

蟾酥中甾体物质对钠、钾 ATP 酶的抑制

王理开* 林其谁

(中国科学院上海生物化学研究所)

蟾酥是蟾蜍腮腺分泌的毒液干燥物,有强心、止痛、解毒、消肿等作用。它的应用在祖国医学上已有悠久的历史,至今许多中药成药如六神丸、痧气丸和梅花点舌丹等都含有蟾酥。毛主席教导我们:“中国医药学是一个伟大的宝库,应当努力发掘,加以提高。”我们在过去蟾酥组工作的基础上,对蟾酥的主要成分——蟾蜍精类中的三种化合物进行了研究。初步的结果表明 Resi 蟾毒配基(Resibufogenin)、华蟾蜍精(Cinbufagin)和蟾蜍灵(Bufalin)对人红血球 Na^+ , K^+ -ATP 酶有强烈的抑制作用,三种化合物的抑制能力与它们的药理作用强度有一致的关系,说明蟾蜍精类对生物体的作用可能是通过抑制体内细胞膜上 Na^+ , K^+ -ATP 酶而表现出来的。此外,本文还通过蟾蜍精类与乌本苷的抑制作用的比较,对人红血球 Na^+ , K^+ -ATP 酶的作用机理进行了讨论。

材料和方法

蟾蜍中蟾蜍精类的分离提取:参考小松曼着的方法提取(1967)。从上海市药材公司购得上海产片酥,用球磨机研磨成粉,置索氏提取器中用氯仿回流提取约 40 小时,氯仿提取液减压浓缩后得油状物,用 80% 甲醇水溶液按体积重量比 1:1 溶解,再用等体积正戊烷抽提 10 次,含水甲醇层减压抽干,准备上柱分离。

层析柱高 1.5 米,直径 2 厘米,内装 100—200 目层析用硅胶干粉,上柱样品与少量硅胶拌和并干燥后装在柱的上端,样品的高度约为 3 厘米。用己烷馏份:丙酮 = 5:1(体积比)洗脱,分部收集,可得纯 Resi 蟾毒配基及华蟾蜍精与蟾蜍灵的混合物。后者再用硅胶柱层析,用

氯仿:己烷馏份 = 3:2(体积比)洗脱即可分开。

柱层析各管用硅胶薄板层析鉴定,展开溶剂一般为氯仿:丙酮:环己烷 = 3:3:4(体积比),显色剂为 20% 三氯化锑的氯仿溶液,Resi 蟾毒配基呈淡绿色,华蟾蜍精呈褐色,蟾蜍灵呈青蓝色。

Resi 蟾毒配基在丙酮、己烷馏份中重结晶后使用,华蟾蜍精及蟾蜍灵在氯仿、己烷馏份中重结晶后使用。

三种蟾蜍精类化合物均用 80% 乙醇配成溶液使用,加入反应系统中的乙醇含量不超过 0.5% (体积比)。若加入体积在 0.02 毫升以下时,则用微量注射器加入。

ATP 的纯化:为了提高酶活力测定的精确度,我们将本所东风生化试剂厂生产的纯度在 80% 以上的 ATP 二钠盐用阴离子交换柱予以进一步纯化。具体操作如下:300 毫克 ATP 二钠盐溶于 30 毫升蒸馏水中,用 0.2 N 氢氧化钠调节 pH 至 6.5—7.0,上 4×1 厘米的阴离子交换柱(上海树脂厂出品,711 氯型),流速约为 1 毫升/分。然后依次用 120 毫升 0.02 N HCl—0.02 M NH_4Cl 及 60 毫升重蒸水洗涤,最后用 0.2 N HCl 洗脱,分管收集。洗脱液立即用 0.5 M Tris 调节 pH 至 6.5—7.0,根据 260 毫微米光吸收来计算 ATP 浓度(克分子消光系数以 15.4×10^3 计),并加 MgCl_2 溶液与重蒸水,使配成 5×10^{-3} M ATP— 7.5×10^{-3} M MgCl_2 溶液,分装于带塞玻璃管,冰冻保存,三周内使用。以上操作均在 4°C 左右进行。

* 广州中山医学院生化教研组进修同志

乌本苷 (Ouabain) 系 E. Merck 公司产品。Tris 为本所东风生化试剂厂产品。硫酸为优级纯, 其他试剂均为分析纯级。所有试剂皆用全玻璃重蒸水配制。

