

452-454

精胺对猪血小板膜中磷酸肌醇和 47 K 蛋白质磷酸化的影响¹

丁克宏², 梁念慈 (湛江医学院生化教研室, 湛江 524023, 中国) R965.1

Effects of spermine on phosphorylation of phosphoinositide and 47 K protein in platelet membranes of pig¹

DING Ke-Hong², LIANG Nian-Ci
(Department of Biochemistry, Zhanjiang Medical College, Zhanjiang 524023, China)

ABSTRACT In the presence of Mg²⁺ and exogenous phosphatidylinositol-4-phosphate, swine thrombocytic membranes were incubated with [γ -³²P]ATP at 30°C for 3 min and the incorporations of ³²P into phospholipids and proteins were measured. Spermine stimulated the formation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (optimal concentration 0.25 mmol · L⁻¹) and inhibited the phosphorylation of 47 K protein (IC₅₀ 1 mmol · L⁻¹). This helps to clarify the effect of spermine on cell growth and proliferation.

KEY WORDS spermine; blood platelets; cell membrane; phosphoinositides; membrane proteins; phosphorylation

提要 在 Mg²⁺和外源性磷脂酰肌醇-4-磷酸存在下, 用猪血小板膜与 [γ -³²P]ATP 在 30°C 下保温 3 min, 测定 ³²P 掺入磷脂和蛋白质。精胺促进磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸的生成(最有效浓度 0.25 mmol · L⁻¹), 并抑制 47 K 蛋白质的磷酸化(IC₅₀ 1 mmol · L⁻¹)。这有助于阐明精胺影响细胞生长增殖的作用。

关键词 精胺; 血小板; 细胞膜; 磷肌醇类; 膜蛋白; 磷酸化作用 磷酸肌醇, 蛋白质

精胺属于多胺类化合物, 存在于所有高级真核生物细胞中, 对细胞生长增殖具有促进作用⁽¹⁾。在生长旺盛的组织和恶性肿瘤病人的

血、尿中, 多胺的含量明显增多^(2,3)。磷酸肌醇在生物信号跨膜传递中起重要作用, 并与细胞增殖和肿瘤形成有密切关系⁽⁴⁾。为了探讨精胺的作用机制, 本文研究其对血小板中磷酸肌醇和蛋白质磷酸化的作用。

MATERIALS AND METHODS

精胺, ATP (Sigma); 蛋白质分子标准(Pharmacia); 磷脂酰肌醇-4-磷酸 (phosphatidylinositol-4-phosphate, PIP), 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂), 为 Sigma 产品; [γ -³²P]ATP (185 GBq · mol⁻¹), Amersham 产品, 其它均为国产 AR 试剂。

猪, ♂, 体重约 100 kg, 电击昏后塑料离心管采血, 预先加入 ACD 溶液抗凝 (ACD: 猪血 = 0.15 : 0.85), ACD 成分为: 柠檬酸 71, 柠檬酸三钠 85, 葡萄糖 111 mmol · L⁻¹。

血小板膜制备 ACD 抗凝血 25°C 下 200 × g 离心 15 min, 吸取上层富血小板血浆, 1500 × g 离心 15 min, 沉淀为血小板。加入改良 Tyrode-Hepes 缓冲液, 成分为: EGTA 1, NaCl 134, NaHCO₃ 12, KCl 2.9, Na₂HPO₄ 0.34, MgCl₂ 1, 葡萄糖 5, Hepes 5 mmol · L⁻¹, pH 7.4。然后 1500 × g 离心 15 min, 如此洗涤两次后加入 5 倍于沉淀体积的低渗液: EGTA 5, PMSF 0.1, Tris-HCl 10 mmol · L⁻¹, pH 7.4。混匀后于 -20°C 下冻融 3 次, 置冰浴下匀浆 30 min, 匀浆液在 4°C 下 90 000 × g 离心 30 min, 沉淀即含血小板膜。在沉淀中加入 2 倍体积含 Triton X-100 1% 的低渗液, 冰浴下匀浆 10 min, 置 4°C 过夜后同法离心得血小板膜溶解液, 小管分装, -20°C 贮存备用。

蛋白质测定 用 Folin-酚试剂法⁽⁵⁾, 牛血清蛋白作标准。

磷脂磷酸化反应⁽⁶⁾ 向反应混合物中补充 PIP 50

Received 1990-10-08

Accepted 1992-04-08

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 3880443.

