

- 1050: 241
 17 Nygard O, Nilsson L. *J Biol Chem*, 1990; 265: 6030
 18 Miyazaki M *et al. J Biochem*, 1990; 108: 1001

- 19 Lee C C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 3508
 20 Brown C M *et al. Nucleic Acids Res*, 1990; 18: 6393

钙调素拮抗剂的研究动态

胡卓逸

(中国药科大学生化研究室, 南京 210009)

提 要

从钙、钙调素的功能论及钙拮抗剂和钙调素拮抗剂的概念。并着重叙述了国内外钙调素拮抗剂研究中的问题和开发动态。

关键词 钙调素拮抗剂, 钙调素, 钙

钙离子有 4 种主要的生物学作用: a. 结构作用; b. 电作用; c. 细胞内酶和蛋白质的辅助因子; d. 作为细胞内的调节剂。钙信号通过钙调素 (CaM) 调节。

1 钙调素 (CaM) 是 Ca^{2+} 信号的重要的调节蛋白

CaM 是第二信使 Ca^{2+} 信号的普遍的调节剂, 其作用类似于 cAMP 依赖的蛋白激酶中 cAMP 结合亚基的作用。如图 1 所示^[1], 这两

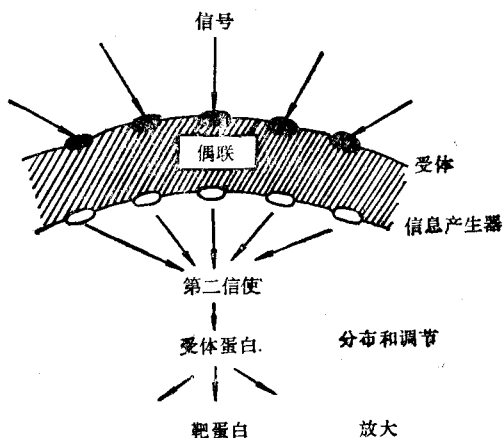
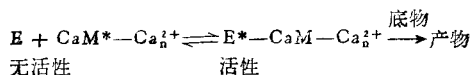
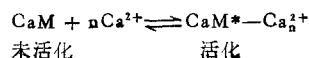


图 1 刺激-反应偶联的第二信使模式

使的浓度变化, 并在这些信号的控制下传递信息给细胞内蛋白质。由 CaM 介导的刺激-反应偶联包括下列步骤: a. Ca^{2+} 浓度瞬时升高, 从 10^{-7}mol/L 至 10^{-3}mol/L ; b. Ca^{2+} 与 CaM 相互作用, 伴随着因 Ca^{2+} 诱导的 CaM 结构变迁; c. CaM 使许多受其调节的酶活化并与受协调的蛋白质相互作用, 其作用通式可表示为:



2 钙拮抗剂 (CA) 和钙调素拮抗剂 (CaMA)

由上列反应式可见, 凡能与 Ca^{2+} 结合的物质都有可能影响 Ca^{2+} 对 CaM 的活化; 凡能与 CaM 结合的物质可能影响 CaM 对酶的活化, 这两类物质最终都有可能影响到受 CaM 调控的酶的活力。

CA 亦有称为“钙内流阻断剂”或“钙通道阻断剂”, 是一类能选择性地阻断细胞膜钙通

道抑制钙内流的药物；而某些药物或化合物在 Ca^{2+} 存在下，与 CaM 以高亲和力相结合，抑制 CaM 对酶的活化作用，这类药物称为 CaM 拮抗剂(或 CaM 抑制剂)。CA 和 CaMA 的分子机制差异可用药物对 K^+ 去极化动脉条由 Ca^{2+} 诱导的收缩效应来判断。CA (如：异博定) 诱导的松弛作用可因加入过量 Ca^{2+} 而完全可逆，CA 将 Ca^{2+} 的剂量-反应曲线以竞争性方式右移。而 CaM A (如：W-7) 所诱导的松弛作用，当加入 $1 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ CaCl_2 时仅能部分逆转，且 W-7 抑制最大的收缩反应，说明 W-7 所导致的松弛作用在去极化动脉条上对 Ca^{2+} 诱导的收缩作用是非竞争性的。W-7 选择性地抑制 Ca^{2+} -CaM 活化的肌球蛋白轻链磷酸化，而异博定在药理作用浓度下仍不影响轻链磷酸化，这些结果表明：W-7 诱导的松弛作用是由于通过 W-7 与细胞内的 Ca^{2+} 结合蛋白相结合而产生的钙阻断作用，而异博定产生的松弛作用则是通过阻断 Ca^{2+} 内流入细胞。图 2 表明不同的拮抗剂作用于不同的部位。

