

## 淋巴细胞 $\beta$ 肾上腺素受体特征及 $\beta$ 阻滞剂的亲和力比较

余细勇 饶曼人 林曙光<sup>①</sup> 韩启德<sup>②</sup>

(南京医科大学心血管药理研究室, 南京 210029)

### Characteristics of $\beta$ -Adrenergic Receptors and Activities of $\beta$ -blocking Agents in Human Lymphocyte

YU Xi-Yong, RAO Man-Ren, LIN Shu-Guang<sup>①</sup> and HAN Qi-De<sup>②</sup>

(Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

#### ABSTRACT

**Aim** To clarify the characteristics of  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes in human lymphocyte and compare the competitive activities of various  $\beta$ -blocking agents.

**Methods** Lymphocyte which derived from normal volunteers were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque solution. The  $\beta$ -adrenergic receptors were measured using hydrophilic radioligand  $^3\text{H}$ -CGP12177 and lipophilic radioligand  $^3\text{H}$ -DHA and  $^{125}\text{I}$ -pindolol. The competition curves were performed in the presence of  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  or  $\beta_3$ -receptor subtype antagonist.

**Results** Specific binding of three radioligands were saturable. In competition curves, butoxamine, a selective  $\beta_2$ -receptor antagonist, was much more potent in displacement of the radioligands than atenolol, a selective  $\beta_1$ -receptor antagonist. Propranolol, a nonselective  $\beta$ -receptor antagonist, inhibited stereoselectively the specific binding sites with S(—)-propranolol 3~10 times more potent than the R(+)-propranolol. It is very interesting that SR59230A, a selec-

tive  $\beta_3$ -receptor antagonist, was of some potency to displace  $^3\text{H}$ -CGP12177 and  $^{125}\text{I}$ -pindolol on intact lymphocytes.

**Conclusion**  $\beta$ -Adrenergic receptors in human lymphocyte were dominated by  $\beta_2$ -receptor subtype, but the intact cells also showed an evidence of  $\beta_3$ -receptor subtype distribution.

**KEY WORDS** Lymphocyte;  $\beta$ -Adrenergic receptor;  $\beta$ -Blocker; Receptor binding assay

**摘要** 为比较  $\beta_1$ 、 $\beta_2$  和  $\beta_3$  肾上腺素受体亚型阻滞剂对淋巴细胞  $\beta$  受体的亲和力, 采用放射性配基  $^3\text{H}$ -DHA、 $^3\text{H}$ -CGP 和  $^{125}\text{I}$ -pindolol 对人外周循环血淋巴细胞进行受体结合分析。结果发现,  $\beta_2$  受体亚型阻滞剂的受体拮抗效应最强,  $\beta_3$  受体亚型阻滞剂具有一定的受体拮抗效应,  $\beta_1$  受体亚型阻滞剂的受体拮抗效应最弱, 而非选择性  $\beta$  受体阻滞剂普萘洛尔的两种对映体 S(—)型和 R(+ )型的受体亲和力相差只有 3~10 倍。提示淋巴细胞  $\beta$  受体以  $\beta_2$  亚型为主,  $\beta_1$  亚型较少, 而且可能存在  $\beta_3$  亚型。

**关键词** 淋巴细胞;  $\beta$  肾上腺素受体;  $\beta$  阻滞剂; 受体结合分析

人外周血循环淋巴细胞(lymphocyte, LC)已成为研究人体  $\beta$  肾上腺素受体调节的经典模型<sup>[1]</sup>。一般认为淋巴细胞存在  $\beta_2$  肾上腺素受体<sup>[2]</sup>, 但对淋巴细胞  $\beta$  肾上腺素受体的特征所知甚少。本课题分别以亲水性  $^3\text{H}$ -CGP12177、亲脂性  $^3\text{H}$ -双氢烯丙洛尔( $^3\text{H}$ -DHA)和  $^{125}\text{I}$ -吲哚洛尔( $^{125}\text{I}$ -pindolol)对淋巴细胞进行受体结合分析, 比较  $\beta_1$ 、 $\beta_2$  和  $\beta_3$  受体亚型阻滞剂对人体淋巴细胞  $\beta$  受体的亲和力, 从分子水平阐明淋巴细胞  $\beta$  肾上腺素受体特征

国家自然科学基金资助项目(批准文号 39470823)

