

# 钙调蛋白拮抗剂

张遂坡 吴隽平 徐友涵

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

## 提 要

钙调蛋白拮抗剂是研究钙调蛋白的生理功能的重要工具。本文着重就阻断钙调蛋白功能的途径、钙调蛋白拮抗剂结构与活性的关系、拮抗剂的专一性以及用生物物理学手段研究拮抗剂与钙调蛋白作用机制等问题进行了讨论, 并指出钙调蛋白拮抗剂的应用前景。

钙调蛋白 (CaM) 是一种广泛存在于生物体内的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白。钙是生理学家的“DNA”, 美籍华人张槐耀博士对 CaM 的发现<sup>[1]</sup>给  $\text{Ca}^{2+}$  的生理功能的研究带来了一场革命。CaM 拮抗剂是研究 CaM 的细胞功能的重要工具, 自从 1974 年 Weiss<sup>[2]</sup> 发现三氟拉嗪 (TFP) 抑制依赖 CaM 的磷酸二酯酶 (PDE) 以来, CaM 拮抗剂的研究得到了迅速地发展, 但是这些 CaM 拮抗剂除了能影响 CaM 的调节功能外, 还有一些其它的副作用, 因此研究专一性更强的 CaM 拮抗剂并探索其生理功能仍然是人们感兴趣的研究方向, 这将进一步推动 CaM 分

子药理学研究。本文分七部分讨论近年来 CaM 拮抗剂的研究进展, 并展望 CaM 拮抗剂的应用前景。

## 一、阻断 CaM 功能的途径

CaM 是存在于真核细胞中的酸性蛋白, 通过分子构象改变与靶蛋白或酶结合发挥其调节功能, 因此任何影响这一过程的有关的物质都会影响 CaM 的调节功能。如图 1<sup>[3]</sup>。

### 1. 降低 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度 (图 1A)

由于 CaM 结合  $\text{Ca}^{2+}$  后才能发挥其生理功能, 因此只要降低体系中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度就有可

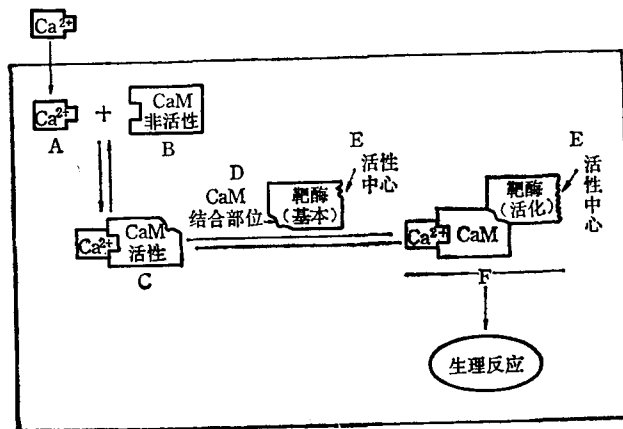


图 1 阻断 CaM 功能的途径

能导致 CaM 的失活,如  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EGTA 和钙通道阻断剂异布定等都有降低体系中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度的作用。

2. 金属离子与 CaM 结合(图 1B)

除  $\text{Ca}^{2+}$  之外,其它金属离子也可以直接作用在 CaM 的  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点上或结合到 CaM 的其它位点上引起  $\text{Ca}^{2+}$  结合区构象变化,影响  $\text{Ca}^{2+}$  与 CaM 的结合。它们通常是二价或三价的金属离子,如  $\text{Cd}^{2+}$ <sup>[4]</sup>、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ <sup>[5]</sup>和  $\text{Tb}^{3+}$  等。

3. 药物与  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 络合物结合(图 1C)

通常我们所说的 CaM 拮抗剂就是直接与 CaM 相互作用,而且是依赖  $\text{Ca}^{2+}$  的,这样形成  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-拮抗剂复合物,使 CaM 失去调节功能。一般来说,这类拮抗剂都有一定的药理功能,表 1 列出一些 CaM 拮抗剂及其药理(或生理)功能。

