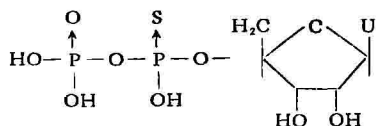
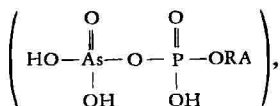


虽对碱基没有严格的专一性,但对糖环却有高度专一性。近来的实验表明,2'-OH 并非绝对必需,2'-O-Me ADP, 2'-O-Me CDP, 2'-O-chloro UDP 和各种 2'-脱氧的核苷二磷酸都可作为酶的底物。酶对引物末端是否 3'-5' 联结也并无绝对专一性,如 UpA (2', 5') 可以作为 *M. luteus* 酶的引物。PNPase 还可以聚合这样的底物:



由此合成的多核苷酸类似物是由糖-磷酸-硫脂作骨架的。在磷酸解反应中,无机磷可被砷酸代替,多核苷酸可被砷酸解,形成 5'-磷酸砷酸核苷



它很容易被水解成单核苷酸。表 4 列出可作为 PNPase 底物的各种修饰过的 5'-核苷二磷酸。其中有一些只有在与其它底物共聚的条件下,

才能为酶所利用,如 dihydro UDP 等。

参 考 文 献

- [1] Grunberg-Manango, M., Ochoa, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3165, 1955.
- [2] Fuwa, I., Okuda, J.: *J. Biochem.*, **59**, 95, 1966.
- [3] Rokugawa, K., Katon, Y., Kuninaka, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1455, 1975.
- [4] Portier, C., Rapenbush, R. V., Thang, M. N., Grunberg Manago, M.: *Eur. J. Biochem.*, **40**, 77, 1973.
- [5] Letendre, C. H., Singer, M. F.: *Nucleic Acids Res.*, **2**, 149, 1975.
- [6] Wood, J. N., Hutchinson, D. W.: *Nucleic Acids Res.*, **3**, 219, 1976.
- [7] Hishinuma, F., Hirai, K., Sakaguchi, K.: *Eur. J. Biochem.*, **77**, 575, 1977.
- [8] Fitt, P. S., See, Y. P.: *Biochem. J.*, **116**, 309, 119, 517, 1970.
- [9] Portier, C., *FEBS Letter*, **50**, 79, 1975.
- [10] Portier, C.: *Eur. J. Biochem.*, **55**, 573, 1975.
- [11] Craine, J. E., Klee, C. B.: *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2923, 1976.
- [12] Michelson A. M. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **217**, 7—28, 1970.

(待续)

[本文于 1978 年 6 月 30 日收到]

钠钾 ATP 酶与阳离子主动运输*

王 理 开

(广州中山医学院生物化学教研组)

高等生物能维持体内环境的相对恒定。一般讲,细胞内液钠浓度低,钾浓度高;细胞外液钠浓度高,钾浓度低。如人心肌细胞内钾离子浓度为细胞外液的 38 倍,而钠离子浓度,外液为内液的 36 倍。这种离子分布的差异,是由于细胞膜不断将钠输出细胞外,将钾输入细胞内所致。这种逆电化学梯度地运输离子的过程是一耗能过程,通常称为一价阳离子主动运输,或称“钠钾泵”。

1957 年,Skoul 从蟹神经的微粒体组份中

发现了钠钾 ATP 酶,提出此酶可能与细胞膜的阳离子运输有关。此后对钠钾 ATP 酶的研究取得了不少的进展^[1-5],本文就钠钾 ATP 酶的研究作一简介。

一、钠钾 ATP 酶是阳离子主动运输机构的证据

1. 凡具有钠钾离子运输系统的生物组织都

* 中国科学院上海生物化学研究所林其谁同志给予热情指导,谨致衷心感谢。

可测出钠钾 ATP 酶活力

离子运输活力高的组织,其钠钾 ATP 酶活力亦高。有人同时测定人红细胞、蛙腓肌肉、蛙皮肤、乌贼神经、蟾蜍膀胱和电鳗电器官的阳离子运输活力和钠钾 ATP 酶活力,虽然不同组织活力可相差 25,000 倍,但各种组织的阳离子运输活力与钠钾 ATP 酶活力之比,却很接近。有一种山羊其红细胞内钾离子浓度高,而另一种山羊的红细胞内钾离子浓度低。进一步的研究发现前者阳离子运输活力为后者的四倍,前者钠钾 ATP 酶活力亦为后者的四倍。各种组织阳离子运输活力与钠钾 ATP 酶活力之间的相应关系,表明它们是密切相关的。

