

慢心律抗钙调素作用的研究

南通医学院生物化学教研室 高中华 黄树模 张宏来

提 要 本文应用脑依赖于钙调素(环核苷酸磷酸二酯酶),发现慢心律能抑制钙调素激活该酶活性, $IC_{50}=1000\mu\text{M}$,而对酶的基础活性无抑制作用,增加反应体系中的钙调素量能减弱慢心律的抑制作用。实验提示慢心律是通过与钙调素相互作用而抑制其对靶酶的激活,这可能与慢心律的两性分子特性有关。

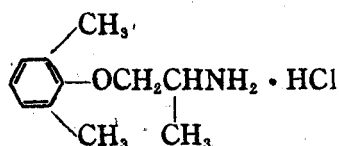
关键词: 慢心律 钙调素 环核苷酸磷酸二酯酶

自从 Weiss 等^[1] 1974 年报道三氟拉嗪 (TFP) 是脑和肺钙调素 (Calmodulin, CaM) 依赖性环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 的抑制物以来,许多实验室已陆续发现一些抗精神病药、镇静药、抗疟药、局部麻醉剂、 β -类肾上腺素能阻滞剂、抗肿瘤药物等也可与 CaM 相互作用,从而减弱或阻断 CaM 对其靶酶的结合和活化。虽然该类作用一般与它们各自的药理作用并无明显相关性,但这对了解 CaM 与其靶酶的作用方式及药物的构效关系提供了良好的启示。

我们应用猪脑依赖于 CaM 的 PDE 检测了抗心律失常药慢心律 (Mexiletinum, Mex) 抗 CaM 作用。

材料与 方法

Phenyl-Sepharose 系 Pharmacia 公司产品, DEAE-Cellulose 系 Whatman 公司产品, EGTA 系上海复大产品, cAMP 由徐州医学院赵升皓教授惠赠,纯度 99.5%, Mex 由中国药科大学提供,化学结构式为



其余试剂均为分析纯。所有试剂均用双蒸水

配制。

蛇毒为响尾蛇毒 (Sigma 试剂)。

新鲜猪脑由当地肉联厂购入。

CaM 制备及纯化 参照 Gopalakrishna 和 Anderson 方法^[2] 稍加修改,由新鲜猪脑制备,最后经 DEAE-Cellulose 离子交换层析纯化, -20°C 保存。

CaM 依赖性 PDE 的制备 参照 Sharma 和 Wang 的方法^[3] 稍作修改,由猪脑制备,分装成 0.8 ml/管, -20°C 保存。

PDE 活性的测定 参照 Sharma 和 Wang 的方法^[3] 稍作改动,采用二步保温及定磷法测定。反应体系 0.8 ml, 按以下顺序配成: 120 mM Tris-HCl (pH 7.5) — 15 mM $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ — 3 mM CaCl_2 0.3 ml, CaM 0.3 μg (如为不含 Ca^{2+} 体系,则缓冲液中不加 Ca^{2+} 而加入 100 mM EGTA 8 μl , 不加 CaM), 补 H_2O , PDE 制品 20 μl (相当于 86 μg 蛋白), 加入 10.8 mM cAMP 100 μl 启动反应, 30°C 保温 30 分钟后,置 100°C 沸水浴 2.5 分钟,冷却后加入 0.5 mg/ml 蛇毒 100 μl , 30°C 水浴 20 分钟,加入 55% 三氯醋酸 100 μl 终止反应, 4000 rpm 离心 20 分钟,取上清 0.5 ml, 加入 95% 乙醇 1 ml (以消除药物在酸性条件下定磷时出现的混浊), 定磷法测 OD_{600} 。每一数据均重复试验 3 次以上。

蛋白浓度测定 参照 Lowry 法^[4]。

结 果

1. Mex对CaM激活的PDE活性的抑制作用

当反应体系含有 Ca^{2+} 和CaM时,CaM对PDE的最大激活活性定义为酶的100%活性(相当于 $\text{OD}_{660} = 0.71$);体系中含 Ca^{2+} 和CaM时的PDE活性定义为酶的基础活性,为17%。测定Mex作用时,在加入PDE之前加入所需浓度的Mex,30℃水浴保温20分钟结果见图1。

