

GTP γ S 对柴胡皂甙(I)刺激胰腺腺泡酶分泌的影响

王 辉, 余 奕, 张文正, 董志勇, 刘保华, 杨文修

(南开大学生物物理系, 天津 300071)

摘要:为了解柴胡皂甙(I)[SA(I)]刺激大鼠胰腺腺泡酶分泌的信号传导通路,研究了GTP γ S对SA(I)刺激通透腺泡细胞酶分泌的影响。用SLO通透细胞的同时,加入GTP γ S在15min期间能诱发酶分泌,10⁻⁷mol·L⁻¹ GTP γ S有最大促泌效应。GTP γ S浓度依赖性的增强SA(I)促酶分泌作用,10⁻⁷mol·L⁻¹ GTP γ S导致10⁻⁷mol·L⁻¹ SA(I)刺激酶分泌量增加到1.6倍。用SLO预通透腺泡10min后,加入GTP γ S使SA(I)刺激酶分泌的量-效曲线左移,SA(I)的EC₅₀从2.0×10⁻⁶mol·L⁻¹减小到1.0×10⁻⁶mol·L⁻¹。以上结果提示,SA(I)活化受体偶联的G蛋白包括在其刺激酶分泌的信号传导通路中。

关键词:柴胡皂甙(I); GTP γ S; 胰腺腺泡; 酶分泌; G蛋白

中图分类号:Q735 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-6737(2001)04-0627-05

用链球菌溶血素O (Streptolysine O, SLO) 通透的胰腺腺泡细胞研究激素和药物刺激腺泡酶分泌的细胞信号传导是一种有效的方法^[1]。已有研究报道,用1.0IU/ml SLO通透小鼠胰腺腺泡10min,可使乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)泄漏100%^[2]。用0.5 IU/ml SLO通透大鼠胰腺腺泡,介质中自由Ca²⁺浓度低于5×10⁻⁷mol·L⁻¹时,不表现Ca²⁺依赖性酶分泌,而3×10⁻⁵mol·L⁻¹ Ca²⁺有最大酶分泌。若预通透10min,可使随后再加入Ca²⁺诱发酶分泌的能力下降近70%^[3]。Guanosine-5'-[γ -thio]triphosphate (GTP γ S)是GTP非水解类似物,可刺激多种通透的外分泌细胞的细胞分泌功能。GTP γ S可使通透的大鼠胰腺腺泡细胞的Ca²⁺依赖性酶分泌剂量依赖曲线左移^[1],与SLO同时加入GTP γ S,可激活腺泡的磷脂酶C(Phospholipase C, PLC)通过升高三磷酸肌醇(Inositol 1, 4, 5-triphosphate, IP₃)浓度诱发胞内Ca²⁺释放,但GTP γ S升高IP₃的作用在通透2min后即衰减^[4]。

柴胡总皂甙是中草药柴胡有效成分的组合物,可显著升高大鼠胰腺腺泡胞浆自由Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_i)和促酶分泌^[5]。柴胡皂甙I(Saikosaponin I, SA(I))是柴胡促酶分泌的代表性单体化合物,其刺激酶分泌效应随浓度增加而趋向饱和,促酶分泌动力学呈S型曲线^[6]。关于SA(I)促酶分泌的细胞信号传导通路研究,我们已报道SA(I)具有拟膜受体激动剂作用,可通过升高[Ca²⁺]_i介导酶分泌。外源性鸟苷二磷酸(Guanosine diphosphate, GDP)可通过降低SA(I)诱发的[Ca²⁺]_i升高抑制其促酶分泌作用^[7]。为进一步了解G蛋白在SA(I)刺激酶分泌的信号传导中的作用,本文采用SLO通透细胞,研究了不同通透条件下GTP γ S对SA(I)刺

收稿日期:2001-01-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目,编号:39770910

作者简介:王辉,1976年生,硕士,电话:(022)23501491, E-mail:wanghui-nk@263.net.

通讯作者:杨文修,1938年生,教授,电话:(022)23501491, E-mail:yangwenx@public.tpt.cj.cn.

