

简报

绞股兰皂苷对人红细胞膜 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶作用的初步研究*

刘承勋 姚士硕 吴洪水

(安徽师范大学生物学系, 芜湖市) (芜湖市医学研究所)

绞股兰 [*Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino] 别名七叶胆, 系葫芦科绞股兰属多年生草质藤本植物。日本学者从该植物中分离得 50 余种皂苷, 其中有三种和人参皂苷相同^[1]。绞股兰具有多种药理活性, 临床证实它对多种癌症有一定疗效。此外还具有抗衰老和抗疲劳等功效^[2]。1986 年我们曾对皖南山区绞股兰的成分及其药理进行过研究。然而, 至今尚未见到绞股兰皂苷对红细胞膜 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶作用的研究报告。本文以人参皂苷为对照, 采用荧光素酶测定 ATP 含量的方法, 研究绞股兰皂苷对人红细胞膜 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶作用。

材料和方法

一、人红细胞膜的制备

按照 Dodge 等的方法^[3], 作若干改进。取新鲜健康人血红细胞 250 mL, 加入等体积的磷酸缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.4) 和 NaCl 配成等渗溶液, 于 4℃ 离心 (3500 转/分) 30 分钟。用上述溶液洗涤三次, 分得较纯净的红细胞。加入 40 倍体积 Tris-HCl (10 mmol/L, pH 7.4) 低渗溶液, 于 4℃ 冰箱中放置 30 分钟, 间歇搅拌几次, 使红细胞充分胀破。在 4℃ 离心 (7500 转/分) 30 分钟, 吸除上清液, 沉淀用同样条件洗涤三次, 最后加入等体积的 Tris-HCl (20 mmol/L, pH 7.4) 和 NaCl 配成的等渗溶液放入冰箱中备用。

分子筛凝胶柱 (Sephacrose 4B, Pharmacia) 1.6 × 23cm, 4℃ 保温, 用 Tris-HCl (20 mmol/L, pH 7.4) 与 NaCl 配成的等渗溶液充分洗涤凝胶柱。每次上样量 3 mL 膜液。以上述等渗液洗脱, 核酸蛋白检测仪 (HD-86-A1 型) 280 nm 波长检测, 自动收集红细胞膜流份。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定得不含血红蛋白的红细胞膜悬浮液。并以牛血清白蛋白 (Serva 产, 上海化学试剂分装厂分装) 为标准, 用改良的 Lowry 法测定膜液含蛋白浓度, 稀释成 1.5 mg/ml 的膜悬浮液, 放于低温保存备用。

二、人参皂苷及绞股兰皂苷的提取

(一) 取红参 (*Radix Ginseng Rubra*) 120g, 按王慕邹等方法^[4,5]制得人参总皂苷。精确称取人参总皂苷 10 mg, 用 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.4) 配成 1 mg/ml 溶液备用。

(二) 绞股兰总皂苷按竹本常松等方法^[1]稍加改进制备。先用三倍体积甲醇温浸绞股兰干粉四次, 减压蒸出甲醇, 得深褐色糖浆状粘稠物。拌以硅胶 H 粉, 再用乙醚脱色。其后操作按人参皂苷提取方法制得绞股兰总皂苷。精确称取绞股兰总皂苷 10 mg, 用 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.4) 缓冲液配成 1 mg/ml 溶液放入冰箱中保存备用。

三、(Na⁺-K⁺) ATP 酶活力的测定及人参与绞股兰皂苷对该酶活力影响的测定

本文采用荧光素酶测定 ATP 含量的方法^[6]。

(一) (Na⁺-K⁺) ATP 酶活力的测定

取离心管 9 支, 分为 3 组。每组加入 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.4) 100 μl, NaCl (150 mmol/L) 50 μl, KCl (30 mmol/L) 50 μl。除此, 第 1 组加水 250 μl; 第 2 组加入 Ouabain (0.1 mmol/L, E. Merck.) 50 μl 以抑制 (Na⁺-K⁺) ATP 酶活性, 红细胞膜液 (含蛋白 1.5 mg/ml) 200 μl; 第 3 组加入红细胞膜液 (含蛋白 1.5 mg/ml) 200 μl, 水 50 μl。各组于 37℃ 保温 5 分钟后, 迅速加入 ATP 二钠盐 (Sigma) 及 MgCl₂ (分别为 0.5 mmol/L 及 5 mmol/L) 溶液各 50 μl, 开始计时, 反应 1 小时后取出, 于 0℃ 离心 (10,000 转/分, Beckman J2-21M 型) 30 分钟。精确吸取上清液 200 μl, 按荧光素酶法测定各管中 ATP 含量。

