

调控剂的电子传递性质对骨骼肌型 钙释放通道的调控效应研究*

宋维涛 朱倩蓉 叶雁萍 夏若虹**

(华东师范大学物理系, 上海 200241)

摘要 肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)中的钙释放通道利阿诺定受体(ryanodine receptor, RyR)是调控胞浆钙离子浓度的重要蛋白, 其活性受多种调控剂影响. 调控剂的不同电子传递性质可能作用于 RyR 的功能性巯基, 进而影响其门控状态. 了解具有不同电子传递性质的调控剂影响钙通道的作用机制具有重要意义. 本研究采用光子相关光谱法(PCS)、CPM(7-二乙基-3-(4'-马来酰亚胺苯基)4-甲基香豆素)荧光标记法及 $[^3\text{H}]$ -ryanodine 结合等实验, 分别检测多种调控剂对 RyR1 的蛋白及复合体粒度分布、自由巯基量及对通道状态的影响, 利用光漂白法检测各调控剂的电子传递性质. 结果显示, 激活剂和巯基氧化剂具有类似电子受体的性质并产生相似作用, 即自由蛋白粒度增加, 自由巯基量减少, 具有激活通道作用; 抑制剂和巯基还原剂则具有类似电子供体的性质, 作用效果相反.

关键词 钙释放通道, 巯基, 调控剂, 电子传递性质

学科分类号 Q64

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00593

研究发现, 许多重要的离子通道, 如钙释放通道、钾离子通道和钠离子通道等, 都以巯基作为通道功能的活性中心^[1-3]. 巯基易被氧化形成由两个半胱氨酸经过共价连接(二硫键)而成的胱氨酸残基, 后者在体内参与抗氧化和巯基/二硫键交换等多种重要的生理反应, 巯基的氧化还原状态决定了通道的激活与抑制, 并调控通道的开放和关闭.

利阿诺定受体(ryanodine receptor, RyR)/钙释放通道属于动物细胞内膜系统(肌质网和内质网)的钙释放通道家族^[4], 在多种细胞功能中, 尤其在兴奋收缩耦联过程, 扮演了重要角色. 目前哺乳动物中已检测到 3 种不同的通道亚型, 分别为骨骼型(RyR1)、心脏型(RyR2)和脑型(RyR3)^[5-6]. 其中 RyR1 作为最大的通道复合体之一, 富含大量的自由巯基, 对氧化还原环境非常敏感. RyR1 上关键部位巯基的氧化, 可以增强单层膜重组 RyR 的开放活性, 提高钙离子从肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)囊泡中释放的速率, 同时也可以加强 SR 囊泡 $[^3\text{H}]$ ryanodine 结合的能力, 而二硫化物的还原则产生相反的结果^[7-9].

RyR 的功能可受多种氧化还原调控剂影响, 例如巯基氧化剂[醌类、硒化合物、氧化型谷胱甘肽(GSSG)和 Zn^{2+} 等]、巯基还原剂[二硫苏糖醇(DTT)和谷胱甘肽(GSH)]等. 此外, 非氧化还原调控剂如甲基化黄嘌呤衍生物(methylxanthines)包括咖啡因、腺嘌呤核苷等都能促进 RyR 的开放, 而丁卡因、钆红、普鲁卡因、 Mg^{2+} 等对 RyR 则有抑制作用^[10]. 非氧化还原试剂虽然不能完全得到或失去电子, 但由于具有不同的电子传递性质, 能够在一定程度上吸引或排斥电子并导致其电子云发生不同方向的位移, 因此有可能通过各自的电子传递特性来影响 RyR1.

此项研究拟用多种氧化还原调控剂(如 ZnCl_2 、亚硒酸钠、GSSG、DTT 和 GSH 等)和非氧化还原调控剂(如普鲁卡因、咖啡因家族化合物等)对提取

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2011CB503703), 国家自然科学基金资助项目(30770539).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54342955, E-mail: xirren@163.com

收稿日期: 2012-12-04, 接受日期: 2013-03-27

的 RyR1 进行处理, 利用光子相干光谱法(PCS)、7-二乙基-3-(4'-马来酰亚胺苯基)-4-甲基香豆素(7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin, CPM)荧光标记法及光漂白方法来考察各调控剂的电子传递特性对通道调控的影响, 进而理解各种调控剂对离子通道的作用机制及为离子通道病的药物开发提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂: 3-[3-(胆酰氨丙基)二甲胺基]丙磺酸内盐(CHAPS)、哌嗪-N, N'-二(2-乙磺酸)(PIPES)、 Na_2SeO_3 、1,4-萘醌(1,4-NQ)、乙二醇双(氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、茶碱、可可碱、1-甲基黄嘌呤、丁卡因、普鲁卡因二硫苏糖醇(DTT)、亚甲基蓝(methylene blue)、4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(NBD-Cl)等试剂购于 Sigma Chemical Co.; Phosphatidylcholine (鸡蛋卵磷脂, PC) 购自 Molecular Probes Co.; 液闪液(Amersham, NBCS104)、CPM 购于 Invitrogen Corporation; 1 mol/L 氯化钙(CaCl_2)溶液购于 Fluka Co.; Leupeptin 购自北京经科宏达生物技术有限公司; 咪唑购自上海西宝生物有限公司; SephacrylS300HR 购自 Amersham Pharmacia. CPM 溶于 DMSO, 避光存于 -20°C , 使用时稀释至 $10\ \mu\text{mol/L}$, 一次性使用。其他试剂均为国产分析纯。

