

环磷酸腺苷的研究进展

樊君, 石奇, 尚红伟, 李海瑞, 李振东, 高续春(西北大学化工学院, 陕西 西安 710069)

中图分类号: R977.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2005)07-0597-03

环磷酸腺苷(cyclic Adenosine-3', 5'-monophosphate, 简称 cAMP)是核苷酸的衍生物, 为蛋白激酶激活剂, 是有机体中广泛存在的一种具有生理活性的重要物质, 由 ATP 在腺苷活化酶催化下生成, 是细胞内传递激素和递质作用的中介因子, 因此被称为“第二信使”。其灭活酶为磷酸二酯酶。它对很多酶催化的反应具有调节作用, 可调节与细胞内贮藏的糖和脂肪反应的一系列酶的活性, 对蛋白质的生物合成也具有调节控制作用。可广泛参与细胞功能的调节, 能舒张平滑肌、扩张血管、改善肝功能、促进神经再生、抑制皮肤外层细胞分裂和转化异常细胞的功能、促进呼吸链氧化酶的活性、改善心肌缺氧等。国外对其生理活性、作用机理进行了大量研究, 涉及疾病治疗、信号表达、基因复制等方面。环磷酸腺苷(cAMP)可以通过化学合成、生物发酵、天然产物分离提取等方法获得。

1 生理活性

cAMP 的胞内浓度增高有利于改善心脏内心肌、骨骼肌、横纹肌的疲劳程度。临床实践证明病人由于骨骼肌疲劳造成的心脏病得到了缓解^[1]。Mulieri Louis 等人研究了 cAMP 对右冠状动脉疾病、二尖瓣回流(mitral regurgitation)、扩张性心疾病、原发性心脏病作用的机理, 认为 cAMP 浓度的变化改变了钙泵的控制^[2]; 对免疫系统的影响方面, 研究者发现在兔子的腹膜巨噬细胞中, cAMP 浓度的增高会明显抑制过氧化物的产生, 提示环磷酸腺苷可以在医疗上用作过氧化物过度产生的保护剂^[3]。Bevilaqua L 等人研究了 cAMP 对脑的作用, 在鼠的后海马区两侧注入 1.25 μg 的 cAMP 及其他辅助兴奋剂, 使细胞内 cAMP 浓度升高, 经过不同时间的训练后, 测试结果显示其记忆程度衰退。证实海马细胞中 cAMP 的浓度影响着记忆固化^[4]。另有研究者对 20 个月的小鼠进行行为测试, 将其分为 workers、parasite、inventors、lazy 四组, 分析了四组小鼠的左右半脑细胞中 cAMP 的含量。结果发现四组之间存在着明显差异, 说明脑细胞中 cAMP 的含量和动物的行为方式相关^[5]。研究证明 cAMP 可以刺激神经产生胆碱能作用, 从而影响快眼动期睡眠(rapid eye movement sleep)。cAMP 含量增高, 则显著降低快眼动期睡眠^[6]。同时 cAMP 对髓鞘的形成、破碎、修复及髓鞘基因的调节、表达、信号传递均有影响^[7]。当小鼠被注射 cAMP (5nmol/min × 100g 体重)时, 发现磷、钠的排泄量显著增高, 当剂量增大时, 血浆中 cAMP 的浓度也增高, 说明了 cAMP 对肝、肾的影响^[8]。在肾上皮细胞中, cAMP 抑制了一氧化氮的合成, 可以减少细胞受伤, 起保护作用^[9]。cAMP 可以活化磷酸化酶蛋白激酶 A, 从而对转录因子起作用^[10]。有研究表明

cAMP 调节人类肾素基因的转录^[11]。嗜铬细胞中, cAMP 浓度的增长引起酪氨酸羟化酶基因表达的增长, 增长是通过 mRNA 转录过程实现的^[12]。脑白质肾上腺萎缩症(adrenoleukodystrophy)是一种遗传的脂肪酸代谢紊乱疾病。增高 cAMP 的浓度则可激发过氧化物酶体的活性, 反之则抑制, 因此可用于该病的治疗^[13]。cAMP 还可促进口腔角质细胞的增殖^[14], 抑制小鼠的主动脉平滑肌细胞中分裂素活化蛋白激酶的活性^[15], 还可抑制支气管哮喘的炎症。临床还用于牛皮癣的治疗^[16]。