人红血球膜的制备: 全血分离血浆后得到的人血球用四倍量左右的生理盐水洗涤, 低速离心, 小心吸去上层液与白细胞层后, 红血球重复洗涤一次, 以尽量除去血浆蛋白与白细胞。得到的红血球加十倍体积的低渗溶液 (含 $8 \times 10^{-3} M$ Tris-HCl, $2.5 \times 10^{-4} M$ EDTA, pH 7.4), 搅匀, 稍放置后, 在 $27,000 \times g$ 离心 30 分钟, 小心倾去上层液, 沉淀再用上述低渗液洗涤, 共 4—5 次。若管底有红色胶状物粘贴, 可将上层沉淀物转移离心管, 以除去胶状物。最后得白色或微红色红血球膜。加蔗糖溶液使配成 $7.5 \times 10^{-2} M$ 蔗糖的红血球膜制剂, 膜浓度一般在 3—5 毫克干重/毫升左右。冰冻保存, 作为 Na^+ , K^+ -ATP 酶制剂。在第一次使用前冻融三次。以上操作均在 $0-4^\circ C$ 进行。

在需精确计算钠离子浓度的系统中进行酶活力测定时, 红血球膜制剂的制备步骤与上述相同, 但低渗液改为 $1 \times 10^{-2} M$ Tris-HCl, pH 7.4, 以避免由 EDTA 带入的钠。如此制备的膜制剂, Na^+ , K^+ -ATP 酶活力略低一些。

Na^+ , K^+ -ATP 酶活力测定系统除注明者外均含: $NaCl 6 \times 10^{-2} M$, $KCl 1 \times 10^{-2} M$, EDTA $2.5 \times 10^{-4} M$, $MgCl_2 1.5 \times 10^{-3} M$, $ATP 1 \times 10^{-3} M$, $Tris-HCl 3 \times 10^{-2} M$, pH 7.4, 总体积 2.5 毫升。膜制剂与反应液 (未加 $MgCl_2$ 与 ATP) 在 $37^\circ C$ 预保温 10 分钟后, 加入 $MgCl_2$ -ATP 溶液开始反应。反应时间一般为 90 分钟, 移冰浴停止反应。然后加入冷 55% 三氯乙酸 0.25 毫升沉淀蛋白, 离心, 取上清液按 Kuttner 氏法定磷 (J. B. C. 1930)。在此条件下, 反应速度与酶量成直线关系。

在每次活力测定的同时, 测在同样条件下而有 $1 \times 10^{-4} M$ 乌本苷存在下的 ATP 酶活力 (非 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力), 以不含乌本苷时的酶活力 (总 ATP 酶活力) 减去含乌本苷时的活力, 即得在此条件下 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活力。空

白管不含酶, 在同样条件下测定。

结 果

蟾蜍精类化合物对人红血球 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制: 我们提纯的三种蟾蜍精类化合物对人红血球膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶均有强烈的抑制作用。图 1 表示不同浓度的 Resi 蟾毒配基对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制, 曲线的形状与乌本苷的抑

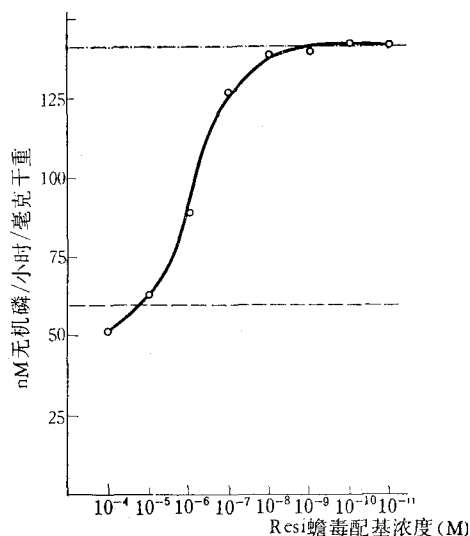


图 1 Resi 蟾毒配基对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制

— — — 不含抑制剂的酶活力 (总 ATP 酶),
— — — 在 $1 \times 10^{-4} M$ 乌本苷存在下的酶活力 (非 Na^+ , K^+ -ATP 酶), 两者之差代表 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力

制曲线 (图 2) 大致相似。从图 1 与图 2 分别求得 Resi 蟾毒配基与乌本苷对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的半抑制浓度 (I_{50}) 均为 $5 \times 10^{-7} M$ 。华蟾蜍精与蟾蜍灵的抑制作用比较强, 它们的 I_{50} 分别为 $1.3 \times 10^{-7} M$ 和 $1 \times 10^{-7} M$ 。

