

葡甲胺-cAMP对环核苷酸磷酸二酯酶的抑制作用*

赵昇皓 刘建军

(生物化学教研室)

提要 葡甲胺环磷酸腺苷 (MGM-cAMP) 可被依赖钙媒介蛋白的环核苷酸磷酸二酯酶 (CaM-PDE) 所水解, 其降解速度仅及天然底物cAMP的75%。原因在于葡甲胺配基对PDE本身有抑制作用, 抑制率约25%。MGM-cAMP对PDE的抑制作用可减慢分解, 有利于其在体内发挥治疗作用。

关键词 葡甲胺环磷酸腺苷; 环核苷酸磷酸二酯酶; 钙媒介蛋白; 心血管药物

环核苷酸 (cAMP) 在腺苷酸环化酶的催化下于细胞膜内侧以ATP为底物环化合成, 而其分解则由细胞内的环核苷酸磷酸二酯酶 (简称磷酸二酯酶或PDE) 催化水解为5'-AMP。

可见, 磷酸二酯酶是调节细胞cAMP水平的两个关键酶之一。外源性cAMP及其同类物进入细胞之后, 其寿命长短取决于PDE活性的高低。双丁酰cAMP易进入细胞, 并不被PDE分解, 故其作用强烈, 且较持久, 但cAMP易被PDE水解, 通常不用抑制剂茶碱处理的组织观察不到cAMP生理效应。原因在于cAMP不易进入细胞而进入细胞的cAMP几乎立刻被PDE所分解¹。

以前我们实验室曾报告过一种测定PDE的方法^{2,3}, 但是灵敏度差, 专一性低, 最近我们以国产和自制试剂为基础, 就Wallace等人⁴的方法作了些改变⁵。方法的灵敏度和专一性与Wallace法相仿, 可用于PDE的活力测定, 还可以作为一个模型系统研究

钙媒介蛋白 (Calmodulin, CaM) 的含量。应用这一方法, 实验测定了PDE对葡甲胺cAMP (MGM-cAMP, 曾称心先安) 的分解作用。发现MGM-cAMP不仅可作为PDE的底物, 并且对PDE表现抑制作用。

材料与方法

一、试剂

CaM, 按前文所述方法⁶制备; SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 单峰; Ca^{2+} 激活荧光变化 ($\lambda_{\text{EX}} = 280\text{nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 307\text{nm}$), 2.5倍; 比活性, 40.000单位/mg; $E_{276\text{nm}}^{1\text{mg/ml}} = 0.18$

^3H -cAMP由北京原子能所购入, 经层析提纯后使用。

cAMP及葡甲胺cAMP均由本室合成, 纯度分别为99.77%和98.8%。

蝮蛇蛇毒, 由广州中山医学院药理教研室赵延德教授惠赠。

DEAE-纤维素 (DE-52), 英国Wha-

*中国科学院科学基金资助课题

teman产品。

其他试剂均为分析纯。所有试剂用玻璃双蒸馏水配制。

二、测定方法

测定采用两步法^[4]，在CaM和Ca²⁺存在

下PDE先与cAMP保温，于是cAMP——→5'-AMP，此为第一步。终止PDE作用后，在反应液中加入蛇毒(5'-核苷酸酶)。5'-AMP转化为腺苷和磷酸，这是第二步。没有反应的cAMP可用717阴离子交换树脂除去，³H-腺苷则用液闪测定。因为717对腺苷有非专一性吸附，回收率为61%。

反应总体积为100μl，标准反应液含40mM Tris-HCl (pH8.0)，3mM MgSO₄，50μM CaCl₂，CaM纯品500μg，依赖CaM的牛脑PDE 20μg，最后加入20μl 10mM ³H-cAMP开始反应。30℃保温10分钟，在沸水中1分钟以终止酶的反应。室温冷却后，加1%蛇毒20μl 30℃10分钟后，加入33%的717树脂1ml。取上清液0.5ml与6ml闪烁液混

