

醋酸棉酚对红细胞膜功能的影响

符云峰 张世联 王 薇

(河北省医学科学院实验医学研究所生化研究室, 石家庄)

提 要

本文报道醋酸棉酚对人红细胞膜功能和完整性的影响。棉酚浓度高于 $50\mu\text{M}$ 可致红细胞溶血, $10\sim 40\mu\text{M}$ 可促进 K^+ 外逸。1—2% 牛血清白蛋白可以对抗这些效应。5— $10\mu\text{M}$ 棉酚明显抑制红细胞膜 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶活性, K_i 值 $6.0\mu\text{M}$ 。

材 料 及 方 法

血样本取自河北省血站, 所用化学试剂购自化学试剂商店。

血样本制备 新鲜肝素化血液经反复离心和洗涤, 悬浮在不含 K^+ 的介质中 (含 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 0.1mM EDTA 及 5mM 葡萄糖)。

红细胞膜制备 取上述分离的部分红细

棉酚是从棉籽油提取的一种多酚物质。经动物实验及健康成年男性试用, 具有极可靠的抗生育效果^[1]。但长期服用有可能出现低血钾^[2]、细胞内 K^+ 含量减低^[3] 及肌无力^[4] 等体内 K^+ 平衡失调的副作用。据推测, 这些副作用是棉酚对细胞膜结构成分损害的效应。本研究的目的是要揭示棉酚的这类副作用的实质——对膜及膜功能的影响。为此取得的第一阶段结果报道如下。

均有所增大。这就意味着由于复合物氧化还原状态的改变, 通过蛋白和脂的相互作用, 使构成线粒体内膜的磷脂从极性基头部直至脂酰链的末端的运动状态都发生改变。

另外值得注意的一点是在底物氧化启动电子传递同时, H^+ 定向转运造成的膜电位可能会影响到膜脂的流动性。先于底物加入解偶联剂 FCCP 以取消 H^+ 梯度, 然后再加入底物仍可见膜脂流动性的增大, 提示底物引起的内膜流动性增加并非膜电位变化所致, 而是与底物启动的电子传递过程密切相关。

本文实验工作承复旦大学生物物理教研室提供荧光探针 2、6、9、12-AS, 谨此致谢。

参 考 文 献

[1] Hackenbrock, C. R.: *Trends, Biochem. Sci.*, 227, 613—626, 1981.

- [2] 程伯基等: 《生物化学杂志》, Vol. 2, No. 3, 37—43, 1986.
- [3] Shraitman, C. A. and Greenawalt, J. W.: *J. Cell. Biol.*, 38, 158—175, 1968.
- [4] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248—254, 1976.
- [5] Chance, B. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 54, 521—529, 1975.
- [6] Shinitzky, M. and Barenholz, Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, 515, 367—394, 1978.
- [7] Thulborn, K. R. and Saywer, W. H.: *Biochem. Biophys. Acta*, 511, 125—140, 1978.
- [8] O'Shea, P. S. et al.: *Biochem. J.*, 220, 795—801, 1984.
- [9] Hsia, J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 3412—3415, 1972.
- [10] De Kruijff, B. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 684, 47—52, 1982.
- [11] Daum, G.: *Biochem. Biophys. Acta*, 822, 1—42, 1985.
- [12] Fato, R. et al.: *FEBS Lett.*, 172, 6—10, 1984.
- [13] Mutet, C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 119, 854—859, 1984.

[本文于 1986 年 9 月 8 日收到]

胞,置于含有低张溶液的试管内,按 Swarts 等人^[5]的方法,制备去血红蛋白的红细胞膜(ghost)。

ATP 酶活性测定 通过测定 Pi 的释放量计算 ATP 酶活性。Mg²⁺, Na⁺, K⁺-ATP 酶活性测定介质 0.4 ml, 含 5mM MgCl₂, 5 mM Na₂ATP, 100mM NaCl, 10mM KCl 及 50mM 咪唑-HCl(pH7.4)。Mg²⁺-ATP 酶活性测定介质不含 KCl, 而含 1mM 哇巴因。反应自加入 20μg 膜酶蛋白开始, 在 37℃ 保温 30 分钟, 加入 1.5 ml 冰冷的 10% (W/V) 三氯乙酸停止反应。再加入 1.5ml 显色混合液 [9.6% (W/V) FeSO₄·6H₂O, 1.15% (W/V) 钼酸铵/0.66M H₂SO₄], 于室温 (20℃) 放置 30 分钟, 以 700nm 读取光密度。以标准磷溶液进行同样的颜色反应及测取光密度, 计算酶反应所释放的磷。从 Mg²⁺, Na⁺, K⁺-ATP 酶活性减去 Mg²⁺-ATP 酶活性, 即得 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性。

