

瑞香素在体外对蛋白激酶A和蛋白激酶C活力的影响[△]

徐学萍* 肖殿模 周文华 王小喜
中国医学科学院基础医学研究所(北京100005) 张俊宝 许彩民 潘华珍 陈华粹

摘要 部分纯化的蛋白激酶A和蛋白激酶C,在体外分别与瑞香素温育。瑞香素浓度达 0.56×10^{-6} mol/L时,显著抑制Ⅰ型蛋白激酶A的活力,大于 0.56×10^{-5} mol/L时,抑制Ⅰ型蛋白激酶A的活力,而高至 0.56×10^{-4} mol/L时,才能抑制蛋白激酶C的活力。结果表明,瑞香素对Ⅰ型蛋白激酶A有较高的特异抑制作用。

关键词 瑞香素 蛋白激酶A 蛋白激酶C

瑞香素是从瑞香科瑞香属植物长白瑞香 *Daphne koreane* Nakai 分离得到的结晶单体,化学结构为7,8-二羟基香豆素,具扩血管,增加冠血流量、改善心肌代谢、抗凝血、抗血栓和抗炎等作用^[1]。临床上用于治疗冠心病、血栓闭塞性脉管炎、风湿性关节炎及克山病,据报告疗效明显^[2,3]。瑞香素的作用机理,目前了解甚少。本实验观察瑞香素在体外对细胞信息传导过程中的关键环节——蛋白激酶A和蛋白激酶C活力的影响。

1 材料

瑞香素:由本所生化室提供,为淡黄色粉末,不溶于水,原液用二甲基亚砷溶解(20mg/1ml),用时用pH7.4 5mmol/L Pris缓冲液稀释成所需浓度。二甲基亚砷在测定系统中的终浓度为 $0.5 \times 10^{-6}\% \sim 1.5\%$ 。[$r\text{-}^{32}\text{P}$]ATP购自福瑞公司,组蛋白(Ⅲ-S、Ⅰ-A)、磷脂酰丝氨酸、二油酰甘油二酯、DEAE-纤维素、巯基乙醇、ATP和cAMP购自Sigma公司。其余试剂为市售分析纯。大鼠(250g左右)由本院实验医学动物研究所供给。

2 方法

2.1 蛋白激酶A提纯和活力测定:参照文献^[4]方法。大鼠骨骼肌在4℃下匀浆后,经等电点沉淀,硫酸铵盐析及DEAE-纤维素柱层析,获得部分纯化的骨骼肌细胞浆Ⅰ型和Ⅱ型蛋白激酶A。以Ⅰ-A组蛋白为底物,测定 ^{32}P 由[$r\text{-}^{32}\text{P}$]ATP转入组蛋白的放射性强度,计算蛋白激酶A活力。以nmol/min·mg蛋白表示。

2.2 蛋白激酶C提纯和活力测定:参照文献^[5]方法。大鼠脑在4℃下,经匀浆、硫酸铵盐析和DEAE-纤维素柱层析,得到部分纯化的脑细胞浆蛋白激酶C。以Ⅲ-s组蛋白作底物,测定 ^{32}P 由[$r\text{-}^{32}\text{P}$]ATP转入组蛋白的放射性强度,计算蛋白激酶C的活力。以nmol/min·mg蛋白表示。

2.3 蛋白质含量测定:以Coomassie亮蓝染料结合法,测定蛋白质含量^[6]。

3 结果

3.1 瑞香素对Ⅰ型蛋白激酶A活力影响:部分纯化的Ⅰ型蛋白激酶A基础活力为 $4.78 \pm$

*Address: Xu Xueping, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

△本研究由国家自然科学基金资助

*进修生,江苏扬州医学院生化教研室

0.31nmol/min · mg蛋白 ($\bar{x} \pm SD$, n = 10)。该酶与不同浓度瑞香素在37℃温育10min后,活性测定显示瑞香素对酶活力呈剂量依赖性抑制作用(图1,每个浓度点至少重复4次,下同)。瑞香素浓度达5.6 μ mol/L时,酶活力降至3.77 \pm 0.21nmol/min · mg蛋白,显著低于基础活力($P < 0.05$)。

3.2 瑞香素对II型蛋白激酶A活力影响:部分纯化的II型蛋白激酶A基础活力为6.39 \pm 0.14nmol/min · mg蛋白($\bar{x} \pm SD$, n = 10)。瑞香素对该酶亦有剂量依赖性抑制作用(图2)。瑞香素浓度达5.6nmol/L时,酶活力降至4.62 \pm 0.25nmol/min · mg蛋白,显著低于基础活力($P < 0.01$)。

