

CPM 抑制了由 1,4-NQ 诱导的对骨肌肌质网 SR 钙通道 RyR1 的激活效应

夏若虹¹, Abramson J. Jonathan², 李莉³, 童华³, 姚松年³

(1. 中国科学院上海生理研究所, 上海 200031; 2. Physics Department, Portland State University, USA;

3. 武汉大学化学系, 湖北 武汉 430072)

摘要: 利用 7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) 甲基化钙通道 RyR1 上的特异敏感性硫醇的方法, 对由 1,4-naphthoquinone (1,4NQ) 诱导的双相性作用进行了研究, 发现 CPM 能明显阻碍由 1,4NQ 诱导的对 RyR1 的激活, 但对由 1,4NQ 产生的抑制没有明显作用。用经 CPM 预处理过和没有处理过的样品与 1,4NQ 温育后离心清洗, 发现未经 CPM 处理的样品经激活和抑制浓度的 1,4NQ 温育后, 离心清洗不能消除 1,4NQ 对 RyR1 的激活和抑制。而经 CPM 处理后的样品, 在 1,4NQ 的激活浓度和抑制浓度下, 离心清洗后未能观测到 1,4NQ 诱导的激活态, 但抑制态仍然明显存在。以上结果说明, CPM 所识别的特异活性硫醇参与了 1,4NQ 激活作用: CPM 与此硫醇发生甲基化作用, 因此阻断了 1,4NQ 对 RyR1 上的激活部位硫醇发生作用, 使钙通道不能被激活。

关键词: CPM; 1,4NQ; 钙通道; 硫醇; 激活部位; SR

中图分类号: Q73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2002)01-0023-06

1,4-Naphthoquinone 具有异常活跃的氧化还原性质, 它在与生物体系发生作用的过程中能干扰体系的氧化还原环境和电子传递链, 它可以耗尽它所在环境中的蛋白硫醇和氧化 GSH^[1-3]。1,4NQ 对谷胱甘肽过氧化氢酶(GSH-Px)有抑制作用, 在线粒体内能通过 GSSG 和 NADPH 的反应体系在 GSSG 还原酶的催化下耗尽 NAD(P)H^[4]。1,4NQ 一方面具有很高的氧化还原电位(+36mV)^[5,6], 另一方面它又能耗尽 GSH 和 NAD(P)H, 同时产生大量氧活性因子(reactive oxygen species), 它的存在会使细胞处于氧化胁迫之下, 致使钙通道门控机制受到影响, 胞内钙浓度急剧上升, 进而造成细胞功能受损及死亡。近年的研究表明, 氧化胁迫所造成的抗氧化防御系统的损伤与运动后肌肉疲劳, 老年化以及某些癌症的生理或病理成因密切相关。因此通过 1,4NQ 对生物系统的氧化干扰研究, 能为这些生理或病理的成因提供有益的参考依据。

骨骼肌肌质网 RyR1 已经被证明是一个氧化还原感受器(redox sensor), 具有确定的氧化还原电位, 并且由 CPM 识别的特异敏感性硫醇参与了氧化还原调控作用^[7]。在离体实验中, 氧压的降低(从 200 百帕到 13 百帕)能控制 RyR1 上还原态硫醇的数量从 29 个升高到 35 个^[8]。在骨骼肌细胞

内, 氧化还原环境主要是由 GSSH/GSH 维持, 泡外 GSH:GSSG(比率)比泡内高一个数量级, 只有在此状态下, RyR1 才有正常的门控行为^[9]。众多的硫醇氧化剂都对此通道有双相调控作用, 这种共性反映了体系的某种普遍规律, 即硫醇-氧化还原电势调控的共同机制, 这些结果进一步支持了我们以前提出的硫醇调控模型^[10]。

