

liver. Pt A. NY: Marcel Dekker, 1979: 301
12 Yue XF, Wu SY, Wu FG, Gui JZ, Xu B. Influence of oxalysine (I-677) on the incorporation of lysine and its subcellular distribution. *Acta Pharmacol Sin* 1983; 4: 54

赖氨酸对小鼠肝细胞的超微结构影响

戴志强、俞月桂、朱芑芑、袁幸莉、许建一、李晚玉 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

摘要 小鼠 po I-677 10, 50, 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 连续 7 d 能引起肝细胞轻度脂变。中、高剂量组停药后 2 wk, 脂肪变性逐渐消退, 4 wk 后, 肝细胞超微结构恢复正常。电镜观察提示, I-677 的作用起始部位是肝细胞的胞浆部分。胞浆局部区域性溶解, 基质丢失, 使蛋白质合成的初始阶段受阻, 脂质载体蛋白缺乏, 可能是 I-677 所致肝脂变的主要原因。

关键词 赖氨酸; 肝; 脂类; 脂肪变性; 电子显微镜检查

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 Jul; 12 (4): 340-343

大鼠脾淋巴细胞 β 肾上腺素受体的放射配位体测定

葛志东、陈敏珠、徐叔云 (安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032, 中国)

Radioligand assay of beta adrenoceptors in lymphocytes isolated from rat spleen

GE Zhi-Dong, CHEN Min-Zhu, XU Shu-Yun (Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

ABSTRACT [³H]Dihydroalprenolol ([³H]DHA) was used to label β-adrenoceptors in intact lymphocytes isolated from rat spleen. The binding conditions were investigated by the methods of L₉ (3⁴) orthogonal analysis, the results showed the optimum binding conditions were pH 7.7, 1 × 10⁶ lymphocytes · ml⁻¹ and 10 min at 25°C for incubation. On these conditions the [³H]DHA binding to β-adrenoceptors was rapid (T_{1/2} 2 min) and readily reversed by propranolol 1 mmol · L⁻¹ (T_{1/2} 4 min). [³H]DHA saturation experiments indicated a single class of site with a K_D of 7.2 ± 2.2 nmol · L⁻¹ and B_{max} of 81 ± 28 fmol / 10⁷ lymphocytes (n = 3). Computer analysis of competition experiments with isoproterenol and epinephrine revealed two classes of sites. One site had high affinity for the [³H]DHA and comprised 60 ± 5% of the total number of sites, whereas the other site had a lower affinity. The affinity of the high affinity

site was about 3 orders of magnitude higher than that of the lower affinity site.

KEY WORDS spleen; lymphocytes; beta adrenergic receptors; radioligand assay; dihydroalprenolol; propranolol; research design; competitive binding; binding site

摘要 用 L₉ (3⁴)型正交设计确立受体结合实验的最佳条件为: pH 7.7, 细胞浓度 1 × 10⁶ 个 · ml⁻¹, 25°C 水浴 10 min。 [³H]二氢烯丙洛尔与大鼠脾淋巴细胞 β 受体结合是快速 (T_{1/2} 2 min), 可逆 (T_{1/2} 4 min) 的, 饱和实验表明 β 受体只存在一种类型, 有高度亲和力 (K_D: 7.2 ± SD 2.2 nmol · L⁻¹), 可饱和性 (B_{max}: 81 ± SD 28 fmol / 10⁷ 淋巴细胞) (n = 3)。在异丙肾上腺素和肾上腺素竞争实验中, β 受体存在两种状态, 高亲和力状态占总受体数的 60 ± 5%, 低亲和力状态占总受体数的 40 ± 5%, 两种状态 β 受体亲和力相差 3 个数量级。

关键词 脾; 淋巴细胞; β 肾上腺素能受体; 放射配位体测定; 二氢烯丙洛尔; 普萘洛尔; 研究设计; 竞争性结合; 结合位点

脾脏淋巴细胞 β 受体是神经免疫调节的重要环节, 用放射配位体测定其特征, 虽有零

Received 1989 Oct 31

Accepted 1991 Mar 30

星报道^(1,2), 但差异极大, 主要与实验条件不同有关. 本文用正交设计建立^[3H]二氢烯丙洛尔(^[3H]dihydroalprenolol, ^[3H]DHA)与大鼠脾脏淋巴细胞 β 受体结合的最佳条件, 在此基础上, 分析大鼠脾脏淋巴细胞 β 受体特征.