从图 1 与图 2 尚可看到, $1 \times 10^{-4} M$ 乌本苷已完全抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶, 在 $1 \times 10^{-3} M$ 乌本苷存在下活力测定的结果与 $1 \times 10^{-4} M$ 的完全相同。然而, 高浓度的 Resi 蟾毒配基 ($1 \times 10^{-4} M$) 以及华蟾蜍精和蟾蜍灵却会产生比 $1 \times 10^{-4} M$ 乌本苷还要大的抑制作用。这可能是由于 Resi 蟾毒配基等对其他 ATP 酶也有抑制作用, 但也提示可能在人红血球膜上存在着不止一种 Na^+ , K^+ -ATP 酶。

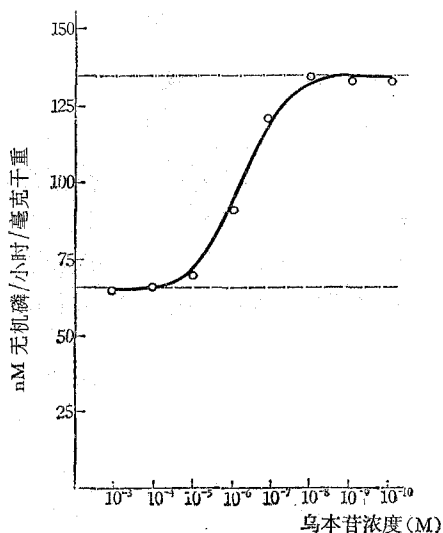


图2 乌本苷对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制
 ——— 不含抑制剂的酶活力(总 ATP 酶),
 - - - - 在 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 乌本苷浓度下的酶活力(非 Na^+ , K^+ -ATP 酶),两者之差代表 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力

图3系不同底物浓度下, Na^+ , K^+ -ATP 酶活力与底物浓度的双倒数作图。如图所示,在我们的测定条件下, Na^+ , K^+ -ATP 酶对底物 MgATP 的米氏常数为 $4 \times 10^{-4} \text{M}$, Resi 蟾毒配基起着反竞争性抑制剂的作用, K_i 为 $5 \times 10^{-7} \text{M}$, 与从图1求得的相同。

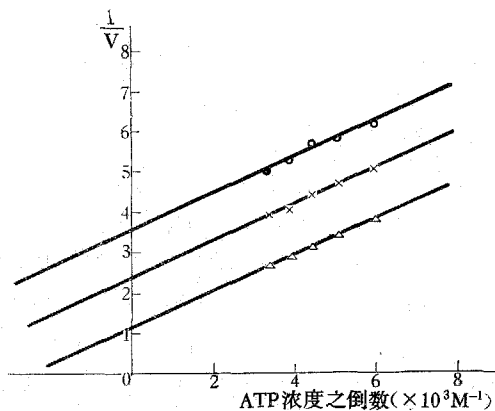
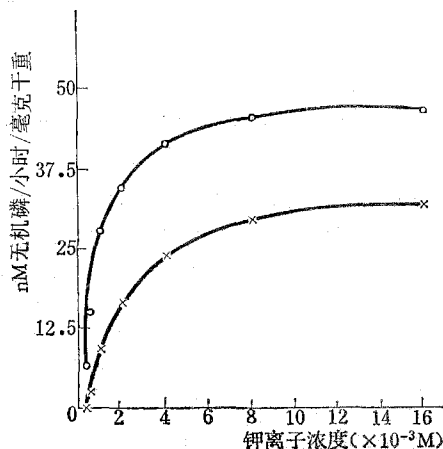


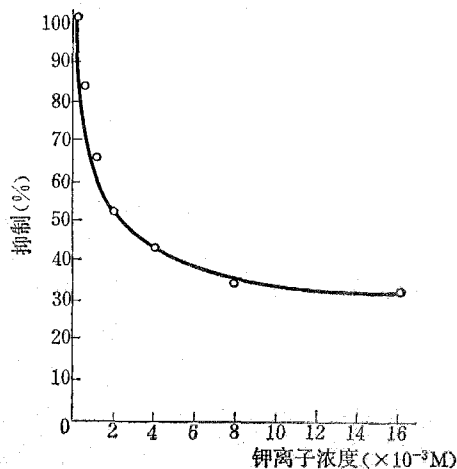
图3 底物浓度与 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力关系的双倒数图

