

柴胡对腺苷酸环化酶的影响

曾熙兰 肖建初* 胡本荣*

(基础学院)

提 要 本文以中国名药柴胡对腺苷酸环化酶活性的影响进行研究,同时以腺苷酸环化酶激活剂多巴胺作对照。结果表明,柴胡对小鼠肝细胞匀浆和艾氏腹水癌细胞的腺苷酸环化酶活性有较明显激活作用,其激活强度随柴胡浓度的增加而加强。在一定剂量范围内,药物浓度与酶反应速度呈现良好的线性关系。

关键词 柴胡 腺苷酸环化酶 环-磷酸腺苷

环磷酸腺苷(cAMP)在生物体内有广泛的生物活性。其水平的高低与许多细胞功能活动密切相关。cAMP由腺苷酸环化酶(AC)催化ATP而生成。Forskolin公认是有效的AC激活剂,属劳丹(Laudane)型二萜类化合物,来自唇形科植物 *Coleus Forskohii*。由于它激活AC的强度大,作用独特、与肾上腺素 β 受体激动剂激活AC的作用不同,而且有广泛的药理作用,引起了学者们极大的兴趣。^[1~3]我们循着植物科属的亲缘关系和化构类似的植物组分寻找兴奋AC的植物,选择中国名药柴胡作为研究对象,观察柴胡是否具有如同Forskolin能激活AC酶使cAMP升高的作用,这在国内外尚未见详细报导。寻找兴奋AC的植物对阐明有关植物药的作用机制开拓了新途径。

材 料 和 方 法

1. 主要试剂与药物

ATP(美国Sigma公司);³H-cAMP(比放射性20~30ci/mMol,北京原子能研究所提供)蛋白激酶(自提);EGTA〔已二醇双(乙-氨基乙基)四乙酸〕缓冲液;茶碱;硫酸镁(MgSO₄);多巴胺(Dopamine);中药柴胡用甲醇提取为粗制剂,未经分离纯化,PH7.4。

2. 小鼠肝组织匀浆AC的制备

选用本校动物场饲养的20~25克正常小白鼠。断头开血,迅速取出肝脏,用滤纸吸干血污,称重,按1:10~1:20(w/v)加入予冷(2~

4℃)的Tris缓冲液(PH7.4)。在冰浴下用玻璃匀浆器手动匀浆。此匀浆称肝组织AC制剂。

3. 小鼠艾氏腹水癌细胞匀浆AC的制备

取BALB/C纯种小白鼠,接种艾氏腹水瘤(EAC)5天后取腹水0.33ml,以0.1%肝素抗凝,用予冷的生理盐水5ml洗涤两次后离心分离癌细胞(2000rpm,1'×4℃),弃去上清,细胞沉淀部分加入Tris缓冲液1ml,在冰浴下制成匀浆。按10⁷细胞/0.5~1ml Tris-HCl(内含2mM MgSO₄, 5mM 茶碱)对腹水瘤匀浆进行AC活性测定。

4. AC活性的测定

反应系统内含2mM MgSO₄, 5mM 茶碱, 1mM EGTA, 1mMATP。根据实验目的加入试验药物及AC制剂(加入的50 μ lAC制剂约含蛋白100 μ g)。反应最终容积为500 μ l。上述操作在冰浴下进行。加入ATP后立即移至30℃水浴,振摇15分钟,然后置沸水浴(98~100℃)3分钟以终止反应。冷却后经1000Xg离心10分钟,取出上清,待测cAMP。每批实验,每一药物浓度均以复管反应,并始终跟随一个空白对照系统,即其中的AC制剂予先置沸水浴3分钟灭活后再参与酶促反应。AC制剂的蛋白含量按Lowry^[4]氏法测定。cAMP含量按蛋白竞争结合法^[5]测定,以反应管的cAMP量减去空白对照管的cAMP量即为AC催化生成的