MATERIALS AND METHODS

^[3H]DHA (1.78 GBq · mol⁻¹)由中国原子能科学研究院标记, 普萘洛尔(propranolol, Pro)为上海第十制药厂产品, *d*-普萘洛尔(*d*-propranolol, *d*-Pro)由张均田教授惠赠, 去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、肾上腺素(epinephrine, Epi)、异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso)均系瑞士 Fluka 公司产品, 海光牌 49[#]玻璃纤维滤纸由上海羽光净化材料联合公司生产.

制备脾脏淋巴细胞 将 4-6 月龄 Wistar 大鼠(244 ± SD 25 g)断颈处死, 按常规方法⁽³⁾用 HBSS 制成脾细胞悬液, 轻置于 IF 分层液(1.085 g · ml⁻¹)上, 400 × g 离心 20 min (4℃), 收集淋巴细胞, 用 HBSS 洗 1 次后, 配成所需浓度.

受体结合实验 结合实验每管 2.5 × 10⁷ 个脾脏淋巴细胞, 均以 Tris-HCl 缓冲液补充至 250 μl. 动力学实验^[3H]DHA 终浓度 3.9 nmol · L⁻¹, 结合动力学实验反应时间 10 s-30 min, 解离动力学实验在加入 Pro 1 mmol · L⁻¹ 后, 反应 10 s-15 min, 饱和实验^[3H]DHA 终浓度 0.5-14 nmol · L⁻¹, 非特异结合管另加入 Pro 1 mmol · L⁻¹, 竞争实验的药物浓度 1 nmol · L⁻¹-1 mmol · L⁻¹. 25℃ 温育 10 min, 3 ml 冰冷 Tris-HCl 缓冲液终止反应, 15 ml 冲洗滤膜, 膜片 80℃ 烘烤 30 min, 加闪烁液后计数.

数据处理 在 IBM 计算机上, 使用汤仲明教授编制的“受体配基结合实验数据处理软件”⁽⁴⁾, 用非线性加权最小二乘法计算受体密

度 B_{max} , 平衡解离常数 K_D , 表现抑制常数 K_i 和 Hill 系数. 以 F 检验比较计算值和观察值之间的差异, 决定处理实验数据的模型.

RESULTS

受体结合实验的最佳条件 以平均^[3H]DHA 特异结合量和特异结合占总结合的百分率(SB/TB × 100)为标准, 综合评估^[3H]DHA 与脾脏淋巴细胞结合反应的结果, 最佳实验条件为: pH 7.7, 反应温度 25℃, 温育时间 10 min, 细胞浓度 1 × 10⁸ 个 · ml⁻¹ (Tab 1).

β 受体的特征 ^[3H]DHA 与脾脏淋巴细胞 β 受体结合迅速, 2 min 达半量最大结合, 10 min 达平衡, 保持 30 min (Fig 1); 加入 Pro 1 mmol · L⁻¹ 后, ^[3H]DHA 迅速解离(Fig 2), 结合速率常数 K_1 为 0.033 L · nmol⁻¹ · min⁻¹, 解离速率常数 K_2 为 0.163 min, 由动力学实验求得 K_D 值 4.94 nmol · L⁻¹.

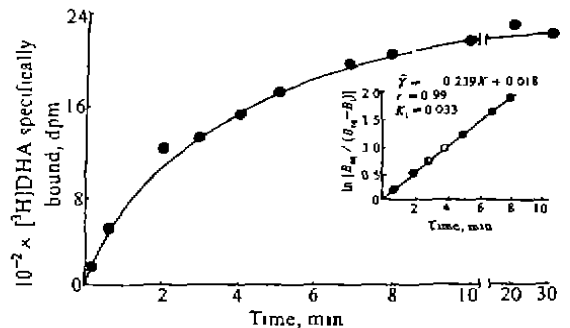


Fig 1. ^[3H]DHA binding to intact splenic lymphocytes. (Inset) the regression line was determined by the plot of $\ln B_{eq} / (B_{eq} - B_t)$ vs time, where B_{eq} = binding at equilibrium and B_t = binding at time t.