在前期研究结果中, 我们已经揭示了在 RyR1 蛋白上至少有两个作用部位分别控制通道的激活和抑制^[5,11]。在本文的实验中, 我们用 CPM 来固定特异敏感性硫醇^[5,7], 以此研究这些硫醇与 1,4NQ 对 RyR1 的激活和抑制关系。

作为一个荧光试剂, CPM 能不可逆地结合于自由硫醇之上, 阻断其参与氧化还原反应, 并产生荧光。所产生的荧光可作为检验 CPM 作用的标志。实验证明, 在 RyR1 通道关闭时由 CPM 所识别的特异敏感性硫醇与 CPM 结合敏感度远远高于一般背景下的硫醇, 因此可以用此方法鉴别特异敏感性硫

收稿日期: 2001-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870235)

作者简介: 夏若虹, 1956 年生, 博士, 研究员, 电话: (021)64956864, E-mail: xirren@yahoo.com.

醇^[5,7,9,11]。我们利用此方法对 1,4NQ 的作用进行了检测。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

CPM 购自 Molecular Probes, Eugen, Oregon, USA。1,4NQ, GSH, DTT, EGTA 等购自 Sigma Chemical Co.。^[3H]-ryanodine 和 ryanodine 购自 Du Pont, 其中^[3H]-ryanodine 的比放射活性为 75-80 Ci/mmol。CPM 溶于 DMSO, 避光存于 -20℃。使用时稀释为 10⁶mol/L, 一次性使用。1,4NQ 溶于 DMSO, 避光存于 -4℃。两种 ryanodine 存于 -20℃。GSH 和 GSSG 配制为 0.5mol/L 的水溶液, 加入 5^μmol/L 的 EGTA, pH 7.1(GSH) 或 7.4(GSSG), 液氮保存, 一次性使用, 保存期限不超过 2 个月。

SR 囊泡样品的制作主要参照 MacLennan 的方法由新西兰白兔后腿和双侧背肌制备^[12], 并在第一次离心悬浮液中除原有成份之外, 另加入了 100^μmol/L EGTA, 100^μmol/L DTT 以清除悬浮金属离子和减少制样时对钙通道的氧化损伤。样品悬浮于含有 100mmol/L KCl, 20 mmol/L PIPES, pH 7.1 悬浮液内, 置于液氮中保存。

1.2 CPM 预处理

在暗室条件下, 20-100 nmol/L CPM (10 mmol/L 母液) 加入搅动中的含有 0.5 mg/ml SR 样品的 ryanodine 结合悬浮液 (1mmol/L CaCl₂, 25 mmol/L PIPES, 250 mmol/L KCl, 15 mmol/L NaCl, pH 7.1) 中, 反应 4min, 最后加入 0.95 mmol/L 的 EGTA, 样品置于冰上待用。同时作平行的荧光光谱确认实验 (激发波长: 385nm, 发射波长: 467nm): 在 SR 样品在加入 CPM 后荧光信号瞬间有大幅度的升跃, 此表明 CPM 已经结合在相关的硫醇上。

1.3 平衡结合实验

0.5mg/ml SR 样品悬浮于常规 ryanodine 结合溶液中, 加入 98.5^μmol/L CaCl₂, 50^μmol/L EGTA。不同浓度的 1,4NQ 加入相应的试管中, 与 SR 温育于 37℃, 3 小时, GF/B 滤纸过滤, 置于液闪液摇床过夜, 由液闪记数仪计数, 然后计算出 ryanodine 平衡结合度 B。

