β阻滞剂及其对映体拮抗TNFα诱发的心肌细胞信号转导异常

余细勇*，林曙光，汪晓梅，伍淑英

（广东省心血管病研究所临床药理室，广州 510080）

摘要　目的：观察β阻滞剂及其对映异构体对TNFα诱发的心肌细胞信号转导异常的拮抗作用。方法：用体外培养的乳鼠心肌细胞进行β受体密度、G蛋白、AC活性及PKA活性测定。结果：TNFα下调β受体密度；下调Gs蛋白，上调Gi蛋白，降低Gs/Gi比值；细胞内cAMP水平升高；激活PKA，总PKA水平升高。此作用能被β阻滞剂的$R(+)$型对映体而不是$S(-)$型对映体所拮抗。结论：β阻滞剂的$R(+)$型对映体有较好的拮抗TNFα介导的细胞毒作用，可能有利于对心衰的治疗。

关键词　肿瘤坏死因子；β阻滞剂；对映体；心肌细胞；信号转导

β阻滞剂治疗心衰已获肯定疗效[1]，但困扰临床医生的一个主要难题是易诱发心力衰竭恶化。大多数发生在治疗的早期，与β阻滞剂的负性肌力作用和急性血液动力学效应有关，用量偏大时更易发生。是否有一种β阻滞剂优于其它β阻滞剂，治疗心衰时既不产生显著的负性肌力作用又能改善患者心功能，延长寿命？本文在建立了乳鼠心肌细胞培养和肿瘤坏死因子-α(TNFα)作用模型的基础上，初步观察不同β受体阻滞药物(尤其是具有立体选择性差异的对映异构体)对细胞信号转导系统的影响，探寻具有治疗心衰潜力的新一代β阻滞剂。

材　料　和　方　法

受试药品　普萘洛尔(propranolol，PPL)，含量>99%，广州何济公药厂提供；$S(-)$型普萘洛尔($S(-)$-PPL)和$R(+)$型普萘洛尔($R(+)$-PPL)购自Sigma公司；阿替洛尔(atenolol，AT)，含量>99%，由天津中央药厂提供；$S(-)$型阿替洛尔($S(-)$-AT)和$R(+)$型阿替洛尔($R(+)$-AT)购自Aldrich公司；卡维地洛(carvedilol，CAR)，含量>99%，由第一军医大学药物研究所提供；β_3受体亚型选择性阻滞剂SR59230A(SR)由意大利Manara博士惠赠。TNFα购自G_{IBCO} BRL公司。

心肌细胞培养　每次取新生1～3 d的Wistar乳鼠20只，♀♂不拘，用75%酒精清洁动物后，在超净台无菌操作下开胸快速分离乳鼠的心脏，立即浸入冰冷的分离缓冲液(Buffer)(NaCl，137 mmol·L^{-1}；KCl，5.36 mmol·L^{-1}；glucose，5.55 mmol·L^{-1}；KH_2PO_4，0.44 mmol·L^{-1}；$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$，0.34 mmol·L^{-1}；HEPES，20 mmol·L^{-1}；penicillin，100 u·ml^{-1}；streptomycin 100 μg·ml^{-1}；pH 7.5)。分离心尖部分的心室组织，尽量剥除心室内、外膜，反复用分离Buffer清洗3～4次，用眼科剪将心肌组织剪成约2 mm^{3}的碎块。用Simpson方法[2]分离、预培养心肌细胞，接种于6孔培养板。24 h后换液，培养液改为含10%胎牛血清的M199，以后隔天换液1次。至d 3～4可见细胞开始搏动，随即进行分组实验：(1)空白对照组；(2)TNFα(1.0 μmol·L^{-1})；(5)TNFα+$S(-)$-AT(1.0 μmol·L^{-1})；(6)TNFα+$R(+)$-AT(1.0 μmol·L^{-1})；(7)TNFα+CAR(1.0 μmol·L^{-1})；(8)TNFα+SR(1.0 μmol·L^{-1})。连续用药7 d。每组设6孔，重复3次实验。

