

苄普地尔对大鼠心肌质膜 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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; $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 · Na₂, 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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\mu\text{mol/L}$), $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的活力逐渐降低。见表 1。

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

ATP Concentrations mmol/L	Bep, $\mu\text{mol/L}$	$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase Activity, $\mu\text{mol Pi/mg protein} \cdot \text{h}^{-1}$			
		0	10	50	100
1.0		12.7 ± 1.1	11.1 ± 0.8	6.6 ± 0.6	4.05 ± 0.21
0.75		11.0 ± 0.6	9.5 ± 0.4	5.6 ± 0.4	3.6 ± 0.5
0.5		8.3 ± 1.1	7.1 ± 0.5	4.2 ± 0.7	2.67 ± 0.06
0.25		4.8 ± 0.4	4.1 ± 0.7	2.6 ± 0.4	1.60 ± 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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的抑制机制是非竞争性的。

Tab 2. Effects of bepridil(Bep) on rat myocardial sarcolemma $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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	V_{max}
	mmol/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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的 K_i 为 $43.0 \pm 1.3 \mu\text{mol/L}$, 见表 3。

Tab 3. The inhibitor constant(K_i) of bepridil(Bep) for rat myocardial sarcolemma $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase. Bep concentrations in enzyme assay media were 0, 10, 50 and 100 μmol/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	
0.75	41.56	43.0 ± 1.3
1.0	44.02	

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

3 讨论

1) 质膜 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性依赖于

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

No.	$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity μmol Pi/mg protein · h ⁻¹			IC_{50}	$\bar{x} \pm s$		
	Bep, μmol/L	0	10	50	μmol/L		
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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶激活作用的抑制^[7]。因此 Bep 对质膜 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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

- Marchall RJ, Winslow E, Lamar JC, et al. Bepridil. In: Sociabiline 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. 苯普地尔消退 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。