

(Na⁺/K⁺)-ATPase 研究概况

谢 静 平

(中国科学院生物物理研究所、北京)

提 要

本文概述 (Na⁺/K⁺)-ATPase 的一般分子性质。介绍神经元和脂肪细胞中两种不同分子形式 (Na⁺/K⁺)-ATPase 的分离鉴定和功能性质, 以及 (Na⁺/K⁺)-ATPase 主要功能亚基一级序列和高级结构研究所取得的一些进展。

(Na⁺/K⁺)-ATPase (E. C. 3. 6. 1. 37) 是哺乳类细胞质膜上从水解 ATP 获得能量、逆电化学梯度转运 Na⁺, 同时反方向转运 K⁺ 的一种内膜蛋白, 也称钠泵。自五十年代 Skou^[1] 预期它的存在以来, 对 (Na⁺/K⁺)-ATPase 的分离鉴定及分子性质作了大量研究。Na⁺ 泵被确认为是强心苷如毛地黄苷和哇巴因等的受体, 并且也许是其唯一的受体。这为心肌调节药物的药理作用提供了可能的生理解释。为此, (Na⁺/K⁺)-ATPase 的发现被看作是医药研究史上的一大突破。此外, 因 (Na⁺/K⁺)-ATPase 在各种组织中分布极广, 且对许多重要的生理过程——如盐离子的跨膜转运及膜电位和神经脉冲的调节等起着关键作用, 从而引起了多种学科许多科学工作者的极大兴趣。(Na⁺/K⁺)-ATPase 是一个发现较晚, 但研究比较深入的功能膜蛋白。本文先简要概述此酶的一般分子性质, 随后较详细地介绍最近几年研究中所取得的一些新的进展。

(Na⁺/K⁺)-ATPase 的一般分子性质

(Na⁺/K⁺)-ATPase 广泛分布于各类细胞质膜上, 如红细胞、肾髓细胞、心肌细胞、精子细胞和脂肪细胞等。在可兴奋细胞如神经突触质膜上含量尤为丰富。它是一种不对称的内膜蛋白, 由紧密结合的 α 、 β 二个亚基组成, 其中 α

亚基分子量约 100kD, 含 ATP 催化水解部位, 是酶的主要功能亚基。 β 亚基是一糖蛋白, 糖占总量(重量比)的 20%, 分子量为 55kD, 目前除已知它对稳定 α 亚基, 能增加整个酶的水解活性外, 对其它可能的功能性质了解甚少。

(Na⁺/K⁺)-ATPase 在天然膜上功能发挥时以二聚体或多聚体形式存在。它每水解一 ATP 分子, 可转运 3 个 Na⁺、同时反方向转运 2 个 K⁺。因涉及到净的电荷转移, 因而是电生性的 (electrogenic)。在一个以二聚体 $\alpha_2\beta_2$ 存在的 (Na⁺/K⁺)-ATPase 分子中存在 16 个可自由结合的巯基。用巯基氧化剂有限修饰易结合的两个 SH 对酶活性无明显影响, 但进一步氧化将抑制酶的活性。将酶和 1mmol/L 乙基马来酰胺 (N-ethylmaleimide, NEM) 保温 20 分钟可使酶的活性显著降低。若保温体系中有 ATP 或 ADP 存在时则可对酶活起一定的保护作用。但存在酶发挥活性所必需的 Mg²⁺、Na⁺ 和 K⁺ 则增加这种抑制作用^[2]。此外, (Na⁺/K⁺)-ATPase 除受其特异性抑制剂(如黄地毛苷、哇巴因等)及对多种 ATP 酶(或称第一类 ATP 酶)呈抑制作用的钒酸盐抑制外, 长链脂肪酸, 棕榈酰肉毒碱及棕榈酰辅酶 A 也显著抑制其活性。在脂肪类中、花生四烯酸和亚麻酸是 Na⁺/K⁺-ATPase 最有效的抑制剂。其抑制机理被认为是自由脂肪酸同酶上 K⁺ 结合位点相互

