

豚鼠肺组织中前列腺素 E₂ 受体的检定¹

田 英、吕宝璋 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提要 采用放射配基结合分析法, 从标记配基结合的可饱和性、可逆性、高亲和力和立体选择性等几方面, 证实了豚鼠肺组织中存在着特异的 PGE₂ 受体。它与配基的结合需 Mg²⁺ 参与。SH 基是其结合部位中的重要功能基团。它的效应可能与激活腺苷酸环化酶有关。

1986年11月1日收稿 1987年6月3日接受

¹国家自然科学基金委员会科学基金资助课题 生字No 85-83

关键词 前列腺素 E₂ 受体; 放射配位体测定; 腺苷酸环化酶类; 豚鼠; 肺; N-乙基马来酰亚胺

前列腺素(PG)是一族具有广泛生物效应的不饱和脂肪酸类物质。在哺乳动物呼吸系统中, PGE₂可使气道平滑肌舒张, 而 PGF_{2α} 和 TXA₂ 则能使之收缩⁽¹⁾。据认为, PG的作用是由靶细胞膜上的受体介导的⁽²⁾。但迄今未见对肺组

织中 PGE₂ 受体检定的报道。我们采用放射配基结合分析法,对豚鼠肺组织中 PGE₂ 受体作了检定,并初步观察了它的效应器系统,以及某些因素对它的活性的影响。

材料与 方法

主要试剂 PGB₁, PGE₂, PGF_{2α}, 6-氧-PGF_{1α}, N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM)和二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)均系美国 Sigma 公司产品; [³H]PGE₂ (592 TBq/mol)购自英国 Amersham 公司; GF/F 玻璃纤维滤膜系英国 Whatman 公司产品; 腺苷-3', 5'-磷酸和甘氨酸甘氨酸(glycyl-glycine, GG)购自英国 BDH 公司; [³H]cAMP 系中国科学院原子能研究所产品。其他试剂均为 AR。

豚鼠肺细胞膜制剂的制备 豚鼠, ♀♂兼用, 体重 400 ± SD 42 g。断头处死,取肺置于冰冷的缓冲液(Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8.5, MgCl₂ 10 mmol/L)中,洗去血污后称重。按 1:5 (wt:vol)加入缓冲液,在冰浴中以 20 000 rpm 转速制成匀浆。组织匀浆在 4℃以 500 × g 离心 10 min; 取上清,再以 30 000 × g 离心 20 min。沉淀以缓冲液稀释至蛋白质含量为 3 mg/ml, 立即供实验用。

受体结合实验 膜蛋白 100 μl, 与最终浓度为 1, 2, 4, 6, 8 和 10 nmol/L 的 [³H]PGE₂ 混合, 加上述缓冲液至总容量为 250 μl, 此为总结合管。非特异结合管除上述成分外, 尚含有终浓度为 20 μmol/L 的 PGE₂, 总容量亦为 250 μl。各管在 37℃水浴中反应 15 min 后, 立即置冰水浴中, 迅速经 Whatman GF/F 滤膜行负压抽滤, 并以含有 0.1% 牛血清白蛋白的冰冷却缓冲液 5 ml 连续冲洗两次。滤膜于 80℃烤干, 置于含有 0.5% PPO 的甲苯中, 以 LKB-1215 液闪计数器测量放射性。

动力学实验 膜蛋白 100 μl 与终浓度为 5 nmol/L 的 [³H]PGE₂ 混合, 加缓冲液使总容量为 250 μl; 各管在 37℃反应 0.5-30 min, 按上述操作抽滤、烤干、测量放射性, 以观察结

合反应的动力学。在反应达平衡后, 再加终浓度为 20 μmol/L 的 PGE₂, 亦加缓冲液使总容量为 250 μl, 并在 37℃反应 0.5-30 min, 按常法操作至放射性测量, 以了解其离解动力学。