$\triangle$ — $\triangle$ 不含抑制剂, $\times$ — $\times$ 含 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ Resi 蟾毒配基, $\circ$ — $\circ$ 含 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ Resi 蟾毒配基, $\text{Mg}:\text{ATP} = 1.5:1$, 除 MgATP 浓度外,其余反应条件如方法所述

钾离子浓度对抑制作用的影响:如图4(A)所示,在反应系统中随着钾离子浓度的增加, Na^+ , K^+ -ATP 酶活力显著增加,而 Resi 蟾毒配基对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制作用在钾离子浓度低时要比钾离子浓度高时明显得多。图4(B)是同一个实验结果以 Resi 蟾毒配基对 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力抑制的百分数来表示,说明钾离子有对抗 Resi 蟾毒配基对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑



(A)



(B)

图4 钾离子对 Resi 蟾毒配基抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶作用的影响

(A) $\circ$ — $\circ$ 不含抑制剂时 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力, $\times$ — $\times$ 含 $3 \times 10^{-7} \text{M}$ Resi 蟾毒配基时 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力。除钾离子浓度外其余反应条件如方法所述
 (B) 图4(A)的数据以抑制百分数表示

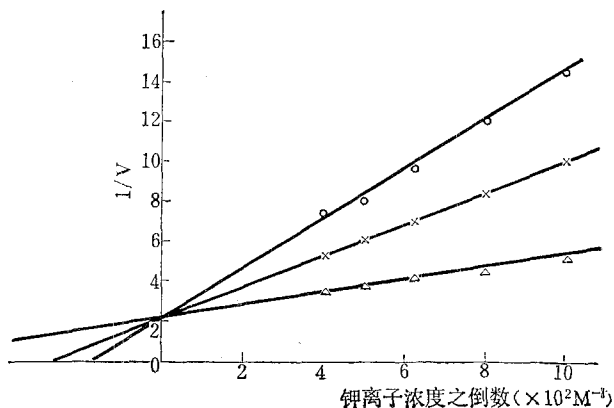


图5 钾离子浓度与 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力关系的双倒数图

$\triangle$ — $\triangle$ 不含抑制剂, $\times$ — $\times$ 含 $1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ Resi 蟾毒配基, $\circ$ — $\circ$ 含 $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ Resi 蟾毒配基, 除钾离子浓度外, 反应条件如方法所述

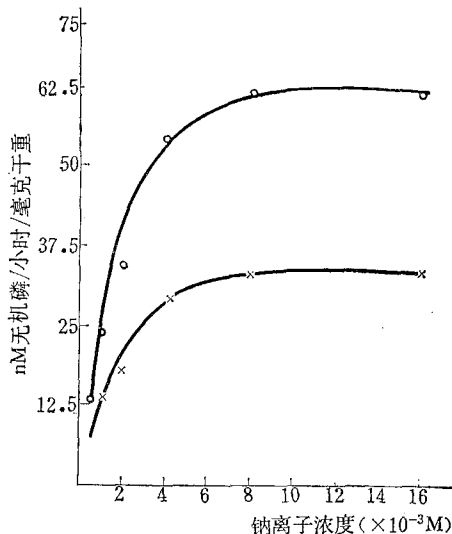
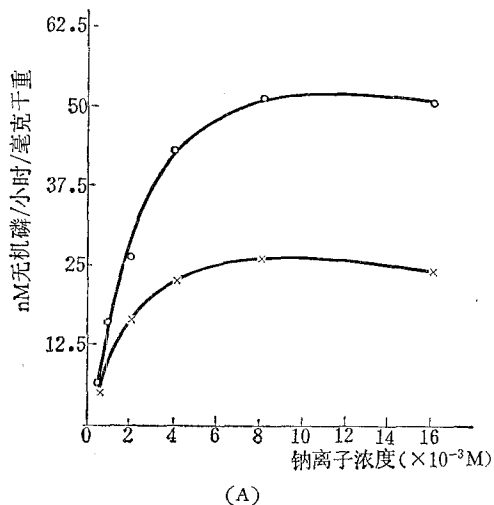
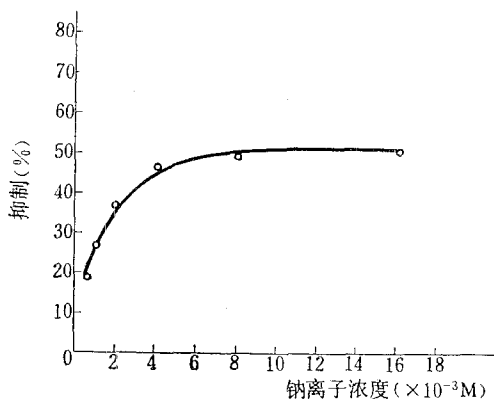


