

两面针碱对钙调蛋白依赖环核苷酸磷酸二酯酶的抑制作用^①

顾熊飞^② 杨东丽

(中山医科大学生化教研室; 广州, 510089)

提 要 以钙调蛋白依赖环核苷酸磷酸二酯酶(CaM-PDE)为分子模型,应用正交试验验证两面针碱(Nitidine, Nit)是一种新的CaM拮抗剂。实验结果表明:①Nit抑制CaM-PDE活性 IC_{50} 为 $86\mu\text{mol/L}$ 。② $75\mu\text{mol/L}$ Nit对 $0\sim 80\text{ng/ml}$ CaM存在下,CaM-PDE V_{max} 基本不变,半激活浓度(AC_{50})增大,抑制常数(K_i)为 $66\mu\text{mol/L}$ 。提示Nit以竞争方式拮抗CaM对其靶酶(PDE)的活化。③ $75\mu\text{mol/L}$ Nit对CaM-PDE抑制动力学研究;改变底物(cAMP)浓度,CaM-PDE的 V_{max} 减少,米氏常数(K_m)值增大, K_i 为 $64\mu\text{mol/L}$, $\alpha > 1$ 。提示Nit对CaM-PDE的抑制作用是非竞争-竞争性混合型抑制。由此推测Nit可能通过与CaM竞争酶分子上的CaM结合位点从而抑制CaM-PDE的激活活性。

主题词 钙调蛋白/拮抗剂和抑制剂; 磷酸二酯酶类; 两面针碱^③/药物作用

中图分类号 R285.5

1958年Arthur等从香港产的两面针植物中分离出一种新的生物碱即两面针碱(Nitidine, Nit)。14年后,Mall首次发现Nit具有很强的抗小鼠白血病 L_{1210} 的活性^[1]。有关Nit与钙调蛋白(calmodulin, CaM)及其靶酶作用的研究迄今未见报道。鉴于肿瘤细胞中CaM水平增高^[2]。CaM拮抗剂具有潜在的抗癌作用。我们推测Nit很可能是一种CaM拮抗剂。为此,本研究以CaM依赖环核苷酸磷酸二酯酶(CaM-PDE)为分子模型,用正交法观察Nit对CaM-PDE的影响。现将Nit对CaM的抑制作用和动力学研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia公司); DEAE-Cellulose(Whatman公司);cAMP(上海东风试剂厂)Nit和眼镜蛇毒分别由本校天然药物研究室和药理教研室惠赠;其余试剂为分析纯级,牛睾丸和牛心取自广州市越秀食品公司,-50℃冻存或新鲜使用,高速冷冻离心机(HITACHI 26PR-52D型日立公司。

1.2 方 法

1.2.1 CaM的制备 参照Gu^[3]的方法。纯化的牛

睾丸CaM具有激活CaM-PDE的能力,半激活浓度(AC_{50})为 16ng/ml ,PAGE和SDS-PAGE鉴定呈单一电泳区带。

1.2.2 CaM-PDE的制备 参照Ho^[4]的方法。从牛心肌中制备,最后经DEAE-Cellulose层析,收集 Ca^{2+} /CaM依赖活性峰管,激活倍数为8倍,分装-20℃冻存备用。

1.2.3 CaM-PDE活性测定 参照Ho^[4]的方法加以改良。反应体系含10个单位CaM-PDE(1U=水解 1nmol/L cAMP/min), 40mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 40mmol/L 咪唑, 5mmol/L 醋酸镁, 0.33mmol/L CaCl_2 , 40ng CaM, 1.2mmol/L cAMP,加入cAMP后立即计时, 30°C 水浴保温20min后加入眼镜蛇毒 0.1mg ,继续保温10min,加入55%三氯醋酸 0.1ml 终止反应。离心,取上清液测定无机磷^[5];所测活性为CaM-PDE激活活性。不加CaM,并以 0.33mmol/L EGTA替代 CaCl_2 ,所测活性为CaM-PDE基础活性。观察药物作用和酶动力学实验;即在上述基础上,加药,改变CaM或cAMP浓度。