蛋白质含量按 Lowry 方法^[6]测定。

细胞内、外 K⁺ 浓度用原子吸收分光光度计测定。

醋酸棉酚购自无锡轻工业学院, 纯度 99%。用前溶于二甲亚砜溶液中, 以咪唑调 pH 为 7.4。进行实验时以等容量的二甲亚砜做平行对照管, 取校正后的净值为棉酚的实际效应。

实验采用双管或三管平行, 每一数值至少重复三次。所有数据进行统计学处理, 测取 t 值。

结果及讨论

ATP 酶活性

表 1 所列结果清楚表明, 醋酸棉酚能够抑

表 1 红细胞膜 ATP 酶活性

酶(例数)	酶活性, μmol Pi/mg 蛋白/小时, M±SD		
	棉酚 0μM	棉酚 5μM	棉酚 10μM
Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶 (11)	22.2±2.5	20.9±2.8	20.3±2.7
Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶 (11)	2.6±0.7	1.3±0.5*	0.7±0.5*
Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶/Mg ²⁺ -ATP 酶	0.1±0.04	0.07±0.03	0.04±0.03*

* 表示 P < 0.05

制 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性, 并呈浓度依赖性, Ki 值为 6.0μM。但不抑制 Mg²⁺-ATP 酶活性, 因此 Na⁺, K⁺-ATP 酶/Mg²⁺-ATP 酶活性比率减小并与棉酚浓度成反比。

这一结果提示, 棉酚能够直接抑制细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性, 这可能是造成细胞失 K⁺ 的主要机制之一。我们^[7] 利用自家兔肾外髓层制备的纯化的 Na⁺, K⁺-ATP 酶, 及叶益新等^[8] 利用自豚鼠肾脏制备的微粒体, 进行的酶动力学研究结果皆表明, 棉酚明显抑制 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性, 与底物 ATP 和其它配体呈非竞争性抑制。Abou-Donia^[9] 及 Olgati^[10] 认为, 棉酚可以抑制所有的膜结合酶, 可能与酶或结构蛋白相结合, 引起酶构象或膜结构变化。因此, 酶的活化型催化位点受到非特异性抑制或数目减少。

对红细胞完整性及 K⁺ 可渗透性的影响

为了查明棉酚对红细胞膜结构完整性的影响, 以一定量的红细胞与不同浓度的醋酸棉酚, 在室温 (20℃) 保温 1 小时。结果显示 (图 1), 棉酚浓度高于 50μM 可致细胞溃破溶血, 其程度随棉酚浓度增加而提高, 当保温介质内棉酚浓度达 800μM 时, 溶血达 100%。这表明棉酚与离体的红细胞直接接触时, 以一种未知机制对红细胞膜完整性造成损害, 估计主要是对膜脂质双层结构成分的破坏。

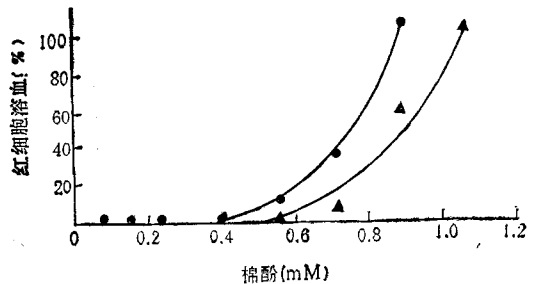


图 1 棉酚的溶血效应 (●) 及牛血清白蛋白 (1%) 的对抗作用 (▲)

鉴于整体情况下, 无论人或动物, 长期服棉酚并无溶血表现。我们考虑可能与血浆蛋白质成分具有某种保护作用有关。我们用分离的红细胞研究证明, 牛血清白蛋白 (BSA) 能够对抗

