

胃 ($H^+ + K^+$)-ATPase 结构与功能的研究*

左凤蓉 李生广 林治焕

(中国科学院生物物理所,北京)

提 要

胃($H^+ + K^+$)-ATPase 属于生物膜的第二类质子泵(E_1E_2 型),从生理角度它是胃酸分泌的质子泵。本文结合我们初步的研究结果:猪、大白鼠胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase 的纯化以及由消炎痛引起的急性胃粘膜病变与胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase 的关系等,对此酶在近十几年来它的纯化、结构、性质、催化机理,向胃腔分泌盐酸的功能及其调节和胃病变的分子机理等方面进行了简要的综述。

一、引 言

胃的($H^+ + K^+$)-ATPase 是 70 年代初^[1,2](Forte 和 Lee)在脊椎动物胃粘膜中发现的一类新的离子主动跨膜转运酶。属于生物膜上的第二类质子泵(E_1E_2 型),该酶在胃酸分泌中起中心作用,是胃的高效质子泵。它的功能主要是通过 ATP 水解的放能反应偶联,进行主动的 H^+/K^+ 的电中性(electroneutral)跨膜离子交换转运^[3],最终在胃粘膜上形成 $10^6:1$ 的跨膜质子梯差。由此可见,胃的($H^+ + K^+$)-ATPase 不仅是研究离子转运酶的一个理想模型,而且是胃酸分泌研究的分子基础。由于上述两个特点,此酶的研究日益受到国际上的重视。近十年来,随着生化与生物物理技术的发展,该酶的结构和功能已取得较大的进展^[4-6],同时在质子泵的多层次调节以及胃病变机理等方面也有了一些初步的结果。这里仅就上述几方面的研究结果作一综述。

二、胃的 ($H^+ + K^+$)-ATPase 在泌酸细胞中的定位

壁细胞(parietal cell)是胃腺的组成细胞之一,它的主要功能是向胃腔分泌盐酸。壁

细胞的超微结构特点是与它的酸分泌功能紧密相关的,该细胞内含丰富的线粒体,能够为质子的主动运输提供充足的能量。当它处于不分泌酸的静止状态时,细胞内含有大量的管囊状内质网膜;当它受胃促分泌素刺激而处于分泌状态时,细胞内的管囊状内质网膜剧减,而同时伴随细胞的顶端质膜数量的等量剧增^[7],扩大的质膜面伸入细胞内,形成带粗短绒毛的分泌小管。显然,扩大的质膜表面来源于随刺激而减少的内质网膜。用($H^+ + K^+$)-ATPase 的单克隆抗体标记,免疫电镜的观察结果表明^[8]:($H^+ + K^+$)-ATPase 在静止状态的壁细胞中定位于细胞内的管囊状的内质网膜上,而在分泌态时则定位于细胞的顶端质膜上。根据上述事实,Forte 等人提出了膜的融合循环假说^[9],用以解释刺激物对胃酸分泌的激素调节。他们认为当壁细胞受刺激时,原来位于细胞内质网膜上的潜在质子泵——($H^+ + K^+$)-ATPase,将会随着膜的融合而转移到细胞的顶端质膜上,成为启动的质子泵,向胃腔分泌质子,而一旦壁细胞不再受刺激后,($H^+ + K^+$)-ATPase 又会随膜转移到细胞内部,此时,质子泵关闭,恢复

* 得到国家自然科学基金会的资助。

原来潜在的质子泵状态。

三、胃的 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的纯化

胃的 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 至目前为止已从 7 种动物的胃粘膜中分离纯化出来。它们是：牛蛙、鸡、兔、狗、猪、大白鼠和人。但从大白鼠中成功制备的报道不多，有的实验室曾报道过他们制备失败的结果^[4,10]。

纯化 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的大致过程是：胃底粘膜的组织刮落层在适当的等渗缓冲液中匀浆以后，经差速离心除去大部分的膜杂质，得到粗的微囊体组分，该组分再经过不连续或连续梯度离心进一步纯化，收集适当密度的膜组分，即为含 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 活力的梯度纯的微囊体膜组分。1981 年 Walosin 和 Forte^[11] 报道了来自静止壁细胞和分泌壁细胞的两种类型的微囊体：即未受刺激的胃微囊体 (gastric vesicles) 和受刺激的胃微囊体 (stimulated gastric vesicles) 在结构和功能上的差异，从分离角度看，前者的密度小于后者的密度。