仪器: 日立(Hitachi)CR22F 型冷冻高速离心机、贝克曼库尔特(Beckman)Optima L-80XP 冷冻超高速离心机、安捷伦 8453 紫外分光光度计、日立 F-4500 型荧光分光光度计、Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪、Labram-1 B 显微拉曼光谱仪(法国 Dilor 公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 SR 囊泡的制备和 RyR1 蛋白提取. 在 MacLennan^[14]的方法基础上, 制备兔骨骼肌 SR 囊泡: 取新西兰白兔后腿及背部骨骼肌, 在首次离心悬浮液中加入 $100\ \text{mmol/L}$ EGTA 和 $100\ \mu\text{mol/L}$ DTT, 最终样品悬浮于含有 $100\ \text{mmol/L}$ KCl, $20\ \text{mmol/L}$ HEPES, pH 7.1 的悬浮液中, 液氮预处理后贮于 -80°C . 采用 West^[12]和尹长城等^[13]的方法提取通道蛋白, 大部分 RyR1 蛋白购于尹长城实验室。

1.2.2 光相干粒度仪观测蛋白质的平均粒径和粒径

分布情况。参考文献方法[14], 将提取的 RyR1 蛋白用测试缓冲液($20\ \text{mmol/L}$ PIPES, $1\ \text{mmol/L}$ CHAPS, $100\ \mu\text{mol/L}$ EGTA, $0.2\ \text{mol/L}$ KCl, pH 7.1)稀释至 RyR1 终浓度为 $10\ \text{mg/L}$, 经装有微孔滤膜(Millipore, $0.22\ \mu\text{m}$)的滤器系统过滤后分装成 $1.5\ \text{ml}$ 的样品, 然后加入不同性质的调控剂混合均匀, 在摇床上震荡 $30\ \text{min}$ 后进行 PCS 检测。使用光源为 $633\ \text{nm}$ 的 HeNe 激光, 检测角度为 173° , 检测温度为 25°C , 溶液的黏度为 1.00 , 溶质和颗粒的散射系数分别为 1.330 和 1.520 , 选择 CONTIN 作为处理数据的方法。

1.2.3 $[\text{H}]\text{-ryanodine}$ 结合实验的测定. $[\text{H}]\text{-ryanodine}$ 结合实验参照 Xia 等^[15]的方法进行: $0.5\ \text{g/L}$ 的 SR 样品悬浮于结合缓冲液($1\ \text{nmol/L}$ $[\text{H}]\text{-ryanodine}$, $14\ \text{nmol/L}$ ryanodine, $250\ \mu\text{mol/L}$ KCl, $15\ \mu\text{mol/L}$ NaCl, $25\ \text{mmol/L}$ Hepes, $50\ \mu\text{mol/L}$ EGTA, $100\ \mu\text{mol/L}$ CaCl_2 , pH 7.1)中。将不同调控剂分别加入实验液中, 37°C 水浴 $3\ \text{h}$. 用 SHB-III 型循环水真空泵抽滤掉游离的 ryanodine. 非特异性结合由终溶液中加入 200 倍的 ryanodine 所获得。总放射性(total)由在 $50\ \mu\text{l}$ 终溶液中加入 $3\ \text{ml}$ 闪烁液(购于 Amersham 公司, NBCS104)获得。其余样品均置于 $3\ \text{ml}$ 闪烁液中摇床过夜, 再由液闪计数器(Beckman LS-6500)测得 $[\text{H}]$ 放射性计数值(cpm)。特异性结合度=总结合度-非特异性结合度。特异性计数值(cpm), 代入以下公式计算出特异性结合率 B 。

$$B/(\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{(SP - NSP) \cdot [Ry] \cdot V}{T \cdot [SR] \cdot V_{\text{act}}}$$

其中, SP : 各样品的 cpm; NSP : 非特异性结合样品的 cpm; T : 总放射性 total 的 cpm; $[Ry]$: 总 ryanodine 浓度; $[SR]$: SR 的浓度; V : total 样品的总体积; V_{act} : 样品反应体积。每次实验中的每个样品有 2 个重复样, 结合值是这两个重复组 cpm 值的平均值计算获得。 n 为重复实验个数。

1.2.4 提纯 RyR1 自由巯基量的测定. 测定提纯 RyR1 上自由巯基数量参照 Xia 等^[15]的方法, 但重新设定了两个避光反应时间。具体如下: 在不同电子传递性质调控剂存在或不存在时, 终浓度为 $0.25\ \text{mg/L}$ 提纯 RyR1 样品悬浮于测试液($250\ \text{mmol/L}$ KCl, $15\ \text{mmol/L}$ NaCl, $20\ \text{mmol/L}$ HEPES)中, 在 25°C 避光反应 $30\ \text{min}$, 再加入 $10\ \mu\text{mol/L}$ CPM 混合均匀, 总容积为 $1.6\ \text{ml}$. 避光反应 $30\ \text{min}$. 用日立 F-4500 型荧光分光光度计检测溶液的荧光值(激

发波长为 385 nm, 发射波长为 465 nm 处). 每个样品检测 3 次取平均值. 每次实验有 3 个重复组.

