 nM 时, 可得到一条饱和结合曲线(图 1 A)。当上述反应液中加入棉酚 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后, 饱和结合曲线明显下移。用 Scatchard Plot(图 1 B)表明, 对照和加棉酚者都各为直线。 K_d 值分别为 247 和 123 nM, B_{max} 值分别为 80 和 42 pmol/mg。用双倒数作图分析(图 1 C)可见, 加入棉酚后的回归线上移且与对照线相平行, 即 F/B 值不变。表明棉酚的作用方式是反竞争型抑制。

棉酚和地高辛对 [^3H]哇巴因与其受点结合的动力学的影响 酶制备蛋白 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, [^3H]哇巴因 2 nM, 非标记哇巴因分别为 0, 20, 40, 80, 160, 320, 640 nM。对照和实验

1984年6月29日收稿 1985年7月9日修回

¹ 本文在金荫昌教授指导下完成

² 现在: 北京, 人民卫生出版社

Tab 1. Inhibitory effect of gossypol in combination with ouabain on Na^+, K^+ -ATPase activity. E_G : % inhibition of gossypol, E_0 : % inhibition of ouabain, E_{G+0} : % inhibition of gossypol in combination with ouabain. $n=6$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$) $q = (E_{G+0} - E_G)/E_0$

Gossypol ($\mu\text{g/ml}$)	0	10	20	30	40	50
E_G	0	54.0 ± 7.5	56.8 ± 8.0	66.6 ± 9.3	74.2 ± 8.0	79.5 ± 7.5
E_{G+0}	27.0 ± 2.3	59.3 ± 8.0	68.3 ± 8.6	76.0 ± 8.6	80.9 ± 6.9	84.4 ± 7.6
q	(E_0)	0.20	0.43	0.35	0.25	0.18
Ouabain (μM)	0	1	2	5	10	100
E_0	0	25.6 ± 2.8	38.2 ± 4.4	59.6 ± 2.6	72.2 ± 1.6	88.8 ± 0.8
E_{G+0}	41.4 ± 6.2	55.6 ± 6.9	64.9 ± 4.8	76.0 ± 1.6	82.2 ± 1.7	92.0 ± 1.3
q	(E_G)	0.55	0.62	0.58	0.56	0.57

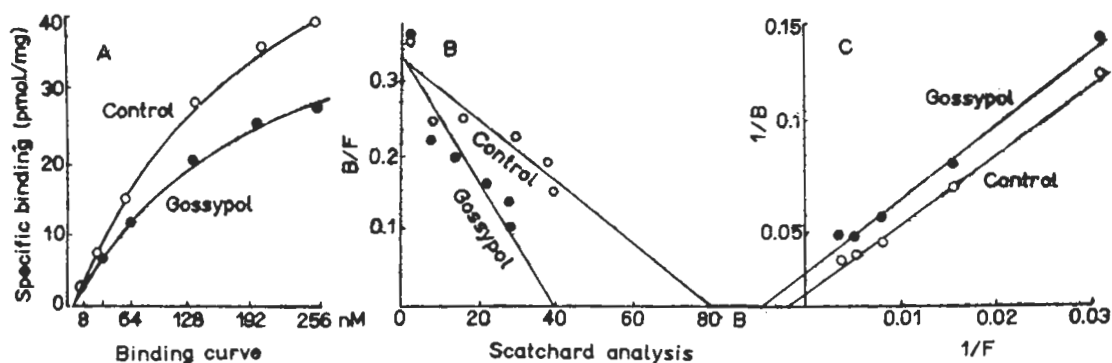


Fig 1. Effect of gossypol (10 $\mu\text{g/ml}$) on the kinetics of $[^3\text{H}]$ ouabain binding to Na^+, K^+ -ATPase. 3 determinations/point

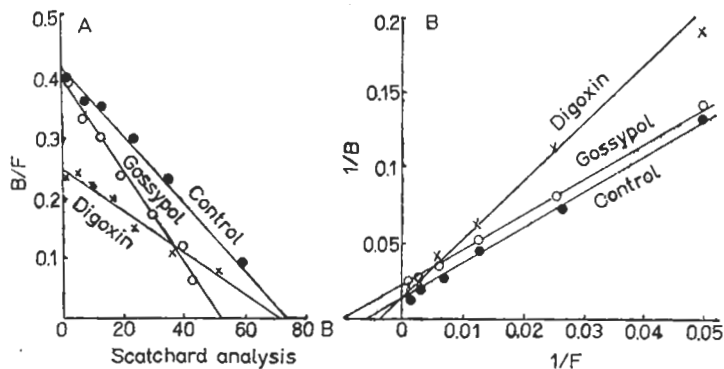


Fig 2. Effect of gossypol (40 $\mu\text{g/ml}$) on the kinetics of $[^3\text{H}]$ ouabain binding to Na^+, K^+ -ATPase in comparison with that of digoxin (50 nM). 5 determinations/point