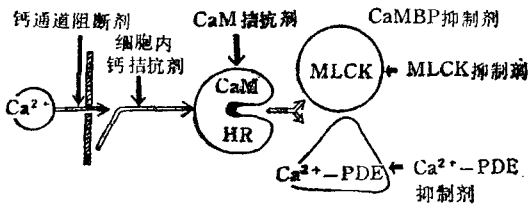


图 2 细胞内钙信使系统和专一的抑制剂

HR: 疏水区; CaMBP: 钙调素结合蛋白; MLCK: 肌球蛋白轻链激酶; Ca^{2+} -PDE: 钙依赖的磷酸二酯酶

值得注意的是，对有些 CA 和 CaMA 的报道上似无严格的区别，有时将一种化合物既把它归于 CA，又归于 CaMA，这一方面反映了这种化合物既有钙拮抗又有 CaM 拮抗作用，但它对两者作用所需的浓度、作用的专一性和亲和力很可能是不同的。例如，Thayer 等发现 $[^3\text{H}]$ -尼群地平以依赖于 Ca^{2+} 的方式与 CaM 相结合，然而这种结合仅仅是低亲和力的，不饱和的，表明二氢吡啶类 CA 在具有药理意义的浓度时是不能与 CaM 相结合的，而典型的 CaMA 三氟啦噪 (TFP) 与 CaM 的相互

作用则具有下列特征：a. 有 Ca^{2+} 时，TFP 与 CaM 结合随 CaM 浓度的增加呈线性关系；b. 两者结合在 Ca^{2+} 专一性的结合部位，是可饱和的；c. 结合依赖有 Ca^{2+} 或 EGTA 而显示可逆性；d. 结合与 pH 有关；e. 与其它两价阳离子比较， Ca^{2+} 最能满足结合的离子要求；f. 与不同蛋白质比较，TFP 对 CaM 的结合有专一性等。

3 CaM A 是研究 CaM 功能的重要工具

从 CaM A 对代谢调节或生理功能的影响，研究 CaM 的功能。

3.1 对某些激素分泌和活性物质合成的调节作用 CaM 对某些激素的分泌和活性物质的合成有调节作用，因此 CaM A 也影响这些调节过程。比如，CaM A 影响渗透过程和血管紧张素 II 诱导的加压素释放；TFP 抑制多胺的生物合成和转运^[2]；与 CaM 相互作用的阳离子型药物，如氯丙嗪，TFP，W-7 和利多卡因影响大鼠肥大细胞中 5-羟色胺的剂量依赖性释放；植物体内激素的作用可能还包含了 CaM 的作用，Iwahori 报道^[3]了 TFP 和 W-7 加速柑桔叶和小水果的脱落，而 Ca^{2+} 和 IAA (吲哚-3-乙酸) 的加入可延缓此过程，这两种化学结构很不相同的 CaM A 表现出类似的促进果叶脱落的作用，说明 CaM- Ca^{2+} 系统包含在脱落的调节过程中，CaM- Ca^{2+} 可能阻止了老化的进展，因此 TFP，W-7 被认为是促进了老化的进程而使果叶脱落下来。CaMA 不仅影响了激素诱导的反应，而且也控制了活力的水平。TFP 等抑制了植物刺激素、赤霉素和细胞激动素的作用，加速果叶的脱落，而醋酸钙和 IAA 延缓果叶脱落，表明叶和果实脱落的基本机制是相似的，可能是通过 TFP 敏感的系统(例如 CaM- Ca^{2+} 或 Ca^{2+} 依赖的蛋白激酶)被 Ca^{2+} 所调节。