1.2.5 光漂白实验. 参考 Marinov 的方法^[6], 在暗室中将一定浓度的待测试剂加入测试液中, 用 4500LM 强度的光照射比色皿, 同时利用紫外 - 可见分光光度计的动力学模式检测 663 nm(亚甲蓝), 以及 470 nm(NBD-Cl)处吸光度随时间的变化. 其中, 电子受体用测试液 1(1 mmol/L Tris, pH 7.3, 50 μ mol/L NADH, 10 μ mol/L 亚甲蓝, 100 μ mol/L NBD-Cl)进行检测; 电子供体用测试液 2[80% DMSO, 20%缓冲液(1 mmol/L Tris, pH 7.3), 10 μ mol/L 亚甲蓝, 100 μ mol/L NBD-Cl]进行检测. 每次实验有 3 个重复组.

1.2.6 统计学处理. 应用 Sigma Plot 8.0 软件对数据绘图和对数据进行线性或非线性回归处理, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为有显著性差异. *n* 表示试验重复次数或者有效通道个数. 图中 *n* 表示重复实验次数.

2 结 果

2.1 通道蛋白之间相互作用的考察

2.1.1 氧化剂和非氧化型激活剂导致大分子交联复

合物增多. 经过巯基氧化剂(GSSG 和 Na_2SeO_3)和通道激活剂[1- 甲基黄嘌呤(1-methylxanthine)、茶碱(theophylline)、可可碱(theobromine)、咖啡因(cafeine)等]处理后, RyR1 的平均粒径都有不同程度的上升(图 1a), 由对照组的 31.4 nm, 分别增大至 65.1、58.4、50.9、45.2、54.6、55.8 和 56.5 nm. 参考蔡知音等^[17]有关检测氧化剂导致蛋白 cross-linking 的实验结果, 可知在此条件下 RyR 已经形成了蛋白交联, 纳米粒度仪(PCS)通过收集和分析溶液中颗粒对光线的散射信号, 能灵敏地测量溶液中颗粒的统计学粒径分布, 并给出颗粒的数学平均粒径(Z-ave), 在实验中, Z-ave 越大代表溶液中聚集物越多、粒径越大, 也就间接表明了 RyR 之间相互作用越大. 利用随机软件 CONTIN 进行数据处理. 分析结果显示, 大分子交联复合物所占比例增加(图 1b), 从对照组的 20.6%(Con), 分别增加至 61.8% (GSSG)、54.7% (Se)、30.0% (1, 4-NQ)、40.5%(1-methylxanthine)、41.9%(theophylline)、47.5% (theobromine)和 42.8%(cafeine), 这很可能是由于通道处于开放状态和复合体增加所致. 与氧化剂相比, 属于非氧化型激活剂的咖啡因家族化合物对通道蛋白的作用略显微弱.

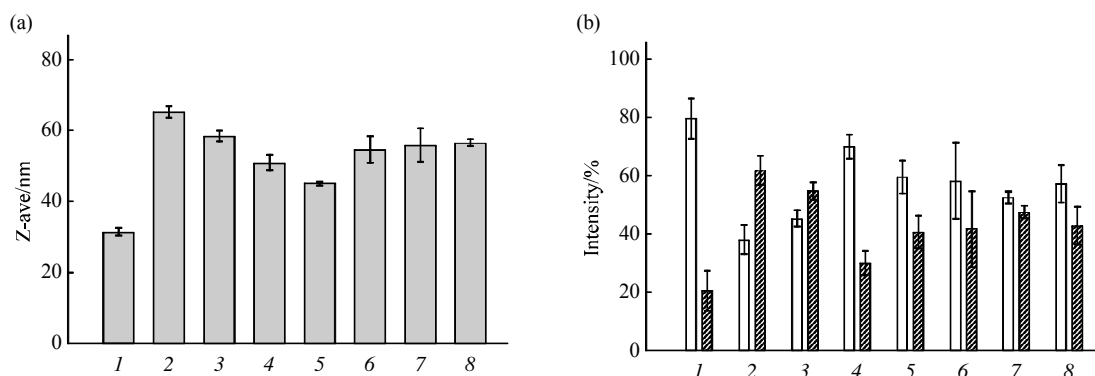


Fig. 1 Channel activators and thiol oxidants increase the size of the protein crosslinking clusters

(a) Channel activators and thiol oxidants increase the Z-average of RyRs. (b) Channel activators and thiol oxidants increase the distribution of RyR clusters. [RyR1]: 10 mg/L; 1: Control; 2: 10 μ mol/L GSSG; 3: 30 μ mol/L Na_2SeO_3 ; 4: 50 μ mol/L 1, 4-NQ; 5: 2 mmol/L 1-methylxanthine; 6: 2 mmol/L theophylline; 7: 2 mmol/L theobromine; 8: 2 mmol/L Caffeine. $\square$: RyR(%); ▨ : Clusters(%). The data shown are the $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$).

2.1.2 还原剂和抑制剂导致大分子交联复合物减少. 通道的巯基还原剂(DTT、GSH)和抑制剂(tetracaine、procaine 和 RR)的作用是使平均粒径减小(图 2a), 由原先的 31.4 nm(CON), 分别减小至 26.6、29.6、26.8、26.7 和 23.9 nm. 大分子复合物所占比例下降, 甚至完全消失(图 2b). 其中,

procaine 使大分子复合物比例由原来的 20.6%下降至 1.4%, 其他 4 组中大分子复合物均完全消失. 这说明通道可能在还原剂和抑制剂的作用下处于关闭状态, 导致粒径变小, 同时导致蛋白复合体解体.