图7 钠离子浓度对乌本苷抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶作用的影响

$\circ$ — $\circ$ 不含抑制剂时 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力, $\times$ — $\times$ 含 $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ 乌本苷时 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力, EDTA 所含的钠已计算在内, 除钠离子浓度外其余反应条件如方法所述



(A)



(B)

图6 钠离子对 Resi 蟾毒配基抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶作用的影响

(A) $\circ$ — $\circ$ 不含抑制剂时 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力, $\times$ — $\times$ 含 $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ Resi 蟾毒配基时 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力, EDTA 所含的钠已计算在内, 除钠离子浓度外其余反应条件如方法所述

(B) 图 6(A) 的数据以抑制百分数表示

制作用。用乌本苷、华蟾蜍精与蟾蜍灵时, 也得到类似的结果。

图 5 系用在不同钾离子浓度下, Na^+ , K^+ -ATP 酶活力与钾离子浓度关系的双倒数图。如图所示, 在我们的测定条件下, Na^+ , K^+ -ATP 酶对钾离子的 K_s 为 $1.4 \times 10^{-3} \text{ M}$, Resi 蟾毒配基起着钾离子的竞争性抑制剂的作用, K_i 为 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 。

钠离子浓度对抑制作用的影响: 如图 6(A) 所示, 在反应系统中随着钠离子浓度的增加, Na^+ , K^+ -ATP 酶活力显著增加; Resi 蟾毒配基对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制作用在钠离子浓度高时比浓度低时明显得多。图 6(B) 表示在不同钠离子浓度下 Resi 蟾毒配基对 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力抑制的百分数, 说明钠离子有促进 Resi 蟾毒配基的抑制作用。用华蟾蜍精与蟾蜍灵时, 也得到类似的结果。然而钠离子浓度在本实验条件下却不影响乌本苷对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制作用 (图 7, 表 1), 说明蟾蜍精类化合物对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制与乌本苷有所不同。如将不同钠离子浓度下的 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力

表 1 钠离子对乌本苷抑制剂作用的影响

钠离子浓度 (mM)	0.5	1	2	4	8	16
Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶受抑制的百分比	48	42	47	45	46	46

与钠离子浓度作双倒数图,可以测得 Na⁺, K⁺-ATP 酶对钠离子的 K_s 为 $5 \times 10^{-3} M$, Resi 蟾毒配基起着钠离子的反竞争性抑制剂的作用, K_i 为 $2.7 \times 10^{-7} M$ 。

蟾蜍精类化合物对 Na⁺, K⁺-ATP 酶抑制的可逆性:虽然上述实验表明在本实验条件下,蟾蜍精类对 Na⁺, K⁺-ATP 酶的抑制是可逆的,但由于 Na⁺, K⁺-ATP 酶的作用机制复杂,至今

对乌本苷的抑制作用是否可逆尚无定论。为了更好地阐明蟾蜍精类对 Na⁺, K⁺-ATP 酶的抑制,并与乌本苷的作用进行比较,本实验选择了一些不同条件。利用稀释法,对抑制的可逆性问题作了进一步的探讨。结果见表 2 与表 3。从表中可以看出,不论预保温时是否存在有钾离子,钠离子或 ATP, Resi 蟾毒配基的抑制作用都是可逆的。用华蟾蜍精与蟾蜍灵时也得到类似结果。然而在用乌本苷时可以看到,如果在预保温溶液中只有钠离子和 ATP 而不含钾离子时,乌本苷的抑制基本上是不可逆的(表 3(5));倘若在预保温溶液中除钠离子与 ATP 外还含有钾离子(表 3(6))时,则乌本苷的抑制作用就