合，用FJ-2101型(262厂产)液闪计数器计数。闪烁液由125克萘，7.5克PPO，0.375克POPOP溶于1000ml二噁烷中配成。

结果

一、依赖CaM的PDE的制备

将新鲜牛脑置碎冰上除去小脑、被膜、血管和结缔组织，按1:3(w/v)加入预冷的缓冲液I(20mM Tris-HCl-2mM EGTA pH7.8)，并制成匀浆，取20.000g离心45分后的上清液，上DEAE纤维素柱(6.0×30cm)。先用上述缓冲液I洗至流出液的A_{280nm}<0.05，再以2000ml NaCl(0~0.4M)进行梯度洗脱，流速为4ml/分，每15ml为1管。测定其中PDE的活力，收集活力最高的部分，浓缩，对20mM Tris-HCl-1mM MgSO₄溶液(pH7.8)透析24小时，换透析液5次。再对玻璃蒸馏水透析。以上操作均在4℃下进行。

由图1可见，如此制成的PDE，因无CaM活力很低，只有加入CaM后才具有完全活力。制成的PDE，其完全活力/基础活

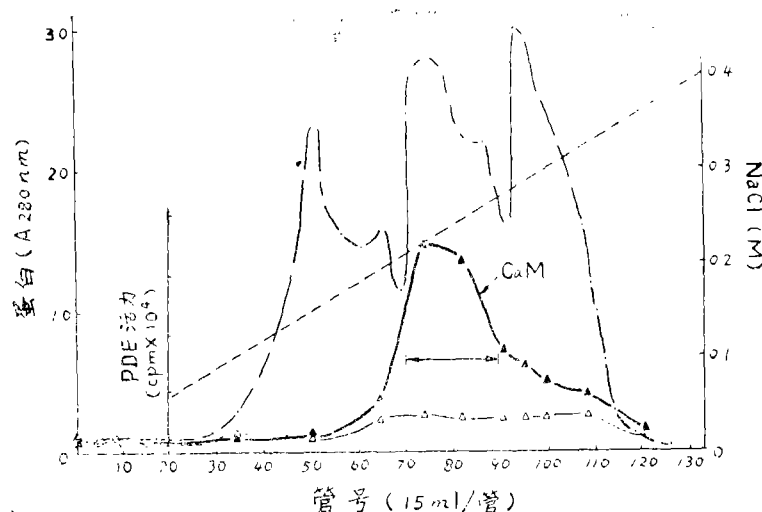


图1 牛脑依赖CaM的PDE的制备

匀浆上清液上DE-52柱，详见正文。NaCl梯度洗脱后收集各管分别测定A_{280nm}(— · —)，PDE基础活力(—△—)和完全活力(—▲—)酶活力以cpm表示。收集70—90管，浓缩后，透析，作为本实验用酶。

力比介于6—10, 可用于cAMP生物特性的测定, 及组织提取液中活性钙媒介蛋白的定量。在有CaM存在时, 此PDE活力表现对 Ca^{2+} 的依赖性。

二、葡甲胺cAMP可作为PDE的底物

实验分别以等克分子的MGM-cAMP和cAMP为底物观察了PDE对CaM的作用动力学。结果为图2所示。PDE的活力随着CaM的增加(0—700ng, 每一测定)而增加, 呈S形曲线。在有充足的CaM和 Ca^{2+} 存在下, PDE对cAMP的最大活力为180 nmol/分/毫克, 而在平行操作下对MGM-cAMP的最大活力为135nmol/分/毫克。说明MGM-cAMP可以作为PDE的底物, 而被PDE分解, 但是其分解速度低于cAMP, 相当于cAMP的75%。可见cAMP在与配基葡甲胺相连接后, 对PDE产生了轻度的抑制作用。

三、葡甲胺对PDE的作用

实验为了研究MGM-cAMP对PDE的抑制原因, 在标准测定体系中添加不同量的葡甲胺观察了PDE的活力变化。以无葡甲胺的体系中PDE的活力作为100, 随着葡甲胺的