* 药理学教研室

cAMP量,以PMol/毫克蛋白/15分钟表示酶的活性。我们所用的药物反应值和基础值均系同一份相同量的AC制剂参与反应,故计算各实验组相对AC活性时均用实验值(生成的cAMP量PMol/15分钟)与基础值(cAMP量PMol/15分钟)求出:相对活性%=(实验值÷基础值)×100

结 果

1. 组织匀浆AC浓度对活性的影响

以不同浓度的肝组织匀浆或腹水癌细胞匀浆的AC制剂进行反应,所得生成cAMP量代表酶的反应速度。结果表明酶的反应速度与酶的浓度成正比,线性关系良好(见图1及图2)。

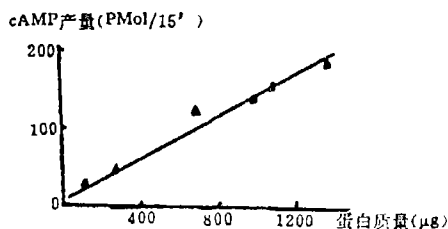


图1 蛋白量与肝AC活性的关系

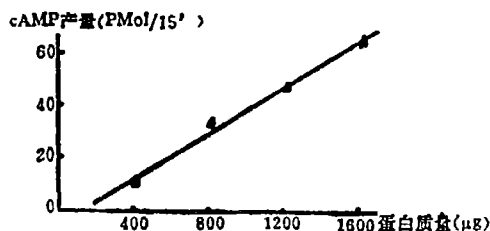


图2 蛋白量与癌细胞AC活性的关系

2. 柴胡对小鼠肝组织匀浆AC活性的影响

用不同生药量浓度的柴胡提取液在30℃条件下与肝组织匀浆作用5分钟,然后测定腺苷酸环化酶的活力,同时观察毫克分子浓度的多巴胺对肝匀浆腺苷酸环化酶活力的影响,结果如表1和图3所示,表明AC激活剂多巴胺能明显提高酶活力。与此同时,柴胡提取液亦表现激活腺苷酸环化酶的活性,其活性随柴胡浓度的升高而增加,柴胡和多巴胺在一定浓度下与酶的反应速度均呈现良好线性关系。

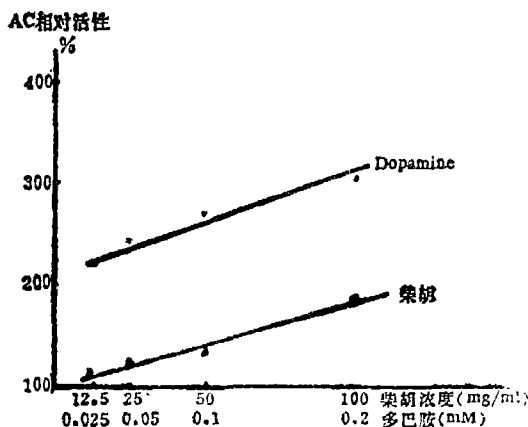


图3 柴胡、多巴胺对小鼠肝匀浆AC活性的影响

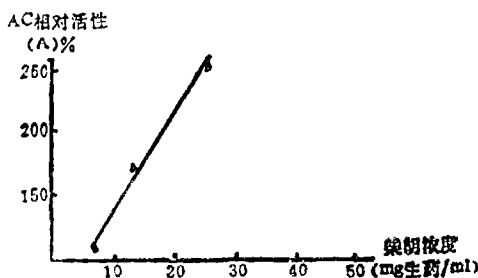


图4 柴胡对小鼠艾氏腹水癌细胞

AC活性的影响 $A = 7.36c - 26.7$

$r = 0.9987 (P < 0.05)$

3. 柴胡对腹水癌细胞匀浆AC活性的影响

如表2和图4所见,AC活性随柴胡浓度的升高而增加。若以柴胡浓度(C)为横坐标,以AC活性(A)为纵坐标,在浓度为25mg生药/ml以下时呈线性关系,且相关系数显著性检验表明 $P < 0.05$,说明柴胡激活AC作用的量效关系显著。柴胡浓度在25mg生药/ml时,呈最大激活作用,当浓度增加至50mg生药/ml时未见活性增加。

