

苍术苷抑制氧化磷酸化的作用机制研究

张文明, 杨桂蓉, 李弘烨, 喻 凯, 陈 伟, 刘 健(西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

摘要: **目的** 探讨苍术苷(ATR)抑制氧化磷酸化电子传递链可能的作用靶点。**方法** 将制备好的线粒体悬液分为对照组、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)组、鱼藤酮(ROT)组、NAC和ROT联合组, 每组再分为4小组, 分别用0, 20, 40, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ATR处理。测定各组线粒体呼吸链中4种蛋白质复合体和ATP酶的活性。**结果** ATR能够抑制复合体I、IV和2种ATP酶的活性, 且其抑制作用和剂量相关。**结论** ATR可能影响呼吸链电子传递的始端复合体I、末端状态复合体IV和ATP酶活性, 最终抑制ATP的形成。

关键词: 苍术苷; 线粒体; 氧化磷酸化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0660-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.003

Inhibitive Mechanism of Atractyloside for Oxidative Phosphorylation

ZHANG Wenming, YANG Guirong, LI Hongye, YU Kai, CHEN Wei, LIU Jian (School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031 Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To research the possible targets of atractyloside for inhibiting respiratory chain of oxidative phosphorylation. **Methods** The mitochondria suspension was divided into 4 groups, namely blank control group, N-acetyl-L-cysteine(NAC) group, rotenone(ROT) group, and NAC-ROT combination group. And then each group was divided into 4 subgroups, which were treated with 0, 20, 40, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of atractyloside respectively. The activities of adenosine triphosphate(ATP) enzymes and 4 complexes at respiratory chain of each group were tested. **Results** Atractyloside could inhibit the activities of complex I and IV at respiratory chain, and $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$. The effects were dose-dependent. **Conclusion** It suggested that atractyloside can inhibit the activities of complex I at initial point and ATP enzymes and complex IV at end point of respiratory chain, which results into the inhibition of ATP production.

Keywords: Atractyloside; Mitochondria; Oxidative phosphorylation

苍术苷(ATR)是一种二萜糖苷类化合物, 在菊科植物苍耳的果实苍耳子、咖啡豆等都有发现, 早期研究^[1-3]发现 ATR 具有抑制氧化磷酸化的作用, 由于氧化磷酸化作用直接与电子传递链相偶联。电子传递链位于线粒体内膜上, 由4种分子量很大的跨膜蛋白复合体(线粒体呼吸链膜蛋白复合体I、II、III、IV)、介于I/II与III之间的辅酶Q以及介于III与IV之间的细胞色素C共同组成^[4]。因此, 本实验测定呼吸链中4种蛋白质复合体和ATP酶的活性, 旨在寻找ATR

抑制氧化磷酸化电子传递链可能的作用靶点, 为探明含ATR的植物或药物的毒性作用机理提供理论依据, 并为ATR的安全使用以及探索其中毒的救治方法奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 ATR, 中科院成都生物研究所提供, 纯度98.3%。用蒸馏水配制成100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的原液, 过滤除菌, 贮藏于4℃冰箱备用。N-乙酰-L-

收稿日期: 2014-03-17

作者简介: 张文明, 男, 硕士研究生, 研究方向: 药物抗肿瘤作用机理研究。Email: 381004917@qq.com。通讯作者: 喻凯, 教授, 博士, 研究方向: 药理毒理学。Email: yukai2037@sina.com。

基金项目: 中国科学院重点部署项目“中药(民族药)标准化研究”(KSZD-EW-Z-004); 国家重点基础研究发展计划项目“973计划”项目(2009CB522804)。

L-半胱氨酸(NAC), 成都科龙化工试剂厂, 纯度大于 99 %; 鱼藤酮(ROT), 德国 Sigma 公司, 纯度大于 95 %; 超微量 ATP 酶试剂盒, 南京建成生物工程有限公司, 批号: 20120109。

1.2 动物 Wistar 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量约 200 g, 成都达硕生物科技有限公司, 生产许可证: SCXK(川)2008-24。