2. 详细比较人红细胞膜碎片的钠钾 ATP 酶活力与人的完整红细胞内阳离子的主动运输,发现两者有许多突出的共同特征

① ATP 酶位于膜上;② 利用 ATP 而不利用 ITP;③ 需 Na^+ 和 K^+ 同时存在;④ K^+ 的激活作用为高浓度 Na^+ 所竞争性抑制;⑤ 被乌本苷(Ouabain)专一地抑制;⑥ NH_4^+ 可代替 K^+ ,而 Na^+ 则不能为任何离子所代替;⑦ Na^+ , K^+ 或 NH_4^+ 和乌本苷显示半最大作用的浓度是几乎相同的。

3. 利用红细胞做的实验,证明钠钾 ATP 酶和阳离子主动运输具有同样的方向性

即 ATP 和 Na^+ 是从膜内表作用的,而 K^+ 和乌本苷是从膜外表作用的。

4. 用提纯的钠钾 ATP 酶可进行钠钾泵重组

用磷脂制备的人工膜小泡(脂质体)对阳离子不能通透。近年来已分别将从鲨鱼直肠腺、犬脑灰质及羔羊肾^[6]提取的钠钾 ATP 酶掺入到脂质体中,进行钠钾泵重组获得成功。重组的钠钾泵在有 ATP 存在时有偶合运输 Na^+ 、 K^+ 的功能,运输 Na^+ 、 K^+ 的比例大致为 3:2,乌本苷抑制此种离子运输。这些性质与正常红细胞的阳离子主动运输的性质非常相似。

鉴于上述诸点,可以认为钠钾 ATP 酶就是负责一价阳离子主动运输的机制。此观点目前已普遍为人们接受。然而也有人提出不同的意见。如 Cope^[7] 最近提出,要维持细胞内 K^+ 浓

度高, Na^+ 浓度低,并不需要泵的存在。他认为可把细胞看作为一个离子交换颗粒, Na^+ 与 K^+ 和颗粒上的负电荷结合,而颗粒优先与 K^+ 结合。在细胞中水是有结构的,而细胞中阳离子可以自由地从结合位置与水进行交换,这样就维持了浓度梯度,这个过程无需阳离子泵,也不需要消耗能量。Cope 的假说对离子运输提出了一个完全不同的概念。虽然他的假说可以解释一些现象,但对不少实验结果,特别是钠钾泵重组实验结果不能解释。

二、分布及生理意义

钠钾 ATP 酶广泛存在于哺乳动物的各种组织中。有人检测了 10 种动物的 21 种组织,发现每种组织约有一定量的钠钾 ATP 酶存在。在猫的 36 种组织中有 29 种可测出此酶活力,只有那些无细胞或细胞密度很低的组织,才测不出来。除哺乳动物外,各种鸟类、鱼类,某些爬行类及某些无脊椎动物的组织均有钠钾 ATP 酶,在某些植物(如大豆、麦根)和细菌(如大肠杆菌)中亦有发现。

在各种组织中钠钾 ATP 酶比活最高者是电鳗的电器官。此外,哺乳动物的脑组织,肾外髓质,某些海生动物(如鲨鱼)直肠腺和某些海鸟(如鸕鹚)的盐腺,钠钾 ATP 酶的比活也很高。肌肉、腺体等组织也富含钠钾 ATP 酶。红细胞膜的钠钾 ATP 酶的比活则很低。

钠钾 ATP 酶仅存在于质膜,不存于细胞质中或细胞器上。钠钾 ATP 酶执行阳离子主动运输功能,对机体生理机能具有重要意义:

1. 维持细胞内钠钾离子浓度的相对恒定,保持细胞内外环境有适当的渗透压平衡

在静息状态下,细胞代谢所产生的能量至少有 20% 用于支持钠钾泵的活动。由此可见阳离子主动运输对细胞生理的重要性。

2. 使去极化的神经、肌肉细胞膜恢复极化,保持神经、肌肉适当的兴奋性和传导性

神经、肌肉等兴奋性组织,在静止期保持一定的膜电位,膜外带正电荷,膜内带负电荷,此膜电位大多由横过膜的 K^+ 浓度梯度决定。当兴奋

(或冲动传导)时,细胞膜对 Na^+ 的通透性一过性增加, Na^+ 透过细胞膜进入细胞内,此时伴有 K^+ 的外渗,膜电位因而消失(去极化)。兴奋后由于钠钾泵的活动,不断输出 Na^+ , 摄入 K^+ , 恢复了细胞内外钠钾离子浓度梯度,恢复了极化状态,使下一次的兴奋和传导有了基础。哺乳动物脑和神经组织含有丰富的钠钾 ATP 酶,是与此种功能相适应的。

