

# 绞股蓝总苷对大鼠心、脑 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用及其动力学分析

韩晓燕, 卫洪波\*, 张富程

(中山大学附属第三医院 中心实验室, 广东 广州 510630)

**摘要:**目的 观察绞股蓝总苷对心、脑微粒体  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性的抑制作用及动力学分析。方法 采用离心法制备大鼠心、脑组织微粒体酶, 以比色法测定  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力, 通过酶动力学研究方法分析绞股蓝总苷对心、脑微粒体  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性的抑制作用。结果 绞股蓝总苷体外可逆性抑制大鼠心、脑微粒体  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性, 并呈浓度依赖性, 且对脑微粒体  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用较强, 其  $\text{IC}_{50}$  分别为 (58.79 ± 8.25)、(52.07 ± 6.25) mg/L。降低  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  浓度或增加 ATP 浓度则增强其抑制酶活性作用。酶动力学分析显示, 绞股蓝总苷对微粒体  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的作用近似  $\text{Na}^+$  的竞争性拮抗剂、底物 ATP 的反竞争性抑制剂、 $\text{K}^+$  的混合性抑制剂。结论 绞股蓝总苷通过抑制心、脑  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性而发挥其强心作用和中枢抑制作用。

**关键词:** 绞股蓝总苷;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶; 微粒体; 酶动力学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)10-1542-03

## Inhibition and enzyme kinetic analyses of gypenoside on $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase in rat heart and brain

HAN Xiao-yan, WEI Hong-bo, ZHANG Fu-cheng

(Research Center, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Key words:** gypenoside;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase; microsomes; enzyme kinetics

绞股蓝总苷 (gypenosides, Gyp) 是葫芦科植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak. 的主要成分, 它含有多种与人参皂苷 (ginsenoside) 结构相似的皂苷成分, 并具有相似的药理活性。Gyp 对心肌的正性肌力作用和对中枢神经系统显著的抑制作用已广泛用于临床, 治疗慢性失眠、头痛, 缓解精神紧张等症状<sup>[1,2]</sup>。药理研究显示 Gyp 对大鼠产生正性肌力作用, 可增加麻醉犬的心输出量; 大剂量可产生中枢抑制作用<sup>[1,2]</sup>。为进一步地探讨 Gyp 的正性肌力作用和中枢抑制作用机制, 本实验采用酶动力学研究方法观察 Gyp 对大鼠心、脑微粒体  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响, 以期为临床应用药提供理论依据。

### 1 材料与与方法

1.1 药品和试剂: 绞股蓝总苷 (Gyp), 由南京大学生物系提供并鉴定, 为黄绿色粉末 (质量分数大于 90%)。三磷酸腺苷二钠 ( $\text{ATP-Na}^{2+}$ ) 为中国科学院生物化学研究所产品, 其余试剂均为国产分析纯, 用前以 Millipor 去离子水配制。

1.2 仪器: Beckman Allegra 64 R 高速冷冻离心

机, Optima L-100XP 超速离心机, Beckman DU640 分光光度计, DY89-1 匀浆器。

1.3 微粒体酶的制备: 雄性 Wistar 大鼠 (购自中山大学动物实验中心), 断颈处死, 速取出心、脑组织置于预冷 (4 °C) 的 Tris-HCl 缓冲液中冲洗 2 次, 去除结缔组织, 加入 5 倍体积的 Tris 缓冲液 (含蔗糖 0.25 mmol/L, Tris-EDTA 1 mmol/L, HCl 10 mmol/L, pH 7.4) 制成匀浆, 经 10 000 × g 离心 15 min 两次, 取上清液, 再行 100 000 × g 离心 30 min, 取沉淀得大鼠心、脑微粒体<sup>[3]</sup>, 以上述缓冲液混匀。以 Bradford 比色法<sup>[4]</sup>测定酶蛋白浓度, 配成 0.5 g/L 微粒体酶蛋白混悬液, 分装, -30 °C 保存备用。上述操作均在 0~4 °C 中进行。

