

# 赛庚啉对钙调素激活的兔红细胞膜 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的抑制作用

辛洪波, 张宝恒 (北京医科大学基础医学院药理教研室, 北京100083, 中国)

## Inhibitory effects of cyproheptadine on calmodulin activated $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of rabbit erythrocyte membranes

XIN Hong-Bo, ZHANG Bao-Heng

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

**ABSTRACT** Membranes prepared from rabbit erythrocyte hemolyzed in isosmotic imidazole ( $151 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) buffer showed an enhancement of calmodulin (CaM) activated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity compared with the membrane prepared in hypotonic imidazole ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , EGTA  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) buffer. The  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of the former (activated-calmodulin) was inhibited by cyproheptadine (Cyp) with  $\text{IC}_{50} 75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (95% confidence interval was  $18-319 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $r = 0.9118$ ), while the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of the latter (inactivated) was hardly influenced by Cyp. The results suggest that cyproheptadine antagonizes CaM, and its actions of the calcium antagonism and the anti-myocardial injury may, at least partially, be related to its CaM antagonism.

**KEY WORDS** cyproheptadine; calmodulin; calcium adenosine triphosphatase; erythrocyte membrane

**摘要** 等渗咪唑缓冲液溶血制备的兔红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性明显高于低渗咪唑液制备的膜酶活性, EGTA 对这种膜酶的制备有显著影响, 由此可分别制备出经 CaM 激活和未经 CaM 激活的膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶。赛庚啉对 CaM 激活的膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性有明显的抑制作用, 其  $\text{IC}_{50}$  为  $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而对未经 CaM 激活的红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性几无影响。

**关键词** 赛庚啉; 钙调素; 钙腺苷三磷酸酶; 红细胞膜

赛庚啉 (cyproheptadine, Cyp) 为一抗 5-羟色胺和抗组胺药, 其化学结构类似于钙调素 (calmodulin, CaM) 拮抗剂氯丙嗪等吩噻嗪类化合物。近年来发现该药具有较强的  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻滞作用<sup>[1,2]</sup>。我们曾观察到该药对多种氧自由基具有明显的清除作用<sup>[3]</sup>, 并对离体大鼠心脏缺钙/复钙<sup>[4]</sup>和缺血/再灌注损伤及异丙肾上腺素诱发的整体大鼠心肌损伤均有明显的保护作用<sup>[5]</sup>。本文用等渗咪唑缓冲液溶血制备一种被 CaM 激活的兔红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶, 观察 Cyp 对该膜酶活性的影响, 以期证实该药是否有抗 CaM 作用及探讨该作用在其抗心肌损伤中的意义。

## MATERIALS AND METHODS

盐酸赛庚啉 (Cyp) 由江苏省常州市第四制药厂生产并惠赠, 咪唑 (imidazole, 江苏省太仓光耀试剂厂), L-组氨酸 (L-histidine, 上海氨基酸厂), ATP- $\text{Na}_2$  (Sigma), 哇巴因 (卫生部药品生物制品检定所), 其它试剂均为 AR。高速冷冻离心机 (RC5C, 美国 Du Pont); 双波长双光束 uv 分光光度计 (uv-3000, 日本岛津)。

**红细胞膜的制备**<sup>[6,7]</sup> 取肝素化后的兔新鲜血液, 用 Tris-HCl 缓冲液 ( $172 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) 冲洗 3 次 (每次  $2000 \times g$  离心 10 min) 以除去血浆及白细胞等。将红细胞沉淀物分别用 1:14 (vol:vol) 的下述 4 种不同缓冲液溶血 20 min ( $4^\circ\text{C}$ ): A. 等渗咪唑缓冲液 II; 咪唑  $151 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; B. 等渗咪唑缓冲液 II; 咪唑  $151 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , EGTA  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; C. 低渗咪唑缓冲液 I; 咪唑  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; D. 低渗咪唑缓冲液 II; 咪唑  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , EGTA  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 均为 7.4。溶血后  $45000 \times g$  离心 20 min。上述各溶血液制备的红细胞膜沉淀均用低渗咪唑缓冲液 I (1:16) 冲洗二次, 然后再用组氨酸/咪唑缓冲液 (组氨酸  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 咪唑  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.1) 洗一次, 每次均  $45000 \times g$  离

心20 min. 最后用上述组胺酸/咪唑缓冲液混悬膜沉淀, 并将膜蛋白浓度调成 $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . 蛋白含量参照Coomassie brilliant blue G 250法<sup>[8]</sup>测定, 以牛血清白蛋白作标准. 膜标本在 $4^\circ\text{C}$ 保存, 并在72 h内测定酶活性.