膜蛋白的制备　取收集的心肌细胞，加Tris(10 mmol·L^{-1}，pH 7.5)-EDTA(1 mmol·L^{-1})液1.0 ml，用玻璃匀浆器快速匀浆15 s，匀浆完毕，用Tris-EDTA液0.5 ml清洗玻棒和匀浆器管壁，收集液体，4℃离心700×g，10 min，上清液转至另一无菌eppendorf管，4℃离心54 000×g，45 min，沉淀溶于50 mmol·L^{-1} Tris和5 mmol·L^{-1} EDTA缓冲液中，用于β受体密度和G蛋白的测定。

蛋白酶的制备　取收集的心肌细胞，加预冷的缓冲液(内含10 mmol·L^{-1} Tris-HCl，pH 7.5，0.25

收稿日期：1998-11-10
基金项目：国家自然科学基金资助项目(39470823)
* Tel：(020)83827812－1317，Fax：(020)83827712，
E-mail：gdylxh@sta.gd.cn

mol·L^{-1}蔗糖，2 mmol·L^{-1} $MgCl_2$，1 mmol·L^{-1} PMSF，10 mmol·L^{-1} KCl，10 μg·ml^{-1} leupetin）1.0 ml，用玻璃匀浆器快速匀浆 15 s。收集匀浆液，4℃离心 700×g，15 min，上层液作为酶的粗体制剂测定 AC 和 PKA 活性。

胞内 **cAMP** 样本的制备　取收集的心肌细胞，加 1 mol·L^{-1}过氯酸液 1.0 ml 磨成匀浆，离心3 000 r·min^{-1}，10 min，分离上清液，用 20% KOH 液调至中性（pH 7.0），再离心去沉淀，将其上清液置于全自动真空浓缩干燥仪中干燥，－20℃冰箱保存。测定前再溶于 Tris-EDTA 缓冲液（50 mmol·L^{-1} Tris，5 mmol·L^{-1} EDTA，pH 7.5）。

β 受体密度分析　采用我室建立的^{125}I-pindolol 受体结合分析法[3]。以特异性结合对游离放射性配体浓度作图，得饱和曲线，经 Ligand 软件分析求得平衡解离常数 Kd 和最大结合量 B_{max}。受体密度以 B_{max}表示。

G 蛋白的测定　采用 ADP 核糖化反应方法[4]。利用霍乱毒素（cholera toxin，CT）催化 NAD 上的 ADP 核糖与 Gs 蛋白的 α 亚基共价结合，百日咳毒素（pertusis toxin，PT）则催化 NAD 上 ADP 核糖与 Gi 蛋白的 α 亚基特异性结合这一特征进行测定。百日咳毒素（pertussis toxin，PT）和霍乱毒素（cholera toxin，CT）购自 G_{IBCO} BRL 公司；thymidine，β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate（NADP），guanylylimidodiphosphate（Gpp[NH]p），phosphocreatine，creatine phosphokinase，β-nicotinamide adenine dinucleotide（NAD），ATP 和 GTP 购自 Sigma 公司，[α-^{32}P]-NAD（9.25 MBq，比放射性 37 TBq·mmol^{-1}）购自 Amersham 公司。反应在 30℃水浴中保温 1 h 后分离蛋白，置液体闪烁计数仪计数。以 cpm·mg^{-1}(protein)间接反映 G 蛋白的活性与含量。

PKA 活性测定　PKA 测定系统包括底物溶液、激活剂、抑制剂、磷酸纤维素纸等购自 G_{IBCO} BRL 公司，γ-^{32}P-ATP（专用于蛋白激酶研究，比活度 1.11 TBq·mmol^{-1}）购自 Amershan 公司。测定的底物为“Kemptide”：Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly，而采用的抑制剂为 PKI（6-22）amide。每一样品同时设为 4 管测定活化 PKA 和总 PKA，a 和 c 管为测定管（a：－抑制剂，－cAMP；c：－抑制剂，＋cAMP），b 和 d 管为阴性对照管（b：＋抑制剂，－cAMP；d：＋抑制剂，＋cAMP）。操作严格按试剂的说明书进行。按下式计算活化 PKA（activated PKA）和总 PKA（total PKA）：

