

石上柏和蒲葵子对蛋白激酶C活性的影响[△]

广东医学院医用生化研究所(湛江 5224024) 黄才* 覃燕梅 梁念慈

摘要 采用DE52柱层析法部分纯化大鼠中的蛋白激酶C,研究了石上柏和蒲葵子醇提物对蛋白激酶C活性的影响。为了证明测定系统的可靠性,观察了多粘菌素B(已知蛋白激酶C抑制剂)对蛋白激酶C活性的影响。表明:石上柏醇提物对蛋白激酶C有强烈的抑制作用,IC₅₀ 2.2μg/ml;100μg/ml的蒲葵子醇提物对蛋白激酶C的抑制率为66.6%,降低药物浓度抑制作用减弱;多粘菌素B对蛋白激酶C有抑制作用,IC₅₀ 17.7u/ml。

关键词 石上柏 蒲葵子 蛋白激酶C

蛋白激酶C(PKC)是一种Ca²⁺和磷脂酰丝氨酸(PS)激活的蛋白激酶,在细胞跨膜信号传递中起着重要作用^[1]。已有许多证据^[2~5]表明,蛋白激酶C与细胞增殖有关,许多蛋白激酶C抑制剂对细胞增殖有抑制作用,而一些抗癌药本身就是蛋白激酶C的抑制剂。因此,寻找新的蛋白激酶C抑制剂可能是研制和开发新抗癌药的有效途径。

许多中草药有抗癌活性。为了从中草药中筛选蛋白激酶C的抑制剂,我们观察了石上柏及蒲葵子醇提物对蛋白激酶C活性的影响。

1 材料

组蛋白ⅢS,PS,diolein,EGTA为Sigma产品;PMSF为上海东风试剂厂产品;ATP为Serva产品;DEAE纤维素(DE52)为Whatman产品;[γ-³²P]ATP(5000 Ci/mmol)购自北京福瑞生物工程公司;多粘菌素B为Pfizer产品;石上柏,蒲葵子采自广东地区,经本院中心实验室关雄泰教授鉴定。大鼠购自广东医学院动物中心。

2 方法

2.1 醇提物的制备:石上柏或蒲葵子5g,加95%乙醇80℃回流抽提30min,过滤收集滤液,抽干。称取醇提物干品,加少量DMSO溶解,临用前用双蒸水稀释。

2.2 蛋白激酶C的提取及部分纯化:将大鼠(5只)处死,迅速取出脑组织。以下操作在0~4℃进行。用生理盐水洗涤脑组织,然后加入6倍体积的buffer A(20mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.25mol/L蔗糖, 10mmol/L EGTA, 2mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF)冰浴匀浆。匀浆液于16000g离心60min,取上清液。用250ml buffer B(20mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.5mmol/L EGTA, 0.5mmol/L EDTA, 10mmol/L 2-巯基乙醇)平衡DE-52柱(1×16cm),然后将上清液上柱,用含20mmol/L NaCl的buffer B流洗未被吸附蛋白质。最后用200ml含20~200mmol/L NaCl的buffer B进行线性梯度洗脱,流速40ml/h。分管收集洗脱液,测定蛋白激酶C的活性。

2.3 蛋白激酶C活性的测定^[6]:反应混合物总体积100μl,内含20mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 10mmol MgCl₂, 0.5mmol/L CaCl₂, 10μg PS, 2μg diolein, 50μg组蛋白ⅢS, 50μmol/L [γ-³²P]ATP(1μCi),酶蛋白约2μg,并根据实验设计加入适量的药物。以上条件下测得的活性减去用2mmol/L EGTA代替Ca²⁺, PS和diolein所测得的活性,即为

Address: Huang Cai, Institute of Medical Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang

△国家自然科学基金资助项目

PKC活性。反应温度30℃,5min,用10μl冰醋酸终止反应。将反应液滴在滤纸片上,阴干。滤纸片依次用10%三氯醋酸(含1mmol/L ATP),95%丙酮处理,然后进行液闪计数。

3 结果和讨论

3.1 蛋白激酶C的部分纯化:图1示大鼠脑蛋白激酶C在DE52上的层析谱。活性曲线上出现2个峰,1个出现于80mmol/L NaCl处,另1个出现于110mmol/L NaCl处。取第1个峰活性高的管进行以下实验。

3.2 石上柏醇提物对蛋白激酶C活性的影响:结果见图2,40μg/ml的石上柏醇提物对蛋白激酶C的抑制率为90%,半数抑制浓度(IC₅₀)为2.2μg/ml,表明石上柏醇提物对蛋白激酶C有强烈的抑制作用。

