

# 去甲替林体外对人和大鼠肝微粒体

## 丁咁洛尔 1'-羟化酶活性的影响

涂植光<sup>1</sup>, Caroline E SEDDON, Alan R BOOBIS, Donald S DAVIES

(Department of Clinical Pharmacology, Royal Postgraduate Medical School, London W12 OHS, UK)

**摘要** 去甲替林能竞争性抑制人和 Wistar 大鼠肝微粒体(+), (-)和(±)丁咁洛尔 1'-羟化酶(Buf 1'-OHase)活性。对人(+), (-)和(±)Buf 1'-OHase, 去甲替林的  $IC_{50}$  分别为 10, 19, 14  $\mu\text{mol/L}$ ,  $K_i$  则为 5, 3 和 4  $\mu\text{mol/L}$ ; 对大鼠的  $IC_{50}$  分别为 4, 10 和

6  $\mu\text{mol/L}$ ,  $K_i$  则为 55, 29 和 43  $\mu\text{mol/L}$ 。表明去甲替林是人和 Wistar 大鼠 Buf 1'-OHase 的强力竞争性抑制剂。

**关键词** 肝微粒体; 去甲替林; 细胞色素 P-450; 肾上腺素  $\beta$  受体阻滞剂

\* \* \* \* \*

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Sep; 10 (5): 469-472

## 肝素等药物对猪红细胞膜上磷脂酰肌醇磷酸化的影响

梁念慈、陈庆辉 (湛江医学院生化教研室, 湛江 524023, 中国)

### Effects of heparin and other chemicals on phosphorylation of phosphatidylinositol in pig erythrocyte membrane

LIANG Nian-Ci, CHEN Qing-Hui

(Department of Biochemistry, Zhanjiang Medical College, Zhanjiang 524023, China)

**ABSTRACT** In the presence of  $Mg^{2+}$ , the pig erythrocyte membranes were incubated with [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP at 30°C for 3 min to study the effects of some chemicals on the phosphorylation of phosphatidylinositol. The incubations were stopped by the addition of chloroform/methanol (2:1, vol/vol) and the phospholipids were extracted with acid chloroform/methanol and separated on silica gel TLC plates. [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] phosphatidyl-inositol-4-phosphate was quantitated by

scintillation counting and autoradiography. The results indicated that heparin and neomycin inhibited the phosphorylation of phosphatidylinositol in a concentration-dependent manner, while dimethylsulfoxide stimulated the phosphorylation at low concentration (<10%), but inhibited at high concentration (>10%). Hexachlorocyclohexane stimulated the phosphorylation within a certain limit of concentration up to 6.4  $\mu\text{g/ml}$ .  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  (10 mmol/L), EGTA (100  $\mu\text{mol/L}$ ) and theophylline (100  $\mu\text{mol/L}$ ) had no significant effects.

Received 1988 Apr 27 Accepted 1989 Apr 7

<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation No 386-0474

**KEY WORDS** phosphatidylinositols; phos-

**phorylation; heparin; erythrocyte membrane; autoradiography**

**摘要** 用<sup>32</sup>P标记法研究肝素等药物对猪红细胞膜上磷脂酰肌醇磷酸化的影响，结果表明：肝素和新霉素对磷脂酰肌醇磷酸化有抑制作用；六氯环己烷则有促进作用；二甲亚砜对该磷酸化也有影响；Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mmol/L, EGTA 100 μmol/L 和茶碱 100 μmol/L 的作用不明显。

**关键词** 磷脂酰肌醇；磷酸化；肝素；红细胞膜；放射自显影术

在肌醇脂质信使系统的信号传递中，关键反应是磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸(PIP<sub>2</sub>)水解生成三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)和二酰基甘油(DG)，后二者作为新的第二信使启动或调节许多细胞效应<sup>(1)</sup>。PIP<sub>2</sub>来源于磷脂酰肌醇(PI)两步磷酸化，并且IP<sub>3</sub>通过一系列反应又重新合成PI，有人称之为肌醇磷脂循环<sup>(1,2)</sup>。因此影响肌醇磷脂循环中任一步反应的因素，也必然影响细胞多种功能。这给生化药理学提供了新的理论基础。现已发现多种激动剂对PIP<sub>2</sub>水解有促进作用<sup>(1,2)</sup>，锂盐能抑制磷酸肌醇水解<sup>(3)</sup>，腺苷对大鼠心肌质膜上PI磷酸化有抑制作用<sup>(4)</sup>，肝素(heparin)对磷脂酰肌醇-4-磷酸(PIP)激酶有抑制作用<sup>(5)</sup>。本文报告肝素等药物对猪红细胞膜上PI磷酸化的影响。

