

xidant *in vivo*, it can protect LDL from oxidative modification. Hence, vitamine C can prevent and treat atherosclerosis.

**Key words** LDL oxidative modification, Cu<sup>2+</sup>, vitamine C, atherosclerosis

## 苄基异喹啉类化合物 D<sub>20</sub> 抑制钙调素激活磷酸二酯酶的研究\*

张虞安 胡卓逸 赵 焯\*\*

(中国药科大学生化研究室,南京 210009)

蔡惠民

(中国药科大学药化研究室)

### 提 要

苄基异喹啉化合物是一类钙调素拮抗剂。对新合成的双苄基异喹啉化合物 D<sub>20</sub> 对钙调素依赖的磷酸二酯酶的抑制作用进行了研究, IC<sub>50</sub> = 5 μmol/L, 表明其拮抗作用大于三氟啦嗪, 是强的拮抗剂。荧光分析表明, 钙调素与化合物 D<sub>20</sub> 的结合常数为 2.64 (μmol/L)<sup>-1</sup>, 一个化合物 D<sub>20</sub> 分子与两个钙调素分子结合, 并显示了结合方向性及空间位阻影响。

**关键词** 钙调素, 磷酸二酯酶, 拮抗剂, 苄基异喹啉类化合物 D<sub>20</sub>, Scatchard 分析

钙调素 (calmodulin CaM) 是 70 年代初发现的耐热钙结合蛋白, 广布于所有真核细胞, Ca<sup>2+</sup> 存在下形成 Ca<sup>2+</sup>-CaM 复合物活化许多重要酶类而调节细胞功能。

CaM 拮抗剂是研究 CaM 生理功能的良好工具, 是探讨药物作用机理、开发新药的重要途径。如 CaM 拮抗剂的降压和扩张冠脉作用治疗心脑血管疾病<sup>[1]</sup>。本文研究了半合成苄基异喹啉类化合物 D<sub>20</sub> (化合物 D<sub>20</sub>) 拮抗 CaM 对磷酸二酯酶的激活作用, 并用荧光分析法研究了化合物 D<sub>20</sub> 与 CaM 间的相互作用。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 材 料

三羟甲基氨基甲烷 Tris, 生化试剂, 常熟福山生化试剂厂; 乙二胺四乙酸 (EDTA), 分析纯, 上海试剂二厂; 乙二醇双(α-氨基乙基)醚四乙酸 (EGTA), 分析纯, 湖州生物化学厂; 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 环腺苷磷酸(cAMP)、牛血清白蛋白 (BSA) 均为生化试剂, 上海生化所

产品; 蝮蛇毒, 浙江金华地区产; 三氟啦嗪 (TFP), 上海黄河制药厂; 化合物 D<sub>20</sub>, 本校药化研究室合成; Phenyl-Sepharose CL-4B 为 Pharmacia 公司产品; DEAE-Cellulose 52 为 Whatman Company 产品; 其它试剂为国产分析纯。荧光测定用 HITACHI MPF-4 荧光分光光度计。

### 1.2 方 法

**1.2.1 猪脑 CaM 制备<sup>[2]</sup>:** 取 350g 去脂肪及血管的新鲜猪脑组织, 加 2 倍体积缓冲液 A (0.05mol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L 巯基乙醇, 0.5mmol/L PMSF, pH 7.5) 匀浆, 离心(10000 × g) 1h, 取上清, 沉淀再用缓冲液 A 提取一次, 合并上清, 四层纱布滤去脂肪, 滤液用 6mol/L HAc 调 pH 至 4.3, 搅拌 10min, 离心 (10000 × g) 1h, 弃去上清, 沉淀溶于小体积缓冲液 A 中, 用 Tris 调 pH 7.5, 搅

\* 国家自然科学基金资助项目。

\*\* 九一届本科实习生。

收稿日期: 1991-09-25 修回日期: 1992-02-22

拌 10min, 离心 (13000 × g) 30min, 上清于 100°C 水浴加热 5min 去除不稳定蛋白, 冷却至 4°C, 离心 (13000 × g) 30min, 上清调 Ca<sup>2+</sup> 浓度至 5mol/L, 上缓冲液 B (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L 2-巯基乙醇, 0.1mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH7.5) 平衡好的 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱, 上样完毕用缓冲液 B 洗至 A<sub>280</sub> < 0.05, 再用含 0.5mol/L NaCl 的缓冲液 B 洗至 A<sub>280</sub> < 0.05, 然后用以 1mmol/L EGTA 代替 CaCl<sub>2</sub> 的缓冲液 C 洗脱, 收集洗脱峰, 透析, 蛋白定量。

