

六种中草药有效成分对钙调素依赖环核苷酸磷酸二酯酶的作用[△]

皖南医学院(芜湖 241001) 杨东丽* 陈 望

中山医科大学

顾熊飞 马洞泉 聂 磊 任 晖

摘要 用正交设计观察了6种中草药有效成分和三氟啦嗪(TFP)对钙调素依赖环核苷酸磷酸二酯酶(CaM-PDE)激活活性的影响,结果表明: a)两面针碱(Nit)、槲皮素(Que)和TFP对CaM-PDE激活活性具有明显抑制作用($P < 0.01$),其抑制强度: $Que > TFP > Nit$;小檗碱(Ber)、麻黄碱(Eph)和鱼腥草素(Hou)对CaM-PDE无明显作用($P > 0.05$),青藤碱(Sin)对酶的作用可疑; c)Que与TFP、Nit与TFP之间有协同作用。结果提示Nit和Que可能是CaM拮抗剂,两者的作用位点似乎不同于TFP。

关键词 环核苷酸磷酸二酯酶 钙调素 拮抗剂 两面针碱 槲皮素 正交设计

钙调素(calmodulin, CaM)是一种广泛存在于生物界的重要 Ca^{2+} 受体蛋白,具有多种调节功能^[1,2]。自从1974年Weiss及其同事首先发现三氟啦嗪(TFP)抑制CaM依赖环核苷酸磷酸二酯酶(CaM-PDE)以来, CaM及其靶酶与药物相互作用的研究受到人们的关注,陆续发现了多种CaM拮抗剂^[3,4],有的已作为研究CaM构象和生理功能的重要工具^[11],有的可望作为肿瘤治疗或辅助治疗的药物^[4]。中草药具有作用温和、资源丰富等特点,从中草药有效成分中寻找毒性低、专一性强的CaM拮抗剂及激活剂具有重要意义。长春花碱等中草药有效成分对CaM-PDE具有抑制作用^[4,5],两面针碱等对CaM-PDE是否有作用,未见文献报道。本研究将正交设计应用到CaM-PDE分子模型,观察两面针碱等6种中草药有效成分对CaM-PDE激活活性的影响,并对药物间的交互作用进行了初步分析。

1 材料与方法

材料: DEAE-Sephadex A-25, Pharmacia产品; DEAE-Cellulose, Whatman产品; 蛇毒, 中山医科大学药理教研室惠赠; TFP, Sigma产品; 两面针碱(nitidine, Nit), 小檗碱(berberine, Ber)和鱼腥草素(houttuynin, Hou)由中山医科大学天然药物研究室提供; 青藤碱(Sinomenine, Sin)由陕西凤县秦岭植物开发研究所陈冲赠; 盐酸麻黄碱(ephedrine chloride, Eph)和槲皮素(quercetin, Que)购自中国药品生物制品检定所; 其余试剂均为分析纯级。牛睾丸和牛心取自广州市越秀食品公司, -50°C 冻存或新鲜使用。

53WBUV/VIS分光光度计, HITACHI 20PR-52D型高速冷冻离心机, 日本。

2 方法

2.1 高纯度CaM的制备: 按文献^[6,7]的方法, 从牛睾丸中纯化。纯化的CaM具有激活CaM-PDE的能力, 12.5% PAGE和12.5% SDS-PAGE鉴定呈单一区带。

2.2 CaM-PDE的制备: 参照文献^[8], 由牛心肌制备。

2.3 蛋白质含量的测定: 按Bradford法^[9], 以BSA为标准。

2.4 CaM-PDE活性测定: 按文献^[8]略加改动。反应体系含108~158 μg CaM-PDE、药物、40 mmol/L Tris/HCl pH7.5、40 mmol/L咪唑、5 mmol/L醋酸镁、0.33 mmol/L

*Address: Yang Dongli, Department of Biochemistry, Wannan Medical College, Wuhu

现在地址: 北京医科大学生化和生物分子实验室

△美国中华医学会(CMB)基金资助项目

CaCl₂、40ng CaM、1.2mmol/L cAMP。加入cAMP后立即计时,30℃保温20min,加蛇毒0.1mg, 30℃保温10min,加55% TCA 终止反应。反应液离心,取上清液定磷^[10], 此为CaM-PDE激活活性。不加CaM,并以0.33mmol/L EGTA替代CaCl₂,所测活性为CaM-PDE基础活性。