3.2 参与钙流钙泵和其他离子的调节 鼠晶体匀浆中 Ca^{2+} -ATPase 活力被 CaM A 所抑制，晶体钙的积聚和混浊与 CaM A W-5，W-7

对 Ca^{2+} -ATPase 的抑制作用的程度有关; Ca^{2+} 诱导的平滑肌收缩被 CaM 拮抗剂 HT-74 所调节; 氟吩噻、 R_{24571} 和化合物 48/80 抑制内质网的 Ca^{2+} 转运系统; Meissner 等证明 CaM 在骨骼肌肌浆网中对 Ca^{2+} 释放的调节作用, CaM 拮抗剂 R_{24571} 和 48/80 抑制依赖于 CaM 的蛋白磷酸化和依赖于 ATP 的 Ca^{2+} 摄入, 但不影响 Ca^{2+} 刺激的 ATPase; TFP 影响培养的血管平滑肌细胞的 Na^{+} 转运等。

3.3 影响生殖生育 高剂量 TFP 和 R_{24571} 可抑制人精子的运动, 低浓度时抑制精-卵融合^[4], 不育男性畸形精子多, 其中 CaM 含量低于正常精子中的含量, 说明 CaM 可能调节人精子的功能^[5]; 随着妊娠期的增长, 人和大鼠的子宫肌 CaM 浓度增高, 同时增强了子宫肌的收缩能力, 给予雌激素后, 子宫 CaM 水平上升, 看来胚胎的发育与 CaM 不无关系。

3.4 研究 CaM 与某些疾病的关系 有报道牛皮癣患者的皮肤中活性 CaM 浓度较高, 磷脂酶 A_2 的活力也较高 (该酶受 CaM 调节), 这可能与牛皮癣发病机制有关。我们用 TFP 和临床上用于治疗牛皮癣的药物蒽林对照治疗牛皮癣患者, 发现用药半月后表皮组织内 CaM 和多胺的含量显著降低, 表观症状有所改善。体外实验也表明蒽林是一种 CaM 拮抗剂, 其可抑制 CaM 激活的磷酸二酯酶 (PDE), 这一结果表明: 可能具有 CaMA 性质的药物有助于治疗牛皮癣, 对研制和开发新药有指导意义。

阻断细胞内 Ca^{2+} /CaM 依赖的过程 (如胞吐作用) 的 CaMA, 在体内外均能有效的抑制肥大细胞介体释放, 一个代表性的 CaMA 药物甲硫哒嗪 (5mg/kg) 可预防由化合物 48/80 诱导的大鼠严重的过敏性休克的发作, 具有专一的对呼吸的保护作用, 看来, CaMA 可能是管理肥大细胞介导的过敏性疾病的有效药物^[6]。

Kikuchi 等^[7]研究了 CaMA 抑制人卵巢细胞的增殖和可能的机制。5 种 CaMA 能直接抑制人卵巢肿瘤细胞株 HR 的增殖, 抑制程度

最强的是蜂毒素和 W-5, 其次是 W-7, R_{24571} 和 Bepridil。HR 细胞增殖是剂量依赖性的受表皮生长因子 (EGF) 所刺激, 这种刺激作用似乎是 EGF 与 HR 细胞结合的结果, 而 EGF 的结合被 W-5, R_{24571} 和蜂毒素所抑制, 肿瘤细胞增殖受 CaMA 的抑制作用可能由于 CaMA 干扰了 EGF 与细胞结合的结果。

3.5 用于分离纯化和研究钙结合蛋白 Umekawa 等把 W-7 偶联到 Sepharose 6B (见图 3), 从人脑中纯化 S-100 蛋白质, 在有 Ca^{2+} 情况下与 S-100 结合, W-7-Sepharose 6B 对分离 S-100a 和 S-100b 也有用; 吩噻嗪类亲和层析柱已广泛用于分离纯化 CaM 等钙结合蛋白。