表 1 CaM 拮抗剂及其药理(或生理)功能

| CaM 拮抗剂         | 药理(或生理)功能        |
|-----------------|------------------|
| 酚卡明             | $\alpha$ -肾上腺阻断剂 |
| 三氟拉嗪            | 抗精神病药            |
| 长春花碱            | 抗肿瘤药             |
| 地布卡因            | 局麻剂              |
| Comp. 48/80     | 抗高血压             |
| 肌肉松弛剂           | 肌肉松弛剂            |
| 苯并二吡庚因          | 抗焦虑剂             |
| Perlapin        | 多巴胺受体阻断剂         |
| Chlordazepoxide | 抗焦虑剂             |
| 肉桂嗪             | 血管舒松剂            |
| 心痛定             | 抗心绞痛药            |
| 神经肽             | $\beta$ 内啡肽      |
| Melittin        | 昆虫毒素             |
| Ophiobolin A    | 植物毒素             |

4. 药物作用在酶上 CaM 的结合位点(图 1D)

通过光化学反应把氯丙嗪和 CaM 用共价键连结起来形成氯丙嗪-CaM(CPZ-CM)<sup>[6]</sup>,发现 CPZ-CM 可以直接作用在酶上 CaM 的结合部位上,与 CaM 竞争性的和酶结合,但它不能调节酶的功能,而是抑制 CaM 的作用,其  $\text{IC}_{50}$  值为  $0.2\mu\text{mol/L}$ (见图 2)。从某种角度讲,这种 CaM 拮抗剂的专一性最好。

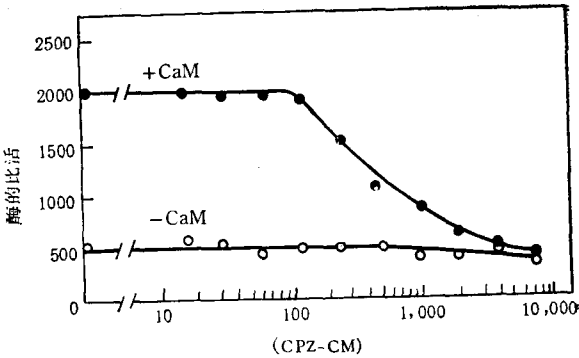


图 2 CPZ-CM 对 CaM 活化的 PDE 活力的抑制作用<sup>[6]</sup>,  
检测体系中含 CaM10nmol/L, cAMP400 $\mu\text{mol/L}$ ,  
终体积 125 $\mu\text{l}$

5. 药物与依赖 CaM 的酶上的催化部位结合(图 1E)

有些钙螯合剂和钙通道阻断剂可以与 CaM 调节的酶上的催化部位(活性中心)结合,由于它们没有直接同 CaM 或 CaM 结合位点作用,通常被称为间接的 CaM 拮抗剂。这些拮抗剂既能抑制 CaM 活化酶的活力,又能抑制酶的基本活力(没有 CaM 活化)因此专一性较差。

除上述情况外,有些拮抗剂既能直接与 CaM 结合,又能与酶结合,同时以多种方式阻断 CaM 的功能。例如 TFP 抑制 CaM 活化的  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 就是这种情况。

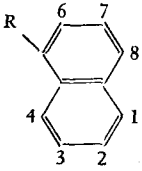
二、结构与活性的关系

CaM 拮抗剂一般都具有疏水性和碱性双重性质,CaM 是酸性蛋白质而且含有许多疏水氨基酸,这两者就会互补结合。因此这种结合主要是靠两种力的作用,即疏水作用和静电作用。

1. 疏水作用

Tanaka 等<sup>[7]</sup>通过研究萘磺酰胺化合物(w 系列)同 CaM 的疏水作用表明,化合物的疏水性与其同 CaM 的亲性和性之间有一定的相关性。化合物的结构式、 $\text{IC}_{50}$  值和疏水性系数见表 2。很明显疏水性越强对 CaM 的亲合力越强,而且两者之间存在有线性关系,其相关系数都在 0.9 以上(图 3)。芳香环上如有卤素取代基,对 CaM 亲和性能也有影响,其结果是 F、Cl、Br 依次

表2 一些 CaM 拮抗剂的结构、抑制依赖 CaM 的 PDE 活力的  $IC_{50}$  值和疏水性系数<sup>[7]</sup>

|  | 亲和力 $IC_{50}(\mu\text{mol/L})$ |       | 抑制力 $IC_{50}(\mu\text{mol/L})$ |       | 疏水性系数 $\log P$ |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|----------------|-------|
|                                                                                   | R = Cl                         | R = H | R = Cl                         | R = H | R = Cl         | R = H |
| 1-SO <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> NH <sub>2</sub>               | 68                             | 440   | 32                             | 570   | 0.89           | 0.11  |
| 1-SO <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>               | 31                             | 210   | 26                             | 240   | 1.46           | 0.13  |
| 1-SO <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> NH <sub>2</sub>               | 3.6                            |       | 18                             |       | 2.57           |       |
| 1-SO <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> NH <sub>2</sub>              | 2.3                            |       | 3.2                            |       | 2.64           |       |
| 2-SO <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>               | 55                             | 280   | 68                             | 260   | 3.25           | 2.35  |
| 2-SO <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>               | 16                             | 180   | 14                             | 130   | 4.55           | 3.00  |