## MATERIALS AND METHODS

肝素(无锡生化制药厂)，新霉素(neomycin，镇江第二制药厂)，六氯环己烷(hexachlorocyclohexane)，标准PIP，EGTA和茶碱(Sigma公司)，[γ-<sup>32</sup>P]ATP(中国科学院原子能研究所)，其余试剂均系市售AR。

猪♂，体重100 kg，电击昏后采血，1%柠檬酸钠抗凝，置4℃，备用。

**猪红细胞膜制备** 将猪血在4℃，300×g离心10 min除去上清及中层，下层即为红细胞。用生理盐水洗两次红细胞，最后加入15倍容量含对甲苯磺酰氟0.1 mmol/L的重蒸水过夜，使之充分溶血。溶血液在13 000×g离

心30 min。去上清，沉淀先用10倍容量含对甲苯磺酰氟0.1 mmol/L, EGTA 0.1 mmol/L, pH 11.2 Tris-HCl 40 mmol/L 缓冲液洗一次，再用10倍容量含对甲苯磺酰氟0.1 mmol/L, EGTA 0.1 mmol/L, pH 7.5 Tris-HCl 40 mmol/L 缓冲液洗4次，每次约在13 000×g离心30 min均去上清，沉淀即为红细胞膜。然后加入2倍容量Tris-HCl 40 mmol/L缓冲液(pH 7.5)混悬，小管分装(每管约1 ml)，在-20℃下保存备用。

膜蛋白测定采用分光光度法，牛血清清蛋白(BSA)作标准<sup>(6)</sup>。

**磷酸化反应** 反应混合物总量为100 μl，内含pH 7.5 Tris-HCl 40 mmol/L 缓冲液，MgCl<sub>2</sub> 15 mmol/L，KCl 100 mmol/L 和[γ-<sup>32</sup>P]ATP 20 μmol/L 膜蛋白约50 μg及适量被试物质，反应在30℃进行，加入放射性ATP开始反应，反应3 min，加入氯仿：甲醇(2:1, vol:vol)混合液500 μl中止反应。

**磷脂抽提** 磷酸化反应后，同时加入少许非放射性PIP作为标志，接着加入250 μl HCl 1.2 mol/L 及250 μl 氯仿，充分摇匀后使之分层，去上层，下层用500 μl 甲醇:HCl 1.2 mol/L(1:1, vol:vol)洗两次，每次洗涤均充分振摇，然后使之分层，去上层，最后下层用氮气流吹干，加入少量氯仿：甲醇(2:1, vol:vol)溶解残渣作薄层层析(TLC)。

**薄层层析分离肌醇磷脂** 用硅胶板进行TLC。硅胶H板先用1%草酸钠湿润处理后点样。用氯仿：甲醇：水：氨水(48:45:11.5:3.3)混合液展开，必要时再用氯仿：丙酮：甲醇：乙酸：水(40:15:13:12:8)第二向展开。用碘蒸气使标准品显色，或用放射自显影使放射性物质“显色”，把PIP斑点刮下，液体闪烁计数，测定其放射性强度。

