

• 研究简报 •

马兜铃酸与钙调素相互作用的荧光光谱分析

南通医学院生化钙调研究室(江苏南通226001) 徐 立 黄树模

自从Cheung发现钙调素(Calmodulin, CaM)以来,钙调素拮抗剂在研究钙调素分子调节机制方面发挥了重要作用。马兜铃酸是我室新近发现的一种钙调素拮抗剂,它是马兜铃科植物马兜铃(*Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc.)中分离提纯得到的单体化合物,具有抗肿瘤和提高细胞免疫的作用。

我室利用马兜铃酸(Aristolochic acid)和丹磺酰标记的钙调素(D-CaM)相互作用产生的荧光光谱变化进行了一系列的研究,并首次发现,马兜铃酸对钙调素的拮抗作用是非钙离子依赖性的。

钙调素为本室制备,SDS-PAGE为一条带。丹磺酰氯为Flura产品。马兜铃酸为卫生部药品生物制品检定所标准品。本实验条件下制备的D-CaM具有与天然CaM相同的生物学活性,可替代CaM来研究CaM与CaM拮抗剂相互作用产生的构象变化。

实验结果: D-CaM结合 Ca^{2+} 后,荧光强度明显增加,峰值蓝移,说明构象发生改变,其疏水区暴露。加入马兜铃酸,荧光强度降低为原来的40%,峰值红移,表明马兜铃酸在有 Ca^{2+} 存在下,能使D-CaM构象发生改变。D-CaM在EDTA存在下,加入马兜铃酸,也能使荧光强度降低为原来的41%,峰值红移,暗示D-CaM在无 Ca^{2+} 情况下,能受马兜铃酸作用而改变构象。

实验测得,在有 Ca^{2+} 和无 Ca^{2+} 两种情况下,马兜铃酸与D-CaM结合的解离常数 K_d 分别为70,77 μM ,提示 Ca^{2+} 在D-CaM上的结合可略增加马兜铃酸与D-CaM的亲合力。

马兜铃酸能使经典的CaM拮抗剂TFP和CaM依赖性靶酶磷酸二酯酶(PDE)引起的D-CaM荧光增强和峰值发生明显改变,而TFP却很难使马兜铃酸引起的D-CaM荧光强度降低回升(此时TFP浓度为马兜铃酸的15倍)。

上述一系列实验表明,马兜铃酸是一种天然CaM拮抗剂,而且其拮抗作用是不依赖 Ca^{2+} 的。推测马兜铃酸主要是作用于D-CaM上 Ca^{2+} 诱导的疏水区以外的部位。通常认为CaM必需在结合 Ca^{2+} 后方能与CaM拮抗剂或其它靶作用物结合,产生相应的拮抗效应或靶效应,即就是,CaM一般认为是利用其 Ca^{2+} 依赖区进行其调节作用的,而本实验发现在无 Ca^{2+} 情况下,马兜铃酸也能拮抗CaM的作用,因此,我们认为,有可能,非 Ca^{2+} 依赖区也是CaM用以调节的另一种重要部位。

本实验为进一步阐明CaM分子调节机制和探讨马兜铃酸的药理作用机制提供了新的很有价值的信息。马兜铃酸的结构与功能的关系有待进一步探讨。