注: ①亲和力以 CaM 中 [<sup>3</sup>H]w-7 被药物置换一半时所需药物浓度表示。

②抑制力以药物抑制 CaM 活化的 PDE 活力一半时所需药物浓度表示。

③疏水性系数以药物在正辛醇和水体系中的分配系数表示。

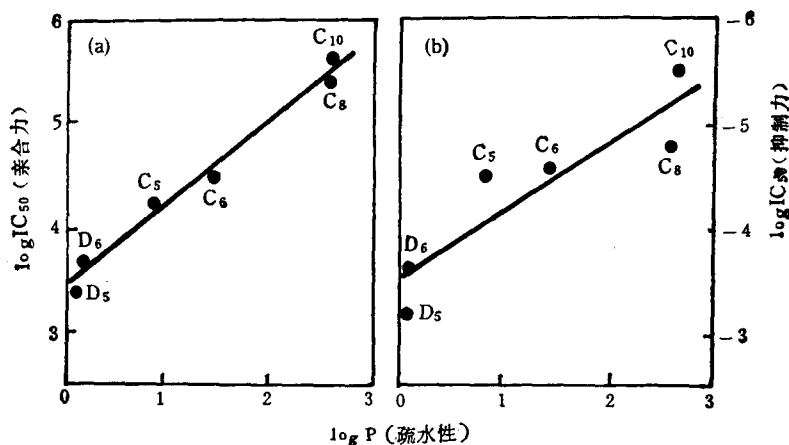


图3 CaM 拮抗剂的疏水性与其对 CaM 的亲性 (a) 和其  $IC_{50}$  值 (b) 的关系

C<sub>5</sub>、D<sub>5</sub> 等代表表2中的一些化合物

增强。实验还证明在同系化合物中, 芳香环越多, 烷基链越长, 其抗 CaM 的性能越强。

## 2. 静电相互作用

一般来说, 拮抗剂除含有疏水基团外, 还含有氨基, 在生理 pH 条件下以铵盐形式存在。如果实验中 pH 超过 8, 药物对 CaM 的亲和力就明显下降, 但是如果把氨基全甲基化形成季胺盐, 药物对 CaM 的亲和力就不受 pH 的影响 (如图 4)<sup>[8]</sup>, 说明只有带正电荷的药物才能同 CaM 结合, 同时表明拮抗剂与 CaM 之间的静电作用也是很重要的。在正常 pH 条件下, 季

胺盐与 CaM 的亲和力低于盐酸盐 (如表 3)<sup>[9]</sup>, 这主要是由于甲基化后增加空间位阻, 不利于互相作用所致。

除上述两种作用力外, 拮抗剂分子构型和电子云分布等也对它们的相互作用有影响。因此拮抗剂与 CaM 的作用机制还有待于进一步研究。

## 三、拮抗剂的 $IC_{50}$ 值

$IC_{50}$  值是拮抗剂抑制依赖 CaM 的酶的活力 50% 时所需要的浓度, 它是标志拮抗剂强弱

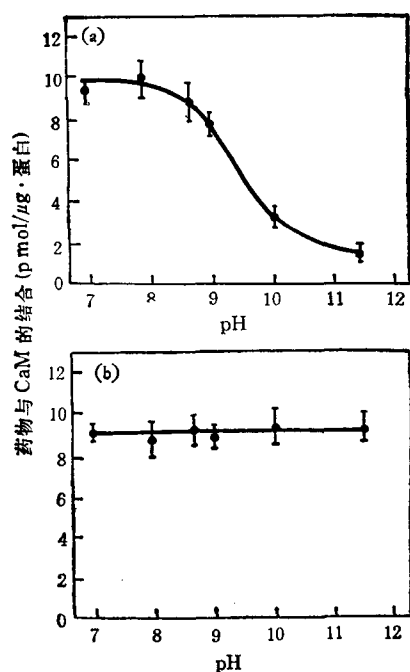


图4 pH对盐酸氯丙嗪和氨基全甲基化氯丙嗪与CaM相互作用的影响<sup>[11]</sup>

a: 盐酸氯丙嗪 b: 氨基全甲基化氯丙嗪

的一个重要参数。 $IC_{50}$  值越小拮抗剂就越强。测  $IC_{50}$  值的条件不同会得出不同的结果,影响  $IC_{50}$  值的因素有以下几种:

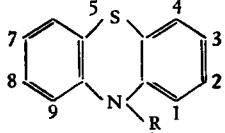
### 1. 靶酶

CaM 可以活化许多靶酶,如磷酸二酯酶(PDE)、肌球蛋白轻链激酶和  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPase 等,但其激活的机制并不完全相同,因此不同的靶酶,拮抗剂的  $IC_{50}$  值也不同。用肌球蛋白轻链激酶、 $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPase 和 PDE 测氯丙嗪的  $IC_{50}$  值分别为  $50\mu\text{mol/L}$ 、 $38\mu\text{mol/L}$  和  $47\mu\text{mol/L}$ <sup>[9]</sup>。

### 2. CaM 用量

体系中 CaM 的浓度对拮抗剂的  $IC_{50}$  值有影响,不难理解随着 CaM 浓度增高,拮抗剂的  $IC_{50}$  值也随之增高,如在 CaM 浓度分别为  $30\text{nmol/L}$ 、 $34\text{nmol/L}$  和  $180\text{nmol/L}$  时,用  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPase 测得 TFP 的  $IC_{50}$  值分别为  $9\mu\text{mol/L}$ 、 $18\mu\text{mol/L}$  和  $50\mu\text{mol/L}$ <sup>[10]</sup>。

表3 一些吩噻嗪衍生物的盐酸盐和碘化学胺盐的结构及其抑制 CaM 活化的 PDE 活力的  $IC_{50}$  值<sup>[11]</sup>

| 化合物               | 环上取代基                   | 取代基位置 |  | $IC_{50}(\mu\text{mol/L})$ |             |
|-------------------|-------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------|
|                   |                         |       |                                                                                     | 盐酸盐                        | 季胺盐         |
| 三氟拉嗪              | $-\text{CF}_3$          | 2     | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$                        | $11\pm 2$                  | $16\pm 3$   |
| 氯丙嗪               | $-\text{Cl}$            | 2     | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$                        | $19\pm 3$                  | $33\pm 4$   |
| 吩噻嗪               | 无                       |       | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$                        | $61\pm 4$                  | $100\pm 6$  |
| 普罗麦嗪              | 无                       |       | $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$                        | $89\pm 6$                  | $120\pm 7$  |
| 氯丙嗪亚砷             | $-\text{Cl}; =\text{O}$ | 2; 5  | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$                        | $530\pm 20$                | $500\pm 20$ |
| 3-(2-氯-10-吩噻嗪基)丙酸 | $-\text{Cl}$            | 2     | $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$                              | $>80$                      |             |

### 3. 保温顺序<sup>[11]</sup>

一般测  $IC_{50}$  值时,酶和药物先保温,然后加

CaM 保温。如果酶先与 CaM 保温,然后再加药物保温,测得的  $IC_{50}$  值偏高,这主要是因为

酶先与 CaM 形成了复合物,影响药物同 CaM 的亲合性。

4. 疏水物质

拮抗剂大部分是疏水性较强的化合物,如果体系中存在其它的疏水物质,它们之间就会发生疏水作用,IC<sub>50</sub> 值会偏高。

此外,体系的 pH 和离子强度等对 IC<sub>50</sub> 值也有影响,但一般都在生理 pH 条件下测定,因此影响不大。根据文献报道,最强的 CaM 拮抗剂是 R<sub>24571</sub> (Calmidazolium) 和 0-(4-乙氧基丁基)小檗胺(EBB),它们拮抗 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 的 IC<sub>50</sub> 值都是 0.35 μmol/L。多肽类中,黄蜂毒素 (Mastoparan) 是最强的 CaM 拮抗剂,其