² Now in Department of Biochemistry, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China.

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (预先与 0.1% Triton X-100 和 Tris-HCl 溶液在 30°C 下超声 3 min), 中止反应后加入少量 PIP 和 PIP_2 作为标志, 用酸化氯仿/甲醇法抽提磷脂, 硅胶板薄层色谱加以分离, 经放射自显影后, 以液体闪烁计数测定 ^{32}P 放射性强度。

蛋白质磷酸化反应⁽⁷⁾ 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离蛋白质, 电泳后凝胶用 Coomassie brilliant blue 染色, 置于滤纸上用凝胶真空干燥机烘干, 干胶作放射自显影, 液闪计数测定放射性标记的蛋白带。

RESULTS

精胺促进 PIP_2 生成 在 Mg^{2+} 和外源性 PIP 存在的条件下, 精胺 (0.13, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 ^{32}P PIP₂ 的生成有明显促进作用, 在 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时作用最强 ($n=6$), 生成的 PIP_2 约为对照的 275%; 精胺浓度再增高时促进作用有所减弱, 但仍明显高于对照 (Fig 1)。

精胺抑制血小板中 47 K 蛋白磷酸化 蛋白质磷酸化后, 以其三氯乙酸不溶物作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影, 结果显示, 精胺对血小板中 47 K 蛋白质的磷酸化有强烈抑制作用 (经与蛋白质标准品反复比较确定分子量), 在一定浓度范围内随着精胺浓度增大其抑制作用加强 (Fig 1)。精胺的半数抑制浓度 (IC_{50}) 约为 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=6$), 在低于 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时作用最敏感, 浓度为 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 磷酸化的蛋白质仅为对照的 36%。

DISCUSSION

本实验中精胺促进 PIP_2 生成, 表明对 PIP 激酶具有激活作用, 由此推想精胺的生物作用机制可能与此有关, 血小板中 47 K 蛋白质是蛋白激酶 C (PKC) 的主要底物⁽⁸⁾, 精胺抑制血小板中此多肽的磷酸化, 提示它可能对 PKC 的活性有调节作用, 这与文献结果⁽⁹⁾相

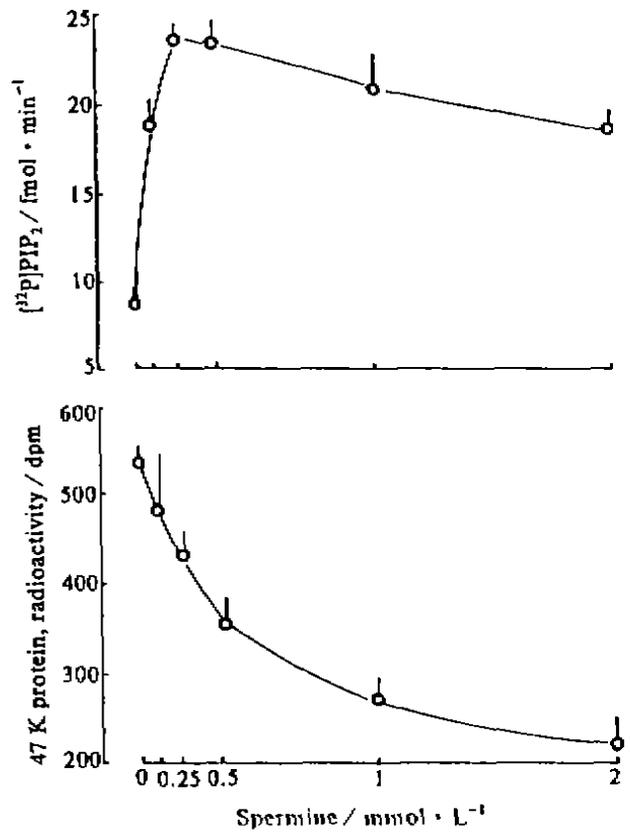


Fig 1. Effects of spermine on formation of PIP_2 and phosphorylation of 47 K protein in swine platelet membranes. $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

符, 但精胺抑制 PKC 的作用机制及意义有待研究。

本文初步提示精胺与肌醇磷脂信使系统的关系, 这有助于阐明它的分子作用机制。

REFERENCES

- 1 Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984; 53 : 749-90.
- 2 Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 1986; 234 : 249-62.
- 3 Durie BGM, Salmon SE, Russell DH. Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy. *Cancer Res* 1977; 37 : 214-21.
- 4 Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341 : 197-205.