作用^[3]。虽然棕榈酰 CoA 等的作用机制尚不清楚,但可推论:这种抑制作用的结果必然同它对生理代谢的调节相关。

在 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 研究史上, $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的分离纯化及在人工膜上的成功重组是继它被发现以来的又一个里程碑。不但此酶水解 ATP 和转运离子的偶联关系得到了大量的实验证实,而且发现 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 在无 ATP 供给能量时,还具有 Na^+ 、 K^+ 等离子通道功能。此外,对 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 同膜脂的相互作用方面也作了广泛的研究。以肾髓细胞膜上的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 为例,Apell 和他同事们的实验结果表明^[4]:用短链磷脂酰胆碱重建的脂酶体, $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 转运功能极低;而以长链单不饱和脂肪酸磷脂酰胆碱则有较高的转运活性。经磷脂酶 C 降解磷脂极性头部,通过分析 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的界面脂组成及酶的活性后得出:磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇对维持酶的活性起着重要作用。此外,胆固醇嵌入脂双层中改变膜脂的流动性也将调节酶的活性。

$(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 在功能发挥中,水解 ATP 本身磷酸化后构象从状态 E_1 转变成状态 E_2 ,从而使转运的离子进行交换。酶构象变化的假说已得到大量的实验证实。并发现在没有 Na^+ 、 Mg^{2+} 和 ATP 存在时,这种构象转变是 $\text{K}^+ \rightarrow \text{K}^+$ 交换所必须的 Jørgensen 等人^[5]在严格控制的条件下预先处理纯化的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$,使 α 亚基肽链在近氨基端一特异部位断裂,被降解的酶蛋白不能从一种构象向另一种构象转变,从而导致相应的 $\text{K}^+ \rightarrow \text{K}^+$ 交换功能丧失。圆二色光谱学的结果还表明: $E_1 \rightarrow E_2$ 的转变伴随着肽链骨架十分剧烈的构象变化。这种变化被认为涉及从 α -螺旋到 β 折叠的转变,导致肽链快速、剧烈和可逆往复变化的原因。Skou^[6]假设并已证明是由质子改变肽链中氨基和羧基的解离来实现的。具体说当酶和 K^+ 结合后质子化,而与 Na^+ 结合后,则脱质子化。由此可以推论:改变环境的 pH 值将影响酶对离子的正常转运。

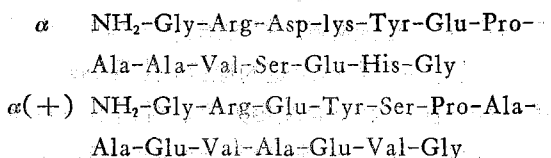
最后,值得一提的是,在重组体系中,由于膜蛋白的嵌入导致磷脂膜对阳离子的通透性增加,及其它一些尚不清楚的原因,使得 Na^+/K^+ 偶联转运比同生理情况相差异。对用不同磷脂重建的脂酶体,还可能出现不同的离子转运比。此外, Na^+/K^+ 的交换转运比也与膜内、外的阴离子种类和浓度有关。

$(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的最新研究进展

1. 两种不同分子形式 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的鉴定及性质

早在从细胞水平上研究 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 时,就发现神经元上的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 和其它非神经组织细胞的有差异。如星状胶质细胞经哇巴因处理后发生显著的渗透膨胀,而神经元则没有变化。不同实验室的大量结果表明:神经元上 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的 K^+ 转运性质及哇巴因结合动力学远比其它组织细胞中的复杂。结果预示,神经元上的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 可能存在两个不同亲和性的抑制剂结合部位,或神经元中存在两种分子性质不同却功能相似的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 。这些疑问到 1979 年基本被澄清,当时,哈佛学者 Sweadner^[7]从鼠脑组织中分离纯化 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳发现经部分分离纯化的制品在非神经组织来源的 α 亚基区域呈紧挨着的两条带,分子量相应为 97kD 和 99kD。两条带在分离胶浓度高达 10% 时仍可清楚区分,在 5% 时分辨率最佳。用放射性磷标记的 ATP 自显影证明两者都具有 ATP 酶水解活性。根据分子量的差异,它们被分别命名为 α , $\alpha(+)$ 。进一步研究发现:两者存在着可探测的结构和动力学差异。除它们对其特异性抑制剂哇巴因表现出不同亲和性外,在天然态,两者对胰蛋白酶消化和 Cu^{2+} -O-phenanthroline 催化交联有不同的敏感性。并且巯基试剂 NEM 在这两种不同分子形式的亚基上可接近的 SH 数目也不同 ($\alpha \sim 2$, $\alpha(+) \sim 4$)。最近, Lytton^[8]分别从鼠肾和鼠脑轴膜中纯化 α 和 $\alpha(+)$ 亚基,用高灵敏气相序列分析仪确定了它们氨基

端的 14 个氨基酸组成, 结果为:



不难看出, 虽然两者是高度同源的, 但有显著的差别使人确信它们是不同的基因, 或同一基因不同外显子 (exon) 的产物。

大家知道, $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 对神经脉冲的传导起着十分重要的作用。神经元中存在两种不同分子形式的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 自然引起了广泛的兴趣和重视。为深入探讨它们的功能性质和生理作用, 在尚无有效分离手段的同时, 若能找到对其中一种特异的抑制剂, 将为揭示两者的结构和功能差异提供十分有效的途径。鉴于两种不同亚基上的自由巯基数不同, 容易想到用巯基氧化剂如 NEM, DTNB, DIDS 等来部分抑制, 但它们特异性不高。1983 年 Matsuda 和 Cooper 报道了抗硫胺素能特异地抑制从神经元中提取的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的活性^[9]。进一步实验证明抗硫胺素主要抑制脑 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的 $\alpha(+)$ 亚基。这种抑制作用除被硫胺素拮抗外, 最近还发现巯基保护剂如二巯苏糖醇 (DTT), 谷胱甘肽 (GSH) 和巯基乙醇等也能部分拮抗。这表明抗硫胺素的抑制作用也可能涉及到与酶中巯基的相互作用或简单地充作一种巯基封闭剂。为了澄清这一疑问, Matsuda 等人^[10]比较了抗硫胺素和巯基封闭剂 NEM 两者对鼠脑 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的抑制作用。发现虽然两者抑制行为在许多方面表现一致, 如它们都选择性地抑制鼠脑 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 中 $\alpha(+)$ 亚基的磷酸化, 降低酶对哇巴因的敏感性等。但两者对 GSH 的拮抗效率及在反应过程中不同配基存在时的抑制效应等方面有显著差异。较低浓度的 GSH ($\mu\text{mol/L}$ 量级) 便可保护鼠脑 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 免遭抗硫胺素的抑制, 但要拮抗 NEM 的作用则需要很高的浓度。此外, NEM 作为巯基封闭剂, 能同样有效地抑制其它一些在活性部位有巯基参与的蛋白酶像乙醇脱氢酶和丙

氨酸脱氢酶等的活性。但抗硫胺素则不表现出抑制作用。直接分析测定经抗硫胺素处理后的牛脑 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 分子中的自由巯基和硫桥数表明, 抗硫胺素虽然引致酶中二硫键的形成, 但似乎并不直接同巯基相互作用。基于上述结果, Matsuda 等人认为, 抗硫胺素是以巯基氧化剂不同的作用方式修饰巯基后, 改变酶的分子结构和构象进而使 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 失活的。用抗硫胺素为选择性抑制剂, 他们还发现两种不同形式的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 对界面磷脂组成有不同的特异性。

继从脑组织中确定有两种不同分子形式的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 后, 1985 年 Lytton^[13] 用免疫学方法发现在脂肪细胞中, $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 也存在有类似差异的两种不同分子形式。它们同样被命名为 $\alpha(+)$ 和 α_0 。其中 $\alpha(+)$ 约占重量比的百分之七十五。1980 年 Resh^[12] 等人曾报道胰岛素激活鼠脂肪细胞膜上 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的 Rb^+ 转运。自鉴定到两种不同分子形式的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 后, Lytton^[13] 已初步证明胰岛素可能选择性地激活 $\alpha(+)$ 。众所周知, 外激素胰岛素的分泌对脂肪代谢起着调控作用, 胰岛素选择性地激活脂肪细胞膜上的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 必然同它的调节作用有关。但这种调节作用的生理意义和具体机制还有待进一步研究。

关于同一组织中存在两个功能相似的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 分子的生理意义及它们的起源目前还不清楚。有趣的是, Matsuda^[14] 等人在分析测定不同发育阶段鼠脑 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的组成时发现: 从受孕到妊娠第十四天的鼠脑 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 主要是 α 型; 但到妊娠第十八天和分娩时主要是 $\alpha(+)$ 型。这说明胚胎发育和两种形式 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的表达有着内在联系。至于脂肪细胞两种分子形式的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 在发育过程中是否有相同的变化; 以及这两种不同组织上的 $\alpha(+)$ 型是否有同源性目前还尚无实验报道。

2. $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 的一级序列和高级结构

最近,三家实验室应用 cDNA 信息库从三种不同的动物中独自分离获得了 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase } \alpha$ 亚基的克隆^[15]。比较羊肾和电鳗电器官 cDNA 克隆所反映的氨基酸序列发现:一级序列在两种不同类的动物中 85% 以上是保守的。编码 α 亚基的信使 RNA, 经蛋白印迹 (Northern blot) 分析, 含五千个碱基, 远大于编码所需的 3063 碱基数。而且腺苷含量很高。其中大部分非翻译的 RNA 位于 5' 端。目前这段序列的功能尚不清楚。蛋白合成后成熟所需的唯一加工就是切除一氨基端五肽。象其