## RESULTS

Fig 1表明，在一定浓度范围内，随着ATP增加，磷酸化作用加强；当浓度达到

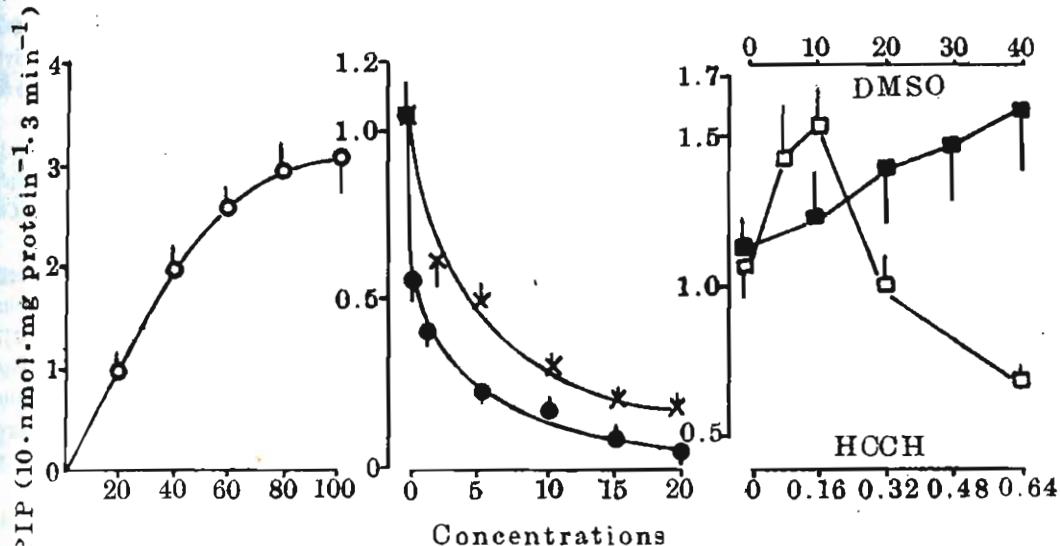


Fig 1. Effects of ATP (○,  $\mu\text{mol/L}$ ), heparin (●, IU/100  $\mu\text{l}$ ), neomycin ( $\times$ ,  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ), dimethylsulfoxide (DMSO, □, %) and hexachlorocyclohexane (HCCH, ■,  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) on the phosphorylation of phosphatidylinositol in pig erythrocyte membrane. The membranes were incubated with KCl 100 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  15 mmol/L, [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP 20  $\mu\text{mol/L}$  and Tris-HCl 40 mmol/L buffer, pH 7.5, in the presence of different concentrations of ATP, heparin, neomycin, dimethylsulfoxide or hexachlorocyclohexane at 30°C for 3 min. The incubations were stopped by the addition of chloroform/methanol (2:1, vol/vol). The phospholipids were extracted with acid chloroform/methanol and separated on silica gel TLC plates. [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]PIP was quantitated by scintillation counting and autoradiography. PIP: phosphatidylinositol-4-phosphate.

80  $\mu\text{mol/L}$  时磷酸化几乎达饱和，即增加 ATP 的浓度，也不能增加 PIP 的生成。

#### 肝素对磷脂酰肌醇磷酸化有明显的抑制作用

用 Fig 1 表明，随着肝素浓度的增大，抑制作用增强；在 5 IU/100  $\mu\text{l}$  以下时，抑制作用最敏感，抑制率达 76% 以上。从 Fig 1 可看出  $IC_{50}$ (半数抑制浓度)  $\approx 0.25$  IU/100  $\mu\text{l}$ 。

#### 新霉素对磷脂酰肌醇磷酸化有抑制作用

实验表明随着浓度增大而作用加强(Fig 1)，浓度在 15  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  时，抑制率为 77%， $IC_5 \approx 4 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 。

#### 二甲亚砜对磷脂酰肌醇磷酸化有影响

不同浓度的二甲亚砜对 PI 磷酸化的作用不同。Fig 1. 浓度在 10% 以下时具有促进作用，激活率达 46%；浓度在 10% 以上时，则随着浓度的增大抑制作用加强；浓度达 40% 时，抑制率达 40%。

#### 六氯环己烷对磷脂酰肌醇磷酸化有激活作用

在一定浓度范围内，随浓度增大而增强；

在 0.64  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  时，激活率达约 36% (Fig 1)。 $\text{Li}_2\text{SO}_4$ (10 mmol/L), EGTA(100  $\mu\text{mol/L}$ ) 及茶碱(100  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 PI 磷酸化影响不明显。