^[3H]DHA 与脾脏淋巴细胞 β 受体结合有高度亲和力和可饱和性(Fig 3), 实验数据用单位点模型分析为最优(Hill 系数 0.79), K_D 为 7.2 ± 2.2 nmol · L⁻¹, B_{max} 为 81 ± 28 fmol / 10⁷

Tab 1. Effects of experimental conditions on the specific [³H]DHA binding to intact splenic lymphocytes (L₉, (3⁴) orthogonal analysis).

	Expt	pH	Temperature (°C)	Time (min)	Cell concn (cells · ml ⁻¹)
	1	8.0	37	30	1 × 10 ⁸
	2	8.0	30	20	5 × 10 ⁷
	3	8.0	25	10	5 × 10 ⁶
	4	7.7	37	30	5 × 10 ⁶
	5	7.7	30	20	1 × 10 ⁸
	6	7.7	25	10	5 × 10 ⁷
	7	7.4	37	30	5 × 10 ⁷
	8	7.4	30	20	5 × 10 ⁶
	9	7.4	25	10	1 × 10 ⁸
SB (fmol / Level 10 ⁷ cells)	1	34.56	18.25	13.93	23.51
	2	32.95	18.87	24.10	19.18
	3	13.51	43.92	43.02	38.28
100 × SB / TB Level	1	49.95	48.15	47.87	75.97
	2	62.24	47.90	52.95	56.77
	3	47.22	63.37	58.60	26.77

SB: specific [³H]DHA binding; TB: total [³H]DHA binding.

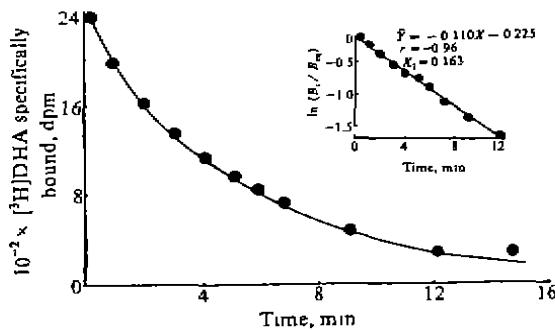


Fig 2. Dissociation of [³H]DHA binding to intact splenic lymphocytes. (Inset) semilogarithmic plots of dissociation of [³H]DHA binding.

淋巴细胞(n = 3).

NE、Iso 和 Epi 抑制 [³H]DHA 与脾脏淋巴细胞 β 受体结合 (Fig 4), NE 的 K_i 为 1.96 ± 0.72 mmol · L⁻¹, 对 Iso 和 Epi 的实验数据, 以二位点模型分析为最优 (Hill 系数分别为 0.27 (Iso) 和 0.26 (Epi)), Iso 对高亲和力状态 β 受体(h)的表观抑制常数 K_h 为 0.12 ± 0.04 mmol · L⁻¹, 对低亲和力状态 β 受体(l)的表

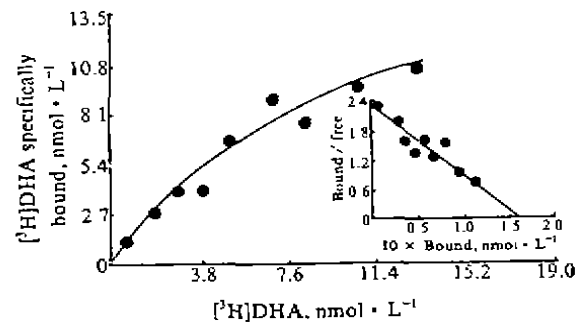


Fig 3. Specific binding of [³H]DHA to intact splenic lymphocytes with increasing concentrations of [³H]DHA. (Inset) Scatchard analysis of the binding data.