1.4 ATP 酶活性测定: 用光电比色法<sup>[4,5]</sup>以复管测定 ATP 酶活力。在 1 mL 反应体系中, 含有咪唑-盐酸 30 mmol/L,  $\text{Mg}^{2+}$  5 mmol/L, 含或不含  $\text{Na}^+$  100 mmol/L, 含或不含  $\text{K}^+$  5 mmol/L, 测心肌酶活力时反应体系中酶蛋白质量浓度为 25 mg/L, 测脑酶酶活力时为 10 mg/L, pH 为 7.4。37 °C 温育 10 min 后加入 5 mmol/L 的 ATP 反应 10 min, 取各测定

收稿日期: 2006-02-12

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (010742)

作者简介: 韩晓燕 (—), 女, 北京市人, 副教授。Tel: (020) 87583706 E-mail: hxy3706@126.com

\* 通讯作者 卫洪波 E-mail: drWHB@21CN.com

管反应液 0.1 mL,按 Mayan<sup>[5]</sup>方法测定无机磷(Pi)的量。酶活力单位以 1 h 内 1 mg 蛋白水解生成的 Pi 微摩尔数表示,即  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。反应体系中不含  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  时所测得的酶活力为相应组织微粒体的  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力,反之为总 ATP 酶活力。总酶活力减去  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力即得  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶活力。本实验测得正常大鼠心、脑  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶活力分别为  $(25.33 \pm 2.86)$  和  $(186.55 \pm 10.60) \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ,分别约为总酶活力的 31.59% 和 68.77%。

1.5 统计分析:实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 SPSS 11.0 软件做统计学数据处理。

## 2 结果

2.1 Gyp 对大鼠心、脑微粒体  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用:Gyp (10、30、60、100、200、300 mg/L) 显著抑制心、脑微粒体  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶活性,并呈浓度依赖性。以半对数作图法(以 Gyp 质量浓度的对数为横坐标,以酶活性抑制率相对应的概率单位为纵坐标)得 Gyp 对心、脑微粒体  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶的  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $(58.79 \pm 8.25)$ 、 $(52.07 \pm 6.25)$  mg/L。降低底物 ATP 浓度,Gyp 对心  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用减弱,降低  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  浓度,Gyp 对脑  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用增强。结果见图 1。可见当 ATP 0.5 mmol/L 时,Gyp (10、30、60、100、200、300 mg/L) 对心  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用明显低于 ATP 5 mmol/L 时 Gyp 的抑制作用,因而 Gyp 的浓度抑制曲线右移;但在  $\text{Na}^+$  10 mmol/L 时,Gyp 对脑  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用显著强于  $\text{Na}^+$  100 mmol/L 时 Gyp 的抑制作用。

2.2 Gyp 对  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶抑制作用的时间过程:本实验以脑酶进行研究。在酶反应开始的不同时间测定酶活力。图 2 显示反应介质中有或无 Gyp 存在时,酶活性均随反应时间延长而增强;测定不同预孵育时间对 Gyp 抑酶的影响,在 Gyp 存在下孵育 6 min 时酶活性降低了约 50%,在反应 17 min 后,孵育时间延长,酶活性不再变化。当介质中 Gyp 质量浓度为 100 mg/L 时,脑  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶活性受到显著抑制 ( $P < 0.01$ )。提示 Gyp 对脑  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶产生快速抑制作用。

2.3 Gyp 对  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用的可逆性:随着酶蛋白质量浓度增加(心酶蛋白 2.5~50 mg/L,脑酶蛋白 5~30 mg/L),心、脑  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶活性也随之增强,呈线性关系 ( $P < 0.001$ ),以酶反应速率对酶蛋白质量浓度作图,见图 3。反应

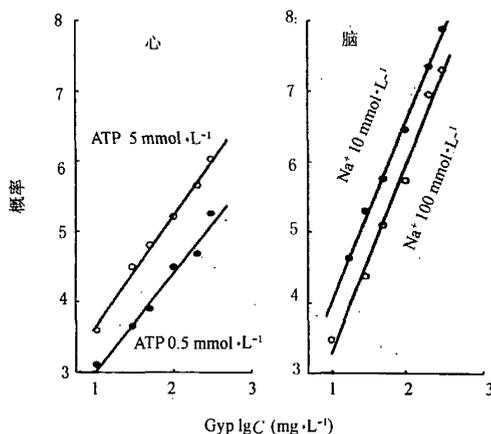


图 1 Gyp 对大鼠心、脑微粒体  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶活力的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