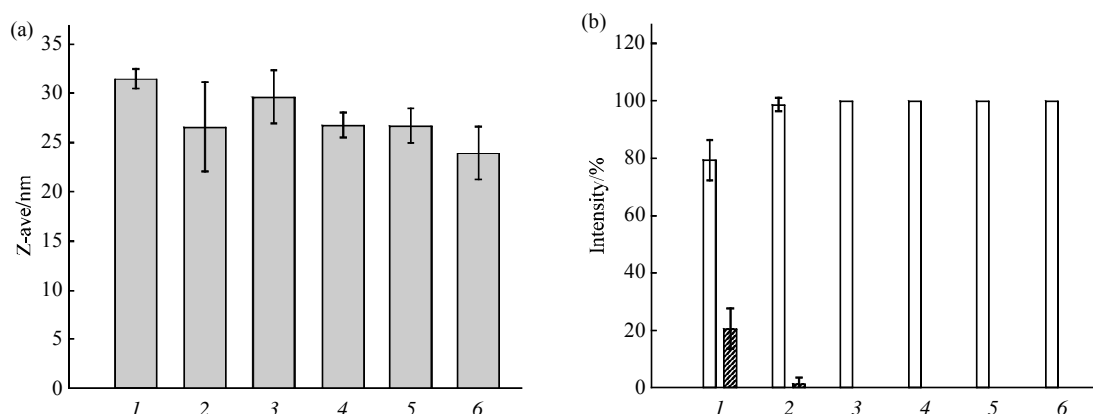


Fig. 2 Channel inhibitors and thiol reducers decrease the size of the protein crosslinking clusters

(a) Channel inhibitors and thiol reducers decrease the Z-ave of RyRs. (b) Channel inhibitors and thiol reducers decrease the distribution of RyR clusters. [RyR1]: 10 mg/L; 1: Control; 2: 500 $\mu\text{mol/L}$ procaine; 3: 500 $\mu\text{mol/L}$ tetracaine; 4: 1 $\mu\text{mol/L}$ RR; 5: 10 mmol/L DTT; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ GSH. $\square$: RyR(%); $\blacksquare$: Clusters(%). The data shown are the $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$).

2.2 通道调控剂的门控效果考察

前期工作已经证明, 本实验中所采用的激活剂均能有效激活通道, 其中 ryanodine、Se、1, 4-NQ、NADH 和咖啡因等能导致重组 RyR1 单通道开放, 除咖啡因家族的试剂外, 均能导致提取的 SR 囊泡钙释放。而所考察的抑制剂均能有效地抑制通道开放和 SR 囊泡钙释放^[9, 16, 18-19], 因此, 实验所考察的所有调控剂已经证明有确定的激活或抑制 RyR1 的性质。本实验将通过检测 ryanodine 结合的方法来考察这些通道调控剂对 RyR 调控的影响。

从图 3 中可以看出, 咖啡因家族化合物均对钙释放通道的活性产生了一定程度的影响, 氧化剂 GSSG(10 $\mu\text{mol/L}$, 阳性对照), 激活剂 caffeine (1 mmol/L)、theophylline(1 mmol/L)和 theobromine (1 mmol/L)分别使通道结合能力上升了 37%、44%、30%和 24%。还原剂 GSH(100 $\mu\text{mol/L}$, 阳性对照)、DTT(10 mmol/L), 抑制剂 procaine(500 $\mu\text{mol/L}$)、tetracain(500 $\mu\text{mol/L}$)和 Mg^{2+} (1 mmol/L, 阳性对照)分别使通道结合能力下降了 74%、61%、22%、28%和 43%。

2.3 通道蛋白相关巯基信号考察

2.3.1 激活剂和氧化剂使通道蛋白自由巯基数量减少。 ZnCl_2 和 Na_2SeO_3 是巯基氧化剂, 它们对 RyR1 的调控作用是双相性的, 随着浓度变化呈现出先激

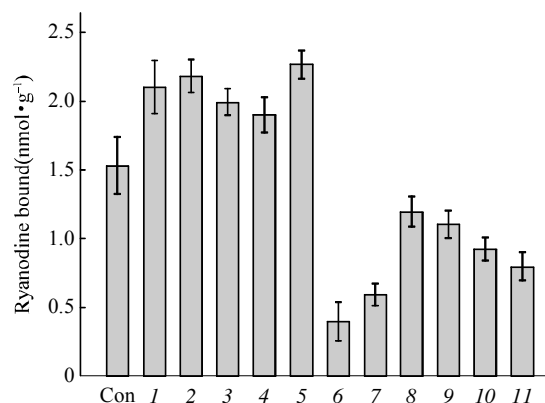


Fig. 3 The effects of channel modulators on the [³H]-ryanodine bindings

0.5 g/L SR vesicles were incubated in binding buffer in the absence (Con) or presence of different oxidizing agents with 1 nmol/L [³H] ryanodine at 37 °C for 3 h. Con: Control; 1: 10 $\mu\text{mol/L}$ GSSG; 2: 1 mmol/L caffeine; 3: 1 mmol/L theophylline; 4: 1 mmol/L theobromine; 5: 1 mmol/L NADH; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ GSH; 7: 10 mmol/L DTT; 8: 500 $\mu\text{mol/L}$ procaine; 9: 500 $\mu\text{mol/L}$ tetracain; 10: 1 mmol/L EGTA; 11: 1 mmol/L Mg^{2+} . Control: $n=6$. The rest: $n=3$.