①广东省心血管病研究所, 广州 510080

②北京医科大学第三医院血管医学研究所, 北京 100083

和药物的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

$^3\text{H}$ -CGP12177 购自 NEN(美国 DuPont, 比放射性 44.5 kCi/mol),  $^3\text{H}$ -DHA 购自中国原子能研究院(比放射性 41 kCi/mol),  $^{125}\text{I}$ -pindolol 采用氩胺 T 法自行标记(比放射性 200 kCi/mol)。S(-)-普萘洛尔(S(-)-propranolol, S(-)-PPL)、R(+)-普萘洛尔(R(+)-propranolol, R(+)-PPL)、选择性  $\beta_1$  受体阻滞剂阿替洛尔(atenolol, AT)和选择性  $\beta_2$  受体阻滞剂 Butoxamine 均购自 Sigma 公司, 4-羟普萘洛尔(4-hydroxypropranolol, 4-OH-P)从英国帝国大药厂(Imperial Chemical Industries)获得, 选择性  $\beta_3$  受体阻滞剂 SR59230A<sup>[3]</sup>由意大利 Dr. Manara 惠赠。

IL-6R 台式冷冻离心机为美国 Beckman 公司产品, 1209 型液体闪烁计数仪和 1275 型  $\gamma$  计数仪为瑞典 Pharmacia (LKB) 公司产品, ZT-IIB 型多头细胞收集器为浙江绍兴卫星机械厂产品。

### 1.2 淋巴细胞的分离与制备

**1.2.1 淋巴细胞的分离** 健康男性 12 例(23~36 岁), 分别抽取外周静脉全血 60 mL 于肝素化抗凝管中, 用 PBS(pH7.6)将其稀释 1 倍, 然后用淋巴细胞分离液(密度 1.077 kg/L)进行密度梯度离心(500 $\times$ g, 30 min), 得到外周血单个核细胞(含 90% 淋巴细胞), 用 DMEM 培养液(含 20% 胎牛血清)调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$ /L, 贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

**1.2.2 淋巴细胞膜的制备** 取淋巴细胞( $1 \times 10^9$  个/L), 加低渗裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mmol/L EDTA, pH7.6) 0.5 mL, 置于-35 $^{\circ}\text{C}$  冰箱 1 h, 然后取出置于 20 $^{\circ}\text{C}$  水浴溶解, 旋转振荡 30 s, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心(400 $\times$ g, 5 min), 上清液转至另一 Eppendorf 管, 沉淀加低渗裂解液 0.5 mL 重复裂解一次, 合并两次裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心(10 000 $\times$ g, 30 min), 沉淀加膜保存液(250 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH7.5) 0.1 mL 悬浮, 贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。膜蛋白含量采用 BCA 法<sup>[4]</sup>测定。

### 1.3 配基结合分析

**1.3.1 受体结合试验** 结合反应在 PBS 缓冲液(pH 7.6)中进行, 其中完整淋巴细胞的浓度为  $1 \times 10^6$ /L(或者  $1 \times 10^9$  个/L 细胞的膜蛋白, 约为 200 mg), 反应总体积 0.25 mL, 加入不同浓度  $^3\text{H}$ -DHA(0.3~10 nmol/L)、 $^3\text{H}$ -CGP(0.4~12.5 nmol/L)或  $^{125}\text{I}$ -

pindolol(6~300 pmol/L), 反应液中分别含或无 PPL( $10^{-5}$  mol/L), 以区别配基的特异性或非特异性结合。

$^3\text{H}$ -DHA 和  $^3\text{H}$ -CGP 反应管置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育 18~20 h,  $^{125}\text{I}$ -pindolol 反应管置于 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 30 min, 以冰冷的 10 mmol/L Tris-HCl 液(pH7.6) 3 mL 快速终止反应, 迅速通过玻璃纤维滤纸(上海红光造纸厂 49 型), 负压滤过, 继续以 3 mL Tris-HCl 液冲洗两次, 负压抽干, 取出滤膜, 分别置于 5 mL 闪烁液(LKB 公司)或干燥的放射免疫管中, 液体闪烁或  $\gamma$  计数仪计数。特异性结合对游离放射性配基浓度作图, 得饱和曲线, 经 Ligand 软件分析求得平衡解离常数  $K_d$  和最大结合量  $B_{\text{max}}$ 。