1.4 ryanodine 动态结合实验

溶液 A: 1 mg/ml SR 悬浮于 5.4 ml 常规 ryanodine 结合溶液中, 另加入 98.5^μmol/L

CaCl₂, 50^μmol/L EGTA, pH 7.1, 置于冰上。溶液 B: 2 nmol/L [³H]-ryanodine (ryanodine) 初结合率试验的溶液 B 中含有 4 nmol/L [³H]-ryanodine, 不含未标记 ryanodine), 98.5^μmol/L CaCl₂, 50^μmol/L EGTA, 28 nmol/L ryanodine 和相应的 1,4NQ 或有关试剂 (两倍浓度) 加入 5.4ml 常规 ryanodine 结合溶液中, 分置于 48 个玻璃试管中, 每个试管 100^μl。在预定的时间将 100^μl 溶液 A 加入每个装有溶液 B 的试管, 以启动 ryanodine 结合反应。如果是用来计算 ryanodine 初结合率, 4 个点为一组, 分别为 12, 9, 6, 3min。37℃。如果要经 CPM 处理, 则在 A 中含 1 mmol/L Ca²⁺, 再加入 CPM, 反应 4min 后加入 0.95 ^μmol/L EGTA。B 中含有 1 mmol/L Ca²⁺ 和 0.95 ^μmol/L EGTA。到所设定的时间时, GF/B 滤纸过滤, 置于液闪液摇床过夜, 由液闪记数仪计数, 然后计算出 ryanodine 动态结合度 B 或者初始结合率 B'。

1.5 计算初始结合率 B'

利用 SigmaPlot 5.0 的线性回归程序对 ryanodine 动态结合度 B 对于时间进行线性回归, 计算出回归直线的斜率, 即 B'。

1.6 离心清洗实验

将经过 (实验样) 或者没经过 (对照样) 不同浓度的 1,4NQ 或 CPM 处理过 0.5g/LSR 样品 (悬浮于常规 ryanodine 结合溶液中, 总容量根据具体实验所确定), 在 37℃ 温育 60 分钟, 然后分装于 4-6 个 TI60 离心管中, 在 2℃ 温度下离心, 35000r/min, 35min。取出离心沉淀物 (SR), 匀浆, 再次悬浮于常规 ryanodine 结合溶液中, 测蛋白质浓度。用此样品进行 ryanodine 动态结合实验。

2 实验结果

2.1 CPM 对由 1,4NQ 诱导的初始结合率二相性的影响

在此实验中主要采用初始结合率, 辅以常规的平衡结合度作为实验指标。此方法的优点为消除了平衡结合实验中不可避免的由长时间温育而引起的系统不稳定因子的干扰和氧环境对样品的氧化作用。初始结合率 B' 的变化能很好地反应钙通道的状态, 而且使通道的激活比比平衡实验更高。比较图 1 和图 2, 可以看出图 2 中通道对 1,4NQ 的反应特性于图 1 的相同, 而且最大激活比较之图 1 上升了将近 3 倍。但也发现 1,4NQ 的最大激活浓度由平衡实

实验中的 5 μ mol/L 提高到 10 μ mol/L,抑制相也相应延迟。

由图 1 至图 4 可以看出, CPM 明显抑制了 1,4NQ 对钙通道 RyR1 的激活。加入 80, 100, 160 nmol/L CPM 对激活态的抑制随其浓度的升高而加剧(图 2)。CPM 浓度最高达到 1 μ mol/L (数据没有显示) 都不能完全抑制 1,4NQ 诱导的激活。类似作用亦可在图 3 中的钙依赖性曲线中反应出来:100 nmol/L CPM 对 5 μ mol/L 的 1,4NQ 的激活产生了压抑,使最大初结合率下降了 23%,但对 100 μ mol/L 1,4NQ 和对照的曲线没有产生作用。CPM 的标记没有改变 1,4NQ 的钙依赖性性质。图 4 显示了经 CPM 处理过和没经 CPM 处理过的 1,4NQ 对 RyR1 作用的时间依赖的 ryanodine 动态结合特性,可以看出经过 CPM 处理之后 1,4NQ 对 RyR1 的激活都明显降低:在存在 5 μ mol/L, 50 μ mol/L 和 100 μ mol/L 的 1,4NQ 情况下,CPM 使相应的 ryanodine 结合度分别下降了约 33%, 35% 和 56%。特别值得注意的是 CPM 对激活浓度

