

· 实验研究 ·

汉防己甲素对钙调蛋白依赖性环核苷酸磷酸二酯酶的双相作用研究*

南通医学院生化教研室(南通) 高中华 黄树模 魏美芳

提要 汉防己的有效成份汉防己甲素(Tet)在较低浓度时能抑制钙调蛋白(CaM)依赖性环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)的活性($IC_{50} = 43 \mu\text{mol/L}$),并且这种抑制能被CaM所对抗;而在较高浓度($>300 \mu\text{mol/L}$)时,无论有无 Ca^{2+} 和CaM的存在,Tet均能非 Ca^{2+} 依赖性激活PDE,这种激活不受CaM拮抗剂三氟拉嗪和氯丙嗪的影响。结果提示,Tet既具有抗CaM作用,又能在较高浓度时直接与PDE相互作用而部分模拟CaM的作用,这可能均与Tet的水、脂两性分子特性有关。该实验为阐明中药的作用机理及CaM与其靶酶相互作用的研究提供了新线索。

关键词 钙调蛋白 汉防己甲素 环核苷酸磷酸二酯酶

钙调蛋白(calmodulin, CaM)是一种广泛存在于生物界的重要 Ca^{2+} 受体蛋白,每分子具有4个 Ca^{2+} 结合位点,当其结合 Ca^{2+} 时,分子构象改变,表面形成疏水区,并能与其靶酶结合使之激活。目前已阐明受CaM调节的重要生物过程已达18种以上^[1]。CaM依赖性环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)在细胞内催化cAMP水解,是最先阐明受CaM调节的靶酶^[2]。自从Weiss及其同事^[3]最初发现一些抗精神病药物能通过CaM结合而抑制PDE活性以来,CaM在一些药物的治疗和毒理机制方面的作用已受到人们的重

视,并为CaM与其靶酶间相互作用的研究提供了新领域。

汉防己甲素(Tetrandrinum Tet. 结构见图1)为防己科植物中药粉防己根的主要生物碱^[4],具有降压和抗心律失常作用,并有报道^[5]能抑制红细胞膜 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$,但未见有对CaM靶酶激活作用的报道。本文以猪脑CaM依赖性PDE作为分子模型系统,对Tet与CaM及其靶酶的相互作用进行了检测,发现Tet在不同浓度范围具有抑制和激活的双相作用。

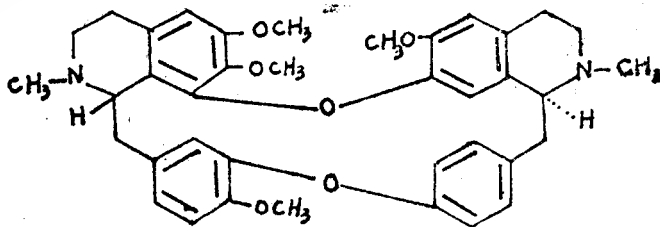


Fig 1. Tetrandrinum

*江苏省卫生厅资助课题

材料和方法

Tet系金华制药厂产品, 三氟拉嗪(TFP)、氯丙嗪(CPZ)和响尾蛇毒系Sigma产品, DEAE-纤维素(DE₅₂)系Whateman产品, cAMP由徐州医学院赵昇皓教授惠赠, 纯度99.5%。其它试剂均为分析纯, 所有试剂均用重蒸水配制。新鲜猪脑由本地肉联厂购入。

CaM制备及纯化 参照文献(6)方法稍加修改, 由新鲜猪脑制备, 最后经DEAE-纤维素离子交换层析纯化, -20℃保存。

CaM依赖性PDE的制备 参照文献(7)方法, 由新鲜猪脑制备, -20℃保存。

PDE活性的测定 参照文献(7)的方法, 稍加改动, 采用两步法测定。测定体系0.8 ml, 按以下顺序配成: 120mmol/L Tris-HCl (pH7.5) - 15 mmol/L 醋酸镁 - 3mmol/L CaCl₂ 0.3 ml, CaM 0.3 μg (如为不含Ca²⁺体系, 则缓冲液中不含Ca²⁺而加入100 mmol/L EDTA 8 μl, 不加CaM), H₂O, 4.3 mg/ml PDE制品 20 μl, 加入10.8 mmol/L cAMP 100 μl启动反应, 30℃水浴30分钟后, 置100℃水浴2.5分钟终止反应, 冷却后加入0.5 mg/ml 蛇毒 100 μl, 30℃水浴20分钟, 加入55%三氯醋酸 100 μl 终止反应, 4000 r/min离心20分钟, 取上清0.5 ml, 加入0.5%十二烷基硫酸钠 1 ml (以避免药物在酸性条件下析出干扰比色)。定磷法测OD₆₈₀。