激大鼠胰腺腺泡酶分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 药品

GTPys, Collagenase IA 购自 Sigma 公司; SLO 购自 GIBCO 公司; Trypsin inhibitor 购自上海东风生物制品公司; 其他药品均购自天津天象人生物制品有限公司。SA(I) 由北京大学药学院分离制备并鉴定^[6]。

1.2 大鼠胰腺腺泡细胞的制备

雄性 Wistar 大鼠, 体重 200-250 克, 由军事医学科学院卫生学环境医学研究所提供(二级)。胰腺腺泡的分离制备采用 Kitagawa 的方法^[2]。将大鼠拉颈处死, 速取胰腺组织, 置于 $0.3\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 胶原酶的 Eagle's MEM 液中在 37°C 振荡消化, 再经机械分离、过滤和离心制成分散的腺泡悬液。用台盼兰拒染实验检测腺泡活性, 要求活细胞比率大于 90%。

1.3 胰腺腺泡的通透

采用 Kitagawa 的方法^[2], 用 SLO 通透胰腺腺泡细胞膜。将制备好的腺泡悬浮于通透介质(包含 SLO $1000\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$, EGTA $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 谷氨酸钾 $140\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgATP $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl₂ $0.64\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl₂ $2.55\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, PIPES $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)中, 其中自由 Ca^{2+} 经计算为 $100\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 另制备含 $1\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 自由 Ca^{2+} 的通透介质作为对照。 37°C 温育所需时间, 制备不同通透条件的胰腺腺泡。

1.4 酶分泌的检测

根据实验要求, 在不同通透条件下, 在胰腺腺泡悬液中加入不同浓度的各种实验药物, 37°C 温育不同时间后, 离心提取上清液, 采用碘-淀粉比色法检测各上清液中淀粉酶活力, 减去 $1\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 条件下的酶活力, 用总淀粉酶的百分比标志细胞分泌酶的功能^[3]。

1.5 统计学处理

结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示, 组间差异用双侧 *t* 检验判别。

2 结果

2.1 SA(I) 和 GTPys 刺激的通透胰腺腺泡酶分泌动力学

用含 SLO 的通透介质悬浮大鼠胰腺腺泡各标本的同时加入 SA(I) 或 GTPys, 37°C 温育不同时间后, 提取上清液检测淀粉酶活力, 得到淀粉酶积累量随时间的变化, 见图 1。在预实验中, 与含 $1\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 自由 Ca^{2+} 浓度通透介质的标本比较, $100\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 不表现 Ca^{2+} 依赖性酶分泌。加入 $10^{-7}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTPys 诱发的酶分泌量开始随时间增加, 约 15min 后分泌趋向停止。加入 $10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA(I) 刺

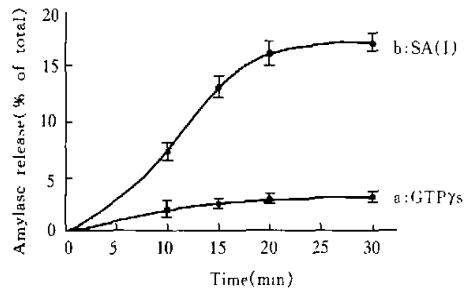


Fig.1 Kinetics of amylase secretion stimulated by SA(I) and GTPys from SLO-permeabilized pancreatic acini. Isolated pancreatic acini were permeabilized with $1000\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$ SLO and $100\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ free Ca^{2+} , adding drugs at the same time. a: $10^{-7}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTPys; b: $10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA(I) ($n=5$, $\bar{x} \pm \text{SD}$)

激的酶分泌量随时间显著增加,在15min后分泌速率下降,20min后趋向停止。可见GTPγs和SA(I)的促酶分泌作用主要表现在通透的早期阶段,但有不同的动力学特征。

2.2 GTPγs 影响 SA(I)刺激的通透胰腺腺泡酶分泌的量-效关系

将制备的胰腺腺泡各标本悬浮于通透介质的同时,分别加入不同浓度的GTPγs;或加入 $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA(I)和不同浓度的GTPγs,37℃温育30min,检测各标本上清液中的淀粉酶积累量,结果见图2。单独GTPγs诱发的酶分泌量随浓度而增加,在 $10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GTPγs对应最大酶分泌量。GTPγs增强 $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA(I)刺激的酶分泌量随浓度增加而升高,亦在 $10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GTPγs有最大效应值,为单独SA(I)作用的1.6倍。更高浓度GTPγs对SA(I)刺激酶分泌的增强作用逐渐下降。两种给药条件下对GTPγs的浓度依赖有相似性。