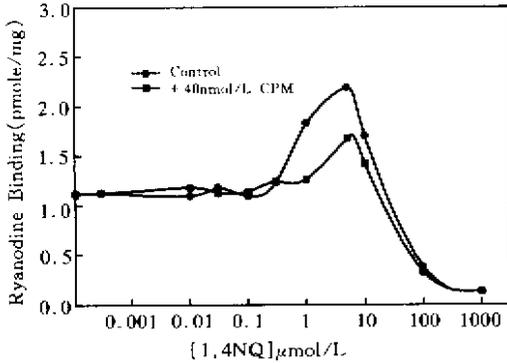


Fig.1 CPM pre-labeling affect the 1,4NQ concentration dependent ryanodine binding

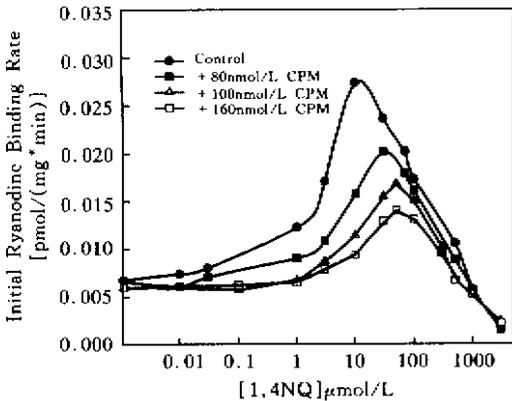


Fig.2 Effects of CPM on the activation phase and the inhibition phase of 1,4NQ dependent initial ryanodine binding rate

的 NQ 的激活压抑是从初始时刻一直延续到 4h,而对更高浓度的 1,4NQ 的压抑仅仅产生在最初的几十分钟内,对后续的反应没有发生效果。

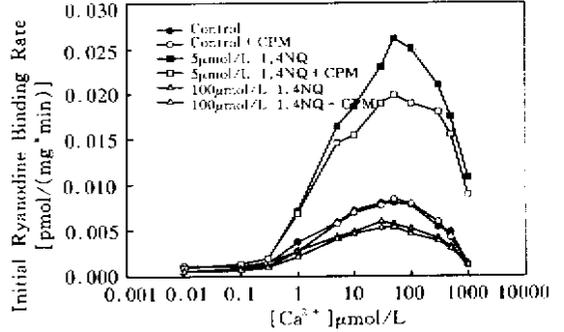


Fig.3 Effects of 1,4NQ and CPM on the Ca²⁺ concentration dependent initial ryanodine binding rates

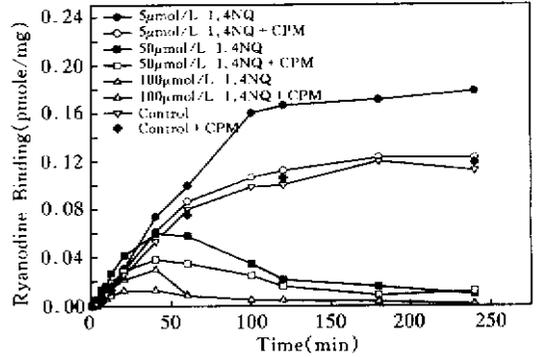


Fig.4 Effect of CPM on time dependent initial ryanodine binding rates

在经激活浓度的 1,4NQ 的温育后,再经 CPM 处理,通过荧光光谱实验证明 CPM 不能结合到特异活跃性的硫醇之上;而经抑制浓度的 CPM 处理后的样品,仍然可以看到初始的荧光信号的跃迁,但跃迁幅度明显变小(篇幅原因,结果不显示),因为 CPM 仅能在通道关闭时结合到特异性硫醇上,此结果说明 1,4NQ 作用于 CPM 所识别的特异性硫醇并使通道开放或关闭。同时钙离子释放实验也证实了 1,4NQ 不能诱导经 CPM 处理后的 SR 囊泡样品的钙释放(结果不显示)。