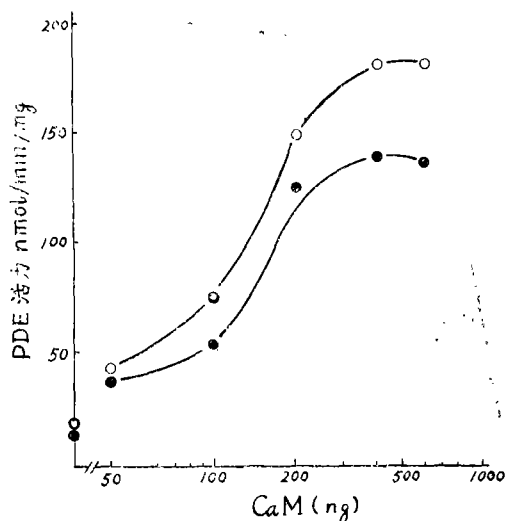


图2 在CaM存在下PDE对cAMP和心先安的作用
○, cAMP; •, MGM-cAMP

酶的活力下降, 并且其基础活力和CaM刺激活力表现出同样的曲线关系(图3)。由此可

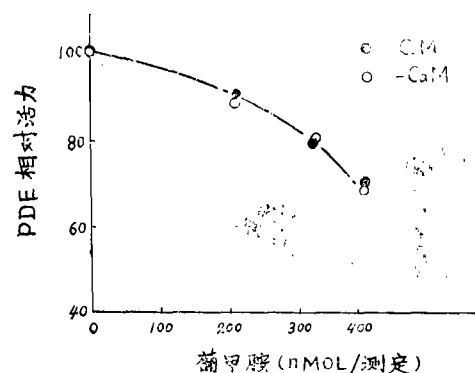


图3 葡甲胺对PDE活力的影响
•, 加CaM; ○, 不加CaM

增加, 见, MGM-cAMP对PDE的抑制是由葡甲胺本身引起的, 而且抑制作用是由于葡甲胺对PDE本身的作用, 不是作用于CaM。

讨论

葡甲胺-cAMP可被PDE分解, 但水解速度为其天然底物cAMP的75%。cAMP葡甲胺衍生物对PDE表现抑制作用, 并且对基础活力和刺激活力的相对抑制率相同。可见, 此cAMP衍生物抑制的位点在PDE本身, 而不在CaM分子。抑制来源于葡甲胺分子。结合的或自由的葡甲胺具有同等抑制效率。葡甲胺-cAMP对PDE的抑制作用可减慢其分解速度, 延长其药效, 有利于它在体内发挥作用, 具有重要实用意义。

参考文献

1. 赵昇皓. 心先安作用的分子基础. 徐州医学院学报 1984; 4: 1—18.
2. 赵昇皓, 张传琳, 赵文君. 环腺苷酸及其相关化合物的氧化铝薄板层析. 生物化学与生物物理学报 1979; 11(2): 121—126.
3. 赵昇皓, 张传琳, 赵文君. 丹参水溶性成分对环腺苷酸磷酸二酯酶的抑制

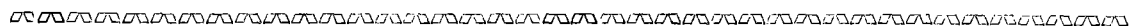
THE INHIBITION OF MEGLUMINE-cAMP ON CALMODULIN-DEPENDENT PHOSPHODIESTERASE

Zhao Shenghao and Liu Jianjun

(Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College,
Xuzhou, Jiangsu)

Meglumine-cAMP(MGM-cAMP), a new cAMP analog, commercially named as 'Xin-Xian-An', has been synthesized in our laboratory. Experiments showed that MGM-cAMP is susceptible to calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE), and the rate of its hydrolysis was 25% less, as compared with that of the natural substrate, cAMP. This inhibition was shown to be ascribed to meglumine, which, either in bound form or in free form, decreases the basal activity and restrains the stimulated activity of PDE. The presence of meglumine in the cAMP analog is a desirable feature of pharmacological importance, for the MGM ligand limits the hydrolysis of MGM-cAMP itself and thus prolongs its effect as a heart drug.

KEY WORDS meglumine cyclic adenylate; nucleotide phosphodiesterase; calmodulin; heart drug



- | | |
|--|--|
| 作用。生物化学与生物物理学报 1980; 12: 357—364。 | Methods in Enzymology 1983; 102: 39—47. |
| 4. 赵昇皓、张光毅、赵文君。钙调蛋白、钙媒介蛋白生物活性的测定。第五次全国生物化学学术会议论文摘要(北京)1984; P.349。 | 6. Chao SH, Suzuki Y, Zysk J, Cheung WY. Activation of Calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. Mol Pharmacol 1984; 26: 75—82. |
| 5. Wallace RM, Tallant A, Cheung WY. Assay of Calmodulin by Ca^{2+} -dependent phosphodiesterase | (1986年1月24日 收稿) |