抑制 PDE 的 IC<sub>50</sub> 值为 0.02 μmol/L<sup>[12]</sup>。

四、CaM 拮抗剂的专一性

从分子水平上讲,有些 CaM 拮抗剂具有一定的专一性,然而许多拮抗剂的专一性并不很好。为了比较拮抗剂的专一性,Gietzen<sup>[10]</sup>提出了一种方法,即用拮抗剂抑制酶基本活性的 IC<sub>50</sub> 值与抑制依赖 CaM 的酶活性的 IC<sub>50</sub> 值的比值作为拮抗剂的专一性系数。一些拮抗剂的专一性系数列于表 4。专一性系数越大,专一性越好。Comp. 48/80 是专一性最好的 CaM 拮抗剂。

五、CaM 与拮抗剂作用的动力学研究

许多 CaM 拮抗剂与 CaM 的结合是可逆性的,而且还有人证明拮抗剂和酶竞争性的同 CaM 结合。笔者<sup>[14]</sup>最近用 EBB 抑制依赖 CaM 的 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase,过量的 CaM 可以恢复酶的活力,双倒数作图曲线交于纵坐标轴上(如图 5),这一结果充分说明了上述观点。

但是也有少数拮抗剂与 CaM 的结合是不可逆的,如植物毒素 Ophiobolin A<sup>[13]</sup> 和 α-肾上腺阻断剂酚卡明等。

六、用生物物理学方法研究拮抗剂与 CaM 的相互作用

随着对拮抗剂与 CaM 相互作用的深入研究,单靠生物化学的方法已远远不够,因而许多

| 表 4 一些 CaM 拮抗剂的专一性系数 <sup>[10]</sup> |                    |                           |      |           |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------------|------|-----------|
| 化 合 物                                |                    | IC <sub>50</sub> (μmol/L) |      | 专一性<br>系数 |
|                                      |                    | -CaM                      | +CaM |           |
| A                                    | 五氟利多               | 20                        | 2.6  | 8         |
|                                      | 蜂毒素                | 3                         | 0.3  | 10        |
|                                      | 三氟拉嗪               | 160                       | 9    | 18        |
|                                      | 氟奋乃静               | 200                       | 10   | 20        |
|                                      | 氯丙嗪                | 500                       | 22   | 23        |
|                                      | R <sub>24571</sub> | 10                        | 0.35 | 29        |
|                                      | 长春花碱               | 1200                      | 35   | 34        |
|                                      | 化合物 48/80          | >700                      | 0.85 | >824      |
| B                                    | W-7                | 2000                      | 100  | 20        |
|                                      | W-9                | 1200                      | 23   | 52        |
|                                      | 化合物 48/80          | >700                      | 3.3  | >212      |

注: ①A、B 两部分测定条件不同。  
②所用的酶为红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase。

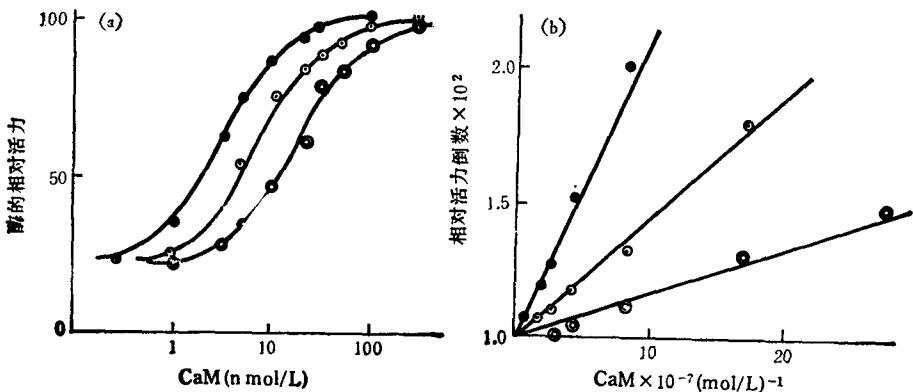


图 5 a. CaM 的浓度对 EBB 抑制依赖 CaM 的红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活力的影响<sup>[14]</sup> b. 双倒数图  
EBB 的浓度分别为: —●— 0 μmol/L, —○— 0.18 μmol/L, —□— 0.54 μmol/L。