3. 参与物质吸收和腺体分泌功能

肾脏的主要功能之一是肾小管的重吸收作用,肾髓质有很高的钠钾 ATP 酶活力,抑制钠钾 ATP 酶活力的强心甙亦能抑制肾小管对 Na^+ 的重吸收。用地高辛灌流狗肾动脉,观察到肾钠钾 ATP 酶活力和肾对 Na^+ 的重吸收能力呈同步下降,说明肾脏对 Na^+ 的重吸收与钠钾 ATP 酶有密切关系。肠粘膜上皮细胞亦有较高的钠钾 ATP 酶活力,肠粘膜吸收 Na^+ 的过程在很多方面与肾对 Na^+ 的重吸收相似。此外脑脊液和眼球房水的生成,唾液腺和胃肠道等腺体分泌功能亦与钠钾 ATP 酶有密切关系。

4. 偶合葡萄糖和氨基酸的运输

葡萄糖、氨基酸通过细胞膜的运输可以有多种形式,包括主动的耗能的运输过程,它要求细胞内外环境有适当的钠钾离子分布。例如肾和肠对葡萄糖的吸收可能是与主动钠离子运输偶合进行的。

三、钠钾 ATP 酶的一般性质

钠钾 ATP 酶在有 Na^+ , K^+ 和 Mg^{++} 同时存在的条件下,催化 ATP 的末端 P 水解,生成 ADP 和无机磷。其他一些核苷三磷酸虽然也可以被水解,但活力要低得多。若以水解 ATP 的活力为 100,则 dATP, CTP, ITP, GTP, TTP 分别为 49, 2.3, 2.4, 0.6, 0.6。 Mg^{++} 与 ATP 的最适浓度比例为 1—2。有人认为 Mg 与 ATP 才是真正的底物。 Na^+ 和 K^+ 各有最适的激活浓度, Na^+/K^+ 最适比例在 10:1—5:1 之间,两者中任一个浓度过高,都有抑制作用。 K^+ 可为很多一价阳离子代替,这些离子按其效力顺序是 $\text{K}^+ > \text{Rb} > \text{NH}_4^+ > \text{Cs} > \text{Li}$ 。 Tl 亦可代替

K^+ , 且对酶的亲和力为 K^+ 的 10 倍。 Mg^{++} 可由 Mn^{++} 或 Co^{++} 代替,但效力只有 1/10。 Na^+ 不能为任何离子所代替,表明它对钠钾 ATP 酶活力是绝对必须的。

有许多药物、化学试剂及生物因子对钠钾 ATP 酶有抑制作用,主要有以下几种:

1. 强心固醇类药物 如乌本苷、地高辛和洋地黄毒甙等。蟾酥中的甾体物质亦属强心固醇类药物,其中 Resi-蟾毒配基、华蟾蜍精和蟾蜍灵对钠钾 ATP 酶有显著的抑制作用,抑制的强度与其药理作用的强度有相应的关系^[8]。给离体猫心灌流乌本苷、在其心肌收缩力增大时,测得心肌钠钾 ATP 酶受抑制,当将乌本苷洗去后,心肌收缩力降至正常,钠钾 ATP 酶活力亦恢复到正常水平。说明强心固醇类药物的强心作用,可能是通过抑制心肌细胞膜钠钾 ATP 酶而表现出来的。作用的机理可能是:钠钾泵受抑制后,细胞内钠增加,导致 Ca^{++} 流入细胞内增加;也可能是由于增强了 Ca^{++} 流入- K^+ 流出的交换反应。无论哪种情况均使兴奋期细胞内游离 Ca^{++} 量增多,后者与收缩蛋白结合,引起心肌收缩力增强。但也有一些实验表明,强心固醇类药物对钠钾 ATP 酶的抑制作用与强心作用无关,而与其毒性作用有关。

2. Erythrophleum 生物碱 是一类非固醇类强心药物,结构上与固醇类药物不同,但亦有显著的抑制钠钾 ATP 酶作用。

3. 巯基试剂 如有机汞利尿剂,马来酰亚胺衍生物,亚砷酸盐,碘醋酸盐等,亦有抑制钠钾 ATP 酶作用,这与钠钾 ATP 酶的活性需要 -SH 基有关。

4. 二价重金属离子 如 Fe^{++} 、 Ca^{++} 、 Zn^{++} 、 Cu^{++} 、 Ba^{++} 、 Sr^{++} 、 Be^{++} 等。