Fig. 1 Inhibition of Gyp on microsomal  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase activity in heart and brain of rats ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

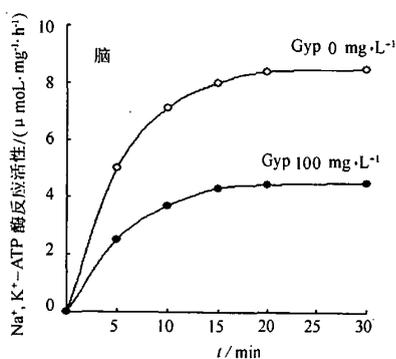
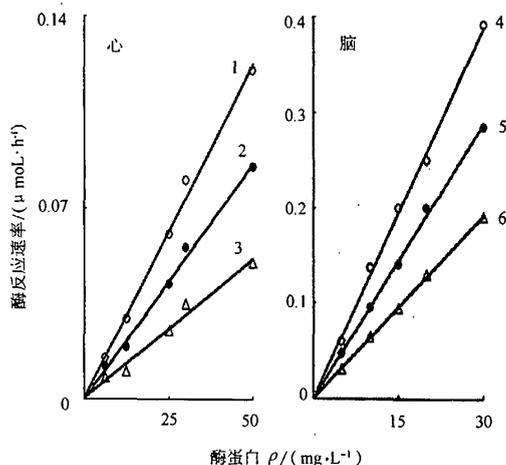


图 2 Gyp 对  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶抑制作用的时间过程 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 2 Time course of Gyp inhibition on  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

体系中存在 Gyp 时,酶反应曲线斜率下降,且随 Gyp 质量浓度增加斜率下降明显,各酶反应曲线分别交于坐标零点。此结果说明 Gyp 对大鼠脑  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用为可逆性的。

2.4  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、ATP 浓度对 Gyp 抑酶作用的影响:在反应介质中 Gyp 的质量浓度不变时,测定不同浓度  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、ATP 对酶活力的影响。结果发现:存在或不存在 Gyp 的反应介质中,改变  $\text{Na}^+$  (10~100 mmol/L) 或  $\text{K}^+$  (0.5~5 mmol/L) 浓度, $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶活力均随  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  浓度增加而增强,而 Gyp 对该酶的抑制作用程度却随介质中  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  浓度的增高而降低,说明  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  可拮抗 Gyp 的抑酶作用。采用 Lineweaver-burk 双倒数方法做图显示<sup>[6]</sup>:随着 Gyp 质量浓度增加,酶的  $V_{\text{max}}$  基本不变 ( $P >$



1~3-Gyp 0, 30, 100 mg/L 4~6-Gyp 0, 80, 200 mg/L

图 3 Gyp 对 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶抑制作用与酶蛋白质量浓度的关系 ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

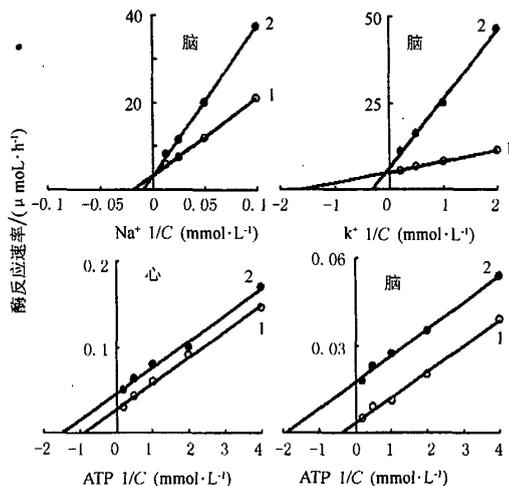
Fig. 3 Relationship between Gyp inhibition on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and enzyme protein concentrations ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

