

人红细胞膜 (Na,K)-ATP 酶的研究

董 伟 沈定国

(中国人民解放军总医院酶学实验室)

红细胞膜 ATP 酶是一种重要的酶,它在物质运送、能量转换以及信息传递等方面具有重要的作用。近年来发现患某些疾病时,此酶的活力发生一定的变化。国内对人红细胞膜的研究报道尚少,仅见张安荣等人^[1]报告了人红细胞膜 (Na, K)-ATP 酶的放化测定法。我们建立了一种新的灵敏的 (Na, K)-ATP 酶测定法,并测定了 30 例正常人及一些疾病患者的红细胞膜 ATP 酶的活力,此法简便易行,灵敏可靠。

材 料 和 方 法

一、人红细胞膜的制备

本实验采用 Pearson 的方法^[2]并作一些改进。取静脉血 2 毫升,加 EDTA 抗凝,采血后,立即在 300g 离心 2 分钟,用滴管吸出血浆层,红细胞用 50mM Tris-HCl-1mMEDTA 生理盐水 (pH7.4) 等渗溶液洗三次,每次 300g 离心 2 分钟,然后按 1:20 的比例向洗净的红细胞中加入预冷的 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4),轻轻摇动几次,使红细胞溶血,6000g 离心 20 分钟,去掉含血红蛋白的上清液层,并去掉离心管底部的白色硬结沉淀物,细胞膜再用 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 洗 3 次,即可得到乳白色的红细胞膜。将得到的红细胞膜悬浮在 50mM Tris-HCl 缓冲液中 (pH7.4) 使膜蛋白含量为 1 毫克/毫升左右,分装在小塑料管中,放入 -40℃ 冰箱保存备用。整个操作在 0—4℃ 连续进行。

经光学显微镜和相差显微镜检查,红细胞膜悬液中未见其他细胞成分污染 (图 1),经生化测定,红细胞膜悬液中血红蛋白含量在 0.3 毫克%以下。

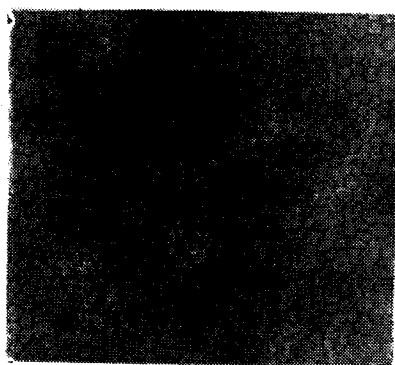


图 1 人红细胞膜相差显微镜照片 (×660)

二、(Na-K)-ATP 酶活性测定

主要参考 Pearson 的方法^[2],但加以改进。酶反应液的总体积为 200 微升,取十二个小试管,分 A、B、C、D 四个组 (每组重复 3 管,取其平均值)。A 组:反应液中含 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4), 150mM NaCl, 20mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM ATP; B 组:反应液中含 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4), 150mM NaCl, 20mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM ATP, 80 微升红细胞膜悬液; C 组:反应液中含有 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4), 150mM NaCl, 20mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM ATP, 80 微升红细胞膜悬液, 0.1 mM 乌巴碱; D 组:反应液中含有 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4), 5mM MgCl₂, 0.5mM ATP, 80 微升红细胞膜悬液, 0.1mM 乌巴碱。反应以加入 ATP 开始, 37℃ 水浴保温 10 分钟后,立刻置入冰浴中,然后向各管加入 50 微升 15% 三氯醋酸,再向 A 组中加入 80 微升红细胞膜悬液,之后,分别向 A、B、C、D 四个组中加入 0.75 毫升双蒸水,将各管在 1000g 离心 10 分钟,小心吸出上清液,待测磷。

分别将 B, C, D 组的消光值减去 A 组的消光值,在标准曲线上查出磷的含量,换算成比活性单位,微克分子磷/毫克蛋白·小时。

磷的测定采用 Muszbek 的方法^[3],蛋白质的测定采用改良的 Lowry 法^[4],以牛血清白蛋白为标准。

A 组为无酶活性的对照组, B 组为 (Na, K, Mg)-ATP 酶活力, C 组为经乌巴碱抑制后的 (Na, K, Mg)-ATP 酶活力, D 组为 (Mg)-ATP 酶活力。

