

首乌藤体外抑制基质金属蛋白酶活性的实验研究

戈宏焱¹, 杨金刚², 房学迅², 赵树华^{1*}

(1. 吉林大学中日联谊医院中医科, 吉林 长春 130033;

2. 吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 研究首乌藤对基质金属蛋白酶(MMPs)活性的抑制作用。方法: 根据抑制MMPs活性后底物降解速率降低的原理, 通过检测底物降解速率, 测定中药首乌藤提取物对MMPs的抑制作用。结果: 首乌藤具有较强的抑制MMP-16活性的作用, 其抑制活性 $IC_{50} = 21 \mu\text{g/mL}$ 。结论: 首乌藤具有抑制基质金属蛋白酶活性的作用。

[关键词] 首乌藤; 基质金属蛋白酶; 酶活性分析

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)08-0029-03

Inhibitory in vitro Activity of *Caulis Polygoni Multiflori* on Matrix Metalloproteinase

GE Hong-yan¹, YANG Jin-gang², FANG Xue-xun², ZHAO Shu-hua^{1*}

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China;

2. Key Laboratory of Molecular Enzymology and Enzyme Engineering of Ministry Education, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) by *Caulis Polygoni Multiflori*. **Methods:** Decreased the degrade rate of substrate is associated with the inhibition of MMP. We studied the inhibitory activity of *Caulis Polygoni Multiflori* on MMP by observing the degrade rate of substrate. **Results:** *Caulis Polygoni Multiflori* inhibited the MMP-16 activity, and the IC_{50} was $21 \mu\text{g/mL}$. **Conclusion:** The *Caulis Polygoni Multiflori* has the inhibitory activity of MMP-16.

[Key words] *Caulis Polygoni Multiflori*; matrix metalloproteinase; the methods for the analysis of enzymatic activity.

首乌藤(*Caulis Polygoni Multiflori*), 又名首乌藤, 为蓼科植物何首乌的藤茎或带叶藤茎。性甘、微苦, 平, 有养心安神, 养血通络, 止痒之功效。主治失眠多汗、血虚, 周身酸痛, 外治风癣疮疥作痒^[1]。基质金属蛋白酶(MMP)是一类锌离子依赖的蛋白水解酶家族, 能够降解细胞外基质成分, 参与众多重要的生

理和病理过程^[2]。根据报道, MMP活性的抑制对肿瘤细胞的行为有重要的影响^[3-5]。我们对首乌藤体外抑制基质金属蛋白酶活性进行观察, 为从分子水平上揭示首乌藤的治病机理奠定基础, 也为从首乌藤中提取基质金属蛋白酶抑制剂提供实验依据。

1 实验材料

1.1 药物和试剂 首乌藤(吉林大学中日联谊医院中药房提供的道地药材), 自制缓冲溶液(50 mmol/L HEPES, 0.2 mol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnSO₄, 0.05% Brij-35), 荧光底物 DQ-gelatin(美国

[收稿日期] 2006-12-30

[通讯作者] * 赵树华, Tel: (0431) 84995564; E-mail: zsh@sohu.com

com

Sigma 公司), 已知广谱 MMP 的抑制药物 15 nmol/L GM6001。

1.2 主要仪器 Bio-Red FLx-800 荧光酶标仪(美国), DPX-9082B-1 点热恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司)。

2 原理与方法

2.1 实验原理 实验所用底物为荧光底物, 酶降解底物后发荧光, 通过荧光酶标仪检测反应体系的荧光强度变化。抑制活性的测定是在反应体系中加入首乌藤提取物, 提取物中抑制成分与酶结合, 占据酶的活性中心, 使底物不能与酶结合, 从而导致酶降解底物速率降低。荧光强度变化减慢。

2.2 方法

2.2.1 提取物的制备 将 3 g 首乌藤放入水中沸水煮 3 h, 然后过滤得到水煮溶液, 将水煮溶液低温冻干, 得到首乌藤水提取物。配制浓度为 1, 2, 3, 4 mg/mL 的水提取物溶液。

2.2.2 抑制活性的测定 将一定量的 MMP-16 分别与 1 μ L 不同浓度的首乌藤水提取物(1, 2, 3, 4 mg/mL)、1 μ L 无菌蒸馏水、1 μ L 15 nmol/L 的 GM6001 加入 96 孔酶标板中, 然后加入缓冲溶液(50 mmol/L HEPES, 0.2 mol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 20 μ mol/L ZnSO₄, 0.05% Brij-35), 使终体积为 50 μ L, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min, 然后加入含有 0.2 μ g DQ-gelatin 的缓冲溶液 50 μ L, 最终反应体系为 100 μ L, 首乌藤水提取物最终浓度分别为 10, 20, 30, 40 μ g/mL, 立即用 Bio-Red FLx-800 荧光酶标仪进行检测, 激发波长为 460 nm, 发射波长为 520 nm。检测 10 min。检测的荧光强度变化就代表酶降解底物活力的强弱。

