

288,275(100%),257,231。
晶Ⅲ:无色针晶(MeOH),mp 214 C~216 C,[α]_D²⁵-39.1 C(c,0.47,MeOH)。分子式为C₂₀H₃₄O₃(HREI-MS m/z:322.2514,计算值:322.2512)。IRν_{max}^{KBr}cm⁻¹:3 400(OH)。EI-MS m/z:322 [M]⁺,304 [M-H₂O]⁺(100%),291 [M-CH₂OH]⁺,273 [M-CH₂OH-H₂O]⁺,255。
晶Ⅳ:无色针晶(EtOAc),mp 163 C-164 C,[α]_D²⁵-112.5°(c,0.49,CHCl₃)。分子式为C₂₂H₃₆O₄(HREIMS m/z:364.2613,计算值:364.2613,计算值:364.2612),IRν_{max}^{KBr}cm⁻¹:3 420(OH),1 722,1 250(OAc)。EI-MS m/z:364 [M]⁺,346 [M-H₂O]⁺,333 [M-CH₂OH]⁺,286 [346-CH₃COOH]⁺,273 [333-CH₃COOH]⁺。

参考文献

1 吴继洲,等.药学报 1989,24(8):600
2 吴继洲,等.同济医科大学学报 1991,20(2):893
3 吴继洲,等.高等学校化学学报 1992,13(5):658
4 Wu Jizhou, et al. Chem Pharm Bull,1995,43(9):1448
5 阮汉利,等.中草药 1999,30(6):404

(1998-12-27 收稿)

天花粉蛋白质与苦瓜子蛋白质改变 DNA 构型的活性[△]
I. DNA 解旋与链结

中国医学科学院基础医学研究所 医学生物学国家重点实验室(北京 100005) 琦祖和* 蒋效松**
中国协和医科大学 杨显荣 李慧云
香港中文大学中药研究中心

摘要 为研究中药有效成分天花粉蛋白质(TCS)与苦瓜子蛋白质(MMC)的生物学活性,以细胞遗传物质DNA为底物,经分子生物学技术分析,发现超盘旋双链DNA发生解旋和链结,单链DNA发生断链,在合适条件下,已解旋和断链的分子还可重新盘绕,再成超盘旋,极微量的蛋白质即表现出很强烈的作用。这一活性与1型DNA拓扑异构酶相同。
关键词 天花粉蛋白质 苦瓜子蛋白质 DNA 解旋 链结

The Action of Trichosanthin and Mommorcharin on DNA Configuration
I. Despiralization and Catenation of DNA

Qi Zuhe, Yang Xianrong, Jiang Xiaosong, et al. (National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS & PUMC, Beijing 100005)

Abstract Trichosanthin (TCS) and mommorcharin (MMC) are ingredients of Tianhuafen and Kuguazi respectively of Chinese traditional medicinal materials. TCS has been used clinically for inducing abortion. Recently their antitumor and antiviral activities were also reported. Especially the inhibition of HIV RNA in the cultured cells and the experimental treatment of AIDS with TCS had shed lights on the potential of Chinese medicinal materials to block HIV infection both in HIV carriers and AIDS patients. The MMC has the same characteristics as TCS. They all belong to the ribosome inactivating proteins (RIP) and perform ribonucleosidase activities similar to ricin. We found that the supercoiled double strand DNA could

* Address: Qi Zuhe, Department of Biochemistry, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS & PUMC, National Laboratory of Medical Molecular Biology, Beijing
琦祖和,女,1957年毕业于北京医学院药系,在中国医学科学院基础医学研究所生物化学与分子生物学室,医学分子生物学国家重点实验室工作,研究员。近年来以基因表达调控异常与疾病的发生为线索,探讨载脂蛋白E异常与心脑血管病的关系,建立了人突变载脂蛋白apoE7与apoE4转基因小鼠模型,证明apoE基因突变使整体发生多系统方面的病理变化。
** 首钢总医院
[△]国家自然科学基金资助项目 No 39470218

be decircularized and catenated by TCS and MMC. While in optimal conditions the supercoiled conformation of the relaxed DNA could be reconstructed by TCS and MMC. During treatment of DNA with TCS or MMC in unfavorable conditions eg. in PBS or incubated at lower temperature the despiralization of DNA was the main display in agarose electrophoresis. While in the optimal conditions the catenation of DNA appeared in addition to the despiralization. Sometimes all the DNA molecules became despiralized and catenated even with only 2 ~ 5 ng of TCS or MMC. This reaction was independent of ATP. The EDTANa₂ and DTT in the reactant was beneficial to the reconstruction of supercoiled configuration of the despiralized DNA. Based on the action of alteration of DNA configuration it was considered that these activities are similar to type 1 DNA topoisomerase.