表 2 Resi 蟾毒配基对 Na⁺, K⁺-ATP 酶抑制的可逆性

组 别		预 保 温 时 浓 度 (M)				测 活 力 时 浓 度 (M)			抑 制
		K ⁺	Na ⁺	ATP	Resi	K ⁺	Na ⁺	Resi	
1	对照 1	2×10^{-2}	0	0	0	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	2.5×10^{-6}	81%
	对照 2	2×10^{-2}	0	0	0	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.25×10^{-7}	28%
	测 定	2×10^{-2}	0	0	2.5×10^{-6}	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.25×10^{-7}	28%
2	对照 1	0	4×10^{-2}	0	0	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	2.5×10^{-6}	78%
	对照 2	0	4×10^{-2}	0	0	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.25×10^{-7}	13%
	测 定	0	4×10^{-2}	0	2.5×10^{-6}	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.25×10^{-7}	16%
3	对照 1	0	0	1×10^{-3}	0	1×10^{-2}	6×10^{-2}	2.5×10^{-6}	80%
	对照 2	0	0	1×10^{-3}	0	1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.25×10^{-7}	26%
	测 定	0	0	1×10^{-3}	2.5×10^{-6}	1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.25×10^{-7}	26%
4	对照 1	2×10^{-2}	0	5×10^{-4}	0	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	2.5×10^{-6}	79%
	对照 2	2×10^{-2}	0	5×10^{-4}	0	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.25×10^{-7}	27%
	测 定	2×10^{-2}	0	5×10^{-4}	2.5×10^{-6}	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.25×10^{-7}	25%
5	对照 1	0	4×10^{-2}	5×10^{-4}	0	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	2.5×10^{-6}	80%
	对照 2	0	4×10^{-2}	5×10^{-4}	0	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.25×10^{-7}	27%
	测 定	0	4×10^{-2}	5×10^{-4}	2.5×10^{-6}	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.25×10^{-7}	25%
6	对照 1	2×10^{-2}	4×10^{-2}	5×10^{-4}	0	1.1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	2.5×10^{-6}	73%
	对照 2	2×10^{-2}	4×10^{-2}	5×10^{-4}	0	1.1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.25×10^{-7}	14%
	测 定	2×10^{-2}	4×10^{-2}	5×10^{-4}	2.5×10^{-6}	1.1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.25×10^{-7}	19%
7	对照 1	5×10^{-3}	1.4×10^{-1}	5×10^{-4}	0	1.025×10^{-2}	6.7×10^{-2}	2.5×10^{-6}	72%
	对照 2	5×10^{-3}	1.4×10^{-1}	5×10^{-4}	0	1.025×10^{-2}	6.7×10^{-2}	1.25×10^{-7}	34%
	测 定	5×10^{-3}	1.4×10^{-1}	5×10^{-4}	2.5×10^{-6}	1.025×10^{-2}	6.7×10^{-2}	1.25×10^{-7}	32%

预保温时,每管含酶液 0.20 毫升,测定管含 Resi 蟾毒配基 0.010 毫升,其余各管则加等体积的 80% 乙醇,总体积为 0.25 毫升。经 37°C 预保温 30 分钟后,加测定液稀释,然后测定活力。测定活力时,每管总体积 5.0 毫升(即稀释 20 倍),此时对照 1 中 Resi 蟾毒配基的浓度与测定管预保温时的浓度相同,对照 2 中 Resi 蟾毒配基的浓度与测定管在稀释后测定活力时的浓度相同,各管所含乙醇浓度相等,为 0.32%(体积比),钠、钾浓度如表所示,其它条件与方法描述的相同。在加 MgATP 开始反应前,于 37°C 预保温 30 分钟,反应时间为 2 小时。每组除表中列出的三管外,还有两管对照,其一为总 ATP 酶活力对照,另一为非 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力对照,由此求得 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力,并计算出各管 Na⁺, K⁺-ATP 酶受抑制的百分比