1.2.4 蛋白质浓度测定 参照Bradford^[6]的方法。

2 结 果

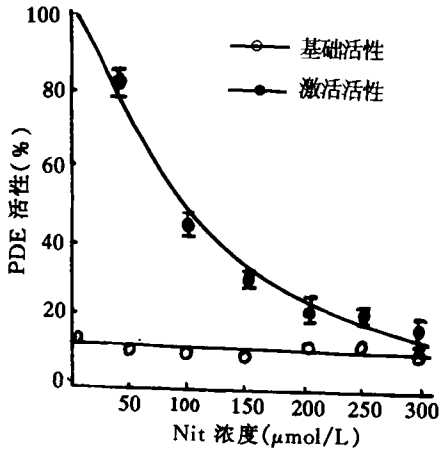
① 本研究由中华医学基金会资助;

② 第一作者,1938年出生,男,副教授;第二作者为卫生部国内访问学者(皖南医学院);

③ 补充词

2.1 Nit 对 CaM-PDE 活性的影响

Nit 对 CaM-PDE 的激活活性有较强的抑制作用, IC₅₀ 为 86 μmol/L, 曲线拟合方程为 $y = 103.5 - 0.8101x + 0.002300x^2$; Nit 对 CaM-PDE 的基础活性几乎无影响(附图)。



附图 Nit 对 CaM-PDE 活性的影响 (n=3)

2.2 Nit 对不同 CaM 浓度时的 CaM-PDE 活性影响

测定分为 2 组; Nit 浓度分别为 0 和 75 μmol/L, 结果见表 1。用 4 种方法对(表 1)的数据进行转换, 建立直线回归方程, 求得 V_{max} 和 AC₅₀(表 2)。

表 1 CaM 浓度对 Nit 抑制 CaM-PDE 活性影响

CaM(ng/ml)	PDE 活性(U ¹¹ /mg)	
	对照	Nit ²⁾
0.0	12	7
5.0	21	14
6.7	24	14
10.0	30	16
20.0	43	29
40.0	50	39
80.0	52	45

1)1U=水解 1nmol cAMP/min; 2)Nit=75 μmol/L

表 2 4 种不同方法计算 CaM-PDE 的 AC₅₀ 和 V_{max}

作图方法	AC ₅₀ (ng/ml)		V _{max} (U ¹¹ /mg)		r	
	对 照	Nit ²⁾	对 照	Nit ²⁾	对 照	Nit ²⁾
Lineweaver-Burk 法	10.1	13.6	62	46	0.9965	0.9736
Scott 法	8.4	20.2	58	57	0.9985	0.9919
Scatchard 法	9.9	19.7	61	57	-0.9879	-0.8739
Hill 法 ³⁾	9.0	19.2	59	56	0.9870	0.9856

1)1U=水解 1nmol cAMP/min; 2)Nit=75 μmol/L; 3)V_{max} 计算和校正(参见文献 7)

由表 2 可以看出, 有 Nit 时 AC₅₀ 增大, V_{max} 基本不变。可以认为 Nit 是 CaM 竞争性拮抗剂。Nit 的 K_i 为 66 μmol/L。

2.3 Nit 对 CaM-PDE 抑制动力学研究

本实验测定了 Nit 浓度为 0 和 75 μmol/L 时, 不同底物浓度(cAMP)对 CaM-PDE 激活活性的影响(表 3)。

表 3 cAMP 浓度对 Nit 抑制 CaM-PDE 活性影响

cAMP(mmol/L)	PDE 活性(U ¹¹ /mg)	
	对照	Nit ²⁾
0.00	0	0
0.10	15	7
0.12	18	10
0.17	26	14
0.25	32	13
0.50	45	28
0.67	52	33
1.20	60	39

1)1U=水解 1nmol cAMP/min; 2)Nit=75 μmol/L

用 Lineweaver-Burk 法对(表 3)数据进行转换, 建立直线回归方程, 求得 K_m 和 V_{max}, 结果表明: 在 Nit 存在时, 改变 cAMP 浓度, CaM-PDE 的 V_{max} 减少, K_m 值增大, K_i 为 64 μmol/L, α=2.75(即 α > 1)提示 Nit 对 CaM-PDE 的抑制作用是非竞争-竞争性混合型抑制。