- 5 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193** : 265-75.
- 6 Liang NC, Chen QH. Effects of heparin and other chemicals on phosphorylation of phosphatidylinositol in pig erythrocyte membrane. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10** : 469-72.
- 7 Liang NC, Lowenstein JM. Inhibition of the phosphorylation of troponin-1 and phosphatidylinositol by adenosine in rat heart. *Chin Biochem J* 1987; **3** : 165-72.
- 8 Imaoka T, Lynham JA, Haslam RJ. Purification and characterization of the 47,000-dalton protein phosphorylated during degranulation of human platelets. *J Biol Chem* 1983; **258** : 11404-14.
- 9 Moruzzi M, Barbiroli B, Monti MG, Tadolini B, Hakim G, Mezzetti G. Inhibitory action of polyamines on protein kinase C association to membranes. *Biochem J* 1987; **247** : 175-80.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Sep; 13 (5) : 454-456

444-446

胺碘酮对普鲁卡因胺及其主要代谢物在兔体内处置动力学的影响

柳晓泉, 黄圣凯 (中国药科大学药理教研室, 南京 210009, 中国) R 969.1

Effects of amiodarone on kinetics of procainamide and its major metabolite disposition in rabbit

LIU Xiao-Quan, HUANG Sheng-Kai
(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT The effects of steady state amiodarone on the kinetics of procainamide (PA) and its major metabolite, acetylprocainamide (NAPA), disposition in rabbits were examined. When PA was given alone, the pharmacokinetic parameters α , β , K_{m0} , K_{im} , V_1 , V_m^{-1} , were 0.20 ± 0.04 , 0.016 ± 0.003 , 0.027 ± 0.01 , and $0.043 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, respectively. When PA was given in combination with amiodarone, the corresponding values were 0.37 ± 0.08 , 0.0059 ± 0.002 , 0.0096 ± 0.004 , and $0.016 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$, respectively. The results indicated that the disposition kinetics of both PA and NAPA were significantly changed by steady state amiodarone.

KEY WORDS procainamide; amiodarone; pharmacokinetics; combination drug therapy

提要 用普鲁卡因胺(PA)及乙酰普鲁卡因胺(NAPA)

的药物动力学模型, 研究稳态胺碘酮对 PA 及 NAPA 在兔体内处置动力学的影响。兔单独 iv PA 后, 其 α , β , K_{m0} , K_{im} , V_1 , V_m^{-1} 分别为 0.20 ± 0.04 , 0.016 ± 0.003 , 0.027 ± 0.01 和 $0.043 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$; 合用胺碘酮后, 其值分别为 0.37 ± 0.08 , 0.0059 ± 0.002 , 0.0096 ± 0.004 和 $0.016 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ 。结果说明 PA 及 NAPA 的处置动力学均发生明显变化。

关键词 普鲁卡因胺; 胺碘酮; 药物动力学; 联合药物治疗法

胺碘酮(amiodarone)和普鲁卡因胺(procainamide, PA)为临床常用的抗心律失常药, 临床上常将胺碘酮与其它药物合用, 以减小其副作用, 提高疗效。然而, 联合用药会出现药物间的相互作用, 若使用不当会使药物的毒副作用增强。胺碘酮与许多药物有相互作用⁽¹⁾。本文用 PA 及其主要代谢物乙酰普鲁卡因胺(NAPA)的药物动力学模型, 综合分析胺碘酮对 PA 及 NAPA 处置动力学的影响, 探讨其相互作用的药物动力学机制。

MATERIALS AND METHODS

血药浓度测定方法 兔 14 只, ♀♂兼用, 体重

Received 1991-04-19

Accepted 1992-04-25