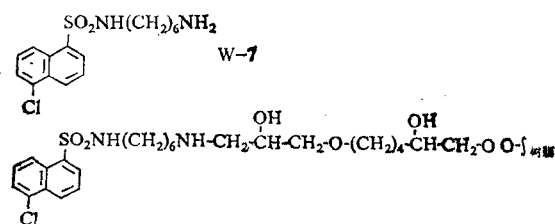


图 3 W-7 和 W-7 偶联到环氧乙烷活化的 Sepharose 6B 的结构

Calpains 是一群 Ca^{2+} 依赖的细胞内的蛋白酶类, 其活性部位含一个半胱氨酸残基, 并需 Ca^{2+} 才有活力。Calpains 含有 2 个 CaM 样顺序, Calpain 活力受 TFP, W-7, W-13 等 CaMA 的影响, 是通过 CaMA 与 CaM 样顺序的相互作用来研究的^[8]。

4 CaMA 的研究动态和展望

CaMA 的分类及吩噻嗪类 CaMA 在临床早已广泛被应用, 它们与 CaM 的相互作用研究最为清楚^[9]。新的 CaMA 陆续被发现并开发为新药。日本 Hokuriku 制药有限公司开发了 1-羟基喹啉-4-磺酰胺衍生物类作为抗高血压药和血管舒张药等循环系统的药物 (图 4a); 该公司还开发了 N-(2-氨基乙基)-异喹啉-8-磺酰胺作为心血管病治疗药 (图 4b)^[10] 和 萘磺酰胺衍生物作为循环系统疾病的治疗药 (图 4c) 均已发表专利。HA 1077 (图 4d) 在体内外均