5. 有机溶剂 如丙酮、氯仿、二乙醚、甲醇、乙醇、丙醇等。一元醇随碳链增长而抑制作用增强,这可能是由于与酶发生疏水性结合,而使酶构象改变或使活性中心周围水结构改变所致。

此外,寡霉素、氟离子等亦有抑制钠钾 ATP 酶作用。中药生脉液中的人参、五味子对大鼠

表 1 各种来源的钠钾 ATP 酶性质的比较

来 源	最适 pH	最适 Mg:ATP 比例	ATP Km (mM)	Mg ⁺⁺		Na ⁺		K ⁺		乌本苷半抑制浓度 (M)
				最大激 活浓度 (mM)	半激活 浓度 (mM)	最大激 活浓度 (mM)	半激活 浓度 (mM)	最大激 活浓度 (mM)	半激活 浓度 (mM)	
鲨鱼直肠腺	7.0	2	0.32	10		120		20		
牛 脑	6.8—7.0		0.1—0.4			100		10—20		$6-10 \times 10^{-7}$
电鳗电器官	7.4		0.29	5—14	1	100—225	15	10	2	1.2×10^{-6}
蟹 神 经	7.2	2					6—8		1.8	1.3×10^{-4}
大 鼠 肾	7.4	0.5					8		0.7	1.3×10^{-4}
鲑鸥盐腺	7.2	1.5					12.5		1.5	5×10^{-7}
兔 胰 腺	7.2	1.5					10		0.8	4×10^{-6}
人红细胞	7—7.7	1—2				32—64	4	4—32	1	
人 肾	7.0		0.38		0.5		16		1.5	1.8×10^{-6}

心肌细胞膜 ATP 酶有抑制作用^[9], 是否也抑制了其中的钠钾 ATP 酶, 有待进一步研究。

不同来源的钠钾 ATP 酶, 性质都很相似。表 1 中综合的一些不同来源的钠钾 ATP 酶, 它们的最适温度, 最适 pH, 底物米氏常数, Mg⁺⁺ 与 ATP 的最适比例, Mg⁺⁺、Na⁺⁺、K⁺ 各自的最大激活浓度及半激活浓度与动力学参数都很相近。不同来源的钠钾 ATP 酶都能为乌本苷抑制, 不过半抑制浓度有较大差异。

比较鲨鱼直肠腺膜结合的钠钾 ATP 酶与从膜上拆下并高度提纯的酶的各种动力学参数, 发现两者都显著相似。比较牛脑不同程度提纯的和未经提纯的钠钾 ATP 酶, 亦得到类似结果。因此, 利用提纯的酶来研究它在完整细胞中的功能和行为是合理的。这也为用提纯的钠钾 ATP 酶来重组钠钾泵提供了依据。

各种组织的钠钾 ATP 酶粗制剂, 往往含有一种需 Mg 的 ATP 酶活力 (MgATP 酶), 不为乌本苷抑制。由于在钠钾 ATP 酶的提纯过程中 MgATP 酶能逐渐被完全除去, 故它不是钠钾 ATP 酶的组成成份。钠钾 ATP 酶本身含有需 K⁺ 的磷酸酯酶活力, 能水解乙酰磷酸和氨基甲酰磷酸, 这种活力也为乌本苷所抑制。从不同动物及不同组织来源的制剂, 此种需 K⁺ 的

磷酸酯酶活力与钠钾 ATP 酶活力之比都相当恒定。

四、酶的提纯及其化学组成

哺乳动物的脑、肾外髓质, 电鳗电器官和鲨鱼直肠腺都含有丰富的钠钾 ATP 酶, 是常用来提取钠钾 ATP 酶的组织。钠钾 ATP 酶是质膜的“内在蛋白”, 这给提纯带来一定困难。提纯制剂一般可分两种, 一种制剂是酶仍留在膜碎片上, 通过从膜碎片上除去结合较不紧密的杂蛋白而达到提纯。例如用 NaI 或一定量去垢剂处理微粒体组份, 再离心分离, 收集膜碎片, 可除去绝大部分的“外周蛋白”而得到一定纯度的钠钾 ATP 酶膜制剂。另一种是用去污剂作较强烈的处理, 以“溶化”膜碎片, 然后通过选择性沉淀得到可溶性酶制剂, 再经凝胶层析或离子交换层析来提纯。

