

## 棉酚乙酸对心肌线粒体膜 ATP 酶的影响

窦淑筠、符云峰 (河北省医学科学院实验医学研究所生化研究室, 石家庄 050021)

**提要** 本文研究了棉酚乙酸对心肌线粒体膜 ATP 酶活性影响。结果表明, 棉酚乙酸对猪心线粒体膜 ATP 酶表现抑制作用, 随棉酚浓度增加, 抑制作用增强, 其最大半抑制浓度( $K_i$ )为  $25 \mu\text{mol/L}$ 。酶动力学研究表明, 棉酚对线粒体膜 ATP 酶的配体 ATP 及  $\text{Mg}^{2+}$  的抑制为非竞争性抑制, 其  $K_i$  值分别为  $2.0$  及  $0.37 \text{ mmol/L}$ 。

**关键词** 棉酚乙酸; 心脏线粒体; 腺苷三磷酸酶

棉酚乙酸是毒性作用较大的一种抗生育药物, 除了它的较强的抗生精作用外, 对其他各脏器有何影响? 有文章报告<sup>(1,2)</sup>, 它能抑制肝脏解毒作用, 并使肝线粒体氧化磷酸化解偶联。棉酚与生物膜脂质单层和脂质双层的相互作用特性, 乃是棉酚对各种膜传递系统的抑制作用<sup>(3)</sup>。心脏作为机体内一重要器官, 当血循环内存在相当浓度的棉酚时, 对心肌细胞内生能的关键装置——线粒体膜 ATP 酶影响如何? 尚

1986年11月3日收稿 1987年11月3日接受

未见报道。本文通过对酶动力学研究,揭示了棉酚对心肌线粒体膜 ATP 酶的某些作用。

## 材料与方 法

**分离提取线粒体** 将新鲜猪心(100-200 g)去掉内、外膜,于含有蔗糖 250 mmol/L-EGTA 10 mmol/L-Tris 10 mmol/L (pH 7.4)溶液中充分剪碎,并用该溶液冲洗数次,以移出多余血,然后用 Glass-Teflon 匀浆器制备匀浆,并分离提取线粒体<sup>(4)</sup>。

**制备线粒体膜** 将上述分离的心肌线粒体悬浮在 Tris 50 mmol/L-乙酸缓冲液 (pH 7.4)中,于  $10\,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min,洗涤 2 次,沉淀物再次悬浮在 18 ml Tris 50 mmol/L-乙酸缓冲液中,并迅速加入 2.0 ml 3% (wt/vol)脱氧胆酸<sup>(5)</sup>(pH 7.6-7.7),混合后悬浮液于  $25\,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,将上清液等分装入 4 管(10 ml 离心管),于  $105\,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 离心 1 h,沉淀物以缓冲液洗涤 3 次,以便去掉残留的脱氧胆酸。最后将得到的膜制备物充分地悬浮于该缓冲液中,以比色法<sup>(6)</sup>测定该悬浮液酶蛋白含量,以牛血清白蛋白做为标准。

将悬浮液分装成若干份,于  $-30^{\circ}\text{C}$ 贮存,该酶活性可保持 6 个多月。

将不同浓度的棉酚乙酸,分别溶解在 10  $\mu\text{l}$  二甲亚砜溶液中(以咪唑调 pH 到 7.4),使其在 0.4 ml 反应液中最终浓度分别为 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 及 100  $\mu\text{mol/L}$ 。

**酶活性测定** 在 0.4 ml 反应体系中含有 ATP 3 mmol/L-Tris<sup>(4)</sup>,  $\text{MgCl}_2$  3 mmol/L (最终浓度), Tris 50 mmol/L-乙酸 (pH 7.4), 30  $\mu\text{g}$  酶蛋白。反应介质于  $37^{\circ}\text{C}$  预热 10 min,反应自加入 0.1 ml 酶悬浮液开始,保温 15 min,立即加入 1.5 ml 冰冷的 8.6% (wt/vol)三氯乙酸,使反应终止,于  $2000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min,测定上清液  $\text{P}_i$  含量<sup>(7)</sup>。以同一条件下标准磷测定值进行计算。

## 结果与讨论

**心肌线粒体膜 ATP 酶某些特征** 首先对心肌线粒体膜 ATP 酶制备物进行了寡霉素敏感试验。当反应体系中存在 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 及 0.75  $\mu\text{g}$  寡霉素时,该酶活性受到明显抑制,分别为对照的 80.9, 57.9, 32.0, 10.42, 10.0 及 9.0%。该酶在最适 pH 条件下,产生最高活性时所需 ATP 及  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度比为 1:1,其浓度为 3 mmol/L,  $K_m$  值分别为 1.2 及 0.2 mmol/L。