讨 论

我们的实验结果表明,柴胡提取液对小鼠肝匀浆腺苷酸环化酶有较明显的激活作用,而且对小鼠艾氏腹水癌细胞匀浆腺苷酸环化酶激活作用有明显量效关系。

柴胡是祖国的名药,本经列为上品,仲景倚之为大将,历代以来深受医家的重用。祖国

表1 柴胡、多巴胺对小鼠肝组织匀浆AC活性的影响

柴 胡				多 巴 胺		
组	浓 度 (mg生药/ml)	cAMP 产量 (PMol/15')	AC相对 活性%	组 浓度 mM	cAMP 产量	Ac 相对活性%
基础值		1.38			1.38	
1	12.5	1.54	111.6	0.025	3.08	223
2	25.0	1.70	123.2	0.050	3.30	240
3	50.0	1.86	134.8	0.10	3.77	273
4	100.0	3.10		0.20	4.25	308
基础值		1.6	193			

表2 柴胡对小鼠腹水癌细胞AC活性的影响

组	浓 度 (mg生药/ml)	cAMP产量 (PMol/15')	AC 相对 活性%
1	6.25	5.56	116.6
2	12.5	8.08	169.4
3	25.0	12.2	256
4	50.0	11.3	237
基础值	—	4.77	—

早已熟悉柴胡能舒肝解郁，并有解热、镇痛、镇静、镇咳作用。中医所谓肝郁，乃肝之疏泄功能失常，表现两胁胀痛，抑郁不乐，或急躁易怒、失眠多梦，这些症状属中枢神经过度兴奋所致。近代的研究表明柴胡有抑制血小板聚集降血脂等作用。但是柴胡的作用机制仍未阐明。柴胡对AC的激活作用，导致细胞cAMP水平的改变，这可以解释柴胡作用的多样化。众所周知，cAMP对机体许多细胞的生理功能和病理生理起着调控作用。例如在神经系统中，cAMP与突触的递质有关，cAMP介导中

枢抑制效应。此外，心力加强、血管舒张、支气管舒张、血小板聚集均与cAMP的生成有关。柴胡对腺苷酸环化酶的影响值得进一步研究。

(刘秀琴、沈宝莲、文良珍负责本研究技术工作，杨惠玲参加部份工作，特此致谢)

参 考 文 献

- [1] Seamon K B Padgett W Daly JW Forskolin. Unique diterpene activation of AC in membrane and in intact cells. Proc Natl acad Sci USA 1981, 78:3363.
- [2] Gehlert DR, et al. Quantitative autoradiography of 3H-Forskolin binding sites in the rat brain. Brain Res 1985, 351:361.
- [3] 蔺京凤摘译. 关于柴胡剂药理作用的报告——日本药学会第102次年会(大阪4月). 宁夏医学杂志 1984 (6):106.
- [4] Oliver H Lowry, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J B C 1951, 193:265.
- [5] 郑广华 曾熙兰. 环腺苷酸(cAMP)蛋白质结合测定法. 细胞内信使系统——基础与临床. 广东高等教育出版社 1988, 251.

Effect of Bupleurum Chinense on the Adenylate Cyclase Activity

Zeng Xilan

(Department of Nuclear Medicine)

Xiao Jianchu Hu Benrong

(Department of Pharmacology)

Abstract

Bupleurum chinense stimulate directly the adenylate cyclase activities of liver cells and enrich ascites cancer in mice in vitro. The activation is strengthened with the increasing of the medical doses and there is a linear relationship. In certain range, the effects between the different doses is significant.

For control experiment, the effect of dopamine on adenylate cyclase activity in liver cells was observed. The result shows that dopamine significantly stimulates adenylate cyclase activity in vitro. The activity is strengthened with the increasing of the medical doses.

Key words Bupleurum chinense Adenylate cyclase cAMP