**红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性测定<sup>[6]</sup>** 反应液总容量为1 ml (pH 7.0), 内含咪唑-HCl 30, NaCl 80, KCl 15,  $\text{MgCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.1, ATP- $\text{Na}_2$  4, 膜蛋白0.2 mg,  $\text{CaCl}_2$  0.1或EGTA  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及各种不同浓度的被试药物, 以加入ATP触发反应. 置 $37^\circ\text{C}$ 水浴中孵育1 h, 加20%三氯醋酸1 ml终止反应.  $1000 \times g$ 离心5 min后, 取上清液0.5 ml测ATP水解的无机磷含量<sup>[9]</sup>. 酶活性以 $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{h}^{-1} / \text{mg protein}$ 表示.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性为含 $\text{CaCl}_2$ 时测得的总酶活性与不含 $\text{CaCl}_2$ 而加有EGTA时测得的 $\text{Mg}^{2+}$ -ATP酶活性之差.

**RESULTS**

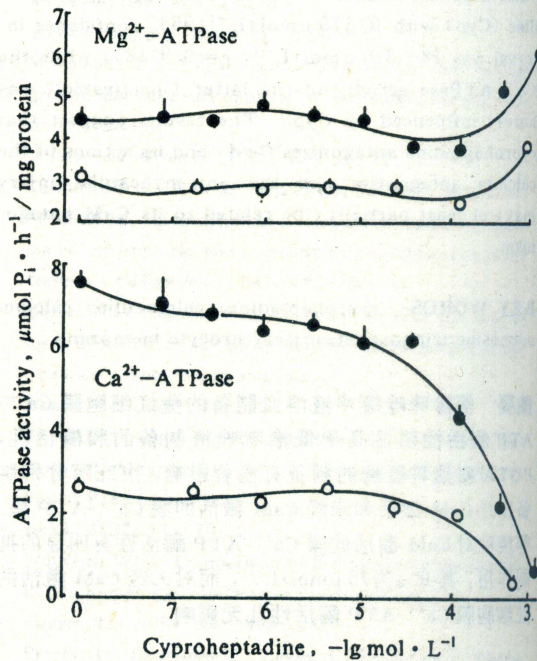
**不同缓冲液溶血制备的红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性比较** 等渗咪唑缓冲液溶血制备的红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性明显高于低渗咪唑液制备的酶活性, 而不含EGTA的等渗或低渗咪唑缓冲液制备的酶活性又分别高于含EGTA时制备的酶活性. 其中不含EGTA的等渗咪唑缓冲液制备的酶活性为含EGTA的低渗咪唑液制备的酶活性的2.7倍. 故实验时, 选用上述两种膜制备以分别观察药物对CaM激活和未经CaM激活的膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响. 结果还显示, 用上述各种缓冲液溶血时, 除含EGTA的低渗咪唑液制备的红细胞膜  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性较低外, 其余缓冲液制备的膜  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性无明显差异, 表明CaM对红细胞膜  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性无显著影响(Tab 1).

**Cyp 对 CaM 激活的红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响** Cyp对CaM激活的红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性具有明显的抑制作用, 且呈浓度依赖性(Fig 1 B). 其 $\text{IC}_{50}$ 为 $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r = 0.9118$ , 95%可信限为 $18 - 319 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). 结果还显示, 当Cyp浓度低于

$316 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对该制备的膜  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性无显著影响, 但当浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 反而对该酶呈现出一定的激活作用(Fig A).

**Tab 1.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities of membranes prepared from rabbit erythrocytes hemolyzed in imidazole buffers.  $n=6$ .  $\bar{x} \pm s$ . <sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs buffer A; <sup>d</sup> $P > 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs buffer B; <sup>g</sup> $P < 0.01$  vs buffer C.**

Buffer	Imidazole (mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ )	EGTA (mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity ( $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{h}^{-1} / \text{mg protein}$ )	$\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity ( $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{h}^{-1} / \text{mg protein}$ )
A	151	0	$6.35 \pm 0.42$	$3.96 \pm 0.35$
B	151	1	$4.36 \pm 0.35^c$	$4.20 \pm 0.53^a$
C	10	0	$3.91 \pm 0.30^{ed}$	$3.85 \pm 0.28^{ed}$
D	10	1	$2.39 \pm 0.32^{ef}$	$3.27 \pm 0.28^{ef}$



**Fig 1. Effects of cyproheptadine on  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities in rabbit erythrocyte membranes with (●) or without (○) calmodulin.  $n=3-4$ ,  $\bar{x} \pm s$ .**

Cyp 对未经 CaM 激活的红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -

ATP 酶活性的影响 当 Cyp 浓度在  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以下时, 该药对未经 CaM 激活的膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性无显著影响, 仅当浓度大于  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 才表现出明显的抑制作用 (Fig 1B). Cyp 对未经 CaM 激活的红细胞膜  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性无显著影响 (Fig 1A).