四、胃 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的结构

纯化的微囊体组分经 SDS-凝胶电泳分析表明 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 是由 M_r 为 100000 的亚基组成^[12]。用胰酶水解^[13]和单克隆抗体标记结果^[14]表明： M_r 为 100000 的亚基并不均一，而是由三种亚基组成的：其中包括催化亚基，糖蛋白亚基和一种性质目前尚不清楚的亚

基蛋白。等电聚焦电泳显示出糖蛋白亚基糖组分的不均一，又由于测得具有活力的酶的表观 M_r 为约 3.0×10^5 左右，所以 Saccomani^[15] 等提出 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的亚基组成是异三聚体： $\alpha\beta\gamma$ 的形式。但这仅仅是一种假说，直接证据还需要通过纯化出亚基以及酶的晶体衍射分析才能得到。近年来，酶的结构研究又有新的突破。1986 年得到大白鼠胃 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的氨基酸序列^[16]。Smolka 等先后在 1983 和 1986 年得到猪和人的 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的单克隆抗体^[14,17]；1985 年 Farlay 等^[18]又成功对猪胃 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 催化亚基上的活性位点肽段的氨基酸顺序进行了分析，这一肽段的序列是：His-Val-Leu-Val-Met-Lys-Gly-Ala-Pro-Glu-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg，这一结果与用氨基酸残基修饰剂对酶的研究相印证，得出该肽段的 His 咪唑基、Glu 羧基^[17]、Arg 或 Lys 氨基^[17]是参与催化功能的基团。此外，肽段之外的 Cys 的巯基也是活性所必需的基团。1986 年 Saches 和 Edwin^[19] 等又获得猪胃 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的 E_2 型微晶，为研究膜结合的 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的三维结构提供了一个努力的方向。

五、胃 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 的性质和催化机理

胃 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 对底物 ATP 具有高的亲和专一性，文献报道 ATP 的 K_m 值在 $20-100 \mu\text{mol/L}$ ^[20]，还有人报道 ATP 具有高、

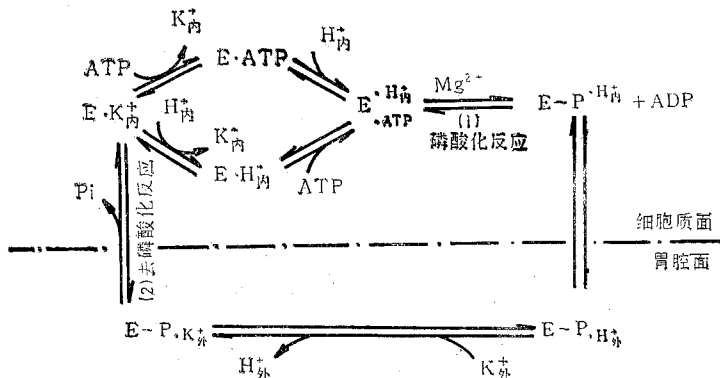


图 1 $(H^+ + K^+)$ -ATPase 催化反应机制

低两个亲和位点存在。除了 ATP 的水解作用, $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 还具有 PNPPase (对硝基酚磷酸酯酶) 的活力, PNPPase 活力是 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 一个分步反应活力另一个侧面的反映。 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的活力需要 Mg^{2+} 的存在, 同时酶的活力在生理条件下受 K^+ 专一激活, 但体外实验表明, 其他单价阳离子对酶活亦有不同程度的激活, 它们的顺序是: $\text{Ti}^+ > \text{K}^+(100) > \text{Rb}^+(76) > \text{NH}_4^+(20) > \text{Cs}^+(16)$, 但 Na^+ 、 Li^+ 对它没有激活作用。另外 Na^+ 、 $\text{K}^+\text{-ATPase}$ 的专一性抑制剂对它也没有影响。

$(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的最适 pH 是 7.5, 但由于 $[\text{K}^+]$ 、 $[\text{ATP}]$ 在测定条件下的不同, 所得的结果有很大差异, 亦有报道其最适 pH 为 6.7—7.0 的^[21]。