活化 PKA（pmol·min^{-1}）＝pmol·min^{-1}（a 管）－pmol·min^{-1}（b 管）

总 PKA（pmol·min^{-1}）＝pmol·min^{-1}（c 管）－pmol·min^{-1}（d 管）

腺苷酸环化酶（**AC**）活性及 **cAMP** 含量测定　AC 活性采用非标记 ATP 为底物的方法测定[5]，酶的活性以 AC 催化净生成的 cAMP 量表示，即 pmol·min^{-1}·mg^{-1} protein。cAMP 采用德普（DPC）公司生产的 cAMP 测试盒进行。BCA 标准法[6]测定蛋白含量。

数据处理　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。组间差异的比较采用 t 检验。

结　　果

1　β 受体密度（B_{max}）

TNFα 下调 β 受体密度（TNFα（0.95±0.31）pmol·mg^{-1}(protein) *vs* control（2.08±0.07）pmol·mg^{-1}（protein），$P=0.004$）。SR 能部分拮抗 TNFα 下调 β 受体密度的作用，但未达到显著性统计学意义（$P=0.087$），其它 β 阻滞剂均无明显的拮抗作用（$P>0.05$）。结果见表 1。

Tab 1　Effect of β-blockers on β-adrenoceptor density of cultured myocardial cells of neonatal rats in presence of tumor necrosis factor-α（TNFα）

	Control	TNFα	TNFα＋S(－)-PPL	TNFα＋R(＋)-PPL	TNFα＋S(－)-AT	TNFα＋R(＋)-AT	TNFα＋CAR	TNFα＋SR
Kd / pmol·L^{-1}	412±22	376±177	430±76	283±103	308±32*	327±46*	398±15	314±72
B_{max}/ pmol·mg^{-1}(protein)	2.08±0.07	0.95±0.33**	1.22±0.27**	0.85±0.31**	0.89±0.08**	1.06±0.09**	1.02±0.15**	1.54±0.31*

$n=3$; PPL: propranolol; AT: atenolol; CAR: carvedilol; SR: SR59230A; Kd: equilibrium dissociation constant; B_{max}: density of receptor (maximum binding sites). Compared with control, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

2 G蛋白

TNFα下调Gs蛋白,上调Gi蛋白,降低Gs/Gi比值(TNFα 1.62±0.83 *vs* control 3.63±1.57,$P<0.01$)。β阻滞剂CAR能拮抗TNFα下调Gs蛋白($P<0.01$),*R*(+)-PPL和*R*(+)-AT能拮抗TNFα上调Gi蛋白($P<0.01$和$P<0.05$),因此,CAR,*R*(+)-PPL和*R*(+)-AT能部分纠正TNFα降低Gs/Gi比值的不良作用($P<0.05$或$P<0.01$)。结果见表2。

3 AC活性

TNFα对AC没有明显影响(TNFα 39±5 *vs* control (40±3) fmol·min^{-1}·mg^{-1} protein,$P>0.05$)。β阻滞剂与TNFα合用,对AC活性的影响不明显($P>0.05$)。结果见表3。

4 细胞内cAMP水平

TNFα升高细胞内cAMP水平(TNFα 7.88±0.58 *vs* control 4.00±0.34 pmol/10^6 cells,$P<0.01$),说明TNFα可能通过其他途径间接作用于cAMP。β阻滞剂CAR,*R*(+)-PPL和*R*(+)-AT能拮抗TNFα升高cAMP的作用($P<0.01$),而其他β阻滞剂*S*(−)-PPL,*S*(−)-AT和SR作用不明显($P>0.05$)。结果见表3。