(Na, K)-ATP 酶活力 = (Na, K, Mg)-ATP 酶活力 - (Mg)-ATP 酶活力。

抑制后 (Na, K)-ATP 酶活力 = 加入乌巴

碱后的 (Na, K, Mg)-ATP 酶活力 - (Mg)-ATP 酶活力。

$$\begin{aligned} & (\text{Na, K})\text{-ATP 酶被乌巴碱抑制的百分数} = \\ & \left(1 - \frac{\text{抑制后的 (Na, K)-ATP 酶活力}}{\text{(Na, K)-ATP 酶活力}} \right) \\ & \times 100\% \end{aligned}$$

实 验 结 果

临床共测定了 50 例人红细胞膜 ATP 酶的活力,其中包括正常人(献血员)30 例,假肥大型肌营养不良患者 13 例,萎缩性肌强直患者 3 例,慢性肾功能衰竭患者 3 例,急性淋巴细胞白血病患者 1 例。结果见表 1

表 1 正常人及病人红细胞膜 ATP 酶活力

分 组	例 数	(Na, K, Mg)-ATP 酶	(Mg)-ATP 酶	(Na, K)-ATP 酶	乌巴碱抑制%
正常对照	30	0.542±0.034	0.234±0.020	0.308±0.023	94.5±1.5
假肥大型肌营养不良	13	0.162±0.024	0.043±0.007	0.116±0.019	93.1±5.7
萎缩性肌强直	3	0.211±0.026	0.071±0.010	0.139±0.031	100±0
慢性肾功能衰竭	3	0.121±0.053	0.031±0.002	0.090±0.041	87.5±12.5
急性淋巴细胞白血病	1	0.078	0.064	0.014	100

注: ATP 酶活力单位为微克分子磷/毫克蛋白·小时表中的数字表示平均值±标准误

从表中看出,假肥大型肌营养不良患者红细胞膜 (Na, K)-ATP 酶活力比正常人低 62.2%,经统计学处理 $P < 0.001$,差别非常显著。萎缩性肌强直患者, (Na, K)-ATP 酶活力比正常人低 54.8%。慢性肾功能衰竭患者,比正常人低 70.9%。急性淋巴细胞白血病一例的 (Na, K)-ATP 酶活力仅为正常人的 4.6%。

此外,从表中看出,乌巴碱对正常人及患者的红细胞膜 (Na, K)-ATP 酶活力都有较强的抑制作用,彼此虽有差别,但差别不显著。

讨 论

红细胞的分离有多种方法,但均有一定缺点。Dodgse 法^[5]用磷酸缓冲液,其中的磷对我们所测反应系统中的磷有干扰。Pearson 的方法^[2]用血量大(10—30 毫升),需要的离心力高(48000g),整个操作过程较长。我们作了进一

步修改,使每份血样减少至 1.5—2 毫升。为了更好地将白细胞,血小板去掉,去血浆层及用等渗缓冲液洗红细胞时,将原来的 2000g 离心 10 分钟,改为 300g 离心 2 分钟,为了缩短操作过程,将 5 倍量溶血改为 20 倍量溶血,溶血液用 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4),省去了加入溶血液之后放置 30 分钟一步,溶血之后的离心速度也由 48000g 改为 6000g,这样既减少了离心次数,缩短了操作过程,又能得到满意的红细胞膜。

常规测定可溶性蛋白质的 Lowry 法^[6],在用于分析细胞膜或脂蛋白样品时,需要在分析前对样品进行预处理,使之溶解。而改良的 Lowry 法在碱性试剂中加入 1% SDS,用以增溶细胞膜,并增加了酒石酸铜试剂的量,从而用于细胞膜脂蛋白样品的分析,避免了与碱保温过夜和烦琐的处理步骤,结果与原始 Lowry 法相