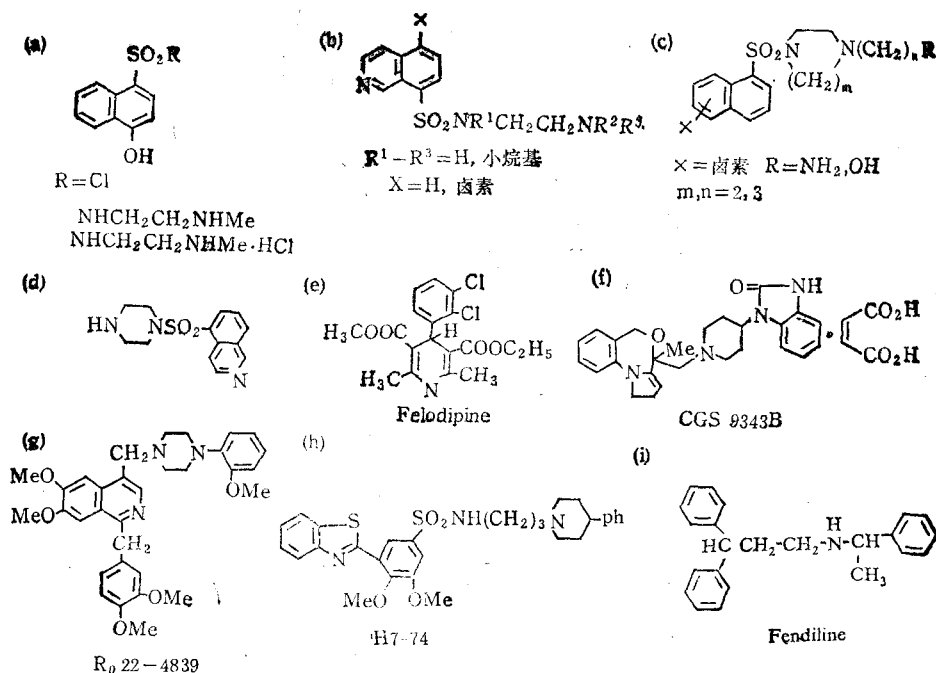


图 4 一些有心血管疾病治疗作用的新化合物的结构

有血管松弛效应,是一种有希望的血管松弛药^[11]。Felodipine (图 4e) 及其类似物属于二氢吡啶类的强的钙拮抗剂,它抑制 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖的 Caldesmon 激酶和肌球蛋白轻链激酶的活力,是一种强的血管舒张药。CGS 9343B (图 4f), R₀ 22-4839 (图 4g) 和 HT-74 (图 4h) 亦为新的 CaM 拮抗剂^[12]。Fendiline (图 4i) 是一种治疗冠心病的抗心绞痛药,它具有钙拮抗和 CaM 拮抗作用,它抑制跨膜钙流,抑制 CaM 活化的肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 和 PDE,用若干安慰剂对照的双盲试验已证明它的抗心绞痛和抗局部缺血的效力,其抗心绞痛作用比尼非的平、异博定、硫氮革酮强,且耐药性弱^[13]。

我国首次报道了粉防己碱和小檗胺及其部分衍生物具有强的抗 CaM 作用^[14]。随之发现苄基异喹啉化合物多有抗 CaM 作用,双苄基异喹啉类化合物的抗 CaM 作用强于单苄基异喹啉类;双苄基异喹啉类化合物中,我们首先报道了蝙蝠葛苏林碱衍生物的抗 CaM 作用强于蝙蝠葛碱类的衍生物^[15]。

蝙蝠葛碱在药理和临床试用中证明具有良

好的抗心律失常作用,其副作用小,安全性好,耐受度大,对 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} 跨膜离子流均有抑制作用,是一个有前途的新的广谱抗心律失常药。与蝙蝠葛碱结构相类似的单醚键型双苄基异喹啉类生物碱——蝙蝠葛苏林碱亦具有抗心律失常作用和广泛的心血管效应。我们从合成的系列蝙蝠葛碱和蝙蝠葛苏林碱衍生物中,以依赖于 CaM 的 PDE 为靶酶,筛选出 10 个 IC₅₀ 值低于国际公认的 CaM 拮抗剂 TFP 的化合物^[15],它们的 IC₅₀ 值都低于母核化合物,很可能有些化合物的抗心血管病的作用强于其母核化合物,有关药理作用尚待进一步研究。

大量的体外实验报告证明 CaM A 在治疗肿瘤方面可能是有效的^[16]。CaM 在促进肿瘤细胞的复制和增殖中有重要作用,许多实验证明 CaM A 对肿瘤细胞有抑制增殖的作用,如: W-7 对神经胶质瘤的增殖生长有抑制作用; W-5 和 W-7 对 5-FU 的抗肿瘤增殖作用有辅助作用^[17]。单独的 CaM A 有抑制各种肿瘤细胞株的增殖和克隆,而显示在体内的抗肿瘤效应,如:与博来霉素合用,局麻药和吩噻嗪类在细胞膜上的作用,加强了博来霉素的毒性,增

强博莱霉素毒性所需的有效剂量常与药物抑制 CaM 的能力有关^[18]。对 L₁₂₁₀ 细胞,一系列结构上不同的 CaM A 以毒性浓度给药,也发现能增强博莱霉素的细胞毒性^[19]。此外,增强博莱霉素细胞毒性的 ID₅₀ 值与它们阻断 CaM 活化 PDE 的作用有关,表明拮抗剂是通过抑制 CaM 调节的过程而发挥它们的作用的,用博莱霉素单独治疗,氯丙嗪单独治疗和两者合并治疗五周后,观察 C₅₇-BL 小鼠中 B-16 黑素瘤瘤块大小和生存的时间,按瘤块生长达 100mm² 大小所需天数计,单独氯丙嗪和博莱霉素治疗分别为 15d 和 17d,合并治疗后为 26d^[20]。