2.2.3 抑制活性计算 V_i 代表加入受试药组的荧光强度变化, 用 V_o 代表没有加入受试药组的荧光强度变化, 抑制百分数用下边的公式表示: 抑制百分数 (%) = $1 - V_i/V_o$, 当抑制百分数为 50% 时, 则为此受试药抑制酶活性的 IC_{50} 。

3 结果

图 1~ 6 分别是空白组与浓度分别为 10, 20, 30, 40 μ g/mL 的实验组及阳性抑制药物的测定结果, 图中“Mean V”表示随时间变化的荧光强度的变化速率, 可以作为相对的底物降解速率, 根据实验方法中所给出的公式, 能够计算出不同浓度的首乌藤提取物对 MMP-16 的抑制百分数。通过以上数据, 我们

能够推测 MMP-16 的活性抑制 50% 时所需要的首乌藤的量, 如图 7, $IC_{50} = 21 \mu$ g/mL。

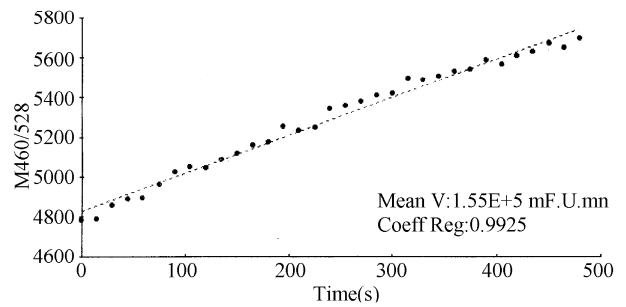


图 1 空白组: MMP-16+ 底物 DQ-gelatin+ 无菌蒸馏水 1 μ L

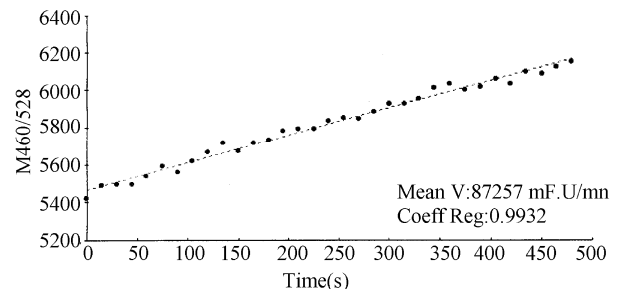


图 2 实验组 1: MMP-16+ 底物 DQ-gelatin+ 首乌藤水煮溶液 10 μ g/mL

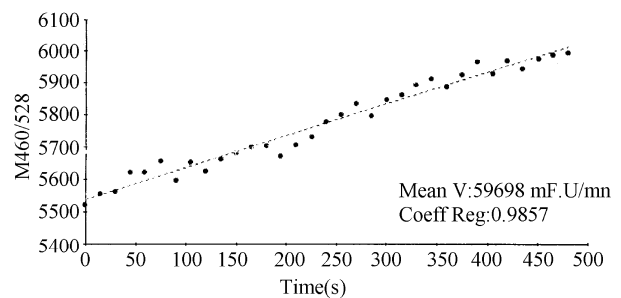


图 3 实验组 2: MMP-16+ 底物 DQ-gelatin+ 首乌藤水煮溶液 20 μ g/mL

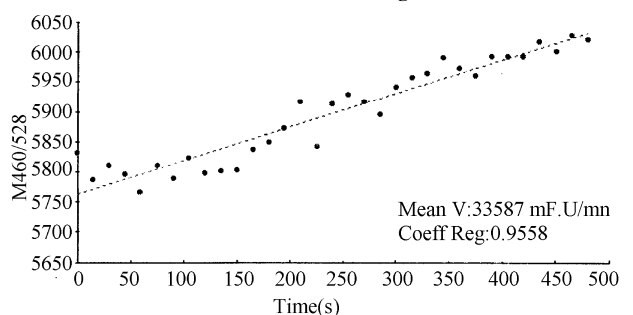


图 4 实验组 3: MMP-16+ 底物 DQ-gelatin+ 首乌藤水煮溶液 30 μ g/mL

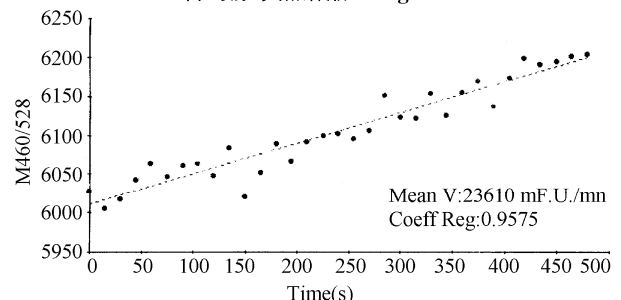


图 5 实验组 4: MMP-16+ 底物 DQ-gelatin+ 首乌藤水煮溶液 40 μ g/mL

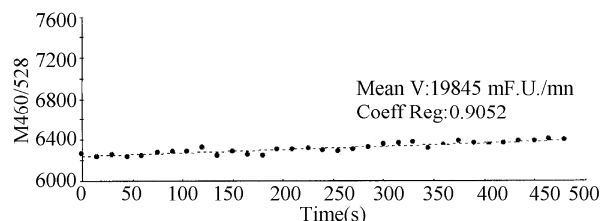


图 6 阳性组: MMP-16+ 底物 DQ-gelatin+ 15nM/L GM6001

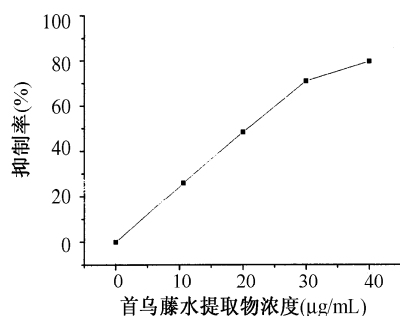


图 7 不同浓度的首乌藤对基质金属蛋白酶活性的抑制作用

4 讨论

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是锌肽酶家族的一员, 是组成结缔组织细胞外基质降解过程中必不可少的酶, 几乎能降解细胞外基质的所有成分, 在体内多种生理和病理过程中起重要作用^[6]。在创伤愈合、骨质再吸收、怀孕和分娩以及乳腺萎缩等与组织重塑有关的生理过程中均有 MMPs 的参与^[7], 而在类风湿性关节炎、骨关节炎、角膜溃疡、牙周疾病、动脉粥样硬化、心肌梗死、神经退行性疾病如多发性梗塞等以细胞外基质过度破坏为主要特征的病理过程中 MMPs 亦发挥重要作用^[8]。MMPs 的表达和活化与肿瘤的生长、侵袭和转移存在正相关, 在恶性肿瘤中 MMPs 经常过度表达^[9]。基于此, MMPs 已成为恶性肿瘤治疗的一个新靶点。目前几种广谱、低分子量的用于数种类型的肿瘤治疗的 MMP 抑制剂已被临床评估。虽然这些小分子药物在临床前的动物实验中能高效地抑制 MMP 的活性并有效地阻止肿瘤的生长和转移, 但是其价格昂贵, 并且在临床应用中表现出了强烈的副作用, 最终导致后期临床的失败^[10]。其原因可能在于这些抑制剂的特异性不强, 对其它种类的 MMP 的正常生理功能有不同程度的影响。因此, 寻求高