3 讨 论

CaM 对其靶酶如 CaM-PDE 的激活有赖于 CaM 与 Ca²⁺ 结合之后其分子构象的改变, 分子螺旋度增加, 暴露出疏水区, 从而与靶酶的相应部位结合使之激活。阻断 CaM 这一功能的实现可通过以下几种方式: ①降低 Ca²⁺; ②金属离子与 CaM 结合; ③药物与 Ca²⁺-CaM 络合物结合; ④药物作用于

CaM 的结合位点;⑤药物与 CaM 靶酶的活性中心结合^[10]。本实验观察到 Nit 对 CaM-PDE 的激活活性具有抑制作用,而对其基础活性几乎无影响,提示 Nit 是一种 CaM 拮抗剂。Nit 与 CaM 作用的动力学实验表明,在 Nit 存在时, V_{max} 基本不变,而 AC_{50} 值增大,提示 Nit 是 CaM 的竞争性拮抗剂。进一步研究 Nit 对 CaM-PDE 抑制作用的动力学,结果是在 Nit 存在时改变底物(cAMP)浓度, CaM-PDE 的 V_{max} 减少, K_m 值增大,并且随着底物(cAMP)的增加,抑制程度降低,表明 Nit 是 CaM-PDE 的非竞争-竞争性混合型抑制剂。因此我们推测 Nit 可能通过方式④,即与 CaM 竞争酶上的 CaM 结合位点来抑制 CaM 对酶的活化。至于 Nit 对 CaM-PDE 的基础活性无明显作用,却是 CaM 活化酶非竞争-竞争性混合型抑制剂。怎样解释?我们认为可能是在 Ca^{2+} 和 CaM 作用下促使 PDE 构象变化所致。

(本校生化教研室马润泉教授热情指导,天然药物研究室王玫馨教授惠赠两面针碱,深表感谢)

参 考 文 献

- 1 陆元柱,唐根源,徐本杰,等. 二氢两面针碱的生成和晶体结构——兼论两面针碱(正离子)的抗癌机理. 中国科学(B辑), 1991, (8): 853
- 2 Veigl ML, Klevit RE, Sedwick MD. The uses and limitations of calmodulin antagonists. *Phar-*

macol Ther, 1989, 44: 181

- 3 Gu XF, Wang ZQ, Red H, et al. Preparation of highly purified calmodulin (CaM) from bovine testies. In: Tam WO. Guangdong-Hong Kong Conference. Shenzhen: The Guangdong Biochemical Society and The Hong Kong Biochemical Association, 1988: 11
- 4 Ho HC, Teo TS, Desai R, et al. Catalytic and regulatory properties of two forms of bovine heart cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Acta*, 1976, 429: 461
- 5 Van Veldhoven PP, Mannaerts GP. Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Anal Biochem*, 1987, 161: 45
- 6 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248
- 7 孙瑞元. 定量药理学. 北京:人民卫生出版社, 1987. 402~411
- 8 张遂波,吴隼平,徐友涵. 钙调蛋白拮抗剂. 生物化学与生物物理进展, 1988, 15(4): 275

(1995-04-06 收稿 1995-07-11 修回)

INHIBITION OF CALMODULIN-DEPENDENT CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE BY NITIDINE

Gu Xiongfei Yang Dongli

(Department of Biochemistry, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou, 510089)

Using CaM-PDE as a molecular model, orthogonal test was carried out. The results showed that nitidine is a new CaM antagonist, with IC_{50} of $86\mu\text{mol/L}$. Kinetic studies showed that the inhibition of nitidine was competitive with CaM and noncompetitive-competitive with cAMP. The inhibitory constants K_i of nitidine for them were calculated to be 66 and $64\mu\text{mol/L}$ respectively. The results suggested that the drug may bind to a calmodulin binding site on the enzyme.

Subject headings calmodulin/antagonists and inhibitors; phosphodiesterases; nitidine^①/drug effects

① complementary word