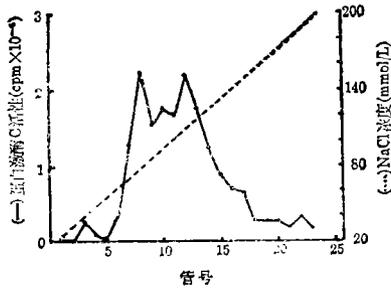


图1 大鼠脑蛋白激酶C在DE52上的层析图

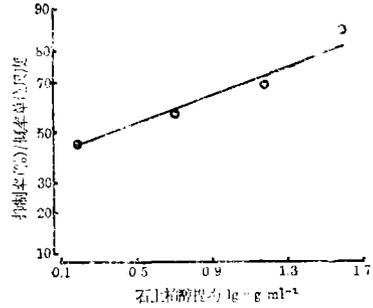


图2 石上柏醇提物对蛋白激酶C活性的影响

3.3 蒲葵子醇提物对蛋白激酶C活性的影响:结果见表1,100μg/ml的蒲葵子醇提物对蛋白激酶活性的抑制率为66.6%,降低药物浓度抑制作用减弱。

3.4 多粘菌素B对蛋白激酶C活性的影响:多粘菌素B是已知的蛋白激酶C抑制剂[7]。图3示多粘菌素B对蛋白激酶C有抑制作用,半数抑制浓度(IC₅₀)为17.7u/ml。说明本测定系统是可靠的。

蛋白激酶C是肌醇脂质信使系统中的一个关键酶,在细胞的增殖分化中起着重要的作用。现已发现,蛋白激酶C的抑制剂对细胞增殖有抑制作用,而一些临床上使用的抗癌药如tamoxifen,阿霉素就是蛋白激酶C的抑制剂[5]。因此筛选蛋白激酶C的抑制剂是开发新抗癌药的一个有效途径。

表 蒲葵子醇提物对蛋白激酶C活性的影响

药物浓度 (μg/ml)	蛋白激酶C活 性(cpm)	抑制率(%)
蒲葵子 0	3795 ± 12	—
蒲葵子 40	1660 ± 123	56.2
蒲葵子 100	1269 ± 39	66.6

据文献[8]报道,石上柏和蒲葵子具有抗癌活性,本实验表明石上柏和蒲葵子醇提物对蛋白激酶C有抑制作用,提示其抗癌活性可能与此有关。深入研究石上柏和蒲葵子抑制蛋白激酶C的成分有可能发现新的抗癌药,或发现新的蛋白激酶C的抑制剂。本研究有助于阐明石上柏和蒲葵子抗癌的分子机理。

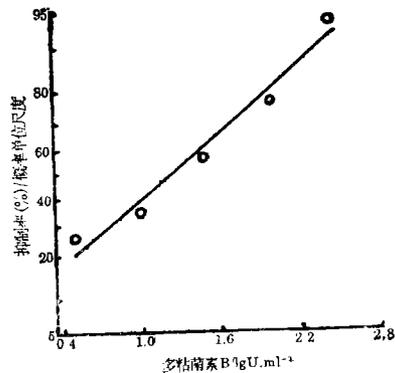


图3 多粘菌素B对蛋白激酶C活性的影响

(下转第418页)

异不显著。但从中可以看出一用药后升高的趋势。

2.3 用药3周对大鼠睾丸DNA含量的影响: 结果见表3。空白对照组DNA含量最低(2.85 ± 0.96 mg/g), 各组与该组比较, 其DNA含量均有所升高, 尤以蚂蚁水提液组和中药组比较显著($P < 0.05$), 复方蚂蚁口服液小剂量组亦与阳性对照组(丙酸睾丸素)接近。

3 讨论

现在人们越来越重视DNA、RNA的生物学活性。DNA-RNA结构与功能的研究能解释细胞的许多生命现象, 而DNA、RNA含量的测定也能在一定程度上说明生命现象。DNA是细胞生物功能及遗传信息的载体, 而DNA控制并从DNA模板上转录的RNA具有许多生物学活性。这些物质含量的多少决定着细胞功能的强弱。在睾丸中进入分裂周期的精原细胞越多, 则单位重量的DNA含量越多; 睾丸间质细胞功能越活跃, 则单位重量的RNA含量越多。以往我们用吖啶橙荧光染色的方法已经发现服用蚂蚁提取物的试验动物除能增强免疫功能外, 胸腺细胞、淋巴细胞及睾丸间质细胞和精母细胞内的DNA、RNA含量增加。本文进一步检测了应用不同方法提取和不同剂量的大黑蚂蚁提取液与复方蚁制剂的大鼠睾丸中DNA、RNA含量, 并作定量分析。再次证明蚁提取液能够使被试动物睾丸重量及其脏器指数增加, 睾丸组织中RNA与DNA含量用药后与不用药组比较有一显著增高的趋势。这与我们另一研究成果, 即应用蚂蚁制剂4周能够提高性腺重量, 分泌睾酮的间质细胞数增多, 电镜下见用药组分化旺盛、代谢活跃, 血清性激素水平增高的结论相一致。