(加入棉酚 40 $\mu\text{g/ml}$ 或地高辛 50 nM) 三组平行操作, 用 Scatchard plot (图 2 A) 可见, 三条

均为直线, 斜率不同。对照、棉酚、地高辛的 K_d 值分别为 180, 132 和 309 nM, B_{max} 值分别

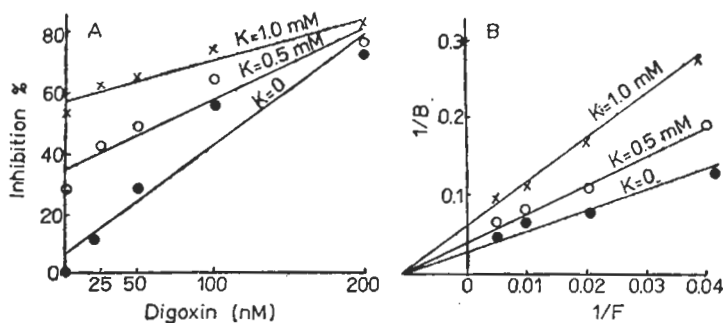


Fig 3. Influence of K^+ on the specific competitive inhibition of digoxin on $[^3H]$ ouabain binding to $Na^+, K^+-ATPase$. 3 determinations/point

为 75, 52 和 72 pmol/mg. 加入棉酚的结果和前一实验一致, 即 K_d 和 B_{max} 都减小. 而加入地高辛后, K_d 值变大, 而 B_{max} 值几乎未变. 双倒数作图(图 2 B)表明, 棉酚的回归线与对照线比较, 平行向上推移, 也为反竞争型抑制. 地高辛的回归线与对照线相交于 y 轴的同一点上, 表明为竞争型抑制.

对地高辛抑制 $[^3H]$ 哇巴因与其受点结合

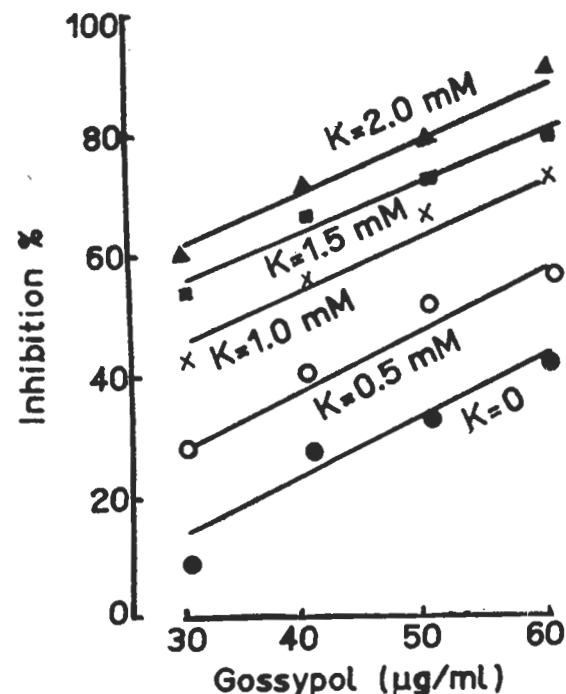


Fig 4. Influence of K^+ on inhibition of gossypol on $[^3H]$ ouabain binding to $Na^+, K^+-ATPase$. 3 determinations/point

的影响 酶制备蛋白 400 $\mu\text{g/ml}$, $[^3H]$ 哇巴因 2 nM, 地高辛分别为 0, 25, 50, 100, 200 nM. 实验管加入 K^+ 0.5 和 1.0 mM. 从图 3 A 可见, 当地高辛浓度为零时, K^+ 对结合反应有明显的抑制作用. 可是随着地高辛浓度增加, K^+ 的抑制作用随着减弱, 当地高辛浓度超过 200 nM 时, 三条线接近相交, K^+ 的抑制作用接近零. 用 Scatchard plot 显示加 K^+ 后不影响 K_d 值, 而 B_{max} 随着 K^+ 增加而减小(图略). 双倒数作图可见三条回归线的延长线都交于 X 轴的同一点上, 呈显非竞争型抑制(图 3 B).