Key words trichosanthin mommorcharin despiralization catenation topoisomerase 1

天花粉蛋白质(TCS)与苦瓜子蛋白质(MMC)分别是中药天花粉与苦瓜子的有效成分。天花粉是栝楼的块根,属葫芦科,栝楼属 *Trichosanthes kirilowii* Maxam。早在秦汉时代医书就记载有通月水等功用,七十年代,发现单味天花粉即可发挥良好的引产作用^[1]。天花粉中含有多种蛋白质,用丙酮分级沉淀法得到的精制蛋白质(trichosanthin TCS)是引产的有效成分,已制成结晶,其分子量 25.682KD,由 234 个氨基酸残基组成单一肽链,蛋白质一级结构已经测定,高级结构也基本排出^[2]。近年来又发现除催产外,TCS 还有抗肿瘤与抗病毒的功能,曾用 HIV 急性或慢性感染体外培养的细胞,证明 TCS 可选择性抑制 HIV RNA 的复制^[3]。因此试用于爱滋病的治疗,是有希望的抗 HIV 药物。苦瓜 *Momordica charantia* L. 与天花粉统属葫芦科,用丙酮分级沉淀法分离和柱层析纯化,自其种子中得到的结晶蛋白质(mommorcharin MMC)是与 TCS 具有相同性质的药用有效成分,也已试用于治疗爱滋病。TCS,MMC 与蓖麻毒蛋白均属于核糖体失活蛋白质类(RIP)^[4],它们的生物学功能是医学研究中的重要课题,受到广泛关注,自从发现蓖麻毒蛋白具有糖苷酶活性后^[5],相继证明 TCS,MMC 也具有相同性质^[4,6],还有报道 TCS,MMC 有胰蛋白酶抑制剂的活性^[7,8]。自 1988 年我们发现 TCS,MMC 可使 DNA 解旋后,对这一新的现象作了继续验证^[9,12],并对其作用机制作了进一步探讨。

1 材料与方法

TCS 自天花粉用常规方法分离,纯化,MMC 自苦瓜子中提取,分离纯化方法与 TCS 相同,按洗脱峰的微小差异,分为 αMMC, βMMC。M₁₃mp₈ 单,双链 DNA 按常规方法分离^[13]。电泳用琼脂糖凝胶(agarose)为进口分装,化学试剂均为分析纯。TCS,MMC 与 DNA 在反应条件下保温,产物用常规 1 % agarose 电泳分离,根据 DNA 条带的变化判断结果,电泳液含 40 mmol/L Tris.Cl, 20 mmol/L CH₃COONa, 1 mmol/L EDTANa₂ pH8.3,当测试到最适反应条件后,一律用最佳条件保温与电泳。

2 结果与讨论

2.1 TCS 与 MMC 使 DNA 解旋与链结的作用

2.1.1 解旋双链 DNA:纯化的质粒 DNA 按照分子体积的大小,在琼脂糖凝胶电泳图见图 1 上可分离出三条带,即超盘旋(supercoiled)带,分子结构紧密,体积最小,泳动速度最快。线性(linear)分子带,DNA 双链断裂成线性,与缺口(nicked)分子带,即链上不同部位有缺口,但双链未完全断开,缺口使大分子高级结构松弛,因而体积最大,泳动速度最慢,如图 1a 中 I, II, III。将 0.5~1 μg DNA 与 TCS, αMMC, βMMC 在非最适条件下保温 10 min 后,经 1 % agarose 电泳分离,发现 DNA 超盘旋区带 I 明显减少并上移,如图 1a I ~ IV,有时 I 带完全消失,说明分子体积增大,这是结构松弛的结果,实验证明

这一改变 DNA 结构的作用与限制性内切酶与非特异性降解的 DNaseI, 以及外切酶的活性明显不同, 当单一 HinC11 切点的 M_{13} mp8 双链 DNA 被降解时, 在反应过程中, 也可见到超螺旋 DNA 量逐渐减少, 线性 DNA 分子与缺口分子增多, 但随保温时间的延长, 或酶量增加, 超螺旋与缺口分子最终消失, 电泳图上为一条线性带, 而 TCS 与 MMC 作用后, 超螺旋带减少到一定程度后, 即使再延长保温时间或增大用量, 线性带并不增加, 说明 TCS 与 MMC 对 DNA 的作用与内切酶不同, 不是切断双链。