5 PKA活性

TNFα能激活PKA(TNFα 2119±341 *vs* control 1182±284 pmol·min^{-1}·mg^{-1} protein),升高总PKA水平(TNFα 2449±390 *vs* control 1836±311 pmol·min^{-1}·mg^{-1} protein)。所有β阻滞剂均能不同程度拮抗TNFα活化PKA的作用($P<0.05$或$P<0.01$),而只有R(+)-PPL,R(+)-AT和CAR能部分拮抗TNFα升高总PKA的作用($P<0.05$,$P<0.01$和$P<0.05$),导致活化PKA的比例下降。见表4。

Tab 2 Effect of β-blockers on Gs and Gi-protein of cultured myocardial cells of neonatal rats in presence of tumor necrosis factor-α (TNFα)

	Gs / cpm·mg^{-1}(protein)	Gi / cpm·mg^{-1}(protein)	Gs / Gi
Control	61419±2455	16935±1560	3.63±1.57
TNFα	39373±1550**	24247±1855**	1.62±0.83**
TNFα+*S*(−)-PPL	37642±2999**	23887±1449**	1.58±0.48**
TNFα+*R*(+)-PPL	38941±1969**	17513±2363##	2.25±0.82**##
TNFα+*S*(−)-AT	39618±2081**	22913±2374**	1.74±0.64**
TNFα+*R*(+)-AT	38950±3738**	20243±1662*#	1.93±0.66**#
TNFα+CAR	48068±1991**##	23315±2627**	2.08±0.93**##
TNFα+SR	39983±1953**	24210±2341**	1.66±0.41**

$n=3$; PPL, propranolol; AT, atenolol; CAR, Carvedilol; SR, SR59230A. Compared with control, *$P<0.05$, **$P<0.01$; Compared with TNFα, #$P<0.05$, ##$P<0.01$.

Tab 3 Effect of β-blockers on adenylate cyclase (AC) and cyclic AMP (cAMP) of cultured myocardial cells of neonatal rats in presence of tumor necrosis factor-α (TNFα)

	Control	TNFα	TNFα+*S*(−)-PPL	TNFα+*R*(+)-PPL	TNFα+*S*(−)-AT	TNFα+*R*(+)-AT	TNFα+CAR	TNFα+SR
AC / fmol·min^{-1}·mg^{-1}(protein)	40±3	39±5	35±4	38±6	33±5	35±6	41±5	42±7
cAMP / pmol/10^6 cells	4.0±0.3	7.9±0.6**	8.2±0.3**	6.6±0.4**##	8.4±0.3**	5.3±0.3*##	4.6±0.4##	7.5±0.4**

$n=3$; PPL: propranolol; AT: atenolol; CAR: carvedilol; SR: SR59230A. Compared with control, *$P<0.05$, **$P<0.01$; Compared with TNFα, ##$P<0.01$.

Tab 4 Effect of β-blockers on cAMP-dependent protein kinase A (PKA) of cultured myocardial cells of neonatal rats in presence of tumor necrosis factor-α (TNFα)

	Activated PKA / pmol•min^{-1}•mg^{-1}(protein)	Total PKA / pmol•min^{-1}•mg^{-1}(protein)	activated / total PKA
Control	1182±284	1836±311	0.61±0.27
TNFα	2118±311**	2448±390**	0.87±0.33**
TNFα+S(−)-PPL	1706±331**##	2525±447**	0.69±0.48*##
TNFα+R(+)-PPL	1841±312**#	2033±289*#	0.89±0.52**
TNFα+S(−)-AT	1565±277*##	2474±484**	0.63±0.34##
TNFα+R(+)-AT	1795±409**#	1907±422##	0.91±0.60**
TNFα+CAR	1681±439**##	2110±387*#	0.79±0.33**#
TNFα+SR	1985±506**#	2375±395**	0.84±0.41**

$n=3$; PPL: propranolol; AT: atenolol; CAR: carvedilol; SR: SR59230A. Compared with control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with TNFα, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