**1.3.2 竞争性抑制曲线实验** 反应体积同受体结合实验, 反应液中  $^3\text{H}$ -DHA 浓度为 5 nmol/L,  $^3\text{H}$ -CGP 浓度为 3.125 nmol/L,  $^{125}\text{I}$ -pindolol 浓度为 0.1 nmol/L, 完整淋巴细胞浓度为  $1 \times 10^9$  个/L, 分别加入竞争性药物 S(-)-PPL、R(+)-PPL、4-OH-P、Atenolol、Butoxamine 和 SR59230A, 最终浓度为  $10^{-8}$ ~ $10^{-3}$  mol/L, 与放射性配基竞争淋巴细胞受体的结合。孵育、抽滤、液体闪烁或  $\gamma$  计数均同上。经 Ligand 软件计算出不同竞争性药物与  $\beta$  受体结合的  $\text{IC}_{50}$ , 再按下式计算表观解离常数( $K_d A$ )<sup>[5]</sup>:

$$K_d A = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + L_t^*/K_d}$$

式中  $L_t^*$  和  $K_d$  分别为标记配基的总浓度和解离常数。

### 1.4 统计学处理

数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, Ligand 分析软件由军事医学科学院放射医学研究所提供, 统计分析由 SPSS Windows 6.0 软件包在 IBM 微机上处理。

## 2 结果

### 2.1 受体结合试验

制备的淋巴细胞膜和完整淋巴细胞, 分别与放射性配基  $^3\text{H}$ -DHA、 $^3\text{H}$ -CGP 和  $^{125}\text{I}$ -pindolol 进行受体结合分析, 三种配基与淋巴细胞膜和完整淋巴细胞  $\beta$  肾上腺素受体的特异性结合均显示饱和曲线特征, 结果见表 1(Table 1)。

### 2.2 竞争性抑制实验

采用完整淋巴细胞进行竞争性抑制实验, 曲线拟合显示存在两个受体结合位点(Site 1 和 Site 2), 不同竞争性药物的表观平衡解离常

数(Kd 1A 和 Kd 2A)测定值见表 2(Table 2)。从表中可知,对于<sup>3</sup>H-DHA, Site 1 的竞争性拮抗效应大小为 Butoxamine>S(-)-PPL>4-OH-P>R(+)-PPL>SR59230A>Atenolol, Site 2 的竞争性拮抗效应为 Butoxamine>S(-)-PPL>4-OH-P>R(+)-PPL>Atenolol>SR59230A。对于<sup>3</sup>H-CGP, Site 1 的竞争性拮抗效应大小为 Butoxamine>S(-)-PPL>4-OH-P>R(+)-PPL>SR59230A>Atenolol, Site2 的竞争性拮抗效应为 Butoxamine>S(-)-PPL>SR59230A>R(+)-PPL>4-OH-P>Atenolol。对于<sup>125</sup>I-pindolol, Site 1 的竞争性拮抗效应大小为 Butoxamine>S(-)-PPL>R(+)-PPL>4-OH-P>SR59230A>Atenolol, Site2 的竞争性拮抗效应为 S(-)-PPL>Butoxamine>4-OH-P>R(+)-PPL>SR59230A>Atenolol。因此,Bu-

toxamine 的竞争性拮抗效应最强,S(-)-PPL 的作用 其次,SR59230A 具有一定作用, Atenolol 几乎无拮抗作用。

Table 1. Saturation curve data of intact lymphocytes and cell membranes ( $\bar{x}\pm s$ ).

Ligand	Receptor (n)	Parameters	
		Kd(nmol/L)	Bmax(nmol/10 <sup>6</sup> )
<sup>3</sup> H-DHA	Membrane(3)	3.07±1.44	12.91±3.55
	Intact cells(4)	4.51±2.49	45.81±13.24 <sup>a</sup>
<sup>3</sup> H-CGP	Membrane(4)	2.46±0.82	6.79±0.17
	Intact cells(4)	2.69±0.98	8.05±1.45
<sup>125</sup> I-pindolol	Membrane(4)	0.09±0.03	9.65±0.68
	Intact cells(5)	0.13±0.10	31.19±10.55 <sup>a</sup>

a: P<0.01, compared with membrane group.

Table 2. Competition curve data in intact lymphocyte.

Antagonist		<sup>3</sup> H-DHA		<sup>3</sup> H-CGP		<sup>125</sup> I-pindolol	
		Kd A (μmol/L)	Bmax(%)	Kd A (μmol/L)	Bmax(%)	Kd A (μmol/L)	Bmax(%)
S(-)-PPL	Site 1	1646.2	65.4	717.6	54.8	114.7	42.0
	Site 2	0.122	34.6	0.066	31.6	0.054	44.0
R(+)-PPL	Site 1	5377.8	73.8	1737.4	59.6	1170.0	42.8
	Site 2	0.727	26.2	0.306	23.4	0.237	52.8
4-OH-P	Site 1	4125.5	74.1	1442.3	55.5	1316.8	46.3
	Site 2	0.502	25.9	0.364	28.4	0.155	55.8
Atenolol	Site 1	11513	94.8	2415.6	84.5	3282.2	55.9
	Site 2	0.853	5.2	0.546	14.0	3.538	41.3
Butoxamine	Site 1	1405.4	69.3	472.3	65.5	110.3	42.6
	Site 2	0.097	30.7	0.007	44.1	0.060	39.4
SR59230A	Site 1	5871.0	79.4	2187.6	44.6	1768.3	30.7
	Site 2	2.223	20.6	0.255	54.8	0.670	46.1