关于蚂蚁制剂能够增加睾丸组织中的核酸含量的作用机制尚不清楚。初步分析可能与该制剂富含微量元素Mn、Zn、Se及大量人体必需的氨基酸, 维生素E和β-胡萝卜素等有关^[5]。维生素E缺乏则出现雄鼠睾丸萎缩, 不产生精子。雌鼠则会导致胎盘萎缩与流产。Mn可激活RNA与DNA聚合酶, 促进核酸的合成^[6, 7]。其它元素亦是多种酶类的组分或激活剂, 又是维持正常生殖的必需元素。

因此, 蚂蚁提取物及其复方制剂对生殖系统与核酸代谢的作用可能是各种因素综合作用的结果。对此有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 吴志成, 等. 江苏中医, 1989, (11): 43
- 2 赵一, 等. 广西中医药, 1983, 6(6): 36
- 3 王忠, 等. 老年学杂志, 1993, 13(), : 353
- 4 L 戴维斯, 等. (姚志建, 等译). 分子生物实验技术. 北京: 科学出版社, 1990. 205
- 5 王忠, 等. 老年学杂志, 1987(4): 41
- 6 王忠, 等. 中华航空医学杂志, 1991, 2(4): 231
- 7 孔祥瑞, 等. 必需微量元素的营养生理及临床意义. 合肥: 安徽科技出版社, 1982. 339

(1994-07-30收稿)

(上接第415页)

参 考 文 献

- 1 Nishizuka Y. Nature, 1984, 308(5961): 693
- 2 Housey G M, et al. Cell, 1988, 52(3): 343
- 3 Martelli A M, et al. Exp Cell Res, 1989, 185(1): 191
- 4 Kuo J F, et al. Adv Exp Med Biol, 1989, 155: 9
- 5 王盛武, 等. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(6): 432
- 6 黄才, 等. 广东医学院学报, 1993, 11(4): 179
- 7 Oishi K, et al. J Biol Chem, 1988, 163(14): 6865
- 8 杨今祥. 抗癌中草药制剂. 北京: 人民卫生出版社, 1981. 107, 178

(1994-09-06收稿)

Determination of Matrine in Jieshenbao Lotion by TLC Scanning

Li Xiangyang, Tu Wanqian

TLC scanning technique was developed for the determination of matrine in Jieshenbao lotion. The method is simple, and highly sensitive, with an average recovery of 99.87% and a variation coefficient of 1.33%.

(Original article on page 405)

Antipromoting Tumor and Antioxidant Actions of G₉₃₁₅

Fu Naiwu, Liu Zhacyang, Zhang Ruyi

G₉₃₁₅ was a complex extracted from *Glycyrrhizae inflata* Batal, and consisted of 6 flavonoids with significant antioxidant effects. At 2mg dose, it showed strong antipromoting effect on two stage carcinogenesis in mouse skin induced by DMBA plus croton oil. At 10 μ g/ml dose, it inhibited the chemiluminescence (CL) of polymorphonuclear leukocyte (PMN) of Wistar rat induced by croton oil, at 20 μ g/ml, it inhibited the CL of new born Balb/c mouse epidermis and liver mitochondria induced by croton oil. It also inhibited the CL of Balb/c mouse microsome induced by CCl₄.

(Original article on page 411)

Effects of Dayecai (*Selaginella doedealeinii*) and Chinese Livistona (*Livistona chinensis*) on the activity of Protein Kinase C

Huang Cai, Qin Yanmei, Liang Nianci

Protein Kinase C (PKC) was partially purified from rat brain by DEAE-52 column chromatography, and the effects of ethanol extracts of *Selaginella doederleinii* and *Livistona chinensis* on PKC activity were investigated. In order to verify the reliability of the assay system, the effect of polymyxin B, a known PKC inhibitor, on the activity of PKC was also tested. Results showed that the ethanol extract of *S. doederleinii* strongly inhibited PKC activity with IC₅₀ 2.2 μ g/ml. The ethanol extract of *L. chinensis* (100 μ g/ml) inhibited PKC activity by 66.6%. Polymyxin B inhibited PKC activity with IC₅₀ 17.7 U/ml.

(Original article on page 414)

Effects of Big Black Ant and Its Compound Preparations on the RNA and DNA Levels in Testes of Rats

Wang Zhong, Zheng Xuexiu, Yuan Guoying, et al

80 male Wistar mice were randomly divided into 8 groups. The effects of the big black Ant preparations (alias Xuanju) obtained in different ways and their compound preparations in different dosages on the amount of RNA and DNA in the testes of mice were observed. After administration of the preparations for 21 days, the mice were decapitated and the testes were excised and weighed. The RNA and DNA in the testes were isolated and