0.05), 但  $K_m$  值较对照增加, 两条曲线交于纵坐标上, 这表明 Gyp 对 Na<sup>+</sup> 表现竞争性抑制作用; 但对 K<sup>+</sup> 其曲线交于第二象限近 Y 轴附近, 所以表现为混合型竞争抑制作用; 当反应介质中存在 Gyp 时, 心、脑 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性随介质中 ATP 浓度的增高而增强, 但  $K_m$  值和  $V_m$  均较对照降低 (图 4), 曲线斜率不变 ( $P > 0.05$ ), 接近平行左移。因而 Gyp 对大鼠心、脑 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶底物 ATP 表现反竞争性抑制作用。

### 3 讨论

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶是一种调节酶, 是维持细胞内外正常离子浓度的重要酶系, 与细胞的正常能量代谢有密切关系。它在调节心肌收缩力、维持中枢神经兴奋性方面起着重要作用<sup>[1,2]</sup>。目前它广泛地用于临床治疗心衰、高血压、头痛、失眠等症状。本研究结果显示, Gyp 体外对 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶具有显著、迅速的抑制作用, 并呈浓度依赖性, 且对脑微粒体 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的抑制作用较强。推测 Gyp 对心、脑的药理作用与 Gyp 对两个组织中 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的抑制作用有关。

酶动力学分析显示, Gyp 与 Na<sup>+</sup> 竞争单一结合位点<sup>[6~8]</sup>, 使得低 Na<sup>+</sup> 浓度的抑制作用更强; Na<sup>+</sup> 与酶以 E · ATP 复合物的形式结合, Gyp 与酶的结合也如此, 但不被 E · ATP 复合物干扰, 即 E · ATP · Gyp 复合物。增加反应介质中的 Gyp 浓度,



心: 1-Gyp 0 mg/L 2-Gyp 30 mg/L

脑: 1-Gyp 0 mg/L 2-Gyp 100 mg/L

heart: 1-Gyp 0 mg/L 2-Gyp 30 mg/L

brain: 1-Gyp 0 mg/L 2-Gyp 100 mg/L

图 4 双倒数曲线显示 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 和 ATP 浓度对 Gyp 抑酶作用的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

Fig. 4 Double reciprocal plots showing inhibition of Gyp on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in various concentrations of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and ATP ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

使 E+ATP→E · ATP 平衡右移, 增加了酶与 ATP 的亲合力, 同时随着 ATP 活性降低, 酶的  $K_m$  值和  $V_{max}$  也降低, 但曲线斜率不变, 说明 Gyp 对 ATP 表现反竞争性抑制作用<sup>[6~9]</sup>。对 K<sup>+</sup> 的混合型抑制作用提示, Gyp 与 K<sup>+</sup> 对酶的结合位点与 Na<sup>+</sup> 不同。

### References:

- [1] Qi G, Zhang L. Progress of gynostemma on pharmacology [J]. *Acta Acad Med Chin PAPF* (武警医学院学报), 2003, 12(3): 239-241.
- [2] Zhang F, Li X T. Protective effect of gypenosides on left ventricular constriction in rats with experimental myocardial ischemia [J]. *Acta Acad Med Shandong* (山东医科大学学报), 1999, 37(1): 31.
- [3] Kocak H, Oner P, Oztas B. Comparison of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activities of in brains of rats at different ages [J]. *Gerontology*, 2002, 48(5): 279-281.
- [4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of m26 (icrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [5] Mayan R R, Fullerton D S, Ahmes K. A simple method for the purification of rat brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase (ATPase) [J]. *J Pharmacol Meth*, 1982, 7: 279.
- [6] Zhang S Z, Meng G Z, He Z X. *Research of Enzymology Technology* (酶学技术研究) [M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [7] Kong B Y, Clarke R J. Identification of potential regulatory sites of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by kinetic analysis [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(8): 2241-2250.
- [8] Andersson R M, Aizman O, Aperia A. Modulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is of importance for RVD [J]. *Acta Physiol Scand*, 2004, 18(4): 329-334.
- [9] Dnran M J, Pierre S V, Carr D L. The isoform-specific region of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase catalytic subunit: role in enzyme kinetics and regulation by protein kinase C [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(51): 16174-16183.