表3 乌本苷对 Na^+ , K^+ -ATP 酶抑制的可逆性

组 别		预 保 温 时 浓 度 (M)				测 活 力 时 浓 度 (M)			抑 制
		K^+	Na^+	ATP	乌本苷	K^+	Na^+	乌本苷	
1	对照 1	2×10^{-2}	0	0	0	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.6×10^{-6}	81%
	对照 2	2×10^{-2}	0	0	0	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	8×10^{-8}	33%
	测 定	2×10^{-2}	0	0	1.6×10^{-6}	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	8×10^{-8}	28%
2	对照 1	0	4×10^{-2}	0	0	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.6×10^{-6}	86%
	对照 2	0	4×10^{-2}	0	0	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	8×10^{-8}	31%
	测 定	0	4×10^{-2}	0	1.6×10^{-6}	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	8×10^{-8}	27%
3	对照 1	0	0	1×10^{-3}	0	1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.6×10^{-6}	83%
	对照 2	0	0	1×10^{-3}	0	1×10^{-2}	6×10^{-2}	8×10^{-8}	35%
	测 定	0	0	1×10^{-3}	1.6×10^{-6}	1×10^{-2}	6×10^{-2}	8×10^{-8}	35%
4	对照 1	2×10^{-2}	0	5×10^{-4}	0	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.6×10^{-6}	66%
	对照 2	2×10^{-2}	0	5×10^{-4}	0	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	8×10^{-8}	14%
	测 定	2×10^{-2}	0	5×10^{-4}	1.6×10^{-6}	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	8×10^{-8}	13%
5	对照 1	0	4×10^{-2}	5×10^{-4}	0	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.6×10^{-6}	85%
	对照 2	0	4×10^{-2}	5×10^{-4}	0	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	8×10^{-8}	45%
	测 定	0	4×10^{-2}	5×10^{-4}	1.6×10^{-6}	1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	8×10^{-8}	75%
6	对照 1	2×10^{-2}	4×10^{-2}	5×10^{-4}	0	1.1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	1.6×10^{-6}	72%
	对照 2	2×10^{-2}	4×10^{-2}	5×10^{-4}	0	1.1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	8×10^{-8}	29%
	测 定	2×10^{-2}	4×10^{-2}	5×10^{-4}	1.6×10^{-6}	1.1×10^{-2}	6.2×10^{-2}	8×10^{-8}	29%
7	对照 1	5×10^{-3}	1.4×10^{-1}	5×10^{-4}	0	1.025×10^{-2}	6.7×10^{-2}	1.6×10^{-6}	70%
	对照 2	5×10^{-3}	1.4×10^{-1}	5×10^{-4}	0	1.025×10^{-2}	6.7×10^{-2}	8×10^{-8}	35%
	测 定	5×10^{-3}	1.4×10^{-1}	5×10^{-4}	1.6×10^{-6}	1.025×10^{-2}	6.7×10^{-2}	8×10^{-8}	31%

测定方法及步骤与表 2 所述相同,但各管均不含乙醇

变成可逆的了。

讨 论

自从 1957 年 Shou 发现 Na^+ , K^+ -ATP 酶以来,不少工作者对此进行了大量的研究,证明它广泛存在于动物组织的细胞膜上,起着钠、钾离子主动传送(即所谓“钠泵”)的作用、在消耗 ATP 的同时,对抗细胞内外电化学梯度,把钠从细胞内输出,把钾输入细胞内。因此, Na^+ , K^+ -ATP 酶对维持细胞内高浓度钾、低浓度钠,恢复去极化神经的极化以及调节神经、肌肉的兴奋性等,均起重要作用。

乌本苷是 Na^+ , K^+ -ATP 酶的专一性抑制剂。从蟾酥中提取的三种蟾蜍精类化合物的结构与乌本苷比较相似(图 8)。从半抑制浓度 (I_{50}) 来看,它们对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制能力,蟾蜍

灵 > 华蟾蜍精 > Resi 蟾毒配基。我们在动物实验中发现它们在对小鼠进行腹腔注射时,半致死量 (LD_{50}) 分别为 1.97、4.45 和 11.7 毫克/公斤体重,与它们对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制能力有相应的关系,说明蟾蜍精类对生物体的作用可能与其抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶直接有关。

关于 Na^+ , K^+ -ATP 酶的作用机理已有不少探讨。一般设想 Na^+ , K^+ -ATP 酶位于细胞膜上, Na^+ 在膜内侧与酶结合,促进酶与 ATP 反应,使酶在膜内侧磷酸化,这时酶产生构象变化,与钠结合的部位转向膜外侧;磷酸化的酶对 Na^+ 亲和力低,对 K^+ 亲和力高,因而在膜外侧释放 Na^+ 而与 K^+ 结合; K^+ 与磷酸化的酶结合后,促进酶的脱磷酸化,因而酶的构象又产生变化,与 K^+ 结合的部位转向膜内侧,使 K^+ 在膜内侧被释放。这样,在 Na^+ 、 K^+ 的参与下, ATP