1.3 大鼠离体肝细胞线粒体的制备 大鼠空腹 12 h, 脱臼处死, 肝脏用生理盐水洗净, 滤纸吸干。称取适量肝组织, 剪碎, 用预冷的匀浆介质洗涤数次, 然后按每克肝组织加 9 mL 预冷的匀浆液, 将肝组织匀浆, 2000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 10000 r·min⁻¹ 再离心 15 min, 所得沉淀即为线粒体, 然后用 PBS 液洗涤两次, 所得沉淀用 0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖溶液制成线粒体悬液。用牛血清白蛋白作为标准品, 根据 Bradford 方法^[5]测出的线粒体悬液中的蛋白质含量, 将该样品稀释 49 倍, 得到蛋白质含量 1 mg·mL⁻¹ 的肝脏线粒体悬浮液。

$$\text{复合体 I 酶活性} = \frac{(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times 50(\text{样品稀释倍数})}{0.006 \text{ mg}(\text{样品质量}) \times 6.2(\text{毫摩尔吸光系数}) \times 1(\text{反应时间, min})}$$

$$\text{复合体 II 酶活性} = \frac{(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times 50(\text{样品稀释倍数})}{0.006 \text{ mg}(\text{样品质量}) \times 21.8(\text{毫摩尔吸光系数}) \times 5(\text{反应时间, min})}$$

$$\text{复合体 III、IV 酶活性} = \frac{(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times 50(\text{样品稀释倍数})}{0.006 \text{ mg}(\text{样品质量}) \times 21.8(\text{毫摩尔吸光系数}) \times 1(\text{反应时间, min})}$$

1.6 ATPase 活性检测 依据试剂盒提供的方法, 测定 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 活性。

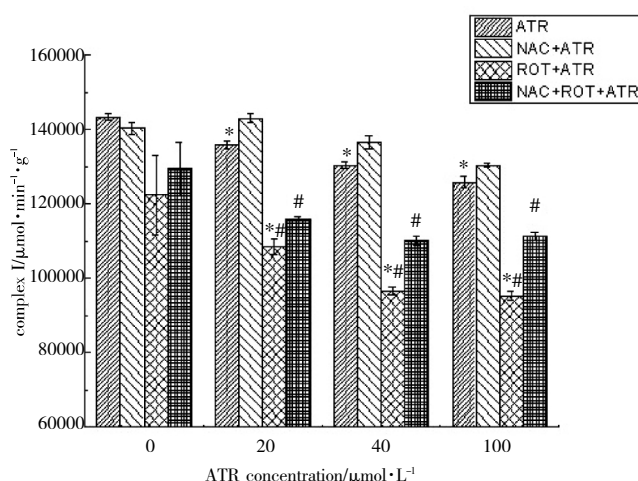
1.7 统计学处理方法 用 SPSS 13.0 统计软件, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析方法进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATR 对线粒体呼吸链复合体酶活性的影响 由图 1 可见, 当 ATR 为 0 μmol·L⁻¹ 时, 与对照组比较, ROT 可抑制复合体 I 的酶活性, NAC 对这种抑制有一定的拮抗作用, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与 0 μmol·L⁻¹ ATR 的相应组比较, 20, 40, 100 μmol·L⁻¹ ATR 的各对照组、ROT+ATR 组能明显抑制复合体 I 的酶活性, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且这种抑制作用随剂量的升高而增强; 在 20, 40, 100 μmol·L⁻¹ ATR 组内, ROT+ATR 组、NAC+ROT+ATR 组复合体 I 的酶活性明显低于对照组($P < 0.05$), 但 NAC 对这种抑制有一定的拮抗作用, 提示 ATR 能协同 ROT 抑制复合体 I 的酶活性。

1.4 分组 将线粒体悬液分为 4 大组, 分别为对照组、NAC 组、ROT 组、NAC 加 ROT 联合组。每组再分 4 小组($n=5$), 分别用 0, 20, 40, 100 μmol·L⁻¹ 的 ATR 处理。各组相应加入 NAC 和 ROT 预处理 30 min 后, 再加入 ATR 处理 30 min。