生物物理学方法应运而生。如核磁共振、顺磁共振、荧光光谱、停流 (Stopped-flow) 法荧光光谱、X-射线晶体衍射、小角度 X-射线衍射和激光拉曼光谱等。

Martin<sup>[19]</sup>等用停流荧光光谱法研究了 TFP 与 CaM 的作用机制,结果表明 TFP 明显降低  $\text{Ca}^{2+}$  的解离速率,TFP 对 CaM 的两个高亲和位点分别在 N-端和 C-端,但 C-端比 N-端的亲和力至少高一个数量级。笔者用荧光标记法证明 EBB 与 CaM 的作用是依赖  $\text{Ca}^{2+}$  的,而且 CaM 上有两个 EBB 的专一亲和位点,此外还证明 EBB 和 TFP 在 CaM 上有不同的结合位点。Oliver<sup>[16]</sup>用五种吩噻嗪的自旋标记衍生物,通过顺磁共振证明拮抗剂与 CaM 的静电作用主要来自侧链上氨基的质子化。Gehrig<sup>[17]</sup>从 26% 聚乙二醇 (400), pH5.2, 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  和 10mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  的溶液中,在 14℃ 的条件下得到了 TFP 和 CaM 的单晶复合物,通过 X-射线晶体衍射得到其晶胞参数,同时证明一个不对称单位中含有一个 CaM 分子和两个 TFP 分子。

## 七、CaM 拮抗剂的应用

正如第二节谈到的那样,CaM 拮抗剂在分子结构上有一定的共性,因此有些药物在治疗疾病方面有一些重合作用。如吩噻嗪类化合物除抗精神病外,还可以作为抗组胺药、局麻剂、平滑肌松弛剂和  $\alpha$ -阻断剂。因此,这类药物的分子机制很可能就是作用在 CaM 上。据此,我们可以在分子水平上通过化学修饰和设计筛选出高效药物。

尽管当前常用的 CaM 拮抗剂的专一性不是很好(体内),但还不失为研究 CaM 的细胞功能的重要工具。用这种方法人们发现了许多生理和病理过程与 CaM 有关的现象,如信息跨膜传递、血小板凝聚、癌细胞增殖、光合作用、胞内 DNA 的合成和皮肤纤维细胞低密度脂蛋

白的合成等。可以说只要与  $\text{Ca}^{2+}$  有关的生理现象几乎都与 CaM 有关。尤其是在治疗疾病方面,如果发现某种疾病的发病机制与 CaM 有关,就有可能用 CaM 拮抗剂治疗这种疾病。比较成功的例子就是牛皮癣病。有人发现牛皮癣患者的皮肤中活性 CaM 的浓度比较高,而且磷脂酶  $\text{A}_2$  的活性也比较高<sup>[19]</sup>,该酶受 CaM 的调节,这很有可能是牛皮癣的发病机制。1986 年 Humbert<sup>[20]</sup>等在治疗牛皮癣的药中加入了 CaM 拮抗剂氯丙噻,收到明显的疗效,这对开发 CaM 拮抗剂用途具有指导性意义。

## 参 考 文 献

- [1] Cheung, W. Y.: *Science*, 1980, 207, 19.
- [2] Weiss, B. et al.: *Mol. Pharmacol.*, 1974, 20, 363.
- [3] Prozialeck, W. C. et al.: *Calcium in Biology Systems*, Plenum Publishing Corporation, 1985, 255—264.
- [4] Chao, S. H. et al.: *Mol. Pharmacol.*, 1984, 26, 75.
- [5] 徐友涵:《生物化学与生物物理学报》,1986,18,367。
- [6] Prozialeck, W. C. et al.: *Eed. Proc.* 1983, 42, 1087.
- [7] Tanaka, T. et al.: *Mol. Pharmacol.* 1982, 22, 403.
- [8] Prozialeck, W. C.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1984, 222, 509.
- [9] Hidaka, H. et al.: *Mol. Pharmacol.*, 1980, 17, 66.
- [10] Gietzen, K. et al.: *Calmodulin Antagonists and Cellular Physiology*, 1985, 347—362.
- [11] 徐友涵等:《科学通报》,1985,17,1348。
- [12] Barnette, M. S. et al.: *Psychopharmacol. Bull.*, 1983, 19, 387.
- [13] Leung, P. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 2742.
- [14] Xu, Y. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 140, 461.
- [15] Martin, S. R. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1985, 151, 543.
- [16] Oliver, J. L. et al.: *Biochem. J.*, 1986, 233, 853.
- [17] Gehrig, L. M. B. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1984, 177, 559.
- [18] Van de Kerkhof PCM et al.: *Br. J. Dermatol*, 1983, 108, 217.
- [19] Verhagen, A. et al.: *Br. J. Dermatol*, 1984, 110, 731.
- [20] Humbert, P. et al.: *Arch. Dermatol*, 1986, 122, 856.

[本文于 1987 年 7 月 21 日收到]