观抑制常数 K_i 为 31 ± 7 nmol · L⁻¹, 高亲和力状态 β 受体占总受体数的 58 ± 4%, 低亲和力状态 β 受体占总受体数的 42 ± 4%. Epi 的 K_h 为 0.68 ± 0.13 mmol · L⁻¹, K_i 为 197 ± 41 nmol · L⁻¹, 高亲和力状态 β 受体占总受体数的 62 ± 3%, 低亲和力状态占 38 ± 3% (n 均为 3).

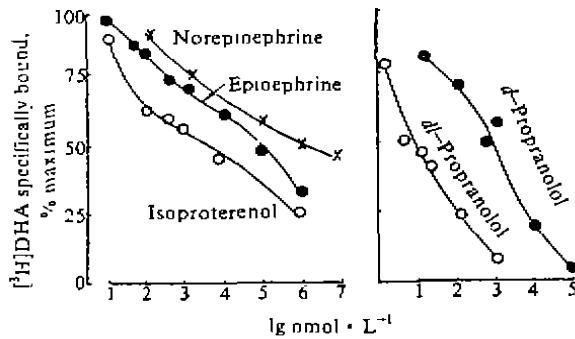


Fig 4. Competition for $[^3\text{H}]\text{DHA}$ binding sites by adrenergic agonists and antagonists in intact splenic lymphocytes.

dl-Pro 和 *d*-Pro 抑制 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 与脾脏淋巴细胞 β 受体结合 (Fig 4), K_i 值分别是 $16.30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.55 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, *dl*-Pro 比 *d*-Pro 效能高 95 倍, 说明脾脏淋巴细胞 β 受体有立体结构特异性。

DISCUSSION

本文用 $L_9(3^4)$ 型正交设计确立受体结合实验的最佳条件, 在最佳条件, $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 与大鼠脾脏淋巴细胞的结合反应迅速、可逆, 并有饱和性、高度亲和力和立体结构特异性, 证明大鼠脾脏淋巴细胞存在 β 受体。 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 与 β 受体的结合与解离过程都是一步进行, 饱和曲线的 Scatchard 图是一直线, Hill 系数接近 1, 提示 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 与 β 受体是单位点结合, 与外周血淋巴细胞 β 受体的特征⁽⁵⁾相似, 不同于文献结果^(1,2)。

在 Iso 和 Epi 竞争抑制实验中, β 受体存在高、低亲和力状态, 前者约占 $60 \pm 5\%$, 后者占 $40 \pm 5\%$, 两者亲和力相差 3 个数量级, 不同于大鼠肺细胞⁽⁶⁾、蛙红细胞⁽⁷⁾和人外周血白细胞⁽⁸⁾ β 受体高、低亲和力状态。

ACKNOWLEDGMENTS 本所张 泓、李延凤协助技术工作; 刘大为帮助处理数据。

REFERENCES

- 1 Johnson DL, Gordon MA. Characteristics of adrenergic binding sites associated with murine lymphocytes isolated from spleen. *J Immunopharmacol* 1980; 2: 435
- 2 Zhou JN, Yang GZ. Assay of beta-adrenergic receptors on mouse spleen cells by H-dihydroalprenolol binding. *Chin J Microbiol Immunol* 1988; 8: 141
- 3 Li YF, Jin WZ, Dai LM, Wei W, Chen MZ. The influence of luteolin on specific humoral immunity in mice. *J Anhui Med Univ* 1985; 20: 8
- 4 Yang XM, Tang ZM, Luo ZP, Zhou JH. The effect of clonidine on the binding characteristics of benzodiazepine receptor agonist, inverse agonist and antagonist in the rat cortex. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1989; 3: 180
- 5 Shan JR, Fu GH, Lu BZ. Identification of β -adrenergic receptors on lymphocytes in blood of guinea pig by radioligand binding assay. *Bull Acad Milit Med Sci* 1988; 12: 73
- 6 Scarpace PJ, Abrass IB. Desensitization of adenylate cyclase and down regulation of beta adrenergic receptors after *in vivo* administration of beta agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 223: 327
- 7 De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1980; 255: 7108
- 8 Feldman RD, Limbird LE, Nadeau J, FitzGerald GA, Robertson D, Wood AJJ. Dynamic regulation of leukocyte beta adrenergic receptor-agonist interactions by physiological changes in circulating catecholamines. *J Clin Invest* 1983; 72: 164