同,在 0—100 微克蛋白范围内呈很好的线性关系。

Muszbek 等人^[3]测定无机磷的方法依据是,在磷钼酸和孔雀绿之间形成一种快速显色复合物,然后用适当浓度的硫酸进一步酸化,以终止反应,在这过程中没有其他复合物形成,过量的染料快速水解,但形成的磷钼酸-染料复合物一直稳定。该方法消除了 ATP 连续释放无机磷的影响,灵敏度与张安荣等人的放化测定法相同,可以测到毫微克分子水平。而我们的方法不需要特殊仪器,方法简便,易于掌握、适用于一般临床生化实验室。

关于(Na, K)-ATP 酶的活力,文献 [2, 7—11] 中报道的结果很不一致(见表 2),其原因可能有多种,如血液贮存时间不同,抗凝剂种类不同,以及红细胞膜的分离方法和酶活力测定方法不同等。我们测定的 30 例正常人红细胞膜(Na, K)-ATP 酶活力,平均值为 0.308 微克分子磷/毫克蛋白·小时,在文献报道范围之内,由于我们测定的例数多,所以标准误差较小,因此,结果更可靠。

乌巴碱是一种糖苷,能抑制细胞膜 Na⁺、K⁺

的运输,但它只抑制人红细胞膜的 Na⁺、K⁺ 泵,而不抑制其他运输系统,1/2 最大抑制浓度是 10⁻⁷—10⁻⁸M。我们的反应系统中,乌巴碱的浓度是 0.1mM,对酶的抑制作用达 90% 以上,与文献报道的结果基本一致。关于乌巴碱的作用点问题,Peronne 等人认为它作用在细胞膜的外表面,作用的主要环节是 K⁺ 的磷酸化反应,所以它对 (Na, K)-ATP 酶的抑制作用受膜外 [K⁺] 影响。

另外我们还观察到假肥大型肌营养不良和萎缩性肌强直,慢性肾功能衰竭及白血病患者红细胞膜 (Na, K)-ATP 酶活力比正常人低很多,因为酶是蛋白质,它镶嵌在细胞膜的脂质双分子层中,倘若患者红细胞膜上 (Na, K)-ATP 酶活力降低,说明这些红细胞的结构发生异常,因此,我们的实验结果可以进一步证实,从分子水平揭示某些疾病的发病机理是可能的。

参 考 文 献

[1] 张安荣等人:《中华核医学杂志》,1, 1, 1981。
[2] Pearson, T. W.: *Life Sciences*, **22**, 127, 1978。
[3] Muszbek, L. et al.: *Anal. Biochem.*, **77**, 286, 1977。
[4] Mary, A. K. Markwell.: *Anal. Biochem.*, **87**, 206, 1978。
[5] Dodge, J. T.: *Arch. Biochem., Biophys.*, **100**, 119, 1963。
[6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951。
[7] Mawatari, S. M. D.: *Arch. Neurology*, **33**, 489, 1976。
[8] Souweine, G.: *J. Neurology*, **217**, 287, 1978。
[9] Godin, D. V.: *J. Medicine*, **10**, 4, 1979。
[10] Dunn, M. J.: *J. Neurological Sciences*, **46**, 209, 1980。
[11] Mishra, S. K.: *J. Neurological Sciences*, **46**, 333, 1980。

[本文于 1982 年 9 月 27 日收到]

表 2 正常人 (Na, K)-ATP 酶活力比较

(Na, K)-ATP 酶活力	例数	作 者	时间, (年)
0.308±0.023	30	本实验室	1982
1.71±0.08 A 法	10	Mawatari, S.	1976
2.45±0.21 B 法	2		
0.391±0.03 A 法	6	Souweine, G.	1978
0.160±0.014 B 法	5		
0.25±0.04	7	Pearson, T. W.	1978
0.28±0.086	15	Godin, D. V.	1979
0.626±0.08 A 法	17	Dunn, M. T.	1980
0.09±0.03 B 法	6		
0.19±0.09	12	Mishra, S. K.	1980

注:酶活力单位为微克分子磷/毫克蛋白·小时,表中的数字为平均值±标准误

更 正

1983 年,1 期《生物医学信号分析》中作者单位应改为南开大学物理系。参考文献 [20] 作者应改为刘键等。