**棉酚对心肌线粒体膜 ATP 酶活性影响** 如图 1 所示,当 0.4 ml 反应体系中含有不同浓度棉酚时,酶反应显示,该酶活性随棉酚浓度增加而减少。反应体系中棉酚的浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时,酶活性为对照的 58%;棉酚浓度增加到 100  $\mu\text{mol/L}$  时,酶活性仅为 7% 左右。以反应速度(v)对棉酚浓度的倒数做图求其最大半抑制浓度( $K_i$ )为 25  $\mu\text{mol/L}$  (图 1)。

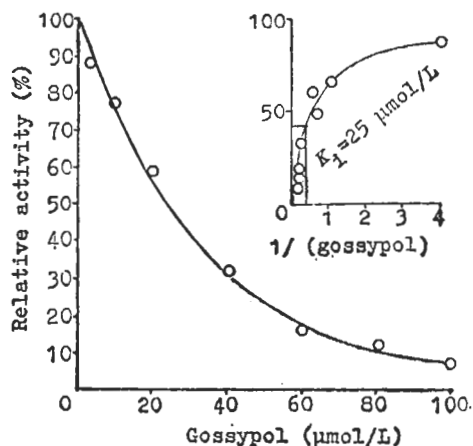


Fig 1. Inhibitory effects of gossypol acetic acid at different concentrations on myocardial mitochondria ATPase. Gossypol was dissolved in 10  $\mu\text{l}$  of dimethylsulfoxide.

**棉酚对该 ATP 酶抑制作用的时间过程** 当反应介质中有或无棉酚存在时,我们观察了该酶活性与保温时间的关系(图 2)。反应介质中棉酚浓度为 40 及 80  $\mu\text{mol/L}$  时,其酶活性均受到抑制。酶活性无论在有或无棉酚时,均随时间延长而增加,但反应到 15 min 后,保温时

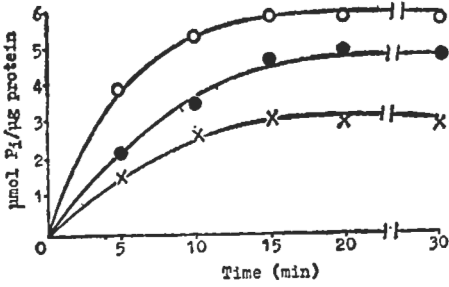


Fig 2. Time courses of ATPase activity in the presence of gossypol acetic acid. Gossypol 0 (○), 40 (●) and 80 (×)  $\mu\text{mol/L}$ .

间延长, 酶活性不再变化。

**棉酚对该酶的抑制作用与酶蛋白浓度的关系** 在有或无棉酚存在时, 该酶活性随酶蛋白浓度增加而增高, 并均呈线性关系(图 3)。

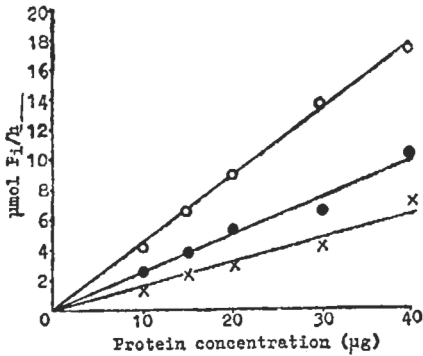


Fig 3. Effects of enzyme protein on ATPase activity in the presence of gossypol 0 (○), 40 (●) and 80 (×)  $\mu\text{mol/L}$ .

**棉酚对该 ATP 酶最适 pH 的影响** 当反应系统中棉酚浓度为  $60 \mu\text{mol/L}$  时, 除该酶活性降低外, 其最适 pH 范围稍示偏移(图 4)。

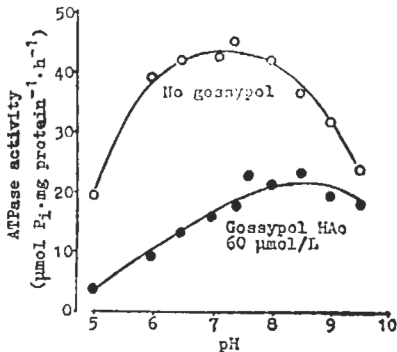


Fig 4. Effects of pH on ATPase activity in the presence of gossypol acetic acid.