2.5 实验设计: 本实验利用CaM-PDE分子模型,用正交设计来观察7种因素即Sin、Eph、Ber、Nit、Que、Hou和TFP对CaM-PDE激活活性的影响。各因素均定为2个水平,选用L₁₆(2¹⁵)正交表安排实验。1水平浓度为0,2水平浓度为100μmol选用L₁₆(2¹⁵)正交表安排实验。

3 结果

3.1 Sin、Eph、Eer、Nit、Que、Hou和TFP对CaM-PDE激活活性的影响: 由表1可知,Ber、Eph和Hou对CaM-PDE活性无明显作用($P>0.05$),而Que、TFP、Sin和Nit对CaM-PDE的CaM激活活性有显著抑制作用($P<0.01$),从R值来看,抑制强度是Que>TFP>Sin>Nit。此外,交互作用Ber×Eph、Ber×Hou、Eph×Hou、Eph×Nit也不容忽视。

表1 6种中草药有效成分对CaM-PDE激活活性的影响

列号	1	2	3	4	5	6	7
因素	Ber	Eph	Ber×Eph	Hou	Ber×Hou	EPh×Hou	
K1	1.134	1.070	1.317	1.159	1.322	1.359	1.085
K2	1.017	1.801	0.780	0.992	0.829	0.891	1.066
R×10 ²	1.462	-0.138	7.388	2.088	6.162	4.612	0.238
P	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01	>0.01	—

8	9	10	11	12	13	14	15
Nit		Eph×Nit	Que		Sin	TFP*	
1.244	1.073	1.199	1.466	1.056	1.317	1.393	1.132
0.907	1.078	0.952	0.685	1.095	0.834	0.758	1.019
4.212	-0.062	3.088	9.762	-0.049	0.038	7.937	1.413
<0.01	—	<0.05	<0.01	—	<0.01	<0.01	—

△本实验按L16(2¹⁵)正交表设计 *CaM拮抗剂作为阳性对照

为了使实验结果更可靠,我们还用L₈(2⁷)正交表安排了实验,除Sin和Ber×Eph的作用有出入外,其余结果都一致。3批正交试验结果均表明Que、TFP和Nit能显著抑制CaM-DEP激活活性($P<0.01$)。因此,我们对Que、Nit和TFP作了进一步分析。

3.2 Nit、Que和TFP之间的交互作用: 本项试验通过分析Nit、Que和TFP的交互作用,试图得到有关Que、Nit作用位点的信息。3种药均取2个水平,1水平浓度为0,2水平浓度为50μmol/L,结果见表2。当Nit和Que取2水平,TFP取2水平时对CaM-PDE激活活性的抑制作用更强,这说明在对酶激活活性的抑制上,Que与TPF、Nit与TFP之间具有协同

表2 Que×Nit,Que×TFP及Nit×TFP交互作用分析表

	Que ₁	Que ₂	Nit ₁	Nit ₂
Nit1	2.343	0.599	—	—
Nit2	1.795	0.580	—	—
TFP1	3.495	0.047	2.274	2.168
TFP2	0.643	0.222	0.668	0.307

*Que₁表示Que取1水平,余类推

作用。

4 讨论

本实验将正交设计应用到CaM-PDE分子模型,从中草药有效成分中筛选CaM-PDE拮抗剂,能同时研究多个药物的作用,具有实验条件均一,对比性强、结果可靠、经济、速等优点。实验不仅能从统计学角度得出何药有作用,何药无作用,而且还能从R值直观快判断何药作用强,何药作用弱。本实验表明Que、TFP和Nit是CaM-PDE的拮抗剂,其中Que和TFP与文献结果^[4,5]相符,Nit未见文献报道。我们还观察到Que、TFP和Nit对CaM-PDE基础活性几乎无影响,而对该酶的CaM激活活性有明显抑制作用,IC₅₀值分别为11、17和86μmol/L(另文发表),其强弱顺序与正交试验结果一致。

值得一提的是正交设计虽然具有上述优点,但不是只做一批实验即可作出可靠的结论。表1中Sin(13列)对CaM-PDE活性具有抑制作用,但与用L₈(2⁷)正交表安排实验所得结果(观察资料)不一致。为此,作者进一步观察了0~500μmol/L Sin对CaM-PDE基础活性和激活活性的影响,结果表明Sin对酶活性不仅无抑制作用,反而对CaM-PDE的激活活性似有轻微激活作用。表1中Sin(13列)对CaM-PDE活性的抑制作用可能系Que(11列)和Eph×Hou(6列)的交互作用存于该列所致。