2.2 离心清洗对 1,4NQ 诱导的时间依赖二相性的影响

做离心清洗试验的目的是考查 1,4NQ 对钙通道蛋白的作用是否可逆,由此区分在反应中 1,4NQ 与通道蛋白的反应是属氧化作用,还是芳基化作用。图 5 中经 30-100 μ mol/L 的 1,4NQ 温育后的

ryanodine 结合曲线处于部分或完全均抑制相,而没有激活相,这是因为 60min 的温育已经使 1,4NQ 对通道的作用进入抑制区,而离心实验所需要的时间能使抑制更加加深。在 SR 样品经 CPM 预处理后再经以上各种浓度的 1,4NQ 温育,经清洗后,发现 $5\mu\text{mol/L}$ 的 1,4NQ 对通道的激活效应基本消除,而抑制浓度的 1,4NQ 对通道的影响与不经 CPM 处理的效果相似。

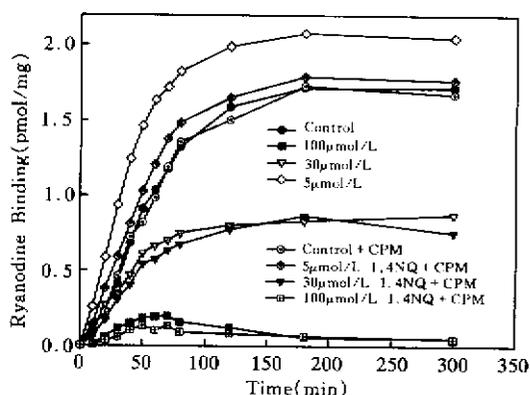


Fig.5 Effects of Post centrifuging wash and the CPM pre-labeling on the time dependent biphasic profile induced by 1,4 NQ

3 讨论与结论

RyR1 是一个含有多达 100 个半胱氨酸残基的大分子。在分子中众多的硫醇基团中,大约 50 个能被氧化^[13],其中一小部分是特别活跃的能参与氧化还原反应的高活性硫醇,它们参与了通道的门控行为,是调节通道的关键成份之一。CPM 已经被证实它所识别的 RyR1 上的高活性硫醇即为参与氧化还原调控钙通道的关键硫醇(但它们在蛋白上的位置仍待确定),说明这一组硫醇的氧化还原状态与通道的门控机制密切相关。在此文中,我们利用 $[\text{H}^3]$ -ryanodine 结合测最初结合率,测平衡结合度,钙染料测 SR 囊泡的钙流释放率,和荧光光谱方法考察了 CPM 对 1,4NQ 与钙通道相互作用之间的关系,发现 CPM 的靶目标硫醇是参与激活 RyR1 通道的 1,4NQ 的激活部位的硫醇。证据如下:在 SR 被 CPM 标记之后,激活浓度的 1,4NQ 诱导的 $[\text{H}^3]$ -ryanodine 结合度和初结合率明显下降,清洗实验中激活浓度的 1,4NQ 诱导激活相消失,1,4NQ 诱导的钙释放行为消失等。在我们以前的实验结果中已经证明,RyR1 上具有一类能感受胞内氧化还原环境的硫醇,当它们被 CPM 标记之后,RyR1 就失去了对环境的氧化还原状态的感受能力,通过此硫

醇的“感觉”,通道蛋白能通过提高或者降低自身的氧化还原电势调节门控行为;此电势的降低利于通道的开放,它的提高有利于通道的关闭^[7]。另外证明了如果当 SR 样品事先被 1,4NQ 处理过后,CPM 就不能标记到那些高活性的硫醇之上^[5]。从这些实验结果可以看出,1,4NQ 所作用的激活部位的硫醇很可能就是作为 RyR1 氧化还原感受器的那个特异硫醇。考虑到 1,4NQ 是脂溶性的小分子,而 CPM 是较大的分子,我们认为,1,4NQ 有可能跨膜进入 SR 腔内与硫醇发生反应,抑制通道。而 CPM 较难进入 SR 腔内,因此不能干扰 1,4NQ 的抑制作用。