近年来已从兔肾、鲨鱼直肠腺、猪脑和电鳗电器官等组织提取得高纯度的钠钾 ATP 酶。最近上海生物化学研究所生物膜组也使用较简单快速的方法, 从猪肾提取出纯度较高的钠钾 ATP 酶。提纯的钠钾 ATP 酶是结合有多量磷酸酯和糖类的复合蛋白质。从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 此酶由两种多肽链组成, 大的多肽

表2 各种来源的不同程度提纯的钠钾 ATP 酶

来 源	提纯程度 (比活*)	产量/次 (毫克蛋白)	乌本苷抑 制百分率 (%)	分 子 量(万)		参 考 文 献
				大多肽链	小多肽链	
牛 脑	238	0.99	99			Sboner (1967)
牛 脑	293	2.2	89			Towle (1970)
兔 肾	2000	1—1.7	98	9.6	5.7	Jrgensen (1971)
狗 肾	800	0.46	98.8	9.7	5.6	Kyte (1971)
狗 肾	1800		>99	8.9	5.6	Lane (1973)
鲨鱼直肠腺	1500		>99	9.7	5.5	Hokin (1973)
猪 脑	3000—7000		>99	10		Nakao (1973)
电鳗电器官	1200			9.3	4.7	Dixon (1974)
人 肾	50—200	1—3.5	100	9.25	5.6	Braugher (1977)

* μ moles Pi/毫克蛋白/小时

链为脂蛋白,分子量 8.4—10 万左右,含多量磷脂。小的多肽链为糖蛋白,分子量约 5—6 万。用放射性灭活法测得的钠钾 ATP 酶分子量约为 25 万。表 2 列举了几种来源的不同程度提纯的钠钾 ATP 酶。

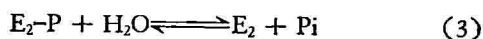
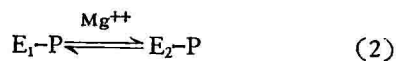
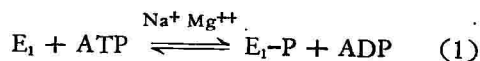
大的多肽链是钠钾 ATP 酶活力所必须的组成成份。在有 Na^+ 和 Mg^{++} 存在下,大的多肽链可与 ATP 反应而被磷酸化,并且有与 Na^+ 、 K^+ 、ATP 和乌本苷结合的部位。从狗肾、鲨鱼直肠腺和电鳗电器官提纯的钠钾 ATP 酶,它们的磷酸化多肽的氨基酸组成非常相似,富含非极性氨基酸, N-末端分别是甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸。这说明在进化过程中,虽然酶的动力学参数仍保持显著的稳定性,但磷酸化的亚基已有一些改变。其结合的磷脂是钠钾 ATP 酶活力所必须的。实验表明,用去垢剂或磷酸酯酶 c 处理钠钾 ATP 酶制剂,可导致酶活性丧失,且酶的失活量与除去的磷脂量成比例。除去磷脂的酶制剂,再加上磷脂时,酶活性又能部分或大部恢复。磷脂中以磷脂酰丝氨酸的作用较为显著。

小的多肽链是糖蛋白,富含疏水性氨基酸,并含有葡萄糖、半乳糖等多种单糖类物质和唾液酸。较多的人认为,它并非钠钾 ATP 酶活力所必须的成分。

五、作用机理

1. 反应步骤

钠钾 ATP 酶催化 ATP 水解成 ADP 和无机磷可能经历多个反应步骤,故此酶也往往被称为钠钾 ATP 酶系统。从一些抑制剂的作用及部分反应的测定,推测酶反应经历如下几步:



式(1)可看作是 ADP-ATP 交换反应, Na^+ 和 Mg^{++} 促进此步反应,结果生成了酶的磷酸化中间物。在有 Na^+ 存在时, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 中的 ^{32}P 能迅速掺入钠钾 ATP 酶制剂中,用三氯醋酸沉淀蛋白, ^{32}P 仍留在沉淀的蛋白上,证明磷酸化中间物的存在。式(2) $\text{E}_1\text{-P}$ 转变为 $\text{E}_2\text{-P}$,代表了磷酸化中间物的构象改变。N-乙基马来酰亚胺和寡霉素抑制整个钠钾 ATP 酶反应,但增强 ADP-ATP 交换反应,不减少磷酸化中间物的生成,推想是抑制了 $\text{E}_1\text{-P}$ 与 $\text{E}_2\text{-P}$ 的转化。式(3)是磷酸化中间物($\text{E}_2\text{-P}$)的水解,亦可看作是 $\text{H}_2\text{O-Pi}$ 的交换反应。亦已有实验