活后抑制特性^[17, 20]。实验结果发现, 当 ZnCl_2 浓度在 $\mu\text{mol/L}$ 量级时, 荧光强度迅速下降(图 4a)。分

别加入 10 和 30 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 时, 强度各下降 60.8% 和 74.5%. 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 Na_2SeO_3 使自由巯基信号下降了 74.4%, 咖啡因、茶碱、可可碱、NADH 和 ryanodine 也能够降低 RyR 上自由巯基的数量, 下降的幅度分别为 57.2%、38.4%、33.5%、85.4%、67.2% 和 23%.

2.3.2 抑制剂和还原剂导致通道蛋白自由巯基数

量增加. 抑制剂和巯基还原剂能够增加通道蛋白上自由巯基的数量. 如图 4b 所示, 经过 procaine (500 $\mu\text{mol/L}$), tetracaine (500 $\mu\text{mol/L}$), MgCl_2 (1 mmol/L)、EGTA (1 mmol/L) 和 DTT (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, CPM 标记的巯基数量分别增加了 16.2%、23.7%、17%、24% 和 61.3%.

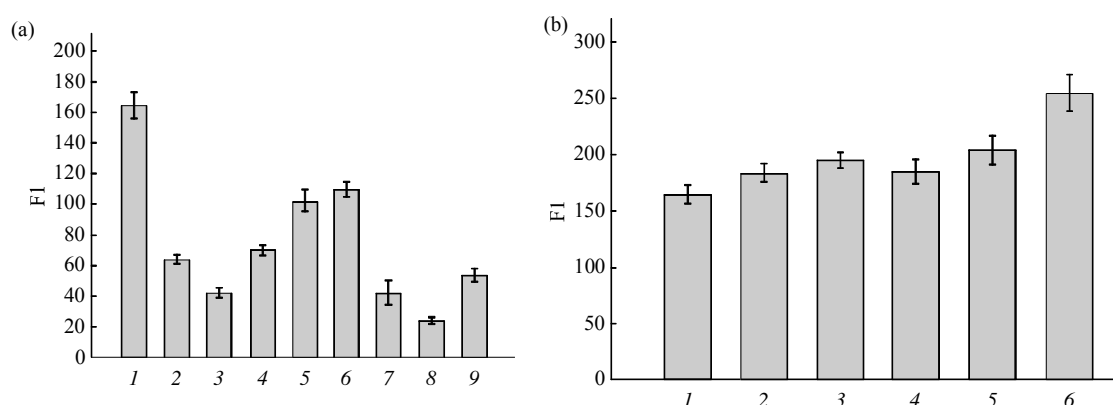


Fig. 4 RyR modulators affect the free thiols on RyR

(a) Channel activators and thiol oxidants reduce the number of reactive thiols on the RyR. 1: Control; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 ; 3: 30 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 ; 4: 500 $\mu\text{mol/L}$ caffeine; 5: 500 $\mu\text{mol/L}$ theophylline; 6: 500 $\mu\text{mol/L}$ theobromine; 7: 30 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 ; 8: 10 mmol/L NADH; 9: 300 $\mu\text{mol/L}$ ryanodine. The data shown are the $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$). (b) Channel inhibitors and thiol reducers increase the number of reactive thiols on the RyR. [RyR1]: 0.2 mg/L; [CPM]: 10 $\mu\text{mol/L}$; 1: Control; 2: 500 $\mu\text{mol/L}$ procaine; 3: 500 $\mu\text{mol/L}$ tetracaine; 4: 1 mmol/L MgCl_2 ; 5: 1 mmol/L EGTA; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ DTT. The data shown are the $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$).

2.4 光漂白方法检测电子传递性质

2.4.1 氧化还原调控剂的电子传递性质. 本实验中, 利用光漂白方法检测了各氧化还原调控剂的电子传递性质, 并以巯基氧化剂 GSSG 和 Na_2SeO_3 光漂白信号的变化, 对氧化剂的电子传递性质进行验证, 并作为一个电子受体的阳性对照标定. 如图 5a 所示, 第 82 s 时, 对照组中光漂白信号下降了 54.0%, 分别加入巯基氧化剂 Na_2SeO_3 和 GSSG 后, 使光漂白信号下降了 36.4% 和 42.0%. 如图 5b, 第 82 s 时, 对照组使光漂白信号下降了 54.0%, 说明它们属于电子受体. 并以 DTT 和 GSH 作为电子供体的阳性对照组, 结果显示 DTT 和 GSH 分别使光漂白信号下降了 85.2% 和 84.3%, 下降程度远远大于对照组, 说明它们属于电子供体.

2.4.2 非氧化还原调控剂的电子传递性质.

已有研究发现, 咖啡因、可可碱、茶碱和 1-甲基黄嘌呤均具有激活通道的功能, 结果如图 5c 所示, 第 82 s 时, 对照组中光漂白信号下降了 54.0%, 咖啡因、可可碱、茶碱和 1-甲基黄嘌呤分别使光漂白信号下降了 46.8%、50.1%、49.8% 和 51.5%, 由此可知, 它们的电子传递性质类似于电子受体.

Tetracaine、procaine 和 RR 均为通道抑制剂, 不具有明显的还原效果. 如图 5d 所示, 第 82 s 时, 对照组使光漂白信号下降了 54.0%, tetracaine、procaine 和 RR 分别削弱光漂白信号至 68.0%、71.1% 和 69.2%, 说明它们的性质类似于电子供体.