由于 1,4NQ 的氧化还原电位 (+36mV) 大大高于 RyR1 的氧化还原电位 (-157mV^[5,6]),当 1,4NQ 被加入到样品中后,必然对 RyR1 产生氧化胁迫,使该特异硫醇被锁定为某个特定的氧化还原状态,从而通道处于开放状态。从图 1 和图 2 可以看出,CPM 对阻碍 1,4NQ 对通道的激活虽然是明显的但也是不完全的,这可能是因为(1)CPM 没有将所有高活性硫醇都固定住,留有残余的自由高活性硫醇仍然在与 1,4NQ 发生作用;(2)在钙通道的 1,4NQ 激活结合部位上可能有其它的 CPM 不能识别的硫醇参与反应;(3)在此激活部位上除硫醇外,还有其它不同的残基或基团参与,而它们不能被 CPM 识别;(4)非特异敏感性硫醇被 1,4NQ 氧化,此过程产生氧自由基,从而激活 RyR1。在本文中我们还不能判断是哪一种因素在起作用,仍待进行更深入的研究。1999 年 Pessah 提出 1,4NQ 与钙通道进行作用的三中可能的机制:氧化还原循环,芳基化,氧化还原感受器^[5]。他认为第二种模型比较可能,因为通过置换单通道实验池的溶液的方法可以去除掉 1,4NQ 的作用。我们重复了此实验,结果和他的相反,1,4NQ 与通道蛋白的作用不能够通过置换溶液的方法去除,而且本文中的离心清洗实验更是另一个有力的证明。又由于 1,4NQ 被氧化后,必需有氧化剂存在才能使它进入下一次循环,因此第一种机制的可能性不太大。我们比较趋向于第三个模型。考虑到 GSH 能有效消除 1,4NQ 对通道的激活和抑制效应,但也不排除以下可能性:即 1,4NQ 对钙通道的作用涉及到两种机制,一方面 1,4NQ 使通道激活部位的硫醇被氧化使之形成双硫桥,同时通过提高氧化还原电位对作为氧化还原感受器的硫醇发出通道开放的信号。另外,还有一个因素也应该考虑到:1,4NQ 具有强氧化能力,在它被氧化时伴生超氧自由基,随后超氧又被歧化为

H₂O₂, 这些活跃氧物质的累积也会对钙通道复合体产生氧化胁迫, 使门控行为受到影响。虽然我们在以前的工作中使用 SOD 和 catalase 对 1,4-NQ 产生氧自由基的行为作过测试, 但现在看来还不够规范和系统。这方面的工作仍有待进一步的深入。虽然 1,4-NQ 和 CPM 也能与 RyR 之外的蛋白和硫醇发生反应, 但由于 ryanodine 结合的特异性, ryanodine 结合曲线只反应与通道有关的信息而其它的信息则被过滤掉。