证明钠钾 ATP 酶催化 H_2O 与 P_i 的交换。式(4)中 E_2 与 E_1 的转变,代表了非磷酸化的酶的构象改变, E_1 对 Na^+ 有较高的亲和力, E_2 对 K^+ 有较高的亲和力。

乌本苷对钠钾 ATP 酶的作用较为复杂,它既抑制 ADP-ATP 交换反应,又抑制需 K^+ 的磷酸化中间物的水解。一般认为它是结合到酶磷酸化中间物上并使其稳定化而起抑制作用的,但亦有些实验表明,酶还未磷酸化时,乌本苷也能结合上去,因而有人提出乌本苷可能不直接结合到磷酸化中间物上,而是结合到一种受体上,这种受体与磷酸化中间物的构象改变有关,乌本苷可能通过诱导酶的构象改变而起抑制作用。

2. 磷酸化中间物的性质

实验表明酶与磷酸结合的键具有酰基磷酸酯键 $[E-CO-P]$ 的特征,它对甲醇及乙醇的分解作用敏感,对羟胺和钼不稳定,乙酰磷可代替 ATP 而使钠钾 ATP 酶磷酸化,因此推想与磷酸基结合的酶蛋白部位是二羧基氨基酸残基。较早期的研究认为磷酸基是结合到酶蛋白的谷氨酸残基上的,而近年来的研究则表明磷酸基是结合到酶蛋白的门冬氨酸残基上的。

3. 泵的矢量性

钠钾泵的概念本身即表明其在膜上的分布是不对称的,有方向性的。将红细胞在低渗溶液下胀破,反复离心洗涤除去血红蛋白后,再恢复至等渗,胀破的红细胞会重新封闭而恢复其原有的对离子的不通透性。在红细胞重新封闭前可以将所需物质掺入到红细胞内。利用这种技术的实验表明,钠钾 ATP 酶和阳离子主动运输功能均具有方向性,即不对称性。钠离子的激活只限于在膜的内表面, K^+ 的激活只限于在膜的外表面, ATP 只能在细胞内被水解,乌本苷只能在膜的外表面与酶结合起抑制作用,使用里翻外的红细胞膜制剂,进一步证明了这一点。利用免疫方法表明钠钾 ATP 酶的大肽链的抗原部位只存在于膜内侧,小多肽链的抗原部位只存在于膜外侧。有人测得每个红细胞有 200 个左右的地高辛结合部位,如果每个泵只

结合一个强心糖甙,而且所有结合都是专一性结合的话,则每个泵每分钟可水解 10,000 个左右的 ATP¹⁾。

4. 泵的可逆性

钠钾泵的活动是一个耗能的过程。在反应中每分解一个 ATP 将 3 Na^+ 输出细胞外, 2 K^+ 输入细胞内。从热力学计算来看, 1 克分子 ATP 水解释出的能量与输出 3 克分子 Na^+ , 输入 2 克分子 K^+ 所需能量相比较,尚剩余大约 4000 卡。利用离子浓度差所产生的渗透能,是否可推动泵逆转,可从通过观察放射性标记的无机磷在红细胞内是否能掺入 ATP 中而得知。当用含高浓度 K^+ , 低浓度 Na^+ 的重封红细胞悬浮于含高浓度 Na^+ , 不含 K^+ 的溶液中保温,离子就逆正常泵运转的方向而扩散,此时可观察到 ^{32}P 掺入 ATP 中,在有强心糖甙存在时,掺入就受到抑制。说明膜内侧 K^+ 与膜外侧 Na^+ 同时逆泵的方向运动时,可使泵逆转而合成 ATP。近年来的研究表明,钠钾泵的各个反应步骤均是可逆的。

5. 阳离子主动运输模型

迄今对钠钾 ATP 酶虽已做了大量工作,但要在分子水平上阐明其运输离子的机理,尚需作更深入的研究。目前已提出的模型不下数十个。这些模型大致可归纳为三类: ① 载体模型。设想酶分子或其结合基团能反复从质膜的一侧转移至另一侧。② 内转移模型。设想质膜两侧的结合基团分别将所结合的离子先运至质膜内的密闭部位,经相互交换后,各再运至质膜的另一侧。③ 闸门管道式模型。

本刊曾介绍过两个模型^[10,11]下面再介绍近年来提出的较为人们注意的另两个模型。

1973 年 Repke 提出 Flip-Flop 模型^[5]是属于第 1 类的双载体模型。作者假设每个钠钾 ATP 酶的功能单位由两个相同的亚基组成,两个亚基各经 6 步反应而完成一个循环,但反应