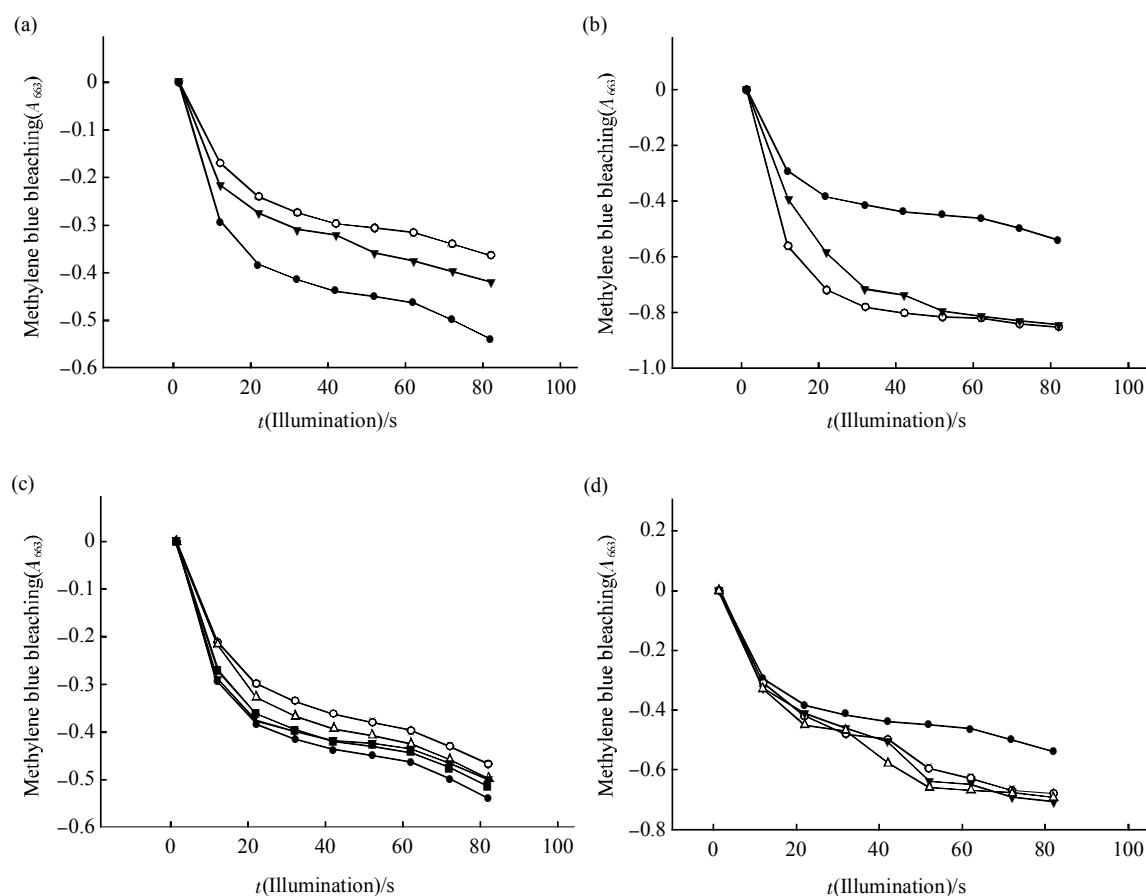


Fig. 5 Results of photon bleaching assay about electron transfer properties of modulators

(a) Oxidants are electron acceptors ([Na_2SeO_3]: 1 mmol/L; [GSSG]: 1 mmol/L). ●—●: Control; ○—○: Na_2SeO_3 ; ▼—▼: GSSG. (b) Reductants are electron donors ([DTT]: 50 $\mu\text{mol/L}$; [GSH]: 50 $\mu\text{mol/L}$). ●—●: Control; ○—○: DTT; ▼—▼: GSH. (c) Activators are electron acceptors ([caffeine]: 1 mmol/L; [theobromine]: 1 mmol/L; [theophylline]: 1 mmol/L; [1-MXT]: 1 mmol/L). ●—●: Control; ○—○: Caffeine; ▼—▼: Theobromine; ▲—▲: Theophylline; ■—■: 1-MXT. (d) Inhibitors are electron donors ([tetracaine]: 50 $\mu\text{mol/L}$; [procaine]: 50 $\mu\text{mol/L}$; [RR]: 50 $\mu\text{mol/L}$). ●—●: Control; ○—○: Procaine; ▼—▼: Tetracaine; ▲—▲: RR.