2.3 GTPγs 对 SA(I)刺激的预通透胰腺腺泡酶分泌的影响

将制备的胰腺腺泡置于SLO通透介质中37℃温育10min,再将腺泡转移到不含SLO的介质中,分别加入不同浓度的SA(I);或加入 $10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GTPγs和不同浓度的SA(I),37℃温育30min,检测各标本上清液的淀粉酶积累量,结果见图3。由图3a可见,单独SA(I)刺激的酶分泌量随浓度增加而增加,高浓度SA(I)对应的酶分泌量趋向饱和。与图2比较, $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA(I)刺激的酶分泌量下降了35%。图3b表明,加入GTPγs明显增强了SA(I)的刺激作用,使SA(I)的浓度依赖曲线左移,SA(I)的 EC_{50} 由 $2.0\times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 减小到 $1.0\times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,但GTPγs增强 $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA(I)刺激的酶分泌量仍低于图2中相应的数值。

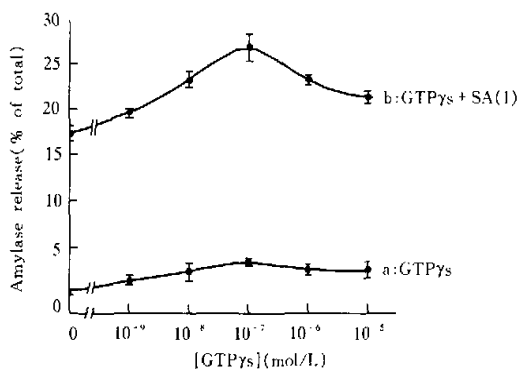


Fig.2 Dose-response relationship of GTPγs and amylase secretion from SLO-permeabilized pancreatic acini. Isolated pancreatic acini were permeabilized with $1000\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$ SLO and $100\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ free Ca^{2+} , adding drugs at the same time. a: various GTPγs concentration; b: $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA(I) + various GTPγs concentration ($n=5, \bar{x}\pm\text{SD}$)

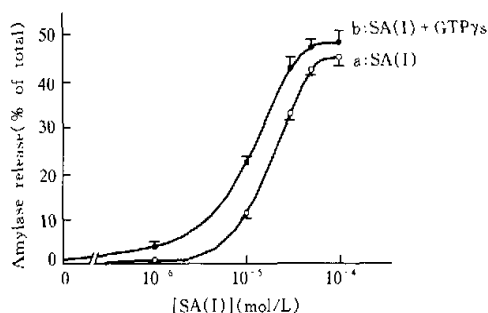


Fig.3 Effects of GTPγs on amylase secretion stimulated by SA(I) from SLO pre-permeabilized pancreatic acini. Isolated pancreatic acini were permeabilized with $1000\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$ SLO and $100\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ free Ca^{2+} for 10min, then adding drugs. a: various SA(I) concentration; b: $10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GTPγs + various SA(I) concentration ($n=5, \bar{x}\pm\text{SD}$)

3 讨 论

本研究中用含 $100\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 自由 Ca^{2+} 浓度的通透介质,大鼠胰腺腺泡不表现 Ca^{2+} 依赖性酶分泌。在此基础上,与 SLO 同时加入 GTP γ s,前 15min 有明显促酶分泌作用。在 $10^{-7}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表现出最大效应,证明 GTP γ s 通过对包括受体偶联 G 蛋白在内的 G 蛋白的活化介导了酶分泌。与 SA(1)刺激完整细胞酶分泌动力学比较^[5],SA(1)与 SLO 同时加入通透介质后,前 15min 变化相似,但随后酶分泌迅速下降并趋向停止,30min 酶积累量显著下降。用 SLO 通透细胞 10min 后再加入相同浓度 SA(1),酶积累量又明显下降。两种通透条件下加入 GTP γ s,都明显增强了 SA(1)刺激的酶分泌量。图 2 中,不同浓度 GTP γ s 增强 SA(1)刺激酶分泌的变化与 GTP γ s 单独作用的变化相似,但前者酶分泌增加的绝对值比后者显著大,表明 GTP γ s 的作用是增加了 SA(1)活化细胞 G 蛋白的敏感性,而不是 GTP γ s 与 SA(1)单独作用的简单叠加。此外,我们已报道,SA(1)促酶分泌与药物通过与膜受体相作用升高细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 密切相关^[6]。综合以上结果,提示 SA(1)刺激酶分泌的信号传导通路中包括活化受体偶联的 G 蛋白。同时,由于细胞被通透会导致胞浆中各种物质的泄漏,包括酶胞吐过程中所需要的一些小 G 蛋白和水解 GTP γ s 的酶^[9,10],会导致不同通透条件下 SA(1)的刺激作用和 GTP γ s 对其影响的复杂性。