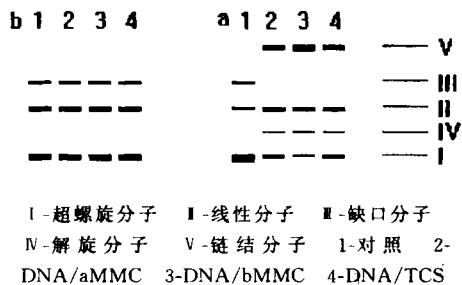


图 1 DNA 的降解与链结电泳图

为除外其非特异性内切酶活性, 又将 DNA 用微量的 DNaseI (8pg) 在非最适溶液中短时间作用, 也可见 DNA 分子解旋, 但当反应物 100 °C 煮沸 3 min 立即放入冰水中使 DNA 解链后, 在 1 % agarose 电泳图上, DNaseI 的反应管中, DNA 分子变成小分子, 而成为弥散带, 而 TCS 的反应管与对照相比无明显变化, 说明解旋非由断链所致。

为除外外切酶的活性, 又将 DNA 用 BamH1, Pst1, HinC11 降解, 造成 5' 末端突出, 3' 末端突出与平齐末端的 DNA 片段, 再经 TCS 作用后, 电泳图上, DNA 片段的泳动速度反而变慢, 说明片段并未减短反而长度增大, 这是解旋作用造成的。另外也曾将 DNA 先与 TCS 作用, 再用内切酶降解, 发现 DNA 分子更容易被切断, 这也可用分子松弛后更易于发生作用来解释。

又为除外蛋白质非特异结合对 DNA 结构的影响, 以大于 TCS 十倍量的 (牛血清白蛋白)BSA 与 DNA 反应, 并未出现 DNA 分

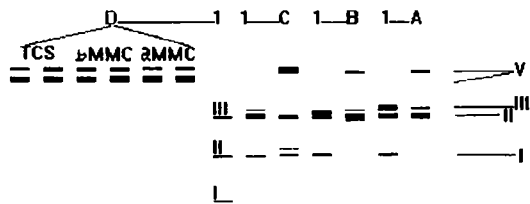
子的解旋。上述各图从略。

2.1.2 链结作用: 当 TCS, MMC 与 DNA 的反应物经最适温度处理 5 min 后, 电泳图上除分离出 DNA 松弛分子的条带外, 同时在靠近加样孔处可见到泳动度极慢的 DNA 分子聚集的大分子又称链结 (catenation)。见图 1-a V。已发生链结的分子中, 在进行电泳分离之前加入 SDS 至 1 %, 则可去除链结, 而恢复分子的超螺旋状态, 图 1-b 说明链结属分子的暂时聚集。实验表明, 在非最适条件时以解旋为主, 在最适条件时, 链结明显, 由于 TCS 与 MMC 有相同的表现, 且 bMMC 作用更强, 选 TCS 为靶, 与 DNA 反应, 电泳分离后, 测定了反应的最适条件。

2.2 解旋 DNA 的条件

2.2.1 pH 与缓冲液: 比较磷酸缓冲液 (1) 与 tris-C1 缓冲液 (2), 在不同 pH 与浓度下保温, 可见在 (2) 溶液中, DNA 分子解旋与链结比 (1) 明显, 在最适条件时几乎全部分子均链结成大分子, 见图 2A。

2.2.2 温度: 在 22 °C 至 70 °C 间, 取一定间隔反应, 可见在低温时解旋明显, 随温度增高, 链结逐渐增强, 表现为 I 带逐渐减少, V 带逐渐增多, 在最适温度时, DNA 可全部呈链结状, 超螺旋分子消失, 全部解旋变大, 见图 2B。



A-最适 pH B-最适温度 C-最适时间 D-最适浓度

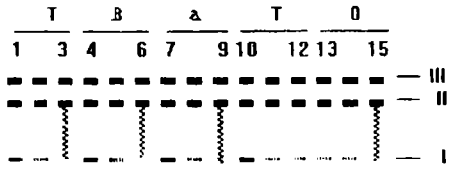
1-对照 1~V 见图 1

图 2 TCS, MMC 使 DNA 分子发生解旋与链结的最适条件

2.2.3 保温时间: 保温 15 min 即出现明显反应, 随时间延缓解旋过程的梯形带也出现, 见图 2C, 加入保护剂 (p) 的明显优于无保护剂的反应管。

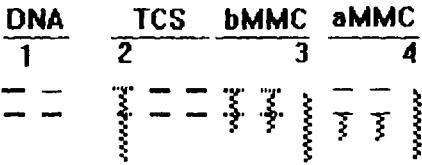
2.2.4 蛋白质用量:在适宜条件下,少至 2 ~ 5 ng 即可发生解旋与链结作用,见图 2D。

