

苄普地尔对大鼠心肌质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶 的非竞争抑制作用

陈丁丁 戴德哉 王彩霞 刘 波

(中国药科大学药理学研究室, 南京 210009)

摘 要 钙通道阻滞剂苄普地尔在体外非竞争性抑制大鼠心肌质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶, 抑制常数 $K_i = 43.0 \pm 1.3 \mu\text{mol/L}$, 半数抑制浓度 $\text{IC}_{50} = 67 \pm 6 \mu\text{mol/L}$, 表明其钙泵和或钙调素拮抗作用较维拉帕米强。

关键词 苄普地尔; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶; 抑制动力学; 钙通道阻滞剂

苄普地尔 (bepridil, Bep) 是一种新型的钙通道阻滞剂^[1], 在体内可消退 *L*-甲状腺素诱发升高的 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活力^[2], 在体外其对该酶的抑制动力学研究未见报道。本文研究了 Bep 体外抑制心肌质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的动力学, 对其抑制机制和药理学意义作了探讨。

1 材料和方法

1.1 动物

SD 大鼠, 体重 200~220 g, 雌雄不拘。由南京医科大学实验动物中心提供。

1.2 药品和试剂

Bep 盐酸盐, 常州第四制药厂。ATP · Na_2 , Sigma 公司。ouabain, Merck 公司。咪唑, Fluka 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 大鼠心肌质膜制备及 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP

酶活力测定

方法同文献^[2]。

1.4 蛋白质的测定

蛋白质的测定用 Bradford 法^[3], 以牛血清白蛋白作为标准品。

1.5 酶动力学参数的测定

根据 Eadie-Hofstee 动力学曲线作线性回归求得 K_m 和 V_{\max} ^[4]。用 Dixon 抑制动力学曲线作线性回归求得 K_i ^[5]。

2 结 果

2.1 Bep 对大鼠心肌质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活力的抑制作用

在不同的 ATP 浓度反应体系中, 随着加入 Bep 终浓度的升高 (0, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$), Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的活力逐渐降低。见表 1。

Tab 1. Inhibition of bepridil (Bep) on rat myocardial sarcolemma Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

| ATP Concentrations | | Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase Activity, $\mu\text{mol Pi/mg protein} \cdot \text{h}^{-1}$ | | | |
|--------------------|------------------------|---|----------------|---------------|-----------------|
| mmol/L | Bep, $\mu\text{mol/L}$ | 0 | 10 | 50 | 100 |
| 1.0 | | 12.7 \pm 1.1 | 11.1 \pm 0.8 | 6.6 \pm 0.6 | 4.05 \pm 0.21 |
| 0.75 | | 11.0 \pm 0.6 | 9.5 \pm 0.4 | 5.6 \pm 0.4 | 3.6 \pm 0.5 |
| 0.5 | | 8.3 \pm 1.1 | 7.1 \pm 0.5 | 4.2 \pm 0.7 | 2.67 \pm 0.06 |
| 0.25 | | 4.8 \pm 0.4 | 4.1 \pm 0.7 | 2.6 \pm 0.4 | 1.60 \pm 0.23 |

收稿日期 1996 05 24

2.2 Bep 的抑制作用机制

在 ATP 浓度为 0.25, 0.5, 0.75 和 1.0 mmol/L 时,求得不同浓度 Bep 存在时的 K_m 和 V_{max} ,见表 2。发现 V_{max} 值随 Bep 浓度的升高而降低,而 K_m 值基本保持不变。说明 Bep 对 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的抑制机制是非竞争性的。

Tab 2. Effects of bepridil(Bep) on rat myocardial sarcolemma Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase kinetic parameters. ATP concentrations ranging from 0.25 mmol/L to 1.0 mmol/L, K_m and V_{max} were calculated by linear regression according Eadie-Hofstee plot method

| Bep concentrations μmol/L | K_m mmol/L ATP | V_{max} μmol Pi/mg protein · h ⁻¹ |
|------------------------------|---------------------|---|
| | μmol/L ATP | μmol Pi/mg protein · h ⁻¹ |
| 0 | 1.27 | 29.24 |
| 10 | 1.34 | 26.30 |
| 50 | 1.07 | 13.51 |
| 100 | 1.20 | 9.03 |

2.3 Bep 抑制 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的 K_i 和 IC_{50}

在不同的 Bep 浓度(0,10,50,100 μmol/L)时,根据 Dixon 抑制动力学曲线作线性回归,求得 Bep 抑制 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的 K_i 为 43.0 ± 1.3 μmol/L,见表 3。

Tab 3. The inhibitor constant(K_i) of bepridil(Bep) for rat myocardial sarcolemma Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase. Bep concentrations in enzyme assay media were 0,10,50 and 100 μmmol/L respectively. K_i was calculated by linear regression according Dixon plot method

| ATP Concentrations mmol/L | K_i μmol/L | $\bar{x} \pm s$ |
|------------------------------|-----------------|-----------------|
| 0.5 | 43.54 | 43.0 ± 1.3 |
| 0.75 | 41.56 | |
| 1.0 | 44.02 | |