3 讨 论

前期研究发现, 萘醌类化合物、硒化合物导致的氧化胁迫状态, 可使通道蛋白的巯基发生氧化, 产生大分子聚合物, 表现为蛋白质平均粒径增大。在高浓度氧化剂导致的过氧化环境下, 由于蛋白上的巯基被氧化, RyR1 与其他钙调控相关蛋白(钙泵、Myosin 等 SR 蛋白)间发生错误交联可形成大分子复合物^[17], 对 RyR 的调控具有低浓度激活和高浓度抑制的双相调控性。本研究发现, 氧化剂和激活剂可以增大蛋白质平均粒径, 提高大分子交联复合物比例, 而还原剂和抑制剂则减小蛋白质平均粒径, 降低大分子交联复合物所占比例, 甚至使其完全消失。从中可以推测, 氧化剂和激活剂可能使

RyR1 之间产生相类似的交联效应, 对应通道开放状态; 并且与还原剂和抑制剂的调控效应相反。

众多研究一致证实, 调控剂若能激活 RyR 通道的开放而促进 SR 囊泡的 Ca^{2+} 释放, 通常也导致 [^3H]-ryanodine 结合度上升。反之亦然, 如果 RyR 被抑制而降低, 阻止 SR 囊泡的 Ca^{2+} 释放, 也引起 [^3H]-ryanodine 结合度下降。因此, ryanodine-RyR 的结合度能较好地反映 RyR 的开放状态。 [^3H]-ryanodine 结合实验显示, 氧化剂 GSSG 和咖啡因家族化合物促进通道打开, 还原剂和抑制剂则能导致通道关闭。在氧化胁迫条件下, RyR1 上自由巯基的数目会减少 80%左右^[20], RyR1 与 [^3H]-ryanodine 结合能力大幅下降, 表明氧化胁迫严重抑制了钙释放通道 RyR1 的活性^[21]。这进一步提示, 调控剂对

通道门控的作用很可能与它们的巯基数目密切相关。巯基作为一种活泼的基团,很容易受氧化还原环境的影响,而生物组织内的氧化还原环境主要由电子供体/受体分子提供,因此氧化剂和激活剂可能具有相类似的电子传递性质。

光漂白方法检测中发现,RyR通道的激活剂(如 *caffeine* 和 *theophylline*)和巯基氧化剂 Na_2SeO_3 均能增强光漂白效应,证明都是电子受体,而抑制剂(如 *tetracaine*、*procaine* 和 *RR*)和巯基还原剂(*DTT* 和 *GSH*)均能削弱光漂白,表明都是电子供体。

通过 CPM 荧光标记法和表面增强拉曼光谱法研究,可以发现电子受体使通道的自由巯基数量不同程度降低,二硫键信号增强,而电子供体则恰恰相反。

在本论文中,利用光漂白方法对具有激活剂或抑制剂性质的调控剂进行检测,发现所检测的调控剂的电子传递性质与它们对 RyR1 的调控效应和自由巯基数量变化之间具有对应关系。对部分调控剂的电子传递性质进行了鉴定与分类,发现所考察的氧化剂和非氧化性激活剂均具有电子受体性质^[2],可引起 RyR1 巯基数量减少,RyR1 平均粒度增大和发生聚集,并导致 *ryanodine* 结合上升。还原剂和抑制剂则具有电子供体性质,引起巯基数量增多,使 RyR1 以单体形式存在,从而抑制了 *ryanodine* 结合。这说明,调控剂的电子传递性质能在一定程度上影响活性巯基的状态,使巯基-二硫键动态平衡发生移动,并推测不具有明显氧化还原性质的调控剂,可能通过吸引或排斥电子云,来干扰巯基-二硫键动态平衡状态。而且自由巯基有着对通道门控状态十分敏感的氧化还原电位^[23]。加入非巯基通道激活剂时,这些巯基的氧化还原电位偏向于更负的状态,导致其更易被氧化。相反,加入非巯基抑制剂时,这些巯基的电位偏向于更正状态,使其更容易被还原^[23]。巯基氧化还原状态的变化引起 RyR1 间相互作用的改变,并激活/抑制通道的开放,进而调节 SR 钙离子调动。激活剂导致 RyR 的开放可能是由于 RyR 上相关调控位点的巯基电子云被调控剂电子云吸引而变稀薄所致。抑制剂导致通道的关闭可能是由于蛋白上相关调控位点的巯基电子云被调控剂的电子云推挤而密度增加所致。在生理条件下,通道的门控过程是迅速且可逆的动态过程,但在人为调控过程中,通道调控剂可能通过引起蛋白关键区域的电子云密度的变化来影

响通道的活性。

目前,对 RyR 通道疾病的药物治疗还受到膜渗透率低、缺乏特异性、对 RyR 亚型的选择性低等一些问题的困扰,因此需要寻求新的方法,开发出更有效的新型药物。本研究中根据电子传递性质对调控剂进行筛选分类的方法,可能为未来的药物设计和活性位点的改造提出一种新的思路。我们的研究表明,有可能对不同结合位点的通道配体进行改造,使其成为所设计的电子传递性质的调控剂,对 RyR 进行更好的定位和效果调控。

参 考 文 献

- [1] Sun J, Xu L, Eu J P, *et al.* Classes of thiols that influence the activity of skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem*, 2001, **276**(19): 15625-15630
- [2] Yi L, Morgan J T, Ragsdale S W. Identification of a thiol/disulfide redox switch in the human BK channel that controls its affinity for heme and CO. *J Biol Chem*, 2010, **285**(26): 20117-20127
- [3] Kellenberger S, Gautschi I, Pfister Y, *et al.* Intracellular thiol-mediated modulation of epithelial sodium channel activity. *J Biol Chem*, 2005, **280**(9): 7739-7747
- [4] Fill M, Copello J A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev*, 2002, **82**(4): 893-922
- [5] Meissner G. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol*, 1994, **56**: 485-508
- [6] Sutko J L, Airey J A, Welch W, *et al.* The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol Rev*, 1997, **49** (1): 53-98
- [7] Abramson J J, Buck E, Salama G, *et al.* Mechanism of anthraquinone-induced calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1988, **263**(35): 18750-18758
- [8] Zable A C, Favero T G, Abramson J J. Glutathione modulates ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for redox regulation of the Ca^{2+} release mechanism. *J Biol Chem*, 1997, **272**(11): 7069-7077
- [9] Xia R H, Ganther H E, Egge A, *et al.* Selenium compounds modulate the calcium release channel/ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle by oxidizing functional thiols. *Biochem Pharmacol*, 2004, **67**(11): 2071-2079
- [10] Laporte R, Hui A, Laher I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev*, 2004, **56**(4): 439-513
- [11] MacLennan D H. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1970, **245**(17): 4508-4518
- [12] West D J, Smith E C, Williams A J. A novel and rapid approach to isolating functional ryanodine receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **294**(2): 402-407
- [13] 韩红梅, 韦日生, 尹长城. 一种快速大量纯化骨骼肌 Ryanodine