结合竞争实验 膜蛋白 100 μl 与终浓度为 5 mmol/L 的 [³H]PGE₂ 混合, 加入 1 nmol/L-1 mmol/L 的非标记配基, 加缓冲液使总容量为 250 μl, 在 37℃反应 15 min, 按前法操作至放射性测量。

化学测定 肺组织膜蛋白制剂的腺苷酸环化酶活性按作者改进的方法⁽³⁾测定; cAMP 含量测定用蛋白竞争结合分析法⁽⁴⁾; 蛋白质含量测定用比色法⁽⁵⁾。

蛋白质修饰剂对结合作用的影响 膜蛋白先与终浓度为 100 μmol/L 的 NEM 或 DTT 反应 10 min, 再按常法做受体结合实验; 或在受体结合实验完成后, 加入终浓度为 100 μmol/L 的 NEM 或 DTT, 继续反应 10 min, 以观察这些处理对结合作用的影响。

结 果

结合饱和实验 图 1 的结果表明, 随着标记配基浓度的增高, [³H]PGE₂ 与膜蛋白的结合趋于饱和。从总结合中减去非特异结合(占总结合的 13-21%), 将 3 次实验特异结合的 B 对 B/F 进行直线回归, 作 Scatchard 图, 得

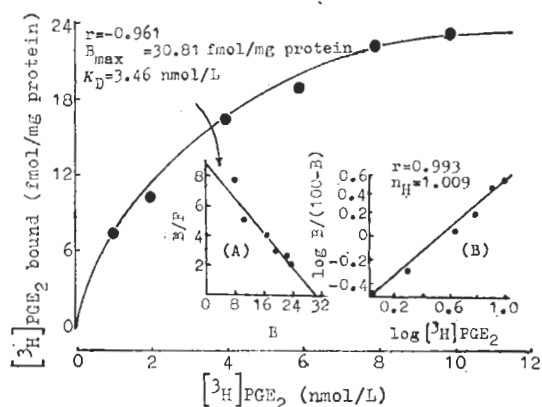


Fig 1. Specific binding of [³H]PGE₂ to PGE₂ receptors in membranes prepared from lung of guinea pig. A, Scatchard plot; B, Hill Plot,

$B_{max} = 30.81 \text{ fmol/mg 蛋白}$, $K_D = 3.46 \text{ nmol/L}$. 以 $\log[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 对 $\log B/(B_{max}-B)$ 作直线回归, 得 Hill 系数 $n_H = 1.009$; 并求得其 $K_D = 3.45 \text{ nmol/L}$, 与用 Scatchard 式求得者一致。

动力学研究 以结合动力学实验中达到平衡时(10 min)特异结合的 cpm 为 B_{0q} , 各时间点特异结合的 cpm 为 B_t , 以 $\ln B_{0q}/(B_{0q}-B_t)$ 对时间(min)作直线回归, 并作准一级速率图如图 2 A, 其斜率 $K_{ob} = 0.187$; 将离解动力学实验的数据, 以 $\ln B_t/B_{0q}$ 对时间(min)作直线回归并作一级速率图如图 2 B, 得 $K_{-1} = 0.098 \text{ min}^{-1}$. 由于 $K_{ob} = K_{-1} + K_1[L]$, $K_1 = (K_{ob} - K_{-1})/[L] = 0.020 \text{ min}^{-1} \cdot (\text{nmol/L})^{-1}$; $K_D = 0.098/0.020 = 4.9 \text{ nmol/L}$, 与前述由结合实验所得者相近。

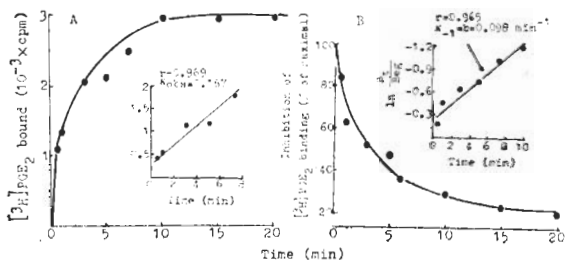


Fig 2. Kinetics of association (A) and dissociation (B) of $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ to PGE_2 receptors in membranes prepared from lung of guinea pig.