**1.2.2 去除 CaM 的磷酸二酯酶(PDE)制备<sup>[3]</sup>:** 取 150g 去脂肪及血管的新鲜猪脑, 加入 3 倍体积缓冲液 I (20mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, pH7.8), 匀浆, 离心 (13000 × g) 50min, 上清以缓冲液 I 平衡好的 DEAE-Cellulose 52 柱 (20cm × 3cm), 用缓冲液 I 洗涤至 A<sub>280nm</sub> < 0.05, 再用含 0—0.5 mol/L NaCl 的缓冲液 I 梯度洗脱, 分部收集, 进行 PDE 活力测定, 合并 CaM 刺激活力高于基础活力 5 倍以上部分, 加入分析纯甘油至终浓度为 40%, -20°C 贮存备用。

**1.2.3 蛋白定量:** Lowry 法<sup>[4]</sup>, 牛血清白蛋白 (BSA) 为标准。

**1.2.4 PDE 刺激曲线制作:** 采用二步温育法测 PDE 活力<sup>[5]</sup>, 定义 1 个 CaM 单位为 CaM 刺激一定量 PDE 至最大活力 1/2 时 CaM 量, 结果参见图 1。

**1.2.5 PDE 活力单位计算:** 按定磷法<sup>[4]</sup>作标准曲线 ([Pi]-A<sub>660</sub>), 然后按 1.2.4 中方法加入等量 PDE, 加入过量 CaM, 两步温育后定磷, 从标准曲线上找得摩尔数, 按 PDE 国际单位定义算得加入之 PDE 量为 0.0094IU。

**1.2.6 化合物 D<sub>20</sub> 拮抗 CaM 刺激 PDE 试验:** 按方法 1.2.4, 加入 0.0094IU PDE 和 1.5 单位 CaM, 然后在不同反应管中添加不同量化合物 D<sub>20</sub>, 测 PDE 活力。用钙调素拮抗剂三氟啦啉 (TFP) 作参照。

**1.2.7 化合物 D<sub>20</sub> 与 CaM 相互作用荧光分析:** 利用在 280nm 光激发时, 化合物 D<sub>20</sub> 对 CaM 酪氨酸残基荧光 (本文采用发射波长 305

nm) 的影响进行研究。在含 4mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1μmol/L CaM (经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测得分子量为 18600) 的 1.8ml 测定液中, 不断滴加 100μmol/L 的化合物 D<sub>20</sub> 溶液, 测定荧光增强, 然后作滴定曲线, 并进行 Scatchard 图式分析<sup>[6]</sup>。所有测定均作空白对照。

## 2 结 果

**2.1 CaM 刺激 PDE 曲线** 见图 1, 采用该

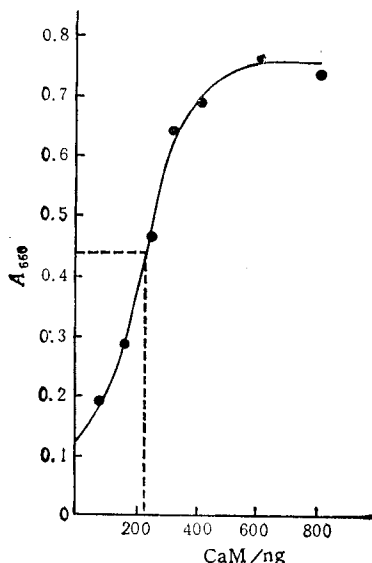


图 1 CaM 刺激 PDE 活力曲线

Fig. 1 PDE activity stimulated by CaM  
PDE: 0.0094IU

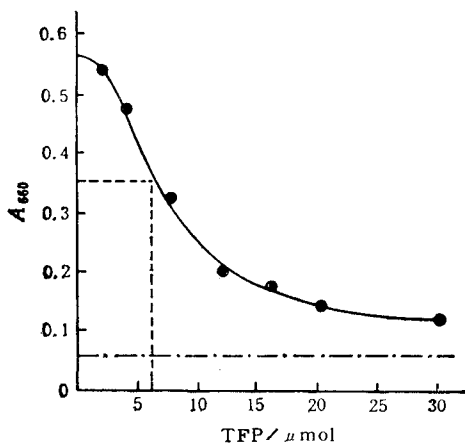


图 2 三氟啦啉拮抗钙调素对 PDE 的激活作用  
Antagonistic effect of TFP on CaM activating PDE

—1.5U CaM —·—None CaM IC<sub>50</sub>=6.6μmol/L

系统测定药物拮抗性, 一个 CaM 单位为 220ng CaM, 加入 PDE 量为 0.0094IU. 以 CaM 拮抗剂三氟啦嗪作参与抑制曲线如图 2, 其半数抑制浓度为 6.6μmol/L, 说明该系统的可行性.