蛋白浓度测定参照文献(8)

每一数据均为3次以上重复试验的平均值。

结果

一、Tet对PDE的CaM激活活性及基础活性的作用

在含Ca²⁺和CaM体系(见材料和方法)

中, CaM对PDE的最大激活活性定义为酶的100%活性(相当于OD₆₈₀ = 0.55)。在不含Ca²⁺体系中酶的活性定义为基础活性, 本实验为20%(相当于OD₆₈₀ = 0.11)。测定Tet作用时, 在加入PDE前加入不同浓度的Tet, 30℃水浴20分钟。

Tet对CaM激活的PDE活性呈现双相作用: 低浓度时抑制, 半抑制浓度(IC₅₀)为43 μmol/L; 高浓度时转而激活酶活性, 最大激活为77.3%, 半最大激活浓度(AC₅₀)为410 μmol/L; Tet对PDE的基础活性仅呈现激活作用, 而无抑制作用, 最大激活为85.5%, AC₅₀ = 500 μmol/L。结果见图

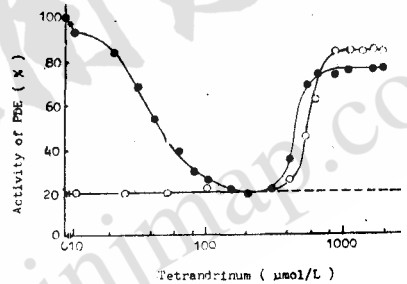


Fig 2. Effects of tetrandrinum (Tet) on the activity of CaM-dependent PDE.

●, The reaction mixture contained Ca²⁺ and CaM, ○, The reaction mixture didn't contain Ca²⁺ and CaM, ---, The level of basal activity in the absence of Tet.

二、CaM对Tet抑制作用的拮抗

在含Ca²⁺和不同浓度Tet的反应体系中增大CaM量, 可使Tet对CaM激活的PDE活性的抑制程度降低, 说明CaM能拮抗Tet对PDE活性的抑制。但体系中Tet浓度越大, PDE的CaM激活曲线右移越显著。结果见图3。

三、TFP和CPZ对Tet激活的PDE活性的影响

在不含Ca²⁺和CaM的体系内, 加入800

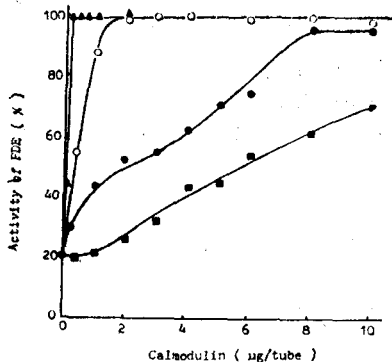


Fig 3. Effects of CaM on the Tet inhibition.

- △, No Tet,
- , 40 μmol/L Tet,
- , 80 μmol/L Tet,
- , 150 μmol/L Tet.

μmol/L Tet (可使PDE激活达85.5%)和不同浓度的TFP或CPZ, 结果见图4。

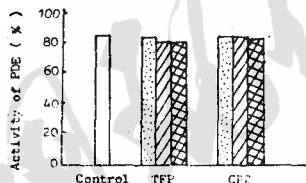


Fig 4. Effects of TFP and CPZ on the activity of PDE activated by Tet in the absence of Ca²⁺ and CaM.

- , Control, no TFP and CPZ,
- ▒, 200 μmol/L,
- ▓, 600 μmol/L,
- ⊞, 1000 μmol/L.