在 ATP 浓度为 1.0 mmol/L 时,测定不同浓度 Bep 存在时 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活力,经线性回归分析,求得 Bep 抑制 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的半数抑制浓度为 67 ± 6 μmol/L,见表 4。

3 讨论

1) 质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性依赖于

Tab 4. Inhibition of bepridil(Bep) on rat myocardial sarcolemma Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity. ATP concentration in enzyme assay system was 1.0 mmol/L. IC_{50} : inhibitor concentration of inhibiting 50% enzyme activity

| No. | Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase activity | | | | | IC ₅₀ μmol/L | $\bar{x} \pm s$ |
|-----|--|------|------|------|-----|----------------------------|-----------------|
| | μmol Pi/mg protein · h ⁻¹ | | | | | | |
| | Bep, μmol/L | 0 | 10 | 50 | 100 | | |
| 1 | | 14.5 | 11.6 | 6.9 | 3.8 | 59.5 | 67 ± 6 |
| 2 | | 12.8 | 9.62 | 5.90 | 4.0 | 60.5 | |
| 3 | | 11.4 | 11.5 | 6.1 | 4.4 | 74.4 | |
| 4 | | 13.0 | 11.5 | 6.9 | 3.9 | 65.5 | |
| 5 | | 12.7 | 11.3 | 7.3 | 4.2 | 69.8 | |
| 6 | | 11.8 | 11.3 | 6.6 | 4.1 | 71.4 | |

钙调素(calmodulin, CaM),受 CaM 的激活和调控^[6]。当细胞兴奋时,胞浆游离 Ca^{2+} 浓度升高, CaM 通过与 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶结合,可大大提高该酶活性,使该酶“泵”钙能力大为提高。因此,质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶(Ca^{2+} -泵)在维持细胞静息态低钙浓度的过程中具有十分重要的作用。

2) 在体外,Bep 对 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的基础活力(无 CaM 存在时的酶活力)的抑制大大弱于对 CaM 对 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶激活作用的抑制^[7]。因此 Bep 对质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的非竞争性抑制作用,可能是通过与酶蛋白的接合实现的。Bep 与酶蛋白的接合只抑制了 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的活性,而不影响该酶与 CaM 或底物的接合。

3) 文献报道,维拉帕米(verapamil)在 1 mmol/L 浓度时仅抑制 CaM 依赖的质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活力的 35%^[8],即维拉帕米对该酶的亲和力较弱。相比而言,Bep 对质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶(或其结合的 CaM)的较高亲和力(低 K_i 和 IC_{50})表明,Bep 在发挥其药理学作用时, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶亦可能是其主要作用靶点之一,其 Ca^{2+} -泵和或钙调素拮抗作用较维拉帕米强。

参考文献

1 Marchall RJ, Winslow E, Lamar JC, et al. Bepridil. In: Socriabine A ed. *New Drugs Annual: Cardiovascular Drugs*, Vol 2. New York: Raven Press, 1984. 157

- 2 陈丁丁, 储永新, 戴德哉. 苄普地尔消退 L-甲状腺素诱发的大鼠心脏肥厚及其质膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活力增高. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(3): 228
- 3 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1):248
- 4 Hofstee BHJ. Non-inverted versus inverted plots in enzyme Kinetics. *Nature*, 1959, 184:1296
- 5 Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*, 1953, 55:170
- 6 Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev*, 1991, 71(1):129
- 7 Raess BU, Record DM. Inhibition of erythrocyte Ca^{2+} -pump by Ca^{2+} antagonists. *Biochem Pharmacol*, 1990, 40(11):2549
- 8 Raess BU, Gersten MH. Calmodulin-stimulated plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase inhibition by calcium channel blockers. *Biochem Pharmacol*, 1987, 36(15):2455

Non-competitive Inhibition of Bepridil on Rat Myocardial Sarcolemma Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase

Chen Dingding, Dai Dezai, Wang Caixia, Liu Bo

Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract Calcium channel blocker bepridil(Bep) could, *in vitro*, non-competitively inhibit rat myocardial sarcolemma Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase. The inhibitor constant (K_i) and inhibitor concentration of inhibiting 50% enzyme activity (IC_{50}) of Bep toward the ATPase was 43.0 ± 1.3 and $67 \pm 6 \mu\text{mol/L}$ respectively. From this we conclude that Bep possesses a quite strong ability of calcium pump and/or calmodulin antagonism.

Key words Bepridil; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase; Inhibition kinetics; Calcium channel blocker

《医药动态》1997 年征订启事

《医药动态》以信息量大、快、准、新为特色。它集技术性、科学性、实用性、情报性、知识性为一体。该刊 1989 年荣获国家医药管理局情报成果奖, 1992 年获陕西省科技情报成果二等奖。经常收到读者的赞美。《动态》设有: 医药发展动向、医药市场、医药科研、医药工业、中药信息、药物临床、药品管理、医药保健、卫生材料、医疗器械、制药机械等栏目, 双月刊, 每期 64 页, 《动态》在手, 纵观全局, 决策要明, 信息第一; 勿失良机, 抓紧办理, 定价全年一份 75 元。欲订请与陕西省医药总公司情报站联系。地址: 陕西省西安市长乐中路 25 号, 邮政编码: 710032。电话 3235366。