效的、特异性强的 MMP 抑制剂是这个领域当前工作的重点, 也是目前国内外开发抗癌药物的热点。首乌藤的临床应用在我国由来已久, 疗效确切且副作用少。实验表明, 首乌藤具有抑制 MMPs 活性的作用, 为今后进一步从首乌藤中提取基质金属蛋白酶抑制剂并开发出以 MMPs 为靶点的中药新药提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2004. 967-968.
- [2] Uta B. Hofmann, Roland Houben, Evar B. Bröcker, *et al.* Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion [J]. *Biochimie*, 2005, 87: 307-314.
- [3] Ming-Chung Jiang, Ching-Fong Liao, Po-Huang Lee. Aspirin Inhibits Matrix Metalloproteinase-2 Activity, Increases E-Cadherin Production, and Inhibits in Vitro Invasion of Tumor Cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 282: 671-677.
- [4] Ki-Tae Ha, Tae-Kyun Lee, Keun-Hwa Kwak, *et al.* Inhibitory effect of Cho-Deung-San on human aortic smooth muscle cell migration induced by TNF- α through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and-9 activity [J]. *Vascular Pharmacology*, 2004, 41: 83-90.
- [5] Risto Alaraho, Vel-Matti Kähäri. Collagenases in cancer [J]. *Biochimie*, 2005, 87: 273-286.
- [6] 陈华江, 毛军杰. 基质金属蛋白酶的结构及其调节机制[J]. *国外医学·肿瘤学分册*, 2001, 28(1) 20-23.
- [7] Kugler A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(2): 1589-1592.
- [8] Vel-Matti K, Saarialho-kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion [J]. *Ann Med*, 1999, 31(1): 34-45.
- [9] Massova I, Kotra LP, Fridman R, *et al.* Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification [J]. *Faseb J*, 1998, 12(12): 1075-1095.
- [10] 房学迅. 基质金属蛋白酶在肿瘤发展中的作用及基质金属蛋白酶抑制剂的开发[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2002. 127-128.