2 制备方法

2.1 化学合成

Smith 等人在 1961 年合成了 cAMP, 此法主要是用 5'-核苷酸和 4-吗啡啉-N, N-二环己基咪在吡啶中用 DCC(Dicyclohexyl-Carbodiimide)作脱水剂进行脱水反应, 而使 5'-腺苷酸发生内酯化, 为避免分子间的反应, 反应必须在高度稀释条件下进行, 因而要用大量无水吡啶, 吡啶对人体危害很大, 并对环境有污染^[17]。又有人采用了二甲基甲酰胺(dimethyl formamide)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide)为溶剂, 这两种物质对反应物的溶解性与吡啶相似, 但由于其沸点较高, 在反应后处理阶段进行浓缩时, 不易除尽, 使产物难于提纯^[18]。1986 年, 我国的研究者又探索了新的溶剂系统。2.5g 的 5'-AMP 和 2 g 的 4-吗啡啉-N, N-二环己基咪溶解于 40mL 的乙二醇单甲醚中与含 4 g DCC 的 450mL 乙二醇单甲醚溶液在 120℃滴加反应, 回流 1h, 降温, 加金属钠调 pH 至碱性, 继续回流 3h。蒸干溶剂, 将产物溶于水后过滤, 再用 50mL 乙醚萃取三次水层减压浓缩, 用浓盐酸调 pH 至 1~2, 然后放置过夜析晶, 用乙醇、乙醚洗涤并干燥, 粗品的收率为 59%^[19]。

2.2 生物发酵

日本研究者采用基因重组的手段获得了菌种 Escherichia coli K-11, 可发酵生产 cAMP。摇床 28℃培养 14h, 培养基为: 葡萄糖 0.5%, KH₂PO₄ 0.6%, K₂HPO₄ 1.4%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, 蛋白胨 0.4%, 酵母粉 0.02%, 培养液中 cAMP 的浓度为 3.9mg/150mL^[20]。

2.3 从天然产物中提取

cAMP 的多种生理活性引起了人们的关注, 寻找富含 cAMP 的动、植物组织成为热点。动物的脑、肾等多种细胞中均含有, 但含量均很小。所以, 人们把目光投向了植物, 测定了多种植物中 cAMP 的含量^[20~22]。

上表中大枣的 cAMP 含量为 44 个枣品种的平均值, 其中山西木枣含量高达 302.50nmol/g. fw。酸枣的数值是测得

表1 植物中 cAMP 的含量

Tab 1 The cAMP content of plant

植物名称	学名	含量 (pmol/g. fw)
大枣	Zizyphus jujuba Mill.	38050.00
酸枣	Z. spinosus (Bunge) Hu.	23870.00
君迁子	Diospirus lotus L.	10000.00
北醇葡萄	Vitis vinifera L. X. V. amurensis Rupr.	5000.00
水栒子	Cotoneaster submultiflous Popov.	2325.00
苹果	Malus Pumila Mill.	336.00
梨	Pyrus bretschneideri Rehd.	<15.00
李	Prunus domestica L.	115.00
杏	Armeniaca vulgaris Lam.	<75.00
桃	Amygdalus persica L.	<15.00
西瓜	Lycopersicum esculenum Mill.	<75.00
向日葵愈伤组织	Helianthus	1.8-12.7
伽蓝	Kalanchoe	2-6
龙舌兰	Agave	1