由图4可见, Tet对PDE的非Ca²⁺依赖性激活不受CaM拮抗剂TFP和CPZ的影响。

讨论

CaM对PDE及其它靶酶的激活是Ca²⁺依赖的。这一过程有赖于CaM结合Ca²⁺以后,其构象的螺旋度增加,暴露疏水区,并与靶酶的相应部位结合而使之激活^[1]。Tet

属双苄基四氢异喹啉类生物碱,由单苄基异喹啉类生物碱通过两个醚键的氧桥相连接而成,其分子中既有疏水结构,又具有碱性氮原子而易形成亲水的铵盐结构(见图1),因而Tet为水脂两性分子。Tet对CaM激活的PDE活性的抑制及增大体系中CaM量能拮抗这种抑制,表明Tet与CaM间存在相互作用,即Tet与PDE之间存在对CaM的竞争结合。这种作用减弱或阻断了CaM对PDE的结合和激活。Tet的这种作用可能与一般抗CaM药物的作用机制^[9]类似,推测是Tet与CaM间的疏水结构间的疏水性相互作用的结果。

当反应体系中Tet超过300 μmol/L时,无论有无Ca²⁺和CaM的存在, Tet均表现为对PDE活性的激活,形成Tet对CaM依赖性PDE活性的低浓度抑制、高浓度非Ca²⁺依赖性激活的双相作用特征。由此提示, Tet不仅能以其分子的疏水结构与CaM的疏水结构相互作用,较高浓度时也能与PDE上的CaM结合部位相互作用,从而部分模拟CaM的作用,以非Ca²⁺依赖性的形式使PDE激活。只是,从Tet作用的过程来看(见图2), Tet对CaM的结合作用大于它对PDE的结合作用,所以Tet仅在较高浓度时才能表现出对PDE的激活。

曾有报道, Tet能抑制CaM激活的红细胞膜Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase活性,但在较高浓度(1000 μmol/L)时未见激活作用^[5]。Tet对CaM靶酶的不同作用,提示CaM靶酶对其激活物可能具有一定的选择性。如果这样,作为生理调节物的CaM,其分子结合不同数目Ca²⁺时所引起的不同构象对不同的靶酶也应具有选择性,这种可能性正是CaM研究者们所一直力图探究的。

总之,虽然断言Tet对CaM的作用就是其药理作用为时尚早,但Tet对CaM依赖性PDE活性的双相作用,尤其是较高浓度时的

非Ca²⁺依赖性激活作用的发现,将会为进一步阐明 CaM 这种重要生理调节蛋白与其靶酶间的相互作用提供有益的新线索。

致谢 本室刘飞同志参与本实验的制备工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Tomlinson S, et al.: *Clinical Science* 1984, 66:497
[2] Cheung WY: *Biochem Biophys Res Commun* 1970, 38:533
[3] Weiss B, et al: *Mol Pharmacol* 1974, 10:615

- [4] 南京药学院主编, 药物化学, 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 1978; 484—485。
[5] 徐友涵等, 科学通报1985, 30:1348
[6] Gopalakrishna R and Anderson WB.: *Biochem Biophys Res Commun* 1982, 104: 830
[7] Sharma RK and Wang JH: In: Greengard BP and Robison GA, ed. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*. Vol 10. New York: Raven Press, 1979; 187—198
[8] Lowry OH, et al: *J Biol Chem* 1951, 193:265
[9] Roufogalis BD, et al: *Can J Biochem Cell Biol* 1983, 61:927

Biphasic Effects of Tetrandrimum on the Activity of Calmodulin-Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase

Gao Zhonghua Huang Shumu Wei Meifang

(Department of Biochemistry Nantong Medical College, Nantong)

Abstract

Tetrandrimum (Tet), a main effective component of a Chinese medicinal herb — Radix Stephaniae Tetrandrae, could inhibit the activity of calmodulin (CaM) -dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) at low concentrations ($IC_{50}=43\mu\text{mol/L}$) and the inhibition could be reduced by CaM. While at high concentrations, whether Ca²⁺ and CaM were present or absent, Tet could Ca²⁺ -independently activate the activity of PDE, and the activation was not affected by CaM antagonists trifluoperazine and chlorpromazine. The results suggest that Tet not only possess anti-CaM effect at low concentrations, but it can also interact directly with PDE and partly mimic the CaM effect at high concentrations. This may be resulted from the amphipathic nature of Tet. This experiment gives new clues to the study of mechanisms about Chinese medicinal herbs and the interaction between CaM and its target enzymes.

Key Words Calmodulin Tetrandrimum Cyclic nucleotide phosphodiesterase