胃的 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的催化机理与 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 十分相似, 它的详细过程见图 1。 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的催化过程可以分为两步: 第一步是 ATP 与酶结合后, 通过依赖 Mg^{2+} 的激酶反应形成稳定的磷酸化酶中间产物 ($\text{E} \sim \text{P}$) 同时释出 ADP; 第二步是通过 K^+ 激活的磷酸酶反应水解磷酸化酶中间产物, 形成游离酶并释出 P_i 。 在酶的磷酸化与去磷酸化过程中, 伴随酶的两种构象互变, H^+ 由细胞内转运到胃腔, 而 K^+ 则由胃腔中转运到壁细胞内, 从而完成整个 ATP 水解——质子转运偶联反应的循环。

六、胃 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 对磷脂的依赖性

由于 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 是膜结合酶, 因此它的功能必然与周围膜脂的存在以及物理状态紧密相关。研究表明: $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的微囊体膜富含胆固醇和磷脂, 尤以 PC, PE 的含量为最高。用磷脂酶水解^[22]以及重组手段揭示了 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 酶活对磷脂很强的依赖性, 但酶与磷脂之间是否存在专一性的相互作用目前尚不清楚。

七、胃 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的抑制剂

已发现该酶有许多非专一性抑制剂, 象氨基酸残基的巯基、羧基、氨基、咪唑基的专一性修饰剂, 还有 Zn^{2+} 、 F^- 和钒酸盐等都属此类抑制剂。它们在酶活性部位的结构以及催化机理的研究方面起了很好的探针作用^[19,21]。但由于缺乏专一性, 很难用来研究质子泵的调节问题, 为此人们一直试图找到 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的一种专一性的抑制剂, 但直到近年, 才由药物学家在筛选抗胃溃疡的药物中合成研制出来, 该药物的英文名称是 omeprazole, 属苯并咪唑类衍生物, 它具有一个与 Cys 的 -SH 共价作用的潜在功能基团, 在酸性条件下可以共价氧化酶活性必需的 -SH 基团, 而专一抑制酶活。酶专一性抑制剂的发现, 为胃酸分泌调节研究提供了有用的探针, 同时 omeprazole 的抗溃疡药效也为研究胃病变的分子机理提供了线索^[23]。

八、胃 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的胃微囊体的质子转运功能

新制备的 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的完整微囊体膜的质子转运功能, 最早是由 Lee^[2] 等人在狗的胃微囊体上发现的。他们发现, 当把 ATP 加到与 K^+ 和 Mg^{2+} 事先保温一定时间的狗胃微囊体悬浮介质中时, 介质将发生碱化。这表明微囊体膜上的 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 消耗了加入介质的 ATP, 同时将介质中的质子主动转运到囊膜内。这暗示了匀浆所成的微囊体是细胞完整膜内翻外的产物 (inside-out vesicles)。以后 Saches^[3] 等人又证明了这种质子

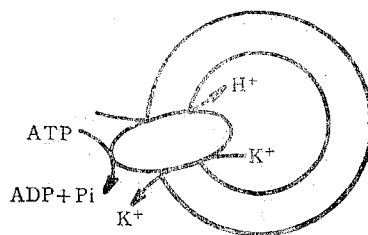


图2 内翻外胃 $(\text{H}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 微囊体的 H^+ 转运模式及底物、配基的定位

泵的性质是 ATP 驱动的 K^+/H^+ 的电中性交换形式(图 2)。由于上述两大发现,人们才真正确认了 $(H^+ + K^+)-ATPase$ 在胃酸分泌中的质子泵作用。但微囊体所产生的跨膜质子梯度却要比完整胃要低得多,有人估计是与膜的质子泄漏以及质子泵在制备过程中的部分失活有关。除了对微囊体主动质子运输的研究,有人还利用同位素的方法对膜的离子通透性和电化学性质作了研究,表明受刺激的微囊体和不受刺激的微囊体在膜的通透性上尤其是对 K^+ 的通透性存在很大差异^[24],这一点将在下文解释。