结合竞争实验 将所得数据均换算为未加标记配基者的百分数(B%), 再按 $\text{logit}(P) = \ln B/(100 - B)$ 式换算成 $\text{logit}(P)$. 以非标记配基 I 浓度的常用对数 $\text{logit}[I]$ 为自变量, 以 $\text{logit}(P)$ 为因变量, 作直线回归, 求出各自的回归方程式. 当 $\text{logit}(P) = 0$ 时的 $\log(I)$ 值, 就是 IC_{50} 的常用对数, 即 $\text{IC}_{50} = 10^{\log[1]}$; 再通过公式 $K_i = \text{IC}_{50}/(1 + [L]/K_D)$ 求得各自的 K_i 值, 以比较各种配基与受体结合的亲和力. 本实验所得 PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-氧- $\text{PGF}_{1\alpha}$, PGB_1 等 4 种配基的 K_i 值分别为 3.0, 9.4, 12.4 和 744.8 $\mu\text{mol/L}$.

PGE₂ 对肺组织膜制剂中腺苷酸环化酶活力的影响 3 次实验所得该酶的基础活力为

$10 \pm 5 \text{ pmol cAMP}/(\text{mg 蛋白} \cdot \text{min})$. 在终浓度为 1 mmol/L 的 PGE_2 作用下活力增至 $70 \pm 23 \text{ pmol cAMP}/(\text{mg 蛋白} \cdot \text{min})$, 与 $100 \mu\text{mol/L}$ 的肾上腺素的作用相当, $58 \pm 20 \text{ pmol cAMP}/(\text{mg 蛋白} \cdot \text{min})$.

Mg²⁺ 对³H]PGE₂ 与受体结合的影响 以有或无 MgCl_2 10 mmol/L 的 Tris-HCl 50 mmol/L (pH 8.5) 缓冲液为反应液, 分别做结合饱和实验, 结果见图 3. 在无 Mg^{2+} 时, 受体的 B_{max} 值下降了 40%, 而 K_D 值无明显变化。

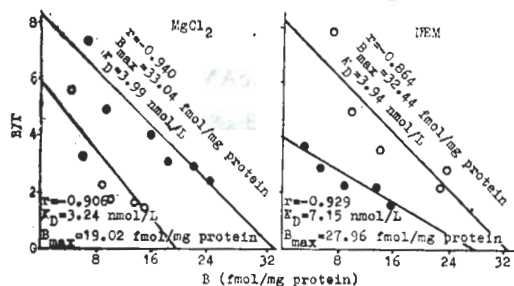


Fig 3. Scatchard plots showing the binding of $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ to lung membranes without (O) or with (●) MgCl_2 or pre-incubation with *N*-ethylmaleimide.

NEM 和 DTT 对³H]PGE₂ 与受体结合的影响 在初步实验中, 曾分别先将膜制剂与 NEM 和 DTT 反应 10 min, 再按常法进行结合实验, 发现 DTT 对 B_{max} 和 K_D 值均无影响, 而 NEM 却使二者都发生了变化. 据此, 分别观察了先将 NEM 与膜蛋白反应 10 min, 和在结合反应完成后加入 NEM, 再反应 10 min, 对结合作用影响. 如图 3 所示, 后加 NEM 对 B_{max} 和 K_D 值均无影响; 而先以 NEM 处理, 除使 B_{max} 有所降低外, 能明显增大 K_D 值, 即降低了受体对配基的亲和力。