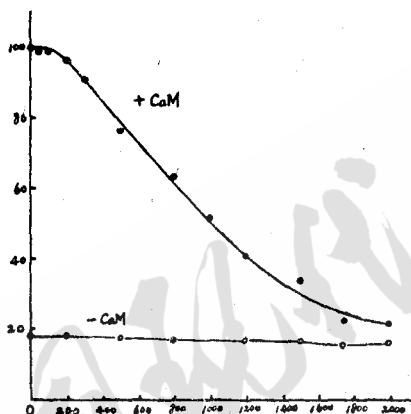


图 1

Fig 1. Effect of Mex on the activity of POE

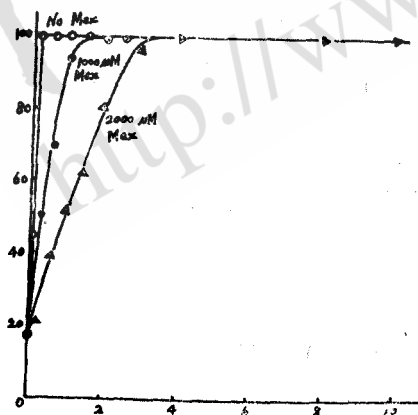


图 2

Fig 2. CaM protecting PDE against Mex Inhibition

由图1可见,Mex对CaM激活的PDE活性具有抑制作用,半抑制浓度(IC_{50})为1000 μM ,但Mex对酶的基础活性无抑制作用。

2. CaM对抗Mex对PDE活性的抑制

当将含 Ca^{2+} 体系中CaM量增大时,Mex对CaM激活的PDE活性的抑制程度降低。在1.5 $\mu\text{g}/\text{管}$ CaM量时,1000 μM Mex丧失对PDE活性的抑制;在4 $\mu\text{g}/\text{管}$ CaM量时,2000 μM Mex丧失对PDE活性的抑制作用(图2),说明CaM能对抗Mex对CaM激活的PDE活性的抑制。

讨 论

Mex是近年来合成的抗心律失常药物,按Singh分类属于膜抑制类抗心律失常药,其药理作用,已为广泛的临床应用所证实。Mex对CaM激活的PDE活性的抑制及这种抑制能为增大CaM量所减弱说明Mex能与CaM相互作用而阻断CaM对其靶酶PDE的激活。

Vincenzi^[5]曾比较了 IC_{50} 从6 μM -2500 μM 的一系列药物的抗CaM作用,发现它们均具有两性分子结构。Mex的化学结构属于氨基醚衍生物,也属两性分子,其分子中即含有在生理pH时呈阳离子的亲水侧链,又含有一个二甲基苯基的疏水基团。Mex的抗CaM作用可能与其它非特异性抗CaM作用的药物的情形类似。一般认为CaM在生理pH条件下带有大量负电荷,在结合 Ca^{2+} 以后能在分子表面形成疏水区,通过该疏水区与其靶酶的相应部位结合而使之激活^[6]。Mex可能通过其疏水结构与CaM的疏水区以疏水性相互作用而结合,从而干扰了CaM对其靶酶的结合和激活。该现象为CaM在结合 Ca^{2+} 以后与其靶酶的作用模式提供了支持。较高浓度Mex对CaM作用的抑制也可能与过量Mex时的毒副作用有关。

参 考 文 献

- [1] Weiss, B. et al. : Molec. Pharmacol 1974, 10, 615—625
- [2] Gopalakrishna, R. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun 1982, 104, 830—836
- [3] Sharma, R. K. et al. : Adv Cyclic Nucleotide Res 1979, 10, 187—198
- [4] Lowry, O. H. et al. : J. Biol. Chem 1951, 193, 265—275
- [5] Vincenzi, F. F. : In "Calmodulin and Intracellular Ca Receptors", eds: Kakuchi et al. Plenum Press, New York 1982, 1—17
- [6] Cheung, W. Y. : Science 1980, 207, 19—27

Studies on the Anti-calmodulin Effect of Mexiletinum

Gao Zhonghua Huang Shumu Zhang Honglai

(Dept. Biochemistry of Nantong Medical College, 226001, Jiang Su)

Abstract

Using Calmodulin (CaM)-dependent cyclic nucleotide Phosphodiesterase we found that Mexiletinum (Mex) could inhibit the activity of the enzyme activated by CaM ($IC_{50}=1000\mu M$), but not inhibit the basal activity, and the increase of the amounts of CaM in the reaction system could reduce the inhibition. The results suggest that the inhibition be through the interaction of Mex and CaM. This may relate to the amphipathic nature of Mex.

Key Words: Mexiletinum, Calmodulin, Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase