

乌头碱对依赖钙调蛋白的环核苷酸磷酸二酯酶的拮抗作用

区耀华 王志刚 周 昕

(清华大学生物科学与技术系,北京)

钙调蛋白 (CaM) 是生物体中一种多功能调节蛋白。已发现多种药物如吩噻嗪、局部麻醉剂、 Ca^{2+} 通道阻断剂、化合物 48/80、长春花生物碱以及粉防己碱和小檗胺^[1]等都 对 CaM 有拮抗作用,抑制 CaM 活化的环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE)、红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 等的活性。但是上述药物中,除后三种外,其余的多为合成药。为了进一步从分子水平上探讨不同类型天然药物分子特别是中草药有效成分与 CaM 的相互作用,我们选用双酯类生物碱——乌头碱 (aconitine),研究了它对 CaM 活化的 PDE 的活性抑制效应。

乌头碱是中药川乌的主要成分之一,具有较好的强心效果并可治疗虚脱、风湿和神经痛。研究表明乌头碱是 CaM 的一种新型天然拮抗剂,对 CaM 活化的 PDE 有抑制作用, IC_{50} 值为 $1.4 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 。

1. 乌头碱对 CaM 活化的 PDE 活力影响

CaM 活化的 PDE 活力测定采用 Butcher 和 Sutherland 的方法并稍加改进。反应底物体系为: $2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ cAMP; $5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ $\text{Mg}(\text{Ac})_2$; $5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 咪唑; $5 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ Tris-HCl; pH=7.5, 终反应体系中含游离 Ca^{2+} $2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, PDE $2.3 \times 10^{-3} \text{g/ml}$, CaM $2.2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 反应总体积为 0.5ml。反应物加入顺序为: Ca^{2+} , CaM + 不同浓度的乌头碱 $\xrightarrow[保温 10\text{min}]{30^\circ\text{C}}$ + PDE $\xrightarrow[保温 10\text{min}]{30^\circ\text{C}}$ + 底物启动反应。以水解 cAMP 最终产生的 Pi 量确定 PDE 的活力。

结果表明乌头碱在浓度大于 $5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 时即能抑制 CaM 活化的 PDE 活性,其 IC_{50}

值为 $1.4 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, 而当乌头碱浓度小于 $5 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 时不影响 PDE 的基本活性。因此乌头碱对 CaM 有一定的拮抗作用。

2. 乌头碱抑制 CaM 活化的 PDE 的动力学研究

测定药物浓度与 CaM 浓度对拮抗作用的影响表明,随着乌头碱浓度增加, CaM 对 PDE 的激活曲线逐渐向右平移,在 $0, 1 \times 10^{-4}$ 和 $2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 乌头碱存在下,最大活化一半 PDE 所需 CaM 量分别为 8×10^{-9} , 14×10^{-9} 和 $20 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 。测活反应速率与 CaM 浓度的双倒数图也表明乌头碱对活化的 PDE 活性的抑制是按竞争抑制的机制进行的。

3. 反应物保温顺序对乌头碱拮抗作用的影响

如以无乌头碱存在时 CaM 与 PDE 保温 10min 后所测的活力为 100%, 则 CaM 与药物保温 10min 后再加入 PDE 继续保温 10min 产生的抑制效果和 PDE 与药物保温后再加入 CaM 保温的结果基本一致 ($2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 药物时酶活为最大活性的 51%), 而若将药物加入预先一起保温后的 CaM-PDE 体系中, 则产生的抑制效果低得多 ($2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 药物时酶活为最大活性的 76%)。

从乌头碱的结构看,它具有大多数 CaM 拮抗剂所具有的阳离子双亲特性,且具有其它药物所不具有的复杂立体构型和七元碳环,疏水性是很强的。因此它对 CaM 的拮抗作用是符合拮抗剂与 CaM 本身所带负电以及结合 Ca^{2+} 后暴露出的疏水部位通过疏水作用和离子键互补形式相互作用的机制^[2]的。它的整个分子由

(下转第 295 页)

者的泪液(采集量为 0.1ml),经 20 倍稀释后直接进行紫外测定,同时采集了 20 位正常人泪液作为对照并测定其紫外吸收值,结果如下:

表 3 人泪液蛋白和核酸含量的变化

组别	蛋白质含量 $\bar{x} \pm S.D.$ (mg/ml)	核酸含量 $\bar{x} \pm S.D.$ (%)
对照组	14.160 $\pm$ 4.120	0.671 $\pm$ 0.111
EHC 组	22.683 $\pm$ 8.760	0.633 $\pm$ 0.213
P 值	<0.05	>0.05

从表 3 可以看到,与对照组相比较,EHC 组蛋白含量单一升高(P 值 <0.05),而核酸总量基本不变,提示有大量蛋白质在膜通透性改变时释放逸出。这可能是一种机体的局部应答反应,以抵御外来病毒侵犯。我们在进一步研究中发现免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 均大量增加,同时还发现泪液中乳酸脱氢酶同工酶谱发生改变。本结果如经进一步研究,可能了解 EHC 病因、临床诊断及预后分析是有益的指标。有关资料待发表。

三、讨 论

天然蛋白质中色氨酸、酪氨酸含量决定了紫外 280nm 吸收峰的大小。虽然对粗制剂的蛋白质定量测定,目前人们大都仍用 Folin 酚法(如 Lowry 法),但对同一来源生物样品蛋白质含量进行比较时,紫外法测定蛋白质含量具有快速简便,不破坏样品,用量少及可直接对水溶液样品测定等优点,再辅以微计算机数据

处理将使此法比其它传统定量手段更受人们欢迎。此法特别适于大量、重复的样品测算,在分析处理组与对照组蛋白相对含量差异时,不失为一个有效的简便方法。

HCPT 和 CPT 均为有效的抗肿瘤药物^[4,5],我们的研究表明,在本实验所用的等毒剂量下,两药均可引起蛋白质含量降低,而核酸含量尚未受到影响。看来,药物在低剂量下主要抑制蛋白的合成。

EHC 是一种由病毒引起的眼科疾病,我国各地每隔若干年即流行一次。有关其流行病学和临床报道已积累了一些资料^[6,7],但 EHC 患者泪液中生化物质变化的测定尚不多见。本文用紫外法测定 EHC 患者泪液蛋白含量明显增加,为进一步的生化分析检验提供了一些依据,如经进一步研究,本法有可能成为一种方便的临床检验手段。

参 考 文 献

- [1] 北京大学生物系生化教研室编:《生物化学实验指导》,人民教育出版社,北京,1982。
- [2] Kirschenbaum, D. M.: *Int. J. Prot. Res.*, 1971, **3**, 109.
- [3] Kirschenbaum, D. M.: *Anal. Biochem.*, 1975, **68**, 465.
- [4] 中国科学院上海药物研究所:《中华医学杂志》,1975, **55**(4), 274。
- [5] 中国科学院上海药物研究所:《中华医学杂志》,1978, **58**(10), 598。
- [6] 胡诞宁等:《中华医学杂志》,1976, 56(8), 525。
- [7] 陈庆奎等:《眼科临床专题讲座》,陕西人民出版社,陕西,1980, 111—133。

[本文于 1987 年 6 月 26 日收到]

(上接第 290 页)

几个毗连的环组成,使得它与 CaM 作用时具有较大的空间位阻,很可能这是它对 CaM 拮抗作用不太强的原因。

参 考 文 献

- [1] 张遂坡、徐友涵:《生物化学与生物物理学报》,1988, **20**(1), 13。
- [2] Gariepy, J. et al.: *Biochemistry*, 1983 **22**, 1586。

[本文于 1988 年 4 月 11 日收到]