讨 论

很多哺乳动物肺组织中都存在着 PGE_2 ⁽⁶⁾. 它有明显的支气管舒张效应⁽¹⁾. 这种作用可能是由特异受体介导的⁽²⁾, 为证实这一点, 本研

究采用放射配基结合分析法,在正常豚鼠肺组织中检测到具有高亲和力的 PGE_2 受体,其具体表现有:(1)随着标记配基浓度的增高,结合达到了平衡,即呈可饱和性;(2)由动力学研究和结合饱和实验所求得的 K_D 值,均在 nmol/L 范围内,说明结合是高亲和力的;(3)结合竞争实验和离解动力学研究,都表明结合是可逆的;(4)竞争结合实验的结果显示了受体的立体选择性。这些都是 PGE_2 受体存在的主要证据。

确定其信号传递系统,是检定某一受体存在的必要条件。我们的实验表明, PGE_2 能象肾上腺素一样,增强肺组织膜制剂中腺苷酸环化酶活力,提示 PGE_2 受体可能是与该酶相偶联的。这同它介导的气道平滑肌舒张效应的机理是一致的: PGE_2 与其受体结合后,激活了靶细胞膜上的腺苷酸环化酶,使细胞内 cAMP 含量增加;由后者激活依赖于 cAMP 的蛋白激酶,导致平滑肌肌球蛋白轻链磷酸化,最终表现为气道平滑肌舒张⁽⁷⁾。

本研究的结果还证实, PGE_2 受体结合部位中的 $-\text{SH}$ 基,是它与 PGE_2 结合所必需的。修饰这种基团,会使受体与配基的结合亲和力明显降低,同时对结合容量亦有一定影响。而一旦受体与配基结合,则 NEM 即不再具有上述效应。这不仅表明 $-\text{SH}$ 基是受体的配基结合

部位中的重要基团之一,也提示配基结合后对它有保护作用。

本研究的结果表明,肺组织膜制剂中受体与 $[\text{}^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 的结合明显地依赖于 Mg^{2+} 。这一点与其他通过激活腺苷酸环化酶而发挥作用的受体系统是一致的。

致谢 单京瑞参加部分技术工作。

参 考 文 献

- 1 Moore PK. *Prostanoids: pharmacological, physiological and clinical relevance*. 1st ed. London: Cambridge University Press, 1985 : 148-72
- 2 Kennedy I, Coleman RA, Humphrey PPA, Levy GP. Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins* 1982; 24 : 667
- 3 吕宝璋、单京瑞、徐菊芬、任蕴芳、和国平、傅国辉. 过敏性哮喘豚鼠肺组织中 β 和 M 受体变化机理的初步探讨. *中华医学杂志* 1986; 66 : 401
- 4 Gilman AG. A protein binding assay for adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 67 : 305
- 5 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 6 Bergström S, Dressler F, Krabisch L, Ryhage R, Sjövall J. The isolation and structure of a smooth muscle stimulating factor on normal sheep and pig lungs. *Arkive Kemi* 1962; 20 : 63
- 7 Creese BR. Calcium ions, drug action and airway obstruction. *Pharmacol Ther* 1983; 20 : 357

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Mar, 9 (2) : 122-126

Characterization of prostaglandin E_2 receptors in lung of guinea pigs

TIAN Ying, LÜ Bao-Zhang

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT By means of radioligand binding assay, the prostaglandin E_2 receptors in lung of guinea pig were identified. The results presented in this paper demonstrated the existence of high affinity binding sites for PGE_2 in the membranes prepared from

lung of guinea pig. The speciality of the binding was verified by the saturability, reversibility, low K_D value (3.4 nmol/L) and stereoselectivity. Both the affinity and the binding capacity of the receptors were decreased by preincubating the membranes

with *N*-ethylmaleimide. This result suggests that the existence of SH group is necessary for the binding site of PGE₂ receptor. The fact that the activity of adenylate cyclase was increased by incubating the membranes with PGE₂ shows the possibility of a similar mechanism of transmembrane signalling to

other receptor systems such as β -adrenoceptor-adenylate cyclase.

KEY WORDS prostaglandin E₂ receptors; radioligand assay; adenylyl cyclase; lung; guinea pigs; *N*-ethylmaleimide