2.2 化合物 D<sub>20</sub> 抑制 PDE 刺激活力曲线见图 3, 其半数抑制浓度为 5μmol/L. 抑制后 PDE 活力能被过量 CaM 恢复(图 4), 可见化合物 D<sub>20</sub> 拮抗 CaM 激活 PDE 的过程, 且较 TFP 拮抗活性更强.

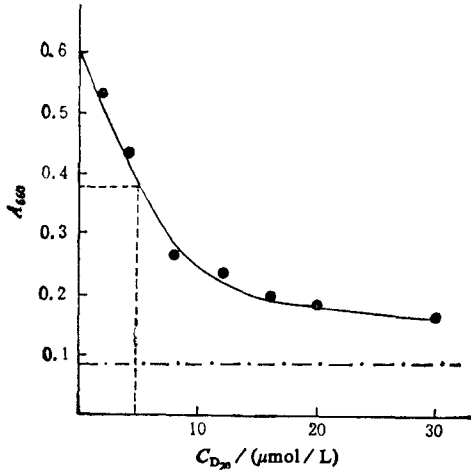


图 3 化合物 D<sub>20</sub> 拮抗 CaM 对 PDE 的激活作用  
Fig. 3 Antagonistic effect of benzylisoquinine compound D<sub>20</sub> on CaM activating PDE  
— 1.5 μM CaM, - - - None CaM, IC<sub>50</sub> = 5 μmol/L

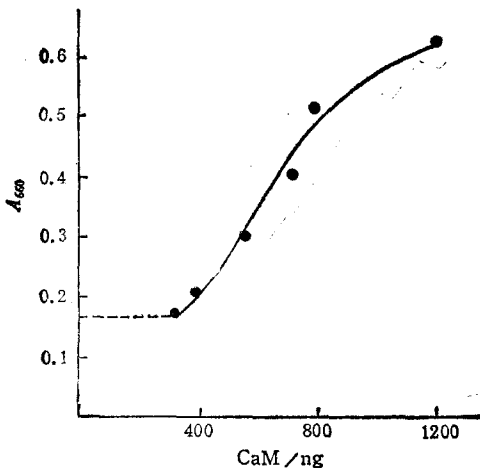


图 4 CaM 恢复化合物 D<sub>20</sub> 对 PDE 的抑制  
Fig. 4 CaM restores PDE activity inhibited by Compound D<sub>20</sub>, 30 μmol/L Compound D<sub>20</sub> exists

2.3 经荧光分析表明, CaM 和化合物 D<sub>20</sub> 在 Ca<sup>2+</sup> 存在下比 EGTA 存在下荧光都有所增加, 并且有 Ca<sup>2+</sup> 时, CaM 滴入化合物 D<sub>20</sub> 溶液引起荧光增加大于 CaM 本身带有的荧光. 因而本文用 Ca<sup>2+</sup> 存在下化合物 D<sub>20</sub> 滴定 CaM 分析两者的相互作用, 方法如前述, 结果见图 5.

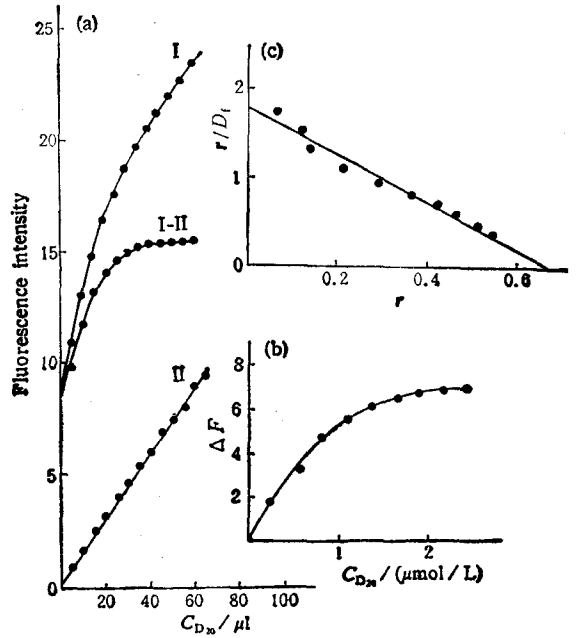


图 5 化合物 D<sub>20</sub> 与 CaM 相互作用的荧光分析  
Fig. 5 Fluorescence analysis of interaction between compound D<sub>20</sub> and CaM