九、胃酸分泌以及胃微囊体在质子转运过程中的 K^+ 循环问题

如前所述, Forte 等人已对胃促分泌素调控胃酸分泌的机制提出过膜融合——循环假说,但假说的不完善处是没有对胃酸分泌过程中 K^+ 的循环作出合理的推想。我们知道,当位于壁细胞顶端质膜上的质子泵 $(H^+ + K^+)-ATPase$ 启动以后,它将不断向细胞外的胃腔泵出质子,同时以电中性方式从胃腔中交换等摩尔 K^+ 进入细胞中,所以维持质子泵正常运转需要胃腔中的 $[K^+]$ 保持恒定,而质子泵的运转又不可避免导致胃腔中 $[K^+]$ 的降低,那么机体在处于受刺激的泌酸状态时,是怎样从别的途径补充胃腔中的 K^+ 以维持其浓度的恒定呢?这一问题由 Wolosin 等人在 1981 年圆满地用实验作了解答^[41],他们发现,来自静止壁细胞的管囊状内质网的微囊体与来自受刺激的分泌壁细胞顶端质膜的微囊体在 K^+ 通透性上存在很大的差异,前者对 K^+ 具有低通透性,而后者对 K^+ 具有高通透性,这就暗示在分泌状

态下壁细胞的顶端质膜上存在一个 K^+ 的循环系统,即质子泵—— K^+ 通道系统,当质子泵将胃腔中为 K^+ 主动转运到细胞内时, K^+ 通道又能迅速地将 K^+ 通过被动运输释放到胃腔中,从而保证了胃酸分泌过程中胃腔中 $[K^+]$ 的恒定。综上所述,胃刺激物(激素)对胃酸分泌的调节是通过将质子泵转移到顶端质膜上和在质膜上建立 K^+ 循环系统而实现的(图 3)。

十、胃 $(H^+ + K^+)-ATPase$ 研究的发展趋势

虽然胃 $(H^+ + K^+)-ATPase$ 的结构和功能研究在近十几年来已取得一些突破性的进展。但仍然存在许多未解决的问题。一类是与酶结构本身相关的问题:诸如亚基的组成、亚基间的空间排列、亚基的三维空间构象以及酶与磷脂的相互作用。另一类是与胃酸分泌相关的问题:如质子泵在胃酸分泌中的调节以及胃病变的分子机理研究。解决前一类问题的关键是纯化问题,鉴于膜蛋白的特性,有人提出用单克隆抗体免疫亲和层析来分离纯化酶的亚基,由于近年来已制备出 $(H^+ + K^+)-ATPase$ 的单克隆抗体^[14,17]和得到酶的微晶体^[19],使上述几方面的工作成为可能。关于质子泵在胃酸分泌中的调节问题,已有初步结果表明 Ca^{2+} 和 cAMP 是参与调节的第二信使,但调节方式仍不清楚,这一问题很可能成为今后研究质子泵的一个热点。对胃病变的分子机理的研究,是一个比较复杂的问题,因为胃酸分泌失调可能在机体不同层次发生。从现有的情况看,质子泵的失调有几种可能性:可能性之一是神经调控紊乱在激素水平造成胃刺激素的分泌异常,从而导致质子泵运转异常;可能性之二是胃刺激素对壁细胞失去调节作用,使质子泵始终处于关闭或启动状态;可能性之三是质子泵的中间调节物:如 cAMP 和 Ca^{2+} 的代谢异常,从而导致整个泌酸细胞代谢异常以至癌变;可能性之四是质子泵本身含量和结构由于遗传或外界因素影响而发生异常。目前的研究还无法从多种选择中找出肯定的答案,这一工作可能需要生物化学家、