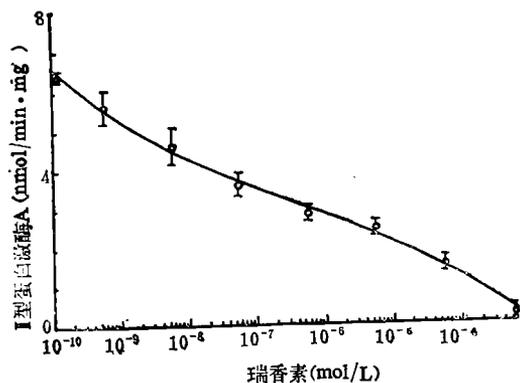
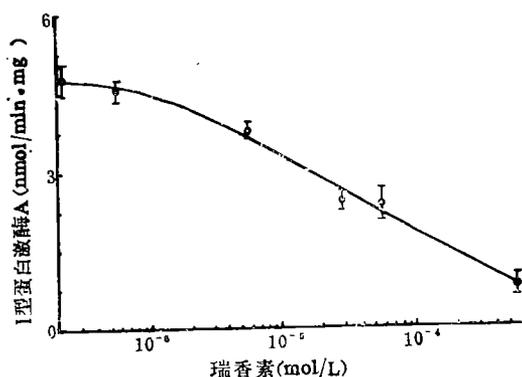


图1 瑞香素在体外对I型蛋白激酶A活力的影响

图2 瑞香素在体外对II型蛋白激酶A活力的影响

3.3 瑞香素对蛋白激酶C活力影响:部分纯化的蛋白激酶C基础活力为8.34 \pm 0.21nmol/min · mg蛋白($\bar{x} \pm SD$, n = 8)。瑞香素在较高浓度下,对该酶有剂量依赖性抑制作用(图3)。瑞香素浓度达56 μ mol/L时,酶活力降至6.33 \pm 0.33nmol/min · mg蛋白,显著低于基础活力($P < 0.01$)。

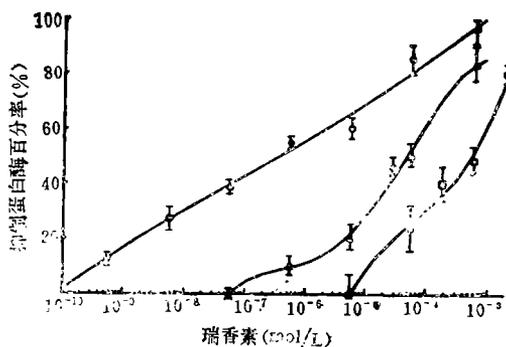
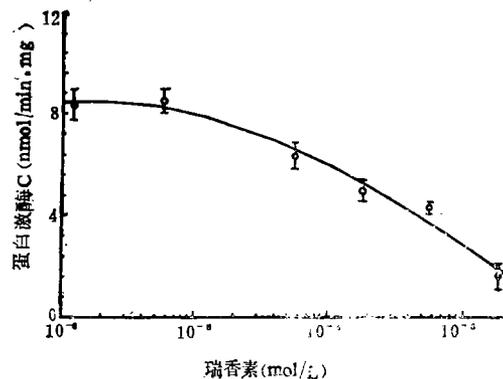


图3 瑞香素在体外对蛋白激酶C活力的影响

图4 瑞香素对不同蛋白激酶活力影响的比较

○蛋白激酶A-II △蛋白激酶A-I □蛋白激酶C

溶剂对照:用等量等终浓度的二甲基亚砜溶液分别与蛋白激酶C、I型蛋白激酶A和II型蛋白激酶A温育10min,测定酶活力。二甲基亚砜对各酶活力无任何影响。

图4比较了瑞香素在不同浓度下对I型蛋白激酶A、II型蛋白激酶A和蛋白激酶C活力抑制的程度,以受抑的百分数表示。引起II型蛋白激酶A活力50%抑制的浓度 IC_{50} 为0.4 μ mol/L, I型蛋白激酶A和蛋白激酶C的 IC_{50} 分别高达40 μ mol/L和500 μ mol/L。

4 讨论

蛋白质磷酸化是细胞信息传递途径的最终共同环节。作为激素作用的第二信使,cAMP和甘油二酯分别激活蛋白激酶A和蛋白激酶C,引起细胞某些特定蛋白质磷酸化,进而影响细胞生理功能[7,8]。为了研究蛋白激酶的生理作用,国内外学者都在寻找蛋白激酶的选择性抑制剂。近年来,国外学者发现了少数对蛋白激酶A活力有选择性抑制作用的物质,如KT 5720、强心药amrinone和milrinone等[9,10],但没有报道这些物质对I型和II型蛋白激酶A抑制作用的差别。国内只报道过藻酸双酯钠和棉酚对两型蛋白激酶A的抑制作用,但它们对蛋白激酶C也有程度相似的抑制作用,缺乏特异性[4,5]。本文结果表明,瑞香素对II型蛋白激酶A的抑制作用约为I型蛋白激酶A抑制作用的100倍,为蛋白激酶C抑制作用的1250倍。因此,瑞香素可作为II型蛋白激酶A的较特异抑制剂,可望有助于蛋白激酶生理功能的深入研究。