**棉酚对该 ATP 酶的抑制类型** 通过棉酚对该 ATP 酶抑制作用的动力学分析, 对该酶的两个配体 ATP 及  $\text{Mg}^{2+}$  在有或无棉酚存在时, 与酶的结合进行了研究。在反应介质中, 在有或无棉酚存在条件下, 测定不同浓度的 ATP 及  $\text{Mg}^{2+}$  对该酶活性的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数做图法作图(图 5), 结果显示, 棉酚作为一种抑制剂, 对线粒体膜 ATP 酶底物 ATP 及  $\text{Mg}^{2+}$  表现非竞争性抑制。其  $K_i$  值分别为  $2.0$  及  $0.37 \text{ mmol/L}$ 。这一结果提示, 棉酚对该酶的抑制作用, 不因 ATP 及  $\text{Mg}^{2+}$  浓度增加而逆转, 推测棉酚与该 ATP 酶结合的位点不是 ATP 的位点, 而可能是形成无活性的棉酚-酶-ATP 的复合体。这一结果支持棉酚与一种酶或结构蛋白相结合, 引起 ATP 酶构象和 ATP 酶活性发生改变。

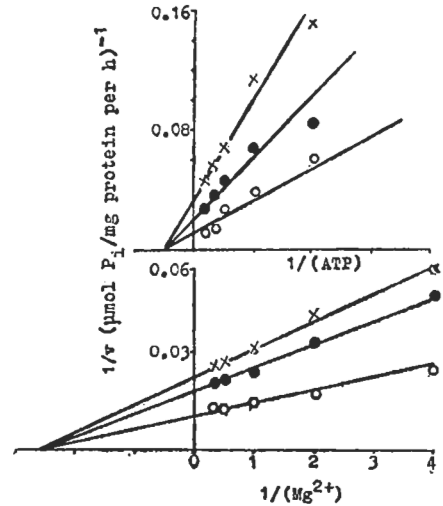


Fig 5. Effects of ATP (Tris salt) and  $\text{MgCl}_2$  on ATPase activity in the presence of gossypol. The double reciprocal plots all showed noncompetitive inhibition of gossypol with ATP and  $\text{Mg}^{2+}$  with  $2.0$  and  $0.37 \text{ mmol/L}$  of  $K_i$  values, respectively. Gossypol acetic acid 0 (○), 40 (●) and 80 (×)  $\mu\text{mol/L}$ .

## 参 考 文 献

- 1 Abou-Donia MB, Dieckert JW. Gossypol: uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Life Sci* 1974; 14 : 1953

- 2 Tso W-W, Lee C-S. Variations of gossypol sensitivity in boar spermatozoal electron chain segments. *Contraception* 1981; 24 : 569
- 3 Reyes J, Allen J, Tanphaichitr N, Bellvé AR, Benos DJ. Molecular mechanisms of gossypol action on lipid membranes. *J Biol Chem* 1984; 259 : 9607
- 4 Sordahl LA, Stewart ML. Mechanism(s) of altered mitochondrial calcium transport in acutely ischemic canine hearts. *Circ Res* 1980; 47 : 814
- 5 Ulrich F. The inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem J* 1963; 88 : 193
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 7 Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Ibid* 1925; 66 : 375

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 May; 9 (3) : 233-236

## Effects of gossypol acetic acid on heart mitochondrial membranes ATPase

DOU Shu-Jun, FU Yun-Feng (Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Hebei Academy of Medical Sciences, Shijiazhuang 050021)

**ABSTRACT** Gossypol exerted an inhibitory action on the mitochondrial ATPase of pig heart. The inhibition was increased either with increasing the concentration of gossypol or prolonging the incubation time. However, the ATPase activity was not longer changed after 15 min incubation at 37°C. It showed that gossypol 2.5-100  $\mu\text{mol/L}$  inhibited the ATPase activity by 13-93% with 25  $\mu\text{mol/L}$  of  $K_i$  value. Meanwhile, the ATPase activity was increased following increasing the concentration of enzyme protein in the absence or presence of gossypol 40 or 80

$\mu\text{mol/L}$  in the reaction system. The optimal pH value for the ATPase was shifted slightly to alkali by gossypol. The kinetic analysis showed that the inhibition type of the myocardial mitochondria ATPase by gossypol was noncompetitive with ATP and  $\text{Mg}^{2+}$ , the  $K_i$  value was 2.0 and 0.37 mmol/L, respectively. These results imply that gossypol may form an inactive complex with the enzyme-ATP.

**KEY WORDS** gossypol acetic acid; heart mitochondria; adenosine triphosphatase