1) 实验测得 3H -地高辛与红细胞膜的结合量为 0.39 微克分子/毫克蛋白,红细胞膜钠钾 ATP 酶活力为 4.1 毫微克 P_i /毫克蛋白/分,后者被前者除得每个结合部位每分钟能水解 ATP 的数量(约 10,000)。

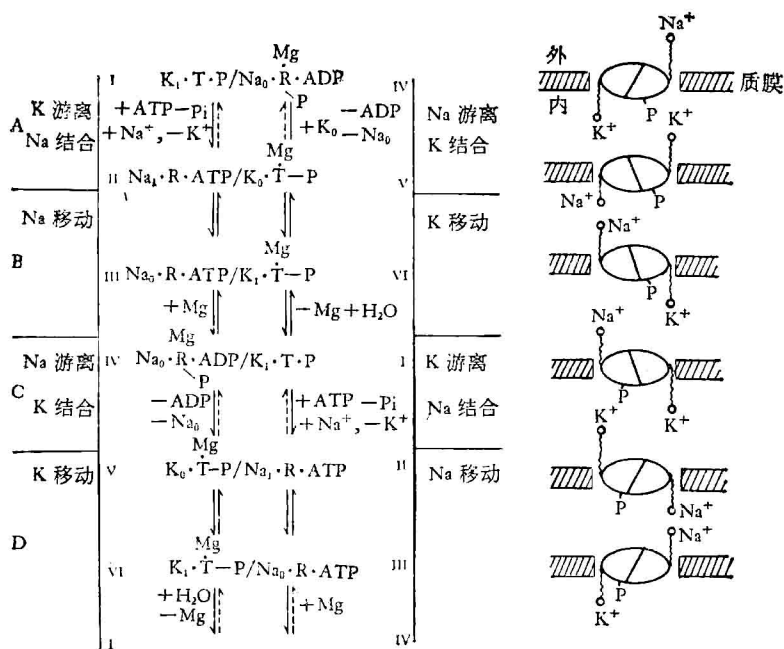


图1 Repke 提出的 Flip-Flop 模型*

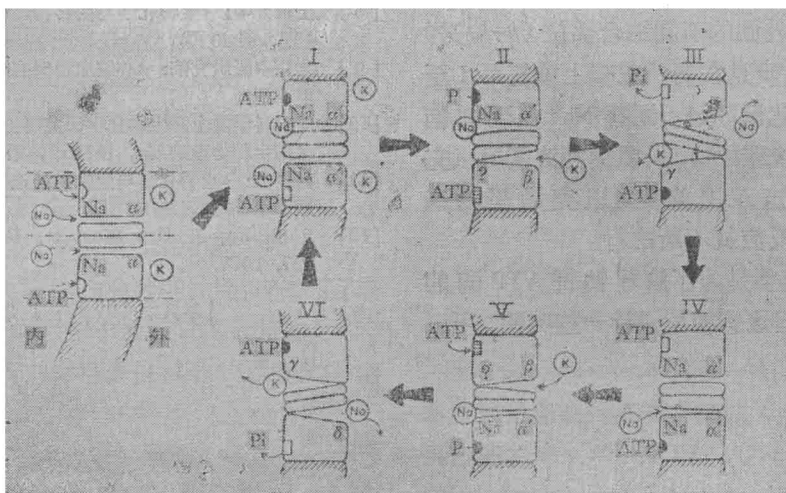


图2 闸门管道式模型

顺序彼此错开半个周期。两个亚基通过彼此接触作用,在各步反应中均互相偶合,当一个亚基与离子结合的部位向膜内侧时,另一亚基与离子的结合部位向膜外侧,反应过程中结合部位发生向量移动,一亚基结合部位向膜外侧移动,另一亚基结合部位则向膜内侧移动,反之亦然,这样两个亚基与离子的结合部位呈翘翘板式运动,当向内的向量移动时,把 K⁺ 甩入细胞内,而在向外的向量移动时,则把 Na⁺ 甩至细胞外。

反应模式如图 1。T 和 R 代表钠钾 ATP 酶的两个主要构象状态。T 对 K⁺ 亲和力高,对 Na⁺ 亲和力低, R 对 Na⁺ 亲和力高,对 K⁺ 亲和力低。符号(/)将左右两个亚基分开,并表示彼此接触,(一)表示共价结合,(·)表示非共价结合。每一反应步骤均可逆进行。一般情况下,反应顺序是 I→II→III→IV→V→VI→I。在一些特

* 右侧是笔者附加的形象化图,左图中元素符号的下角 0 代表“外”,1 代表“内”

殊情况下,可发生不同形式的离子运动,如反应 $II \rightleftharpoons III$ 的进行,代表 Na^+-Na^+ 交换, $V \rightleftharpoons VI$ 代表 K^+-K^+ 交换, $III \rightleftharpoons IV$ 代表 $ADP-ATP$ 交换, $I \rightleftharpoons VI$ 代表 $HPO_3^{2-}-H_2O$ 交换。因此许多实验结果可用此模型加以解释。

1977 年, Robinson 提出一种属第 3 类型的闸门管道式模型^[12]。如图 2 所示,设想钠钾 ATP 酶由两个催化亚基组成,每个亚基含有对底物亲和力和高的部位和潜在性运输管道(分解一个 ATP 能运输 $3Na^+$, 设想每个酶有三个管道,图中只以一个表示)。左边图表示反应前的酶,膜内侧有 Na -位,膜外侧有 α -位。反应的第一步, ATP 加至一个亚基上,降低了另一亚基对底物的亲和力,同时亦降低了 α -位对 K^+ 的亲和力, $\alpha \rightarrow \alpha'$ 。第 II 步膜内侧的钠结合到 Na^+ -位上,酶被磷酸化,对侧亚基出现 β -位。第 III 步,因 K^+ 结合到 β -位,引起脱磷酸化,伴随钠钾离子的运输, K^+ 从膜内侧的瞬间结合部位 (γ -位) 弹入, Na^+ 从膜外侧的瞬间结合部位 (δ -位) 弹出。第 IV 至 VI 步是在另一亚基上重复第 I 至 III 的反应。如此循环,不断将 Na^+ 甩至细胞外,将 K^+ 甩入细胞内。只要钠钾浓度足以充满 Na -位和 β -位, ATP 浓度足以充满底物亲和部位,循环式反应就不断进行。

提出各种模型是为了解释钠钾 ATP 酶的作用原理。根据这些模型设计一些实验,可以

促进对酶作用原理的研究。

钠钾 ATP 酶的研究有着重要的理论意义与实践意义,它受到生化,生理,药理等学科的广泛注意。研究范围在不断扩大和深入。已从几种动物来源提取得高纯度的酶制剂,钠泵的重组获得了可喜结果。相信在不远的将来必将取得重大突破。

主要参考文献

- [1] Skou, J. C.: *Physiol. Rev.*, **45**, 596, 1965.
- [2] Glynn, I. M.: *Brit. Med. Bull.*, **24**, 165, 1968.
- [3] Glynn, I. M. et al.: *Ann. Rev. Physiol.*, **37**, 13, 1975.
- [4] Dahl, J. L. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 327, 1974.
- [5] 中尾 真:《蛋白质 核酸 酵素》, **20** (4), 366, 1975.
- [6] Anner, B. M. et al.: *Biochem. Biophys. acta*, **467**, 340, 1977.
- [7] Cope, F. W.: *Trends in Biochem. Sci.*, **2**(10), N225, 1977.
- [8] 王理开等:《生物化学与生物物理进展》, 1976 年, 第 4 期, 第 40 页。
- [9] 北京中医研究院:《心脏血管疾病》, 1973 年, 第 1 卷, 第 4 期。
- [10] 中国科学院上海生物化学研究所生物膜组:《生物化学与生物物理进展》, 1974 年, 第 2 期, 第 12 页。
- [11] 何泽涌:《生物化学与生物物理进展》, 1976 年, 第 4 期, 第 25 页。
- [12] Robinson, J. D.: *Biochem. Biophys. acta*, **482**, 427, 1977.

[本文于 1978 年 1 月 30 日收到]

海鱼抗冻剂的结构功能和抗冻机制

朱 仁 华

(山东海洋学院生物系)

海水在 $-1.86^{\circ}C$ 结冰,而极区鱼的血液在 $-2.0^{\circ}C$ 左右才结冰。经分析,发现它们血液中存在一种大分子物质,能使鱼的血液冰点下降。近年来,对这种大分子抗冻剂作深入研究,已证明四种鱼的血清中,两种鱼的这种抗冻剂是糖

蛋白,另两种鱼的是蛋白质。这些抗冻剂在化学组成和空间构型上有所不同,但都能降低血液的冰点。最近的研究表明,它们的抗冻机制也很相似。

一、抗冻剂的分子结构