它离子转运蛋白如肌质网 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ ^[16] 及红细胞阴离子交换蛋白等一样, 新合成的 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase } \alpha$ 亚基缺少氨基端的信号肽。

综合特异性部位标记和蛋白水解酶研究, 从预期的氨基酸序列可获得多肽链穿膜折叠形成天然态的一个简略的结构模型(见图 1)。图中箭头所指之处是胰蛋白酶 (Try) 和胰凝乳蛋白酶 (Chy) 在肽链结合不同离子时选择降解部位; 数字①到⑧表示 13 个穿膜疏水区; 方框所围部分与肌质网 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 同源; 用斜线所涂肽段则与 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 和细菌 K^+ -

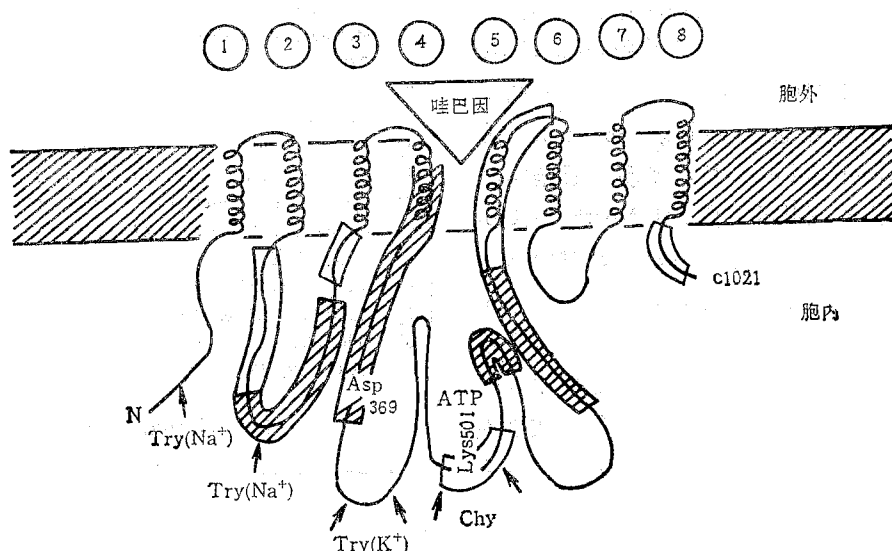


图 1 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 催化亚基穿膜折叠的模型
(引自 Cantley, L. TINS, 1.1. 1986)

ATPase 两者都同源。从图看出, 这模型的突出特点是, 在细胞质一边有一由中央三分之一肽链折叠而成的特大域; 而氨基和羧基端的各三分之一形成多个跨膜域。氨基端的四个区是由几个亲水残基不时间断的连续疏水残基构成的 α 螺旋折叠而成。这模型和从蛋白水解酶研究获得的结果一致。在细胞质边的大域上包含 ATP 催化水解部位。荧光标记证明 ATP 的竞争结合剂 FITC (Fluorescein-5'-isothiocyanate) 和 501 位的赖氨酸结合; 而 ATP 水解过程中的磷酸化中间产物天冬氨酸则在 369 位。这说明构成 ATP 水解位点的氨基酸残基在一级序列上相距 132 个残基之远。另外,

FITC 反应位点 (Lys 501) 和穿膜域②之间的肽链区对催化机制具有特殊的意义。当 Na^+ 和 ATP 存在时胰酶选择性地在穿膜区②和③之间消化断裂; 而在 K^+ 存在时则在磷酸化的天冬氨酸 (Asp 369) 和 FITC 反应位点间断裂。由此可以推论: 位于两个胰蛋白酶敏感点间的穿膜域③和④, 对耦合阳离子转运和 ATP 水解起着重要作用。

用膜不通透的哇巴因素和标记研究表明: 哇巴因在 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ 上的结合位点至少部分由 α 亚基组成。早期实验发现, 哇巴因从膜外表面同酶结合后抑制 ATP 耦合的离子转运及 Na^+ 诱发的构象变化。由此推论上