1.5 线粒体呼吸链各复合体的酶活性测定 复合体 I、II、III、IV 酶活力测定: 分别将 6 μL 处理后的线粒体加入到 300 μL 已经 37 °C 预热好的相应的复合体反应介质中, 孵育 3 min, 然后复合体 I、II 分别加入还原型辅酶 I、辅酶 Q, 使其终浓度分别为 100, 50 μmol·L⁻¹ 启动反应; 复合体 III、IV 加入细胞色素 C, 使细胞色素 C 终浓度分别为 125, 75 μmol·L⁻¹ 启动反应。复合体 I 在 340 nm, 复合体 II 在 600 nm, 复合体 III、IV 在 550 nm, 复合体 I、III 记录 0 min 和 1 min 的吸光度变化值; 复合体 II、IV 记录 0 min 和 5 min 的吸光度变化值。按以下列公式计算酶活性^[6]。



注: 与 0 μmol·L⁻¹ ATR 的相应组比较, * $P < 0.05$; 在 ATR 同浓度组中, 与 ATR 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 ATR 对复合体 I 酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 1 Effect of ATR on the activities of complex I

由图 2 及图 3 可见, 在不同浓度 ATR 组间及同浓度组内各组的复合体 II、III 的酶活性比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

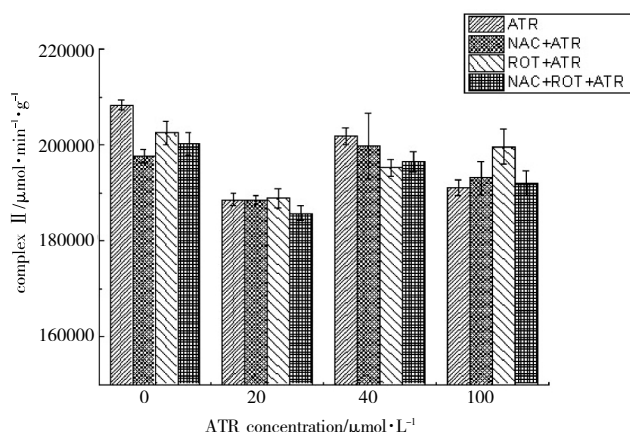


图2 ATR对复合体II酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 2 Effect of ATR on the activities of complex II

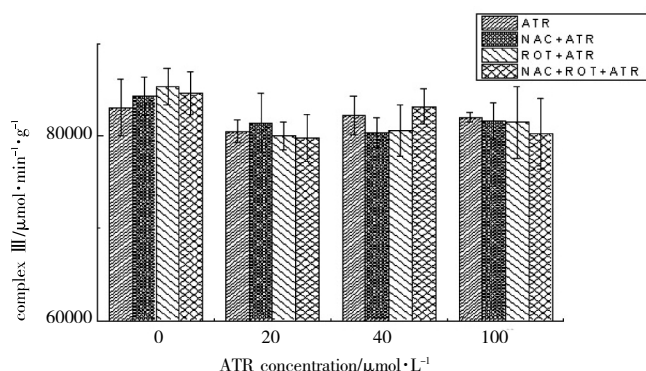


图3 ATR对复合体III酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

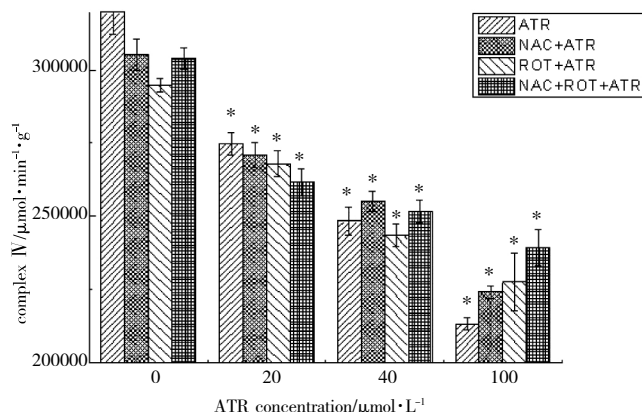
Figure 3 Effect of ATR on the activities of complex III