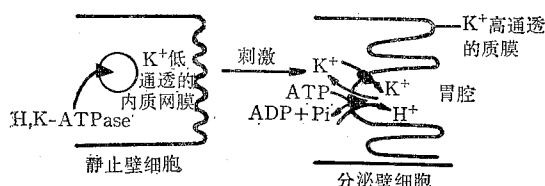


图 3 胃酸分泌的 K^+ 循环

生理学家和药物学家的共同协作才能完成,而这样的协作团体国际上正在逐渐形成,而且已取得初步的结果^[23]。

我们近两年来也对胃($H^+ + K^+$)-ATPase开展了一些探讨性的研究,并在两方面有了一定的结果(待发表)。(1)从纯化方面,我们用一种疏水性质的 T-Gel 对 one-step 梯度离心纯的猪($H^+ + K^+$)-ATPase 微囊体,在疏水层析柱上作了进一步的纯化,将很难分离的 Mg^{2+} -ATPase 大部份从($H^+ + K^+$)-ATPase 中除掉。另外,我们摸索了在国际上尚少成功报道的大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase 的制备方法,在实验室现有的条件下制备出较高活力的($H^+ + K^+$)-ATPase,从而研究了 ATP 浓度、pH 及 K^+ 对大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase 活力以及胃囊泡主动质子转运速度的影响。(2)在胃酸调节和胃病变机理方面,我们选用大白鼠作为模型动物,对由消炎痛引起的急性胃粘膜病变与胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase 活力的关系进行了初步探讨。整体和离体实验结果皆表明,消炎痛对大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase 有抑制作用。而对萎缩性胃炎有显著疗效的“维酶素”可使有急性胃粘膜病变的大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase 活力恢复到正常水平,但其如何与胃($H^+ + K^+$)-ATPase 作用及其对胃粘膜病变的药理机理还不甚清楚,有待于进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Forte, J. G. et al.: *J. Cell Physiol.*, 1974, 69, 293.

(上接第 420 页)

- [13] Scheidereit, C. et al.: *Cell*, 1987, 51, 783.
- [14] Maniatis, T. et al.: *Science*, 1987, 236, 944.
- [15] Gerster, P. et al.: *EMBO J.*, 1987, 6, 1323.
- [16] Sen, R. & Baltimore, D.: *Cell*, 1986, 46, 705.
- [17] Briskin, M. et al.: *Science*, 1988, 242, 1036.
- [18] Atchison, M. & Perry, R. P.: *Cell*, 1987, 48, 121.
- [19] Harrelson, A. L. & Goodman, C. S.: *Science*, 1988, 242, 700.

- [2] Lee, J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 60, 825.
- [3] Saches, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 7690.
- [4] J. J. H. M. de, pont and S. L. Bonting: *Structure and Mechanism of Gastric K, H-ATPase*, Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, Oxford, 1982.
- [5] Wolosin, J. M.: *Am. J. Physiol.*, 1985, 248, G595.
- [6] Forte, J. G. et al.: *Bioscience*, 1985, 35, 38.
- [7] Ito, S. et al.: *Gastroenterology*, 1977, 73, 889.
- [8] Smolka, A. et al.: *Am. J. Physiol.*, 1983, 245, G589.
- [9] Forte, J. G.: *Gastroenterology*, 1977, 73, 941.
- [10] Saches, G. et al.: *Gastric Secretion, In Intern. Rev. Physiol., Gastrointestinal Physiology*, University Park Press, Baltiwores, U. S. A. 1977, 12, 147.
- [11] Wolosin, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 3149.
- [12] Saccomani, G. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 465, 311.
- [13] Chang, H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 464, 313.
- [14] Smolka, A. et al.: *Am. J. Physiol.*, 1983, 245, G598.
- [15] Saccomani, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 7727.
- [16] Gary, E. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 16788.
- [17] Smolka, A.: *Gastroenterology*, 1986, 90, 532.
- [18] Robert, A. Farley, et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 3899.
- [19] Edwin, Raban, et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 1434.
- [20] Saches, G. et al.: *Physiol. Rev.*, 1978, 58, 106.
- [21] Ray, T. K. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1978, 443, 451.
- [22] Bonting, S. L. et al.: *Biochem. Soc. Transact.*, 1980, 8, 40.
- [23] Elander, B. et al.: *Scand. J. Gastroenterol.*, 1986, 21, 268.
- [24] Wolosin, J. M. et al.: *J. Membr. Biol.*, 1983, 71, 195.

[本文于1988年6月30日收到]

- [20] Dustin, M. L. et al.: *Immunol. Today*, 1988, 9, 213.
- [21] Anderson, P. et al.: *Immunol. Today*, 1988, 9, 199.
- [22] Nossal, G. J. V.: *Immunol. Today*, 1988, 9, 286.
- [23] Benoist, C. et al.: *Immunol. Today*, 1986, 7, 138.
- [24] William, G.: *Trends in Biotechnol.*, 1988, 6, 36.
- [25] Hood, L. et al.: *Cell*, 1985, 40, 225.

[本文于1988年6月30日收到]