棉酚的溶血作用。当与 1% BSA 共保温时,开始出现溶血的棉酚浓度提高到 $100\mu\text{M}$,至 $1050\mu\text{M}$ 才完全溶血(图 1); 当同数目的红细胞与 $800\mu\text{M}$ 棉酚和不同浓度的 BSA 共保温时,1% BSA 为 80% 对抗、2% BSA 为 100% 对抗溶血(图 2)。

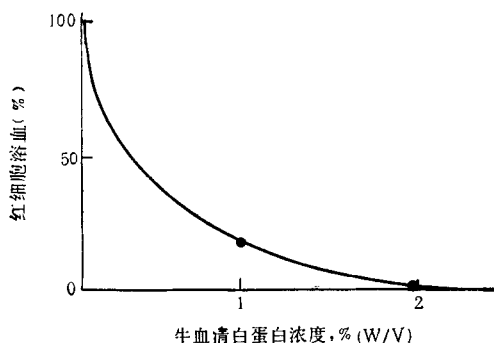


图 2 牛血清白蛋白对抗棉酚溶血

据 Juan Reyes 等人^[11]研究证明,棉酚是作为质子载体而与膜脂质双层结构蛋白相结合,可能主要是棉酚的醛基与蛋白质的自由氨基直接结合。推测 BSA 及整体情况下血浆蛋白质对抗棉酚溶血的作用,就是对红细胞膜的保护,阻止棉酚与膜蛋白相结合而实现的。确切机制有待研究阐明。

为了阐明非溶血低浓度棉酚对完整离体的红细胞膜 K^+ 可透渗性的影响,我们用等量的红细胞与不同浓度 ($10-40\mu\text{M}$) 的棉酚保温 30 分钟,发现棉酚可以提高红细胞膜的 K^+ 可渗透性, K^+ 外逸量随棉酚浓度提高而增加,而 BSA 可对抗这种效应(图 3)。这进一步说明棉酚对膜结构的损害过程及血浆蛋白质的保护作用。

上述结果提示,整体情况下长期服用棉酚可能出现的体 K^+ 水平减低及有关的临床症状,其关键机制是棉酚抑制肾小管细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性、减少近端小管 K^+ 重吸收和增加

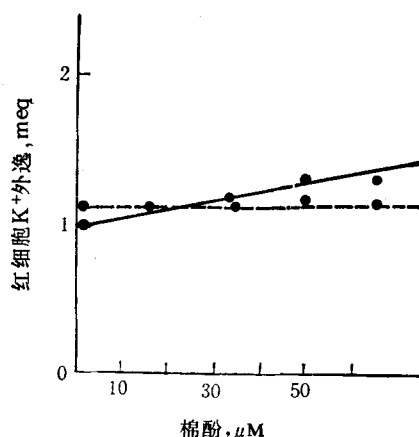


图 3 棉酚促细胞 K^+ 外逸 (●—●) 及 BSA 的对抗作用 (●---●)

远端小管 K^+ 分泌,造成肾性失钾。确切的机制可能比这些更复杂,可能涉及肾内各有关激素和酶系统,有待研究阐明。

棉酚致低血钾的副作用,存在明显的个体间和种属间差异,可能是细胞膜对棉酚毒性作用的敏感性或耐受性之不同所致。例如人最敏感,犬最不敏感;人群中棉酚致低血钾者不过百分之几^[1]。所以,探究其原因具有实际意义。

参 考 文 献

- [1] National Coordinating Group On Male Antifertility Agents: *Chinese Medical J.*, 4(6), 417, 1978.
- [2] 刘国振等:《中华医学杂志》, 65(2), 107, 1985.
- [3] 钱绍祯等:《药学报》, 14, 116, 1979.
- [4] 上海市棉酚协作组:《棉酚科研资料汇编》(上海市计划生育委员会科研处), 第 227 页, 1986 年 9 月.
- [5] Swartz, H. G. P. et al.: *Hypertension*, 3, 641, 1981.
- [6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [7] 符云峰等:《生物化学杂志》, 1987 年待发表.
- [8] 叶益新等:《中国药理学报》, 7(3), 265, 1986.
- [9] Abou-Donia, M. B. and Dieckert, J. W.: *Life Sci.*, 14, 1955, 1974.
- [10] Olgati, K. L. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 231, 411, 1984.
- [11] Juan Reyes, et al.: *J. Biol. Chem.*, 259, 9607, 1984.

[本文于 1986 年 9 月 22 日收到]