在以前我们所假设的双硫醇氧化还原模型中^[10], 提出了钙通道上位于 SR 囊泡外方的一对硫醇, 它们的氧化态对应于通道的开放状态, 还原态对应于通道的关闭状态。本文仅对参与开放通道的硫醇的行为及特性进行了考察, 但对可能存在的另外一对参与通道关闭的硫醇还没有结论, 这是此文留下的几个尚待解释的问题之一: (1) 1,4-NQ 是如何关闭通道的? 是不是通过氧化还原反应与另外一对功能性硫醇发生了反应? (2) 1,4-NQ 具有很强的产生氧自由基的能力, 这些氧自由基是否能够与 CPM 识别的高活性硫醇发生作用从而改变通道蛋白的氧化还原状态? (3) 如果采用提纯的 RyR1 样品, 是否还能观测到 1,4-NQ 对通道的双相性行为? 这些都有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Goin J, Gibson DD, McCay PB, Cadenas E. Glutathionyl and hydroxyl radical formation coupled to the redox transitions of 1,4-naphthoquinone bioreductive alkylating agents during glutathione two-electron reductive addition[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991,288(2):386-396.
- [2] Jordan J, d'Arcy Doherty M, Cohen GM. Effects of glutathione depletion on the cytotoxicity of agents toward a human colonic tumour cell line[J]. *Br Cancer*, 1987, 55(6):627-631.
- [3] Byung Pal Yu. Free Radicals in Aging[M]. Boca Raton: CRC Press, 1993.6-12.
- [4] Igor B. Afanasev. Superoxide Ion: Chemistry and Biological implications[M]. Boca Raton: CRC Press, 1989.20-35.
- [5] Feng W, Liu GH, Xia RH, et al. Site-Selective Modification of Hyperreactive Cysteines of Ryanodine Receptor Complex by Quinones[J]. *Mol Pharm*, 1999,55:821-831.
- [6] Clark WM. Oxidation Reduction Potentials of Organic Systems[M]. Baltimore: Williams & Willkins, 1960. 50-78.
- [7] Xia R, Stangler T, Abramson JJ. Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators[J]. *J Biol Chem*, 2000,275(47):36556-36561.
- [8] Jerry P Eu, Sun JH, Xu L, et al. The Skeletal Muscle Calcium Release Channel: Coupled O₂ Sensor and NO Signaling Functions[J]. *Cell*, 2000,102:499-509.
- [9] Feng W, Liu G, Allen PD, et al. Transmembrane redox sensor of ryanodine receptor complex[J]. *J Biol Chem*, 2000,275(46):35902-7.
- [10] 夏若虹. 1,4-Naphthoquinone 与兔骨肌肌质网钙通道相互作用表现出的双相特性[J]. *生物物理学报*, 1998, 14(3):429-437.
- [11] Liu GH, Abramson JJ, Zable AC, et al. Direct Evidence for the Existence and Functional Role of Hyperreactive Sulfhydryls on the Ryanodine Receptor-Triadin Complex Selectively Labeled by the Coumarin Maleimide 7-(Diethylamino)-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin[J]. *Mole Pharm*, 1993,45:189-200.
- [12] MacLennan DH. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum[J]. *J Biol Chem*, 1970,245:4508-4518.
- [13] Sun J, Xu L, Eu JP, et al. Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel[J]. *J Biol Chem*, 2001,276(19):15625-15630.

CPM INHIBITS THE ACTIVATION OF THE CALCIUM RELEASE CHANNEL OF SKELETAL MUSCLE SARCOPLASMIC RETICULUM INDUCED BY 1,4NQ

XIA Ruo-hong¹, ABRAMSON J.Jonathan², LI Li³, TONG Hua³, YAO Song-nian³

(1. Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2. Physics Department, Portland State University, USA;

3. Chemistry Department, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: By using an alkalating agent 7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) which specifically reacts with hyperreactive thiols in calcium release channel protein RyR1, the biphasic effect of 1,4-naphthoquinone (1,4NQ) on RyR1 was investigated. It shows that CPM could partially block the activation phase of either concentration or time dependence ryanodine binding induced by 1,4NQ, but had no effect on the inhibition phase. The samples were treated with or without CPM in the presence of various concentrations of 1, 4NQ. Results show that neither activation nor inhibition effects of 1,4NQ could be removed by re-spin wash in the absence of CPM; while in the presence of CPM, only the activation effect of 1, 4NQ can be washed out, but not the inhibition effect. All the data suggest that the hyperreactive thiols identified by CPM are involved in the activation effect of 1,4NQ on the channel protein. By blocking the thiols on the activation site of RyR1, CPM inactivates the channel gating.

Key Words: CPM; 1,4NQ; Calcium release channel; Thiol; Activation site; SR