- 受体的方法. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, **22**(9): 755–760
- Han H M, Wei R S, Yin C C. Chin J Biochem Mol Biol, 2006, **22**(9): 755–760
- [14] 胡晓芳, 陈克樱, 夏若虹, 等. 应用 PCS 和 AFM 研究单价阳离子和通道功能状态对兔骨骼肌 ryanodine 受体(钙释放通道)相互作用的影响. 电子显微学报, 2003, **22** (2): 105–109
- Hu X F, Chen K Y, Xia R H, *et al.* J Chin Electron Microscopy Society, 2003, **22** (2): 105–109
- [15] Xia R H, Ganther H E, Egge A, *et al.* Selenium compounds modulate the calcium release channel/ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle by oxidizing functional thiols. Biochem Pharmacol, 2004, **67**(11): 2071–2079
- [16] Marinov B S, Olojo R O, Xia R H, *et al.* Non-thiol reagents mediate ryanodine receptor function by redox interactions that modify reactive thiols. Antioxid Redox Signal, 2007, **9**(5): 609–621
- [17] 蔡知音, 张玉焜, 叶燕萍, 等. 超氧中介巯基氧化剂对骨骼肌型钙释放通道的调控作用. 航天医学和医学工程, 2008, **21** (6): 455–461
- Cai Z Y, Zhang Y K, Ye Y P, *et al.* Space Medicine & Medical Engineering, 2008, **21**(6): 455–461
- [18] Xia R H, Webb J A, Gnall L M, *et al.* Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH dependent oxidase that generates superoxide. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, **285**(1): C215–221
- [19] Pessah I N, Stambuk R A, Casida J E. Ca^{2+} -activated ryanodine binding: mechanism of sensitivity and intensity modulation by Mg^{2+} , caffeine, and adenine nucleotides. Mol Pharmacol, 1986, **31**(3): 232–238
- [20] Xia R H, Cheng X Y, Wang H. Biphasic modulation of ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum vesicles of skeletal muscle by Zn^{2+} ions. Biochem J, 2000, **345**(Pt 2): 279–286
- [21] 张玉焜, 蔡知音, 朱倩蓉, 等. 氧化胁迫对骨骼肌型钙释放通道与相关蛋白作用的影响. 华东师范大学学报(自然科学版), 2010, **2**(2): 92–101
- Zhang Y K, Cai Z Y, Zhu Q R, *et al.* J East Chin Normal University (Natural Science), 2010, **2**(2): 92–101
- [22] Olojo R O, Xia R H, Abramson J J. Spectrophotometric and fluorometric assay of superoxide ion using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole. Analytical Biochemistry, 2005, **339** (2): 338–344
- [23] Xia R H, Stangler T, Abramson J J. Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well-defined redox potential that is sensitive to channel modulators. J Biol Chem, 2000, **275** (47): 36556–36561

The Effects of Ryanodine Receptor Modulators on The Calcium Release Channel Functions According to Their Electron Transfer Properties*

SONG Wei-Tao, ZHU Qian-Rong, YE Yan-Ping, XIA Ruo-Hong**

(Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract Ryanodine receptor (RyR) locating in the sarcoplasmic reticulum(SR) is one of the most important calcium release channels. It is known that RyR is rich in functional thiol groups, which play crucial roles in controlling channel gating, therefore the protein is quite sensitive to the redox environment. The main purpose of this research is to understand how the RyR1 modulators in general affect the channel gating according to their electron transfer properties. In this research, methods such as CPM labeling, photon correlation spectroscopy (PCS) and [³H]-ryanodine binding experiments were used to detect the change of free thiols' population, the diameter and distribution of protein complex and the gating state of RyR1. Furthermore, we used photon bleaching assay to determine the electron transfer property of the modulators. The results show that the channel activators and thiol oxidants appear to be electron acceptors that affect RyR1 in the same manner, which is to decrease the free thiols on RyR1 and to increase the size of the protein crosslinking clusters. In contrary, channel inhibitors and thiol reductants appear to be electron donors and their effects on RyR1 are opposite to activators and oxidants. Therefore, we propose that the similar electron transfer properties of channel modulators results in the similar effects on RyR1 by changing the local redox environment around the active thiols, inducing changes in thiol/disulfide balance and RyR1 gating.

Key words Ca²⁺ release channel, thiol, modulator, electron transfer property

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00593

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China and The National Natural Science Foundation of China (30770539)

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54342955, E-mail: xirren@163.com

Received: December 4, 2012 Accepted: March 27, 2013