由图4可见,与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATR的相应组比较,20, 40, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATR的各对照组、NAC+ATR组、ROT+ATR组、NAC+ROT+ATR组能明显抑制复合体IV的酶活性,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与20, 40, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATR的各对照组比较,NAC+ATR组、ROT+ATR组、NAC+ROT+ATR组复合体IV的酶活性差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示NAC、ROT对复合体IV的活性没有影响。

2.2 ATR对ATPase活性的影响 由图5、图6可见,ATR浓度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATR的相应组比较,对照组、NAC+ATR组、ROT+ATR组、NAC+ROT+ATR组均能明显抑制 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性($P < 0.05$),且ATR的作用有一定的量效关系。

3 讨论

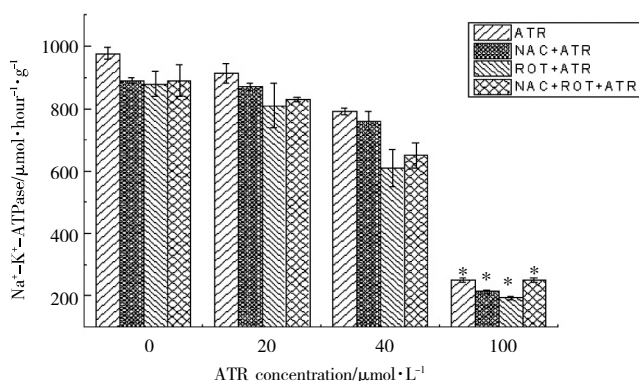
早期的研究报道^[1-3]ATR能抑制腺苷二磷酸(ADP)与线粒体结合,阻碍线粒体膜内外间的核苷酸移动,从而抑制氧化磷酸化。但目前还不能确定这是



注:与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATR的相应组比较, $*P < 0.05$ 。

图4 ATR对复合体IV酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

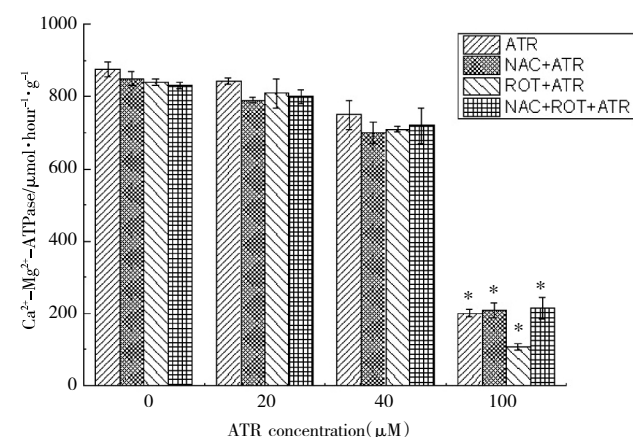
Figure 4 Effect of ATR on the activities of complex IV



注:与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATR的相应组比较, $*P < 0.05$ 。

图5 ATR对 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 5 Effect of ATR on the activities of $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$



注:与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATR的相应组比较, $*P < 0.05$ 。

图6 ATR对 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 6 Effect of ATR on the activities of $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$

否是ATR抑制氧化磷酸化作用的唯一作用机制。

在线粒体进行的氧化磷酸化是由电子传递和磷酸化两个部分偶联而成。电子传递链分两条途径,一条

为复合体 I-辅酶 Q-复合体 III-细胞色素 C-复合体 IV；另一条为复合体 II-辅酶 Q-复合体 III-细胞色素 C-复合体 IV^[7]。电子传递过程中释放的自由能在 ATP 合成酶的作用下合成 ATP。复合体 I、III、IV 被认为是呼吸链中电子传递与磷酸化偶联的 3 个位点，同时，这 3 个复合体也是质子泵出的部位。ATP 酶是一个多组分结构，在分离状态下具有 ATP 水解酶的活性，在结合状态下具有 ATP 合成酶的活性。Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 可以分别调节线粒体膜的 Na⁺、K⁺ 和 Ca²⁺、Mg²⁺ 的平衡，维持能量平衡。Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 的活性在一定程度上可以反映 ATP 合成酶的活性。