第 1 组测得的 ATP 含量为 3.98×10^{-9} mol/L, 表示 ATP 在 37℃ 保温 1 小时自行分解后 ATP 剩余量。

第 2 组测得的 ATP 含量为 2.79×10^{-9} mol/L, 表示 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶被 Ouabain 抑制后, Mg²⁺

* 安徽省教委经费资助的科研项目。

ATP 等酶的水解量为 1.19×10^{-9} mol/L。

第 3 组测得的 ATP 含量为 1.22×10^{-9} mol/L。表示 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 酶全酶的水解量为 2.76×10^{-9} mol/L。

计算得 (Na^+-K^+) -ATP 酶的水解量为 1.57×10^{-9} mol/L。

(二) 人参和绞股兰皂苷对 (Na^+-K^+) -ATP 酶活力的影响的测定

取离心血管 36 支, 每 3 支为 1 组, 按上述测定

(Na^+-K^+) -ATP 酶活力的方法, 测定加入不同浓度的人参和绞股兰总皂苷对 (Na^+-K^+) -ATP 酶活力的影响。对照组为前述(一)项之第 3 组。

结 果

一、人参总皂苷对 (Na^+-K^+) ATP 酶的激活作用, 结果如表 1。

二、绞股兰皂苷对 (Na^+-K^+) ATP 酶的激活作用如表 2。

表 1 人参皂苷对 (Na^+-K^+) -ATP 酶作用

数值 项目 \ 组别	对照组	1	2	3	4	5	6
加入皂苷量 (μg)	0	5	10	20	30	40	50
ATP 剩余量 (10^{-10} mol/L)	12.21 ± 0.18	6.25 ± 0.21	6.92 ± 0.18	5.59 ± 0.08	4.30 ± 0.04	6.91 ± 0.05	7.60 ± 0.08
ATP 水解量 (10^{-10} mol/L)	27.58	33.54	32.87	34.20	35.49	32.88	32.19
激活量 (10^{-10} mol/L)		5.96	5.29	6.62	7.91	5.30	4.61

$n = 5$

表 2 绞股兰皂苷对 (Na^+-K^+) -ATP 酶作用

数值 项目 \ 组别	对照组	1	2	3	4	5	6
加入皂苷量 (μg)	0	5	10	20	30	40	50
ATP 剩余量 (10^{-10} mol/L)	12.21 ± 0.18	4.94 ± 0.23	6.25 ± 0.07	6.58 ± 0.12	7.76 ± 0.15	7.94 ± 0.13	8.63 ± 0.03
ATP 水解量 (10^{-10} mol/L)	27.58	34.85	33.54	33.21	32.03	31.85	31.16
激活量 (10^{-10} mol/L)		7.27	5.96	5.63	4.45	4.27	3.58

$n = 5$

加入皂苷后对酶的“激活量”为各组 ATP 水解量减去对照组酶促 ATP 水解量。

讨 论

一、绞股兰皂苷及人参皂苷在一定浓度范围内对人红细胞膜 (Na^+-K^+) ATP 酶起激活作用, 似与其三萜皂苷的特殊分子结构有关。

二、鉴于细胞膜中含有多种蛋白质和 ATP 酶, 实验结果表明绞股兰皂苷及人参皂苷对它们都有不同的激活作用。为了进一步揭示其中的规律, 今后有必要利用单一酶来探讨不同单一皂苷的作用。

本研究所用绞股兰, 承安徽师大植物分类学教授钱虎同志的帮助鉴定, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 竹本常松等:《药学杂志》1983, 103(2), 173; 1983, 103(10), 1015。
- [2] 郭生模等:《中草药》1987, 7, 37。
- [3] Dodge, J. T et al.: *Archs. Biochem. Biophys.*, 1963, 100, 119。
- [4] 王慕邹等:《药学报》1979, 14, 309。
- [5] 章观德等:《药学报》1980, 15, 175。
- [6] 王维光等:《生物化学与生物物理进展》, 1987, (6), 38。

[本文于 1988 年 4 月 19 日收到]