参考文献:

- [1] Padfield PJ, Ding TG, Jamieson JD. Ca^{2+} dependent amylase secretion from pancreatic acinar cells occurs without activation of phospholipase C linked G-proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991,174:536-541.
- [2] Kitagawa M, Williams JA, De Lisle RC. Amylase release from streptolysin O-permeabilized pancreatic acini[J]. *Am J Physiol*, 1990,259:G157-164.
- [3] Padfield PJ, Panesar N. Ca^{2+} -dependent amylase secretion from SLO-permeabilized rat pancreatic acini requires diffusible cytosolic proteins[J]. *Am J Physiol*, 1995,269:G647-652.
- [4] Tortorici G, Zhang BX, Xu X, et al. Compartmentalization of Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} pool in pancreatic acini[J]. *J Biol Chem*, 1994,269:29621-29628.
- [5] 杨文修,余奕,姚宏强,等.柴胡皂甙促胰腺腺泡酶分泌和升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的动力学特征[J]. 中国学术期刊文摘(科技快报), 1999,5:1185-1186.
- [6] 杨文修,余奕,赵玉英,等.柴胡皂甙促大鼠胰腺腺泡酶分泌作用的特征及胞外 Ca^{2+} 对其的影响[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2000,33:41-44.
- [7] 杨文修,余奕,张文正,等.柴胡皂甙(1)对胰腺腺泡的拟膜受体激动剂作用[J]. 生物物理学报, 2001,17:222-228.
- [8] 梁鸿,赵玉英,丘海蕴,等.北柴胡中的新皂甙的结构测定[J]. 药学报, 1998,33:37-41.
- [9] Rosales JL, Ernst JD. GTP-dependent permeabilized neutrophil secretion requires a freely diffusible cytosolic protein[J]. *J Cell Biochem*, 2000,80:37-45.
- [10] Padfield PJ, Panesar N. The two phases of regulated exocytosis in permeabilized pancreatic acini are modulated differently by heterotrimeric G-proteins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998,245:332-336.

**GTP γ s MODULATION OF SAIKOSAPONIN(I) STIMULATED AMYLASE
SECRETION IN ISOLATED PANCREATIC ACINI**

WANG Hui, YU Yi, ZHANG Wen-zheng, DONG Zhi-yong,
LIU Bao-hua, YANG Wen-xiu

(Department of Biophysics, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: To elucidate the site of action of Saikosaponin (I) [SA(I)] in pancreatic acinar cells, the modulatory effects of guanosine 5' - [γ -thio]triphosphate(GTP γ s) were investigated in SLO permeabilized pancreatic acinar cells. In a permeabilizing medium, GTP γ s addition induced 15min amylase secretion, the effects being maximal at 10^{-7} mol \cdot L $^{-1}$. GTP γ s effects were concentration dependent. GTP γ s 10^{-7} mol \cdot L $^{-1}$ increased amylase secretion stimulated by 10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ SA(I) 1.6 fold. After acinar cells were pre-permeabilized with SLO for 10min, GTP γ s shifted the dose-response curve of SA(I) stimulated amylase secretion to the left, decreasing EC $_{50}$ from 2.0×10^{-5} to 1.0×10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$. These results suggest receptor-coupled G protein activation is involved during SA(I) stimulation of amylase secretion.

Key Words: Saikosaponin(I); GTP γ s; Pancreatic acini; Amylase secretion;
G protein