述模型中穿膜域③和④之间的膜外肽链可能是抑制剂结合的关键部位。从目前所得的结果看, Na^+ 泵对哇巴因的敏感性似乎不单是由 α 亚基所决定的。English 等人^[17]克隆了一个完全对哇巴因不敏感的鼠基因, 它仅转录 1.2 千个碱基的 mRNA, 这明显少于编码 α 亚基所需的密码; 却表达这基因的细胞膜上明显包含正常的 α 亚基, 但对哇巴因的亲性和性很低。这基因是否编码一不规则的 β 亚基或产生另一改变酶对哇巴因亲性和性的调节蛋白或其它都还有待进一步研究。

由于脑神经细胞中有两种对哇巴因不同亲和性的 α 亚基。最近人们已开始用多抗和遗传工程方法对脑组织中 $(\text{Na}^+/\text{K}^+)-\text{ATPase}$ 的基因结构和转录特征进行探讨。Schneider 等人^[18]用 Southern blot 分析, 发现在鼠脑中仅含有单一编码 α 亚基的基因; 用 Northern blot 分析也只获得一约五千个碱基的 mRNA 带。对此最可能的解释是两种亚基来自同一转录子的不同加工, 以致成熟的 mRNA 难以分离获得。因此, 要弄清 α 和 $\alpha(+)$ 的功能性质及哇巴因结合所涉及的氨基酸残基还有待于成功地

测定它们完整的一级序列。

参 考 文 献

- [1] Skou, J. C.: *Q. Rev. Biophys.* 1975, **7**, 401.
- [2] Skou, J. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, **339**, 234.
- [3] Bidard, J. N. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **769**, 245.
- [4] Marcus, M. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **854**, 270.
- [5] Jorgensen, P. L. et al.: *Ann. NY Acad. Sci.* 1982, **402**, 207.
- [6] Skou, J. C.: *Curr. Top. Membr. Transp.* 1983, **19**, 323.
- [7] Sweadner, K. J.: *J. Biol. Chem.* 1979, **254**, 6060.
- [8] Lytton, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, **132**, 764.
- [9] Matsuda, T. & Cooper, J. R.: *Biochemistry* 1983, **22**, 2209.
- [10] Matsuda, T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **817**, 17.
- [11] Lytton, J. et al.: *J. Biol. Chem.* 1985, **260**, 1177.
- [12] Resh, M. D. et al.: *J. Biol. Chem.* 1980, **255**, 10928.
- [13] Lytton, J.: *J. Biol. Chem.* 1985, **260**, 10075.
- [14] Matsuda, T. et al.: *J. Biol. Chem.* 1984, **259**, 3858.
- [15] Shull, G. E. et al.: *Nature* 1985, **316**, 69.
- [16] MacLennan, D. H. et al.: *Nature* 1985, **316**, 696.
- [17] English, M. H. et al.: *J. Biol. Chem.* 1985, **260**, 1114.
- [18] Schneider, J. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, **82**, 6357.

[本文于 1988 年 3 月 14 日收到]

北京市星火技术研究所与有关单位联合举办特种养殖培训班

包盈利、包销路、包种源、包技术

一、蜗牛养殖技术: 蜗牛肉是高蛋白美味佳肴, 不仅可出口创汇, 而且内脏可提取蜗牛酶, 壳可做饲料添加剂, 投资 300 元每人每年收益可达万元以上。每只一年可繁殖 600—1000 只, 生长五个月可出售, 包销最低保值价每斤 3 元, 签订合同, 面授 80 元, 函授 30 元。

二、养蝎及蝎毒提取技术: 蝎子不仅是名贵中药材, 还是高档佳肴, 提取的蝎毒更是价值百倍, 每月可提 2—3 次毒, 售价每克 1200—1800 元, 每平方米可养 2000 只, 年收益达千元以上, 回收蝎最低保值每条 0.15 元。提供蝎毒器每台 100 元, 同时可为函授学员邮寄种蝎, 包赔途中损失。每条 0.3—0.6 元, 签定回收合同, 面授 120 元, 函授 35 元。

三、食用菌制种栽培技术培训: 主要有姬菇、金

针菇、猴头、黑木耳、灵芝、竹荪等十多种技术, 代料栽培及加工全套技术培训, 供应菌种, 包销产品。由于品种不同, 回收价格不一, 最低保值价每吨在 3800 元以上, 面授 80 元, 函授 30 元。

以上培训班常年举办, 随到随教, 蜗牛、蝎子面授 2—3 天, 食用菌面授 10 天, 函授时间均为两个月, 如函授不会, 可申请面授, 面授时减去函授费。结业后发给(钢印)结业证书。

汇款及通讯处: 北京 867 信箱 20816 组李群,

邮政编码 100024。

市中心接待处: 北京市西城区鼓楼西大街 204 号。