59 个品种后的平均值,最高值为 152.00nmol。除了直接测定植物中的含量,人们还试图通过植物组织培养来提高 cAMP 的含量,以期使从植物中提取 cAMP 成为可行。Ashton 等人悬浮培养了黑麦草 (rye grass) 胚乳组织,发现内源 cAMP 的浓度在 3-14pmol/g 鲜重之间变化^[23]。Johnson 等人通过烟草组织培养,获得了 90-130pmol cAMP/g 鲜重^[24]。Brown 和 newton 将四季豆秧苗培养 6d 后,用结合蛋白测定法测得其内源性 cAMP 含量为 2.2nmol/g 干重^[25]。但是 Van Onckelen 等人质疑了该结果。他们将四季豆 (Phaseolus vulgaris L.) 的种子在 21℃,80% 的湿度条件下播种,秧苗生长时,12h 白炽灯照射,12h 处于黑暗,反复交替。培养 6d 后,将秧苗浸泡在乙醇和水中,于液氮中冷冻,然后将其冻干。同时还对照培养了低等植物绿藻 (Chlorella sp.)。采用的培养基为:KNO₃ 10mmol/L, KH₂ PO₄ 0.21mol/L, MgSO₄ · 2H₂O 70mmol/L, ZnSO₄ 0.14mmol/L, CuSO₄ · 5H₂O 3.16μmol/L, MnSO₄ · H₂O 10μmol/L, Ca(NO₃)₂ · 6H₂O 2.34mmol/L, (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ · 4H₂O 0.14μmol/L, CaCl₂ 40μmol/L, 柠檬酸铁 20μmol/L, 柠檬酸 30μmol/L。培养两周后,得到培养物,离心,将沉淀冻干。然后将这两种混合物经过多步前处理后,用木炭吸附,采用聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和 Dowex 柱层析,再通过制备级高效液相色谱 (HPLC) 纯化,得到 cAMP。通过分析级高效液相色谱和结合蛋白两种方法测定,确定了四季豆秧苗中的 cAMP 含量为 13.6 ~ 19.7pmol/干重;绿藻中 cAMP 含量为 69 ~ 92pmol/g 干重^[26]。Hanabusa 提取了大枣中的 cAMP,将枣粉于 5℃ 搅拌 1h,离心收集沉淀并溶于水,上两次 Dowex 1x4 型甲酸柱,用 0.05N 甲酸做洗脱液,再上氧化铝柱,所得组份冷冻干燥,最后得到纯度为 34% 的 cAMP, TLC 纯化后纯度提高到 97%^[27]。作者将陕北佳县油枣粉碎后,室温浸提三次,离心,上清液真空浓缩,上强碱性阴离子柱,用甲酸洗脱,洗脱液经浓缩处理后得到 cAMP。

3 分析方法

3.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法具有方便、迅速、所需样品量少的优点。将含有 cAMP 的植物干燥制成粉末,水浴提取后,取其上清液作为样品溶液。采用 Asahipak ODP-50 (C₁₈, 150mm × 4.6 mm, Asahikasei) 色谱柱,流动相为 50mmol/L KH₂ PO₄-CH₃ OH (95:5),流速为 0.8mL/min,检测器 SPD-6A (Shimadzu, 日本岛津) 在波长 254nm 处于室温下检测,16min 开始出峰^[28]。

3.2 竞争蛋白法

将待测样或标准样与 H-cAMP、结合蛋白混合均匀,置于冰浴中 2 ~ 3h,加入冰冷的洗涤缓冲液 (20mmol/L pH7.5 的磷酸盐溶液),终止反应,将反应液滴加在处理好的微孔滤膜上抽滤,80℃ 烘干滤膜,将其放在盛有闪烁液 (PPO 和 POPOP 的二甲苯溶液) 的计数瓶中,进行液闪计数^[29]。

3.3 薄层层析

植物提取 cAMP 的含量在 30% 以上时,可以用薄层层析进行检测及纯化。以硅胶为固定相,苯-乙酸乙酯-甲醇 (1:1:3),作为展开剂,紫外灯下检视 (R_f 0.75),出现黑色斑点。用此方法纯化可将 cAMP 含量提高至 90% 以上^[27]。

3.4 其它分析方法

酶联免疫法是利用生物获得半抗原,进行荧光检测的方法,该法具有灵敏度高、需样品量少的特点^[30]。Stephen 等人建立了荧光比率成像 (Fluorescence ratio imaging) 方法。将 cAMP 标记上荧光物质,根据其荧光变化的强弱测量其浓度变化,可以不破碎细胞,有利于了解胞内生理活动^[31]。毛细管电泳和紫外联用可以把 cAMP 和 cGMP、cIMP 分开,22KV 下操作上柱展开 30min,在 210nm 波长处检测出峰,但该方法设备昂贵^[32]。