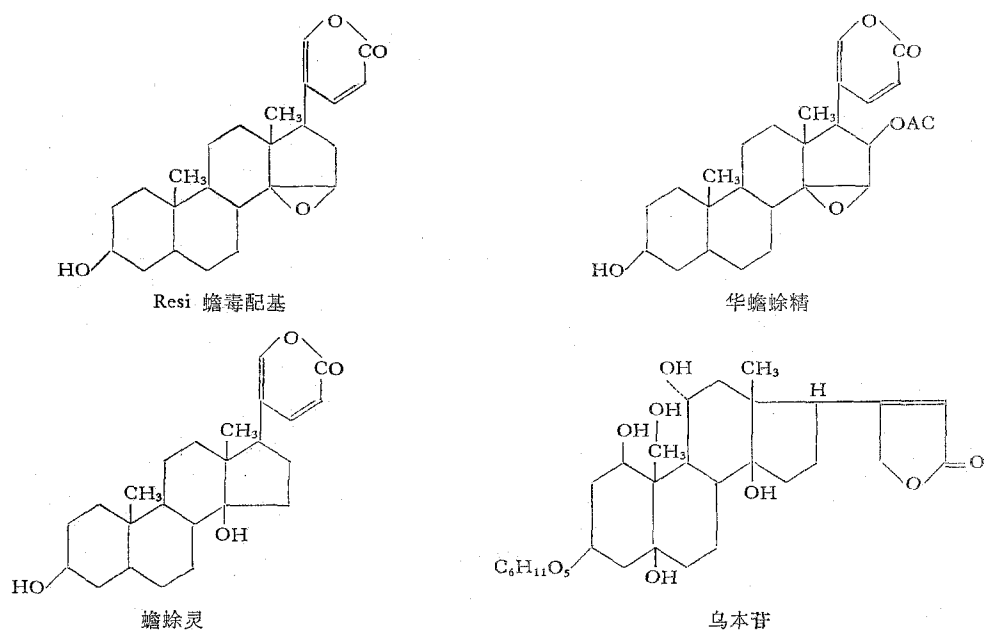
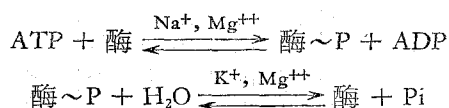


图 8 Resi 蟾毒配基、华蟾蜍精、蟾蜍灵和乌本苷的结构式

被水解,同时 Na^+ 被输出, K^+ 被输入细胞。其反应可以下列简式表示:



根据本试验, Resi 蟾毒配基等蟾蜍精类化合物是 Na^+ , K^+ -ATP 酶的底物的反竞争性抑制剂,钾离子有对抗抑制剂的作用,而钠离子有促进抑制的作用,这些都清楚表明 Resi 蟾毒配基等对 Na^+ , K^+ -ATP 酶抑制的作用点在于酶的磷酸化中间物(酶 $\sim$ P)。由于 Resi 蟾毒配基等起着钾离子的竞争性抑制剂的作用,换言之,酶 $\sim$ P 与蟾蜍精类结合后不再与钾离子结合,因而促进了酶 $\sim$ P 的稳定,不易水解。

乌本苷对 Na^+ , K^+ -ATP 酶的抑制作用与蟾蜍精类不尽相同,乌本苷的抑制与钠离子浓度无关;乌本苷的抑制在不含钾而含钠和 ATP 的

系统中基本是不可逆的。乌本苷的这些性质表明它与酶 $\sim$ P 结合较牢固。联系生理试验, Resi 蟾毒配基等的作用维持时间比较短,可能是因为蟾蜍精类与酶 $\sim$ P 结合较不牢固的缘故。

Hoffman (1966) 曾经提出红血球膜上有对 ethacrynic 酸敏感而对乌本苷不敏感的钠泵的存在。在本试验中,高浓度的蟾蜍精类对总 ATP 酶活力的抑制大于乌本苷的抑制,这说明蟾蜍精类可能对另一类 ATP 酶也有抑制作用。这类 ATP 酶究竟在红血球膜上有什么生理功能,值得进一步研究。

蟾蜍精类化合物除具有强心作用外,还具有表面麻醉的作用,用它们滴眼使角膜反射消失的能力比可卡因盐酸盐要大的多。由于神经兴奋传导过程中的复极化,需要 Na^+ , K^+ -ATP 酶的参与,因此蟾蜍精类的表面麻醉作用,也可能与它们抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶有关。