## DISCUSSION

研究表明, CaM 对红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶的激活作用是以一种离子强度依赖性机制而实现的<sup>[6]</sup>. 本文结果表明, 用于溶血的咪唑缓冲液的离子浓度对红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性有显著影响, 而对  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性则无明显影响, 提示膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶可被 CaM 激活, 而  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶则对其不敏感. CaM 对细胞功能的调节作用十分广泛, 它可作为细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  受体参与对细胞各种生理过程的调节; 此外, CaM 还涉及许多疾病的病理过程<sup>[10]</sup>. 吩噻嗪类衍生物如三氟拉嗪、氯丙嗪及三环类化合物如丙咪嗪、阿米替林等均有明显的 CaM 拮抗作用, 它们在结构上都属于阳离子双亲化合物, Cyp 的分子结构也具有此特征. 有文献表明, 三氟拉嗪等吩噻嗪类化合物对心脏缺血<sup>[11]</sup> 及心脏缺钙/复钙损伤<sup>[12]</sup> 有明显的保护作用, 提示在上述心肌损伤过程中可能涉及 CaM 的参与. 本文结果表明, Cyp 对经 CaM 激活的红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶具有明显抑制作用, 而对未经 CaM 激活的膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性无明显影响, 这就提示该药对  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶的抑制作用主要是通过拮抗 CaM 而产生的, 而其抗 CaM 作用可能至少与其阻断  $\text{Ca}^{2+}$  通道及抗心肌损伤等作用有关.

ACKNOWLEDGMENTS CaM 激活的红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶的制备曾得到中国科学院上海药物研究所陈恩鸿副研究员的指教.

## REFERENCES

- 1 Winquist RJ, Siegl PKS, Baskin EP, Bohn DL, Morgan G, Wallace AA. Calcium entry blocker activity of cyproheptadin in isolated cardiovascular preparations. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; **230**: 103-9.
- 2 Riccioppo Neto F. Effects of cyproheptadine on electrophysiological properties of isolated cardiac muscle of dogs and rabbits. *Br J Pharmacol* 1983; **80**: 335-41.
- 3 Xin HB, Zhang BH. Scavenging effects of cyproheptadine on oxygen free radicals. *Acta Pharm Sin* 1993; **28**: 161-5.
- 4 Xin HB, Zhang BH, Shen HJ. Protective effects of cyproheptadine on calcium paradox in isolated rat hearts. *Acta Pharm Sin* 1992; **27**: 806-11.
- 5 Xin HB, Zhang BH, Liu YW, Fan JS. Protective effects of cyproheptadine on isoproterenol-induced myocardial injury in rats *in vivo*. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1993; **7**: 176-9.
- 6 Farrance ML, Vincenzi FF. Enhancement of ( $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase activity of human erythrocyte membranes by hemolysis in isosmotic imidazole buffer. I. General properties of variously prepared membranes and the mechanism of the isosmotic imidazole effect. *Biochim Biophys Acta* 1977; **471**: 49-58.
- 7 Chen EH, Yao RJ, Zhang YF. Preparation of CaM-erythrocyte membrane of rabbit. *Chin Biochem J* 1983; **3**: 159-63.
- 8 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54.
- 9 Taussgy HH, Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 1953; **202**: 675-85.
- 10 Means AR, Van Berkum MFA, Bagchi IC, Lu KP, Rasmussen CD. Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther* 1991; **50**: 255-70.
- 11 Sanrgent CA, Steph PG, Dzwonczyk S, Smith MA, Grover GJ. Effect of calmodulin and protein kinase C inhibitors on globally ischemic rat hearts. *J Cardiovascular Pharmacol* 1992; **20**: 251-60.
- 12 Schaffer SW, Burton KP, Jones HP, Oei HH. Phenothiazine protection in calcium overload-induced heart failure: a possible role for calmodulin. *Am J Physiol* 1983; **244**: H328-34.