4 展望

cAMP 具有广泛的生理活性,它是当前分子生物学研究的重要内容之一,据医学临床证明,它与牛皮癣、冠心病、气喘、高血压、糖尿病以及恶性肿瘤关系十分密切,在蛋白质的合成中,基因的转录和翻译都受 cAMP 的影响。它控制遗传信息,起着“第二信使”的作用,并影响许多酶的活性和细胞的代谢过程。研究工作和医学临床试验均需大量的 cAMP。但化学合成所用溶剂有一定毒性,易污染环境,生物发酵受菌种限制且难以分离,而植物尤其是大枣中 cAMP 含量是目前所知中最高的,如何从天然产物中分离出纯度高的 cAMP,是当前研究的所要解决的问题。

参考文献

[1] Bishop Amy., Travers Kerry., Ann. N. Y. Acad. Sci. [J], 1998, 853:209.
[2] Mulieri Louis A., Basic Res. Cardiol. [J], 1997, 92:95.
[3] Si Qiu-sheng, Nakamura Yoichi., Immunopharmacology [J], 1997, 36(1):1.
[4] Bevilacqua L., Behav. Pharmacol. [J], 1997, 8(4):331.
[5] Stepanichev M., Yu Egorova L K., Zh. Vyssh. Nervn. Deyat. Im. I. P. Pavlova. [J], 1996, 46(1):137.
[6] Capece M., Lydic R., Am. J. Physiol. [J], 1997, 273(4, Pt.

2):R1430.

- [7] Walikonis Randall S. , Altschul symp. Ser. [J] ,1997,4:129.
- [8] Ahloulay Mina , Clin. Invest. [J] , 1996,98(10):2251.
- [9] Kitamura, Kenichiro, Tomita, Kimio, Am. Soc. Nephrol. [J] , 1997,8(4):558.
- [10] Daniel, Philip B. , Walker, William H. , Annu. Rev. Nutr. [J] ,1998,18:353.
- [11] Germain,S. ,Konoshita T. , Clin. Exp. Hypertens. [J] ,1997, 19(5&6):543.
- [12] Semin. Cell Dev. Biol. [J] ,1997,8(2):101.
- [13] Pahan Kalipada, Khan Mushfiquddin *et al.* ,. Lipid Res. [J] , 1998,39(5):1091.
- [14] Kapas Supriya, Brown. Dean W, FEBS Lett. [J] ,1997,418 (3):287.
- [15] Plevin Robin, Malarkey Kevin . , Cell. Signalling. [J] ,1997,9 (3/4):323.
- [16] Kubota. , Teikyo Igaku Zassh [J] ,1996,19(6):563.
- [17] M. Smith ,A. C. S. [J] ,1961,83:698.
- [18] 张今. 医药工业,[J] ,1979,4:7.
- [19] 韩文炎,屠宛蓉. 河北大学学报(自然科学版), [J] ,1986,

(1):54.

- [20] 刘孟军,王永惠. 河北农业大学学报,[J],1991,14(4):20.
- [21] Kokai Tokyo Koho JP [P] 59,109,189.
- [22] Truelsen T A. , Wyndaele R. , Physiol. Plant. [J],1978,42: 324.
- [23] Ashton A R. , Polya G M. , Biochem. J. [J] ,1977,165:27.
- [24] Johnson L P. , Mac Leod J K. , Planta. [J],1981,152:195.
- [25] Brown, E. G. , Newton, R. P. , Phytochemistry [J],1973,12, 2683.
- [26] Van Onckelen H A, Dupon M, Phisiol. Plant [J],1982,55:93.
- [27] Hanabusa H, Cyong J, Takahashi M, Planta medica [J],1981, 42:380.
- [28] 王慕邹. 常用中草药高效液相色谱分析 [M] , 北京:科学出版社,P12 ,1999.
- [29] Gilmah A G. , Proc. Natl. Acad. Sci. [J],1970,67(1):305.
- [30] Itaru Yamamoto, Jun-Ichi Tsuji, Pharmacobio-Dyn [J],1980,3 (5):S26.
- [31] Stephen R. Adams, Nature [J] ,1991,349:694.
- [32] Luis Hernandez, ACS. Symp. Ser. [J] ,1990,434:50.

收稿日期:2005-04-30