瑞香素的药理作用较为广泛,本实验证明了瑞香素在体外能抑制蛋白激酶A和蛋白激酶C的活力。瑞香素在体内能否抑制蛋白激酶的活力,从而干扰细胞信息的传递过程,需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 刘延泽,等.中草药,1987,18(2),32
- 2 吉林省中医中药研究所中医研究室内科,等.新医药学杂志,1977,4,11
- 3 傅国治,等.中西医结合杂志,1987,7(10),640
- 4 肖殿模,等.中国海洋药物,1992,1,7
- 5 肖殿模,等.基础医学和临床,1992,12,20
- 6 Read S M, et al. Anal Biochem, 1981, 116, 53
- 7 Scott J D. Pharmacol Ther, 1991, 50, 123
- 8 Stabel S, et al. Pharmacol Ther, 1991, 51, 71
- 9 Earl C Q, et al. Life Sci, 1986, 39, 1901
- 10 Kase H, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 142(2), 436

(1992-12-17收稿)

浮肿可用红豆消退

浙江省龙泉市卫生防疫站(323700)

郭振东

红豆又叫赤小豆、饭赤豆、红小豆。它不仅是民间喜爱的豆类食品,而且还是一种疗效好,最常用的良药。中医学认为,赤小豆味酸性平,有利尿消肿、清热解毒等多种功效,常常用于治疗水肿、脚气、黄疸、腹泻及疮疡肿毒等疾病。赤小豆的营养价值也十分可观。据分析测定,0.5kg红豆含蛋白质108.5mg、脂肪4g、糖303.5mg、钙380mg、磷1930mg、铁22.5mg,此外,还含有多种维生素等营养物质。医药工作者在实验中还发现,赤小豆煎剂对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌等有

较强的抑制作用,因此对肠炎、痢疾、腹泻及疮疡疖肿都具有良好的效果。若患有水肿、小便量小或肠炎腹泻,可用赤小豆50~100g煎水内服或用鲜茅根200g或干茅根50g,用水洗净后,加水适量煎煮30min后,将茅根捞去,再加赤小豆、大米各100g,继续煮成粥,一日内分顿食用,效果较好。用赤小豆100g煎水内服可以治疗肾炎水肿。对于妊娠水肿,可用赤小豆100g,鲫鱼250g水炖烂即可服食,一般服5~7次即可见效。

(1993-07-13收稿)

Analysis of Active Constituents in Mycelium and Fermentation Broth of Lingzhi (*Ganoderma lucidum*)

Li Zhaolan and Zheng Tao

Active constituents in mycelium and fermentation broth of *Ganoderma lucidum* were determined. Results showed that the amount of polysaccharides obtained from mycelium by 1mol/L NaOH extraction and hot-water extraction were 2% and 0.64% respectively, while the fermentation broth contains 0.1% polysaccharide. The mycelium contains 17 kinds of amino acids, totalling at 14.7%. The fermentation broth contains 29 kinds of amino acids, totalling at 0.93%. The mycelium and fermentation broth contain 22 and 17 kinds of trace elements respectively, predominately P, Fe, Zn and Ca.

(Original article on page 17)

Effects of Daphnetin on Activities of Protein Kinase A and Protein Kinase C in Vitro

Xu Xueping, Xiao Dianmo, Zhou Wenhua, et al

Daphnetin, isolated from *Daphne koreana* Nakai, has been reported to dilate blood vessels, inhibit thrombosis and have antiinflammatory effect. In this study, type I and type II protein kinase A partially purified from rat skeletal muscle and protein kinase C from rat brain were incubated with varying concentrations of daphnetin. Type II protein kinase A was significantly inhibited by daphnetin at the concentration of 0.0056 μ mol/L, while type I protein kinase A and protein kinase C were inhibited at the concentrations of 5.6 μ mol/L and 56 μ mol/L, respectively. The results indicated that daphnetin might be used as a specific inhibitor of type II protein kinase A.

(Original article on page 23)

Protective Effect of "Compound Antioxidant Herb" on Rat Gastric Injury Caused by Stress

Li Yifan, Shi Jin, Lu Binghuai, et al

Protective effect of Chinese medicinal herbs against gastric stress injury was studied. The compound antioxidant prescription used was composed of ten herbs, each of which had proven antiperoxidation action. Bound-soaked rats were used as victims of stress injury. In the two groups of rats under protection of the "prescription and injection of salvia" the indexes of gastric mucosa injury were 8.50 ± 2.31 and 19.00 ± 4.25 , LPO in serum were 10.74 ± 0.94 and 11.80 ± 1.06 nmol/ml respectively. Both were significantly decreased as compared with the control group (39.00 ± 6.50 , LPO 19.06 ± 1.10 nmol/ml). These results signified that the antioxidant medicinal herbs, especially in compounded form, may prevent gastric stress injury.

(Original article on page 26)