对棉酚抑制 $[^3H]$ 哇巴因与其受点结合的影响 图 4 可见不同 K^+ 浓度所构成的回归线几乎与对照线平行; 不同棉酚浓度所构成的回归线也与对照线平行(图略), 表明 K^+ 对结合反应的抑制作用不受棉酚的影响. 反之, 棉酚对结合反应的抑制作用也不受 K^+ 浓度的影响.

讨 论

可逆性酶抑制剂的作用方式, 一般可分为竞争型、反竞争型, 非竞争型和混合型等类型. 根据类型可分析抑制剂、酶和底物三者之间的关系, 包括抑制剂在酶上的作用位点. 本文动力学的结果表明, 地高辛的作用方式是竞争型抑制, 符合它与哇巴因为同类 Na^+, K^+-ATP 酶特异抑制剂, 竞争同一受点. 棉酚的作用类型与地高辛不同, 为反竞争型, 解释此类作用机

制是比较复杂的。一般认为此类抑制剂不是直接作用于受点上,但是与受点有一定关系。可能通过抑制剂与受点所在的酶形成复合体后,使酶的构型发生变化,从而影响受点与配基的亲和力。 K^+ 可改变地高辛的抑制作用(非竞争型),但不影响棉酚的抑制作用,也支持棉酚与地高辛作用点的不同。哇巴因与棉酚合用,对 Na^+ , K^+ -ATP酶的抑制为相互拮抗,证实两者的作用点有一定的关系,从酶活力的角度,佐证受体结合动力学的结果。

前文报道 K^+ 可拮抗棉酚的抑酶作用^(1,3)。与本文结果不同,正说明酶活力和哇巴因结合法的不同。在 Na^+ , K^+ -ATP酶水解ATP过程中, K^+ 起激活作用,为测酶活力的必要条件⁽¹⁾;而在结合法中, K^+ 抑制哇巴因,与其受点的结合^(4,6,7),为研究强心甙作用机制中两种常用方法,可起到相辅相成的目的^(6,7)。

本文结果表明棉酚抑酶性质是可逆的,如果棉酚浓度过高或与酶温育时间过长,也可以导致不可逆^(3,4)。为此本文采用棉酚的浓度梯

度大多与棉酚有效血浓度相接近。温育时间一律在0.5 h,以避免导致不可逆性抑制。

综上所述,棉酚抑制 Na^+ , K^+ -ATP酶的作用机制可能通过酶蛋白的构型改变或棉酚与受体形成复合体,间接地影响哇巴因受点的亲和力,从而抑制酶的活力,如有高比度的标记棉酚,直接观察棉酚与酶蛋白的结合,将有助本问题的深入研究。

参 考 文 献

- 1 毕晓峰、郑云娟、杨惠芬、张志荣. 中国科学 1980; 9: 914
- 2 费仁仁、梁德才、高仪,等. 生殖与避孕 1982; 2 (1): 42
- 3 毕晓峰、郑云娟、梁端、杨惠芬. 中国药理学报 1984; 5: 115
- 4 叶益新、郑云娟、杨惠芬. 中华核医学杂志 1983; 3: 38
- 5 周元晏、王宏镛、唐志广、马德录. 中国药理学报 1984; 5: 217
- 6 Chio YR, Akera T. *Biochim Biophys Acta* 1977; 481: 684
- 7 Inagaki C, Lindenmayer GE, Schwartz A. *J Biol Chem* 1974; 249: 5135

Acta Pharmacologica Sinica 1986 May; 7 (3): 265-268

Mode of inhibitory action of gossypol on Na^+ , K^+ -ATPase *in vitro*

YE Yi-xin, BI Xiao-feng, ZHENG Yun-juan, YANG Hui-fen

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

ABSTRACT When ouabain was applied in combination with gossypol, the inhibitory effect of both gossypol and ouabain on Na^+ , K^+ -ATPase activity was antagonistic.

The kinetic studies of gossypol on [3H]ouabain binding to Na^+ , K^+ -ATPase showed that gossypol decreased both K_d and the B_{max} values uncompetitively, whereas digoxin decreased competitively.

K^+ did not affect the action of gossypol on [3H]ouabain binding to Na^+ , K^+ -ATPase.

KEY WORDS gossypol; [3H]ouabain; digoxin; uncompetitive inhibition; sodium, potassium adenosine triphosphatase

¹ This work was completed under the guidance of Prof JIN Yin-chang