3 讨论

目前测定 β 肾上腺素受体有两类放射性配基,一类为<sup>3</sup>H 标记,另一类为<sup>125</sup>I 标记,前者具有半衰期较长,性质稳定的优点,但放射性比活度较低,需要闪烁液,操作较为复杂;后者却具

有放射性比活度高,操作简便的优点,但半衰期较短。我们发现,<sup>125</sup>I 标记配基 pindolol 后,将其贮存于-20℃冰箱,其货架寿命大于 90 天,进行适当校正后,仍能得到满意结果。

饱和曲线显示,<sup>3</sup>H-DHA 和<sup>125</sup>I-pindolol 对细胞膜和完整淋巴细胞受体的最大结合容量

B<sub>max</sub> 差异明显,可能与 DHA 和 pindolol 为亲脂性药物有关。二者能透过细胞膜进入胞浆与胞内受体结合,使得完整细胞标本的结合容量增高,而 CGP12177 为亲水性配基,进入胞浆的量较少,因此<sup>3</sup>H-CGP 更能反映细胞膜受体的状况。

在竞争性受体结合试验中,发现普萘洛尔的两种对映体,S(-)-PPL 和 R(+)-PPL 对淋巴细胞 $\beta$ 肾上腺素受体的亲和力在 Site 1(低亲和力位点)相差只有 3~10 倍,在 Site 2(高亲和力位点)相差也只有 5 倍左右,与文献[7]报道的动物实验结果(相差 100 倍)不一致。普萘洛尔的活性代谢物 4-OH-P 对淋巴细胞 $\beta$ 肾上腺素受体的亲和力与 R(+)-PPL 相近,说明 R(+)-PPL 仍具有较强的 $\beta$ 受体阻滞效应。造成这种差异的原因是否与淋巴细胞存在新的 $\beta$ 肾上腺素受体亚型有关?我们选择了最新合成的 $\beta_3$ 受体拮抗剂 SR59230A 进行分析,发现 SR59230A 对<sup>3</sup>H-CGP 和<sup>125</sup>I-pindolol 在 Site 1 和 Site 2 均具有一定的拮抗作用,对<sup>3</sup>H-DHA 的拮抗作用较差,而 CGP12177 和 pindolol 均为 $\beta_3$ 受体的部分激动剂<sup>[8]</sup>,显示淋巴细胞可能存在 $\beta_3$ 受体亚型,此结果有待进一步研究证实。

#### 参考文献

- 1 Brodde OE, Kresch R, Ikezono K, et al. Human  $\beta$ -adrenoceptors: relation of myocardial and lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptor density. *Science*, 1986, **231**: 1584~1585.
  - 2 Maisel AS, Wright CM, Carter SM, et al. Tachyphylaxis with amrinone therapy: association with sequestration and down-regulation of lymphocyte beta-adrenergic receptor. *Am Internal Med*, 1989, **110**: 195~201.
  - 3 Nisoli E, Tonello C, Landi M, et al. Functional studies of the first selective  $\beta_3$ -adrenergic receptor antagonist SR59230A in rat brown adipocytes. *Mol Pharmacol*, 1996, **49**: 7~14.
  - 4 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985, **150**: 76~85.
  - 5 张德昌. 受体与跨膜信息传递机理研究技术. 见:方福德,周吕,丁濂,等(主编). 现代医学实验技巧全书(下册). 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995: 459~489.
  - 6 Blasi AD, Lipartiti M, Motulsky HJ, et al. Agonist-induced redistribution of  $\beta$ -adrenergic receptors on intact human mononuclear leukocyte redistributed receptors are non-functional. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, **61**: 1081~1088.
  - 7 Walle T, Webb JG, Bagwell EE, et al. Stereoselective delivery and actions of beta-receptor antagonists. *Biochem Pharmacol*, 1988, **37**: 115~124.
  - 8 Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, 1994, **46**: 121~136.
- (1997-08-14 收到)