2.3 TCS 与 MMC 使已解旋的 DNA 分子重新形成超螺旋:为探讨各种离子与 ATP 对这一解旋与链结作用的影响,曾经选低浓度的一价,二价及多价金属以及 DTT(二硫苏糖醇),EDTA,ATP 等分别加到反应液中,结果表明,ATP 不影响反应,高价离子对解旋反应不利,EDTANa₂,与 DTT (1 ~ 5 mmol/L)为 DNA 反应中常用试剂,有利于 DNA 结构的稳定,当微量 DTT 与 EDTANa₂ 加到反应液后,一保存时间较长的 DNA 样品,超螺旋 1 带已消失并略有降解,但经过 TCS,aMMC,bMMC 处理后,超螺旋 1 带重新出现,自图 3 可见,超螺旋重形成时,线性 DNA 带显著减少,说明 TCS,MMC 还具有可使断开的分子重新连接的性质。



1, I, ■ 与图 1 同 O-DNA a-aMMC
B-bMMC T-TCS 1,4,7,10,13-加 EDTA

图 3 TCS,MMC 使解旋的 DNA 重新形成螺旋



1-ss DNA 2-ss DNA/TCS 3-ss DNA/
bMMC 4-ss DNA/aMMC

图 4 TCS,MMC 降解单链 DNA 电泳图

2.4 TCS 与 MMC 降解单链 ssDNA 的作用:以 M₁₃mp₈ 单链 DNA 与 RNA 为底物进

行检测发现,TCS,MMC 可切断 ssDNA 与 RNA,在 agarose 电泳时,可见 RNA 量明显减少,ssDNA 成为弥散的带,见图 4。而在 8 %聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)时,降解的片段呈靠近加样孔处的弥散条带,说明被降解但未成碎片仍保留了一定长度(图略)。

上述结果说明,TCS,MMC 可作用于 DNA,使单链 DNA 发生断裂,超螺旋双链 DNA 分子发生解旋和链结,在合适条件下,已解旋的分子还可再重新连接并成超螺旋,极小量的蛋白质,即可表现出很强的活性。

这一改变 DNA 构型的活性与 1 型 DNA 拓扑异构酶一致,为进一步说明分子构型的变化,又进行了电镜观察,另文发表。

致谢:在验证上述条件的过程中,朱席琳同志参加部分测定。

参 考 文 献

- 1 玉亚辉,等. 动物学报,1976, 22:137
- 2 中国科学院有机所等. 天花粉蛋白研究讨论会资料(7),1981
- 3 Grath M S, *et al.* Proc Natl Acad. Sci USA, 1989, 86:2844
- 4 张劲松,等. 生物化与生物物理进展,1994, 21:23
- 5 Edo Y *et al.* J Biol Chem, 1987, 262:8128
- 6 Ren J, *et al.* Structure, 1994, 2:7
- 7 钱岳伟,等. 中国科学, 1989, 9:934
- 8 谭复隆,等. 生物化学与生物物理学报, 1985,17:530
- 9 琦祖和,等. 中国医学科学院学报, 1988,10:367
- 10 Qi Zuhe, *et al.* Proc Soc Exp Biol Med, 1989, 191: 430
- 11 Qi Zuhe, *et al.* Chinese Peptide Symposium, 1992, PD05
- 12 琦祖和等. 中华流行病学杂志, 1992,13,特刊 2 号: 413
- 13 Sambrook J, *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. Press, CSH N. Y. 1992

(1998-12-07 收稿)

《国内医药信息总览》是专门收集国内 300 多种报纸、内刊及资料的医药类信息资料,是集政策法规、科研、生产、市场信息的大全书,也是查找医药经济类、科技类医药信息的唯一途径。每月一期,每期为您提供近千条信息。同时可提供数据库、光盘服务。联系地址:北京西城区北礼士路甲 38 号国家药品监督管理局信息中心,邮编:100810 联系电话:(010)68350889 或 68311976 转编辑部