阐明 CaM 作用机理的一个最通用的途径是某些酶被 CaM 活化,而这种活化被 CaM A 所抑制。有些 CaM A 的副作用是对非 CaM 调节的靶也有抑制作用,因而缺乏专一性。虽然 CaM A 已经是并且还将继续是作为 CaM 与它的靶蛋白相互作用的主要试剂,然而,研究 CaM A 与 CaM 在体内相互作用仍是相当困难的,如:某些拮抗剂的抗精神病效应与它们抑制 CaM 活化的 PDE 的能力并不相关,而它们无论是临床有活性和无活性的形式都是同等有效的 CaM 拮抗剂,暗示这些药物发挥作用并不是通过抑制 CaM 调节的过程,因此在作出体外有拮抗 CaM 活性的物质是否真正与其药理作用有关的结论时,需慎重。

心血管疾病和肿瘤仍是导致人类死亡率最高的两种疾病,而已有的研究表明,有些 CaMA

对这两类疾病有一定的疗效,仍不失为有值得研究和可望开发为新药的前景。

参 考 文 献

- 1 Klee C B, Newton D L, Wei-Chao Ni. *Calcium and the cell*. Ciba Foundation Symposium 122. John Wiley & Sons, 1986: 162—182
- 2 Heston W D, Charles M. *Biochem Pharmacol*. 1988; 37(13): 2511
- 3 Iwahori S. *Scientia Horticulturae* 1989; 37: 325
- 4 Aithen R J *et al. Gamete Res*. 1988; 21(1): 93
- 5 吴承军等. *中华医学检验杂志* 1990; 13(12): 94
- 6 Grollmuss Oswin *et al. Clin Physiol Biochem*. 1989; 7(5): 229
- 7 Kikuchi Y, Miyauchi M *et al. Gynecol Oncol*. 1989; 35(2): 156
- 8 Zhang H, Johnson P. *Biochemical Society Transactions* 627th meeting, Nottingham 1988; 18: 1043
- 9 胡卓逸等. *中国药科大学学报* 1987; 18(4): 312
- 10 Hidaka H, Tanaka T *et al. Jpn Kokai Tokkyo Koho* Jp 02, 15, 067 [90 15067]
- 11 Asano T, Suzuki T *et al. Br J Pharmacol*. 1989; 98(4): 1091
- 12 Isikawa T, Hidaka H. *Seitai nokagaku* 1989; 40(4): 374
- 13 Bayer R, Mannhold R. *Pharmatherapeutica* 1987; 5(2): 103
- 14 徐友涵,倪基德. *科学通报* 1985; 17: 1348
- 15 Hu Z Y, Xu L M, Sun Y *et al. Cellular Signalling* 1990; 2(4): 353
- 16 Hait WN, Lazo JS. *J Clin Oncol*. 1986; 4: 994
- 17 Kikuchi Y *et al. Gynecol Oncol*. 1987; 26(2): 208
- 18 Mizuno S, Ishida A. *Cancer Res*. 1982c; 42: 4726
- 19 Lazo J S, Chen D L *et al. Cancer Res*. 1986; 46: 2236
- 20 Hait W N, Lazo J S, Chen DL *et al. J. Natl Cancer Inst*. 1988; 80: 246

信息服务

贵重药材番红花种植技术

提供种茎培训技术回收产品

西红花又名番红花,系国内外紧缺贵重药材,国内药源长期依靠进口,价格极为昂贵。西红花自古入药,用途广泛、功效奇特,尤以活血功能而闻名天下。近年引种试验证明,西红花具有极强的适应性,耐寒零下 20℃,我国大部分地区可露地种植(东北地区可采用塑料膜覆盖或室内栽培)。其中田间生长六个月,亩产值达 1.5 万元左右,为解决西红花药源,北京市星火技术研究所特聘中科院西红花专家做技术指导,提供西红

花种茎,每公斤 40 元,一公斤以上免费邮寄(合同随种寄发),保发芽率达 98% 以上。并提供全套种植技术资料(单购资料 65 元/套)及生长影照。本所重合同、守信誉,详细简介,请附 1 元邮资函索。

[100024 北京 867 信箱 20816 组 万莉(电话: 5762127, 5762194)]