(a) 曲线 I: 100 μmol/L 的化合物 D<sub>20</sub> 滴定 1.8ml 1 μmol/L CaM Curve I: Titration of 1.8ml 1 μmol/L CaM with 100 μmol/L compound D<sub>20</sub>

曲线 II: 100 μmol/L 的化合物 D<sub>20</sub> 滴定 1.8ml 空白溶液 Curve II: Titration of 1.8ml blank solution with 100 μmol/L compound D<sub>20</sub>

曲线 I - II: 曲线 I - 曲线 II  
curve I - II: curve I - curve II

(b) 由曲线 I - II 作出, ΔF 为滴定引起的荧光净增量  
The net fluorescence intensity increase on titration (ΔF = curve I - curve II)

(c) 由(b)作出, 为 Scatchard 图式, P = 0.08  
Scatchard plot from (b), P = 0.08

图 5a 中曲线 I 为滴定曲线, 曲线 II 为 D<sub>20</sub> 本身带人空白对照的荧光, 曲线 I-II 由曲线 I 和曲线 II 对应点的差值作出.

图 5b 由曲线 I-II 得到, 为滴入化合物 D<sub>20</sub> 引起的荧光净增量 (ΔF) 随化合物 D<sub>20</sub> 实际达

到浓度的变化曲线, 该曲线起始处斜率代表结合态单位浓度化合物  $D_{20}$  引起的荧光净增量, 本文取最大荧光净增量(约 6.8) 的 10% 处曲线上点计算  $P$  值,  $P = \text{化合物 } D_{20} \text{ 浓度} / \text{荧光净增量} = 0.08$ , 然后进行 Scatchard 分析。

图 5c 从图 5b 得到, 对于图 5b 中计算  $P$  值点以后任一点, 可查得化合物总浓度  $D_t$  及荧光增量  $\Delta F$ , 则与 CaM 结合的化合物  $D_{20}$  浓度为  $D_b = \Delta F \cdot P$ , 游离化合物  $D_{20}$  浓度为  $D_f = D_t - D_b$ ,  $r$  为每摩尔 CaM 结合化合物  $D_{20}$  的摩尔数(按  $D_b$  可求得化合物  $D_{20}$  结合摩尔数, 而 CaM 总摩尔数为  $1 \mu\text{mol/L} \times 1800 \mu\text{l}$ )。按 Scatchard 公式  $r/D_f = K_s n - K_s r$ , 图 5c 中曲线的横轴截距即为  $n$  (每个 CaM 分子结合化合物  $D_{20}$  的分子数), 斜率绝对值为  $K_s$  (CaM 与化合物  $D_{20}$  的结合常数)。从图中可知  $K_s = 2.64 (\mu\text{mol/L})^{-1}$ ,  $n = 0.67$ , 为使结合比为整数, 本文取最接近  $n$  的数值  $n' = 0.5$ , 即一个化合物  $D_{20}$  分子结合两个 CaM 分子。

### 3 讨 论

苄基异喹啉类化合物已成为一类典型的钙调素拮抗剂, 通过各种结构改造, 研究其生理生化活性为药物开发的重要基础工作<sup>[7]</sup>。化合物  $D_{20}$  的结构见图 6。

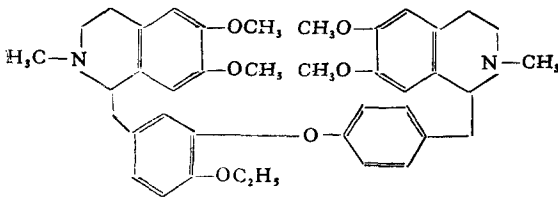


图 6 化合物  $D_{20}$  的化学结构

Fig. 6 Chemical structure of Compound  $D_{20}$ .