CaM及其靶酶与CaM拮抗剂相互作用的研究,除用动力学方法外,目前多采用生物物理学的手段^[4,11]。已知CaM上有多个位点与其拮抗剂和靶蛋白相互作用^[4]。TFP是研究得较为清楚的CaM拮抗剂,用正交设计分析Que、Nit和TFP之间的交互作用,结果表明Que与TFP、Nit与TFP之间有协同作用,提示Que和Nit在CaM-PDE反应体系中作用位点可能不同于TFP。

参 考 文 献

- 1 Cheung W Y. Science, 1980,207:16
- 2 Zhao S H. Acta Pharmacol Sin, 1992, 13(1):78
- 3 Gietzen K. In Intracellular Calcium Regulation. Manchester University Press, 1986,405
- 4 Veigl M L, et al. Pharmac Ther, 1989, 44:181
- 5 Nishino H, et al. Gann, 1984, 74(5): 311
- 6 Gu X F, et al. in: Guangdong-Hongkong Biochem Conference, 1988,11
- 7 Dedman J R, et al. Methods Enzymol, 1983, 102:1
- 8 Ho H C, et al. Biochim Biophys Acta, 1976,429:461
- 9 Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72 (2):248
- 10 Van Veldhoven P P, et al. Anal Biochem, 1987,161:45
- 11 张遂坡,等:生物化学与生物物理进展, 1988, 15 (4):275
(1994-03-15收稿,1995-01-24收稿)

上海市清华科技函授学院中医函授院招生

经上海教育局批准面向全国招生,免试入学,学制2年,选用全国高等中医院校函授教材,确保大专水平,各科均由专家教授亲自执教,精心辅导并负责解答学员提出的疑难问题,与全国高等教育中医专业自学考试紧相配合。凡高、初中文化程度者均可报名。详见简章,来函即赠,地址:上海085-314信箱中医函授院李琳收。邮编200085。

6.91. The result suggested that the stability constant can be improved at decreased temperatures and increased concentrations of MG.

(Original article on page 574)

Effects of Six Effective Components of Chinese Herbal Drugs on Calmodulin-Dependent Cyclic Nucleotide phosphodiesterase

Yang Dongli, Gu Xiongfei, et al

Effects of nitidine (Nit), berberine (Ber), sinomenine (Sin), ephedrine (Eph), houttuynin (Hou), quercetin (Que) and trifluoprazine (TFP) on calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (CaM-PDE) were investigated by orthogonal design. Our observation came out that Nit, Que and TFP significantly inhibited the CaM-activated PDE activity ($P < 0.01$) in the order of $Que > TFP > Nit$. Ber, Eph, and Hou had no effects on the enzyme activity ($P > 0.05$). The effect of Sin on CaM-PDE was uncertain. It was also shown that there were cooperativity between Nit and TFP and synergism between Que and TFP. These results suggested that Nit and Que may act as calmodulin antagonists and might have different sites on calmodulin in comparison with those for TFP.

(Original article on page 582)

Inhibition of Respiratory Syncytial Virus by Wuhutang, A Traditional Chinese Prescription Composed of Five Medicinal Herbs

He Shuangteng, Ou Zhengwu, Wu Canrong

Wuhutang, a well known traditional Chinese herbal decoction for the treatment of asthma was found to have an antiviral effect on respiratory syncytial virus (RSV) both in vitro and in vivo. A 50% reduction of plaque formation was observed on Hep-2 cell monolayer at a concentration of 1:80. At such concentration, the value of $\lg TC_{ID50}$ of viral yield was 2.1, and 55% RNA synthesis of RSV was inhibited. It was found that among the five medicinal herbs in prescription *Ephedra sinica* Stapf is responsible for the antiviral activity on RSV. IC_{50} for plaque inhibition was found to be 1.6mg/ml. In animal model, Wuhutang significantly reduced the titre of RSV and accelerated RSV clearance in mice, and alleviated viral pneumonitis by either oral or aerosol route.

(Original article on page 585)

Effect of Common Threewingnut (*Tripterygium wilfordii*) on Blood Rheology in Experimental Arthritis Rats

Liang Wenbo, Jin Zhengnan, Piao Huishun, et al

Ethyl acetate extract of *Tripterygium wilfordii* (20mg/kg, 40mg/kg), given to adjuvant arthritis rats (ig) for 7 consecutive days, markedly decreased both high and low shear whole blood viscosity, plasma viscosity, whole blood reduction viscosity, hematocrit and fibrinogen content, but without effect on blood sedimentation and K value in blood sedimentation equation. These results indicated that the decreasing effect of *T. wilfordii* on blood viscosity may be related to its influence on red blood cells and plasma composition.

(Original article on page 589)