## DISCUSSION

实验结果表明：该磷脂酰肌醇磷酸化反应对 ATP 极敏感，这对保证细胞低能(低 ATP 浓度)状态时肌醇脂质信使系统的正常功能有重要意义。

肝素有抗凝作用，近年来有人报告它和可的松合用对某些血管生长有抑制作用，甚至可使一些肿瘤消退<sup>(7,8)</sup>。这些事实提示：肝素在特定条件下对细胞增殖生长有抑制作用。肝素抑制磷脂酰肌醇和磷脂酰肌醇-4-磷酸的磷酸化，从而减少 PIP<sub>2</sub> 的生成，即减弱了肌醇脂质信使系统的信号传递。这可能与其抑制细胞增殖生长有关。

新霉素抑制磷脂酰肌醇磷酸化作用可能与其抗菌、阻断神经肌肉接头及对肾毒性等作

用<sup>(9)</sup>有联系。

二甲亚砜在浓度低于10%时，对红细胞膜有增溶作用，从而使细胞膜上磷脂酰肌醇激酶游离出来，并使质膜上PI水溶性增大，故起激活作用；当浓度大于10%时，又可能使磷脂酰肌醇激酶变性，活性减弱，从而出现抑制作用。

六氯环己烷是数种立体异构体混合物。其分子结构与肌醇相似，这可能与其促进磷脂酰肌醇磷酸化的机理有联系。有人曾报道六氯环己烷可引起小鼠肝脏肿瘤。本实验提示六氯环己烷的致癌作用可能与其促进肌醇磷脂代谢有关。

本文研究的一些药物对磷脂酰肌醇磷酸化影响的结果不仅可能解释这些药物的部分作用机理，也许会为发现这些药物的一些新作用提供线索。

## REFERENCES

- 1 Hokin LE. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Annu Rev Biochem* 1985; 54 : 205
- 2 Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 1984; 220 : 345
- 3 Hallcher LM, Sherman WR. The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J Biol Chem* 1980; 255 : 10896
- 4 Liang NC, Lowenstein JM. Inhibition of the phosphorylation of troponin-I and phosphatidylinositol by adenosine in rat heart. *Chin Biochem J* 1987; 3 : 165
- 5 Cochet C, Chambaz EM. Catalytic properties of a purified phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from rat brain. *Biochem J* 1986; 237 : 25
- 6 Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83 : 346
- 7 Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 1985; 230 : 1375
- 8 Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Ibid* 1983; 221 : 719
- 9 戴自英，主编。实用抗菌素学。第1版。上海：上海人民出版社，1977 : 206-10
- 10 Nagasaki H, Tomii S, Mega T, Murugami M, Ito N. Development of hepatomas in mice treated with benzene hexachloride. *Gann* 1971; 62 : 431

## Papers are welcome

*Acta Pharmacologica Sinica* publishes papers on a broad range of topics of general interest to pharmacologists and toxicologists, both experimental and clinical. Manuscripts in English or Chinese of original research, from any country, are welcome.

The "Instructions to authors" appeared in *Acta Pharmacol Sin* 1989 Jan; 10 (1) : 1-6, which were essentially in accordance with the "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" published in *Ann Intern Med* 1988; 108 : 258-65 and *Br Med J* 1988; 296 : 401-5.

An ABSTRACT (no more than 150 words) is followed by 3-10 KEY WORDS, using terms from medical subject headings list from *Index Medicus* 1989; 30 (Suppl) when possible. Mean values must be accompanied by SD (not SEM). Body weights are expressed in actually measured  $\bar{x} \pm SD$ . Do not include more significant figures in the data than are justified by the accuracy of the determinations. Use the Système International d'Unités (SI units). The statistical significances are indicated by  $*P > 0.05$ ,  $**P < 0.05$ ,  $***P < 0.01$ . The number of REFERENCES should not exceed 15.

Please send manuscripts to *Acta Pharmacologica Sinica*, 319 Yue-yang Road, Shanghai 200031, China. Telephone 311833, Telegram 3434, Telex 33275 CASS CN.