本实验发现 ATR 能够抑制复合体 I、IV 的活性，还可能协同 ROT 抑制复合体 I 的活性，且与剂量相关；而对复合体 II 和 III 的活性无明显影响。同时，ATR 还能抑制 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 的活性，也与剂量相关。结果提示 ATR 抑制氧化磷酸化的机制，除了早期发现的阻碍线粒体膜内外间的核苷酸移动外，可能还与其抑制呼吸链电子传递的始端

复合体 I 和末端状态复合体 IV 以及 ATP 酶活性有关。

参考文献：

- [1] Calmes M, C respin F, Maillard C, et al. High performance liquid chromatographic determination of atractyloside and carboxy-atractyloside from *Atractylis gummifera*[J]. *Journal of Chromatography*, 1994, 663: 119-122.
- [2] Santi R. Potassium atractylate, a new inhibitor of the tricarboxylic acid [J]. *Nature*, 1958, 182: 257-258.
- [3] Vignais PV, Vignais PM, Stanislas E. Action of potassium atractylate on oxidative phosphorylation in mitochondria and submitochondrial particles[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1962, 60: 284-300.
- [4] 孙飞, 周强军, 孙吉, 等. 线粒体呼吸链膜蛋白复合体的结构[J]. *生命科学*, 2008, 20(4): 566-578.
- [5] 钟才高, 邓媛媛, 关岚, 等. 赤霉素对大鼠肝细胞线粒体呼吸功能的影响[J]. *卫生研究*, 2010, 39(6): 697-700.
- [6] 邓媛媛. Cr(IV)对大鼠离体肝细胞线粒体呼吸功能的影响[D]. 长沙: 中南大学公共卫生学院, 2010: 7-8.
- [7] 李森. 氧化磷酸化作用中 ATP 的产生数目释疑[J]. *生物学通报*, 2010, 45(2): 17-18.

(编辑: 梁进权)

玉壶汤对 db/db 小鼠糖尿病的药效学研究

丁勤霞¹, 陈婉姬², 杨明华³, 李晓东³, 朱芳芳³ (1. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012; 3. 浙江省中药研究所糖尿病重点实验室, 浙江 杭州 310023)

摘要：目的 观察玉壶汤对 db/db 小鼠的降糖调脂作用，并比较党参代替人参后新方与原方的药效。方法 取 12 周龄自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠，将血糖值大于 16.7 mmol·L⁻¹ 的小鼠按血糖水平分层随机分为模型组、玉壶汤组、玉壶汤新方组、消渴丸组，另设野生型雄性 db/db 小鼠为正常对照组。给药 8 周后，以生化仪检测小鼠血糖、总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)；酶标仪检测小鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、胰岛素、白介素-6(IL-6)含量。结果 与模型组比较，玉壶汤组小鼠血清中血糖、CHOL、TG、MDA 和 IL-6 含量显著降低，SOD 活力、胰岛素水平显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；玉壶汤新方组小鼠血清中血糖、CHOL、TG 和 IL-6 含量显著降低，SOD 活力、胰岛素水平显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 玉壶汤对 2 型糖尿病有较好的降糖调脂作用，以党参代替人参入方后的新方与原方的药效相当。

关键词：玉壶汤；2 型糖尿病；db/db 小鼠；血糖；血脂

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1003-9783(2014)06-0663-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.004

收稿日期：2014-07-07

作者简介：丁勤霞，硕士研究生，研究方向：中药药理学。Email: sophiedqx@163.com。通讯作者：杨明华，博士，教授，研究方向：中药药理与新药研究。Email: ymh702@126.com。

基金项目：浙江省科技计划重点项目(2004F12016)；浙江省科技厅重点实验室建设项目(2012F10002)。