PDE 抑制试验表明, 化合物  $D_{20}$  的作用依赖于 CaM, 其拮抗作用较 TFP 更强。

荧光分析表明, 一个化合物  $D_{20}$  分子与两个 CaM 分子结合, 这从分子结构考虑也是可

能的。化合物  $D_{20}$  中两个苄基及两个异喹啉环满足结合两个 CaM 分子的结构特点(二个疏水基团及二个正电荷部位)<sup>[8,9]</sup>。由于生物大分子的空间位阻, CaM 只可能从化合物  $D_{20}$  分子两端结合, 即与正电荷部位结合, 提示该类化合物与 CaM 结合时异喹啉环向内, 疏水部位朝外。所得  $n$  值(0.67, 相当于一个化合物  $D_{20}$  分子与 1.5 个 CaM 分子结合)偏大也可归因于空间位阻使结合第二个 CaM 分子的能力减弱。

研究结果表明化合物  $D_{20}$  是 CaM 拮抗剂中新的一员。本文也为 CaM 拮抗剂构效关系增加了信息, 为化合物  $D_{20}$  可能的药效机理研究提供了途径。

### 参 考 文 献

- 1 Hidaka H, Asano M, Iwadare S *et al.* A novel vascular relaxing agent, N-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide which affects vascular smooth muscle actomyosin. *J Pharmacol Exp Ther*, 1978; 207:8
- 2 Rayudu G K, Wayne B A.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced hydrophobic site on calmodulin, application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatograph. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982; 104(2): 830
- 3 Wallace R W, Tallant E A, Cheung W Y. Assay of calmodulin by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphodiesterase. *Methods in Enzymology*, 1983; 102: 39
- 4 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265
- 5 Sharma R K, Wang J H. Preparation and assay of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modulator protein. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1979; 10: 187
- 6 Raymond F C. Fluorescence spectroscopy—a tool for studying drug interactions with biological systems. In: Colin F C ed, *Methods in Pharmacology*, New York: Meredith Corporation, 1972; 2: 33
- 7 Hu Z Y, Chen S L, Hao Z G *et al.* Benzylisoquinoline compounds inhibit the ability of calmodulin to activate cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Cellular Signalling*, 1989; 1(2): 181
- 8 Prozilack W C, Weiss B. Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs, structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther*, 1982; 222: 509
- 9 Tanaka T, Ohmura T, Hidaka H. Hydrophobic interaction of the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex with calmodulin antagonists naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol*, 1982; 22: 403

## Antagonistic Effect of Benzylisoquine Compound D<sub>20</sub> on CaM Activating Phosphodiesterase

Zhang Yuan    Hu Zhuoyi    Zhao Ye

(China Pharmaceutical University, division of biochemistry, Nanjing 210009)

Cai Huimin

(China Pharmaceutical University, Division of medicinal chemistry)

### ABSTRACT

Synthetic benzylisoquine compound D<sub>20</sub> exhibits stronger inhibition on CaM-activated phosphodiesterase than TFP.  $IC_{50} = 5 \mu\text{mol/L}$ . Fluorescence analysis indicates that the association constant ( $K_a$ ) for the interaction between CaM and compound D<sub>20</sub> is  $2.64 (\mu\text{mol/L})^{-1}$  and compound D<sub>20</sub> molecule possesses 2 binding sites for CaM. Binding style is discussed.

**Key words** calmodulin (CaM), phosphodiesterase (PDE), antagonist, benzylisoquine compound D<sub>20</sub>, scatchard plot

## γ-谷氨酰转肽酶的纯化及其特性的研究

关赛芳    许凯黎    陈复华

(上海市肿瘤研究所, 上海 200032)

### 提 要

从胎肝和肝癌组织中纯化的 GGTP, 经 4%—30% PAGE 鉴定表明分成二部分, 其中第一部分活力最强, 经亲和层析柱吸附后, 免疫动物获纯的抗血清。该部分 GGTP 经 10% PAGE 显示一条带, 其分子量为 92kD, pI 值为 4.2。但经 SDS-PAGE 则显示二条蛋白带, 其分子量分别为 64kD 和 27kD。酶免疫抑制试验表明该抗血清对 GGTP II, II' 具有抑制作用, 双扩散免疫试验产生单一沉淀线, 并互相融合在一起。说明二种组织来源的 GGTP 的免疫学特性相一致。

**关键词** γ-谷氨酰转肽酶 (GGTP), 胎肝, 肝癌组织

γ-谷氨酰转肽酶 (GGTP)[E.C. 2.3.2.2.] 广泛存在于人体肾、胰、肝、脾和小肠等组织中, 其中以肾含量最丰富, 但胎肝和肝癌组织具有高度组织特异性活力<sup>[1]</sup>。有关文献提示 GGTP 具有酶分子的不均一性, 以多种同工酶形式出

现, 一旦肝细胞癌变时, 肝癌患者血清中显示肝癌特异性同工酶, 因而通过血清学检测该特异性同工酶可对肝癌起到鉴别诊断作用<sup>[2,3]</sup>。为进