讨 论

β阻滞剂的发展大概可分为3个阶段:第1代为非选择性β阻滞剂,以普萘洛尔(PPL)为代表;第2代为心脏(β_1-AR)选择性β阻滞剂,以阿替洛尔(AT)为代表;第3代为具有血管活性的β阻滞剂,以卡维地洛(CAR)为代表。近年来的研究显示,β阻滞剂的化学结构中广泛存在手性中心(chiral center),其对映异构体之间的药理作用相去甚远[7],如R(+)-PPL的β受体阻滞作用虽较S(−)-PPL弱,但却具有抗动脉粥样硬化作用[8]。这种立体选择性差异是否会对β受体脱敏及其信号传递通路产生不同的影响?值得深入研究。

TNFα是近年发现的可能参与充血性心力衰竭发生、发展过程的重要细胞因子[9]。研究表明,心衰时TNFα受体信号机制的可能途径之一是通过一氧化氮(NO)介导心肌的负性变力效应,TNFα能通过对可诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的调节而参与心衰的进程[10];心衰时TNFα受体信号机制的可能途径之二是通过ras通路介导了心肌细胞毒作用,有研究提示,TNFα信号转导可能需要G蛋白和酪氨酸激酶的参与[11]。于是,我们设想:TNFα受体是否通过G蛋白或其他信号传递分子与β肾上腺素受体之间发生相互作用?本实验发现,TNFα确能下调乳鼠心肌细胞β受体密度,降低Gs/Gi蛋白比值,激活PKA,但对AC活性没有明显影响,说明TNFα受体与β受体信号传递通路之间存在交互作用。TNFα不影响AC活性却升高胞内cAMP浓度,可能有两方面的原因:通过其他途径使细胞内cAMP累积,或者抑制cAMP的降解,其确切机理有待进一步研究。最近文献亦报道,TNFα短期作用引起成年培养心肌细胞的肥厚性生长反应[12],体内长期作用则可能导致心肌细胞凋亡。因此,TNFα升高细胞内cAMP水平可能与其对心肌细胞的早期肥厚性生长反应有关。

本实验的重要结果为:β阻滞剂的R(+)型对映体与第3代β阻滞剂CAR能拮抗TNFα对G蛋白的不良影响,减缓TNFα对胞内cAMP的累积作用以及部分拮抗TNFα升高细胞内总PKA的作用,而S(−)-型对映体则无此作用。胞内cAMP浓度的过高,有可能激活核转录因子CREB[13],诱发多种靶基因的异常表达。因此,β阻滞剂的R(+)型对映体可能具有较好的拮抗TNFα介导的细胞毒作用。说明R(+)型对映体,虽苦其β受体阻滞活性较弱,但却能直接作用于β受体信号传递的下游通路。这在逆转心衰β受体脱敏的进程中尤为有益,因为它有可能减弱β阻滞剂治疗心衰的负性肌力作用。

参 考 文 献

1 Doughty RN, Sharpe N. Beta-adrenergic blocking agents in the treatment of congestive heart failure: Mechanisms and clinical results. *Annu Rev Med*, 1997, **48**:103

2 Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. *Circ Res*, 1982, **50**:101

3 余细勇,饶曼人,林曙光,等.淋巴细胞β肾上腺素受体特征及β阻滞剂的亲和力比较.中国动脉硬化杂志, 1998, **6**:140

4 Kots AY, Gumanova NG, Akhmedzhanov NM, *et al*. The GTP-binding regulatory proteins, Gs and Gi, are altered in erythrocyte membranes of patients with ischemic heart disease resulting from coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**:1244

5 曾熙兰.腺苷酸环化酶(AC)活性测定方法.见林曙光,等主编:《细胞信号转导系统——基础医学与临床》.天津:天津科学技术出版社,1996.118
6 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, *et al*. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985,**150**:76
7 余细勇,林曙光.普萘洛尔对映体的药代—药效学相关性研究.中国临床药理学杂志,1994,**10**:6
8 Cruickshank JM, Smith JC. The beta-receptor, atheroma and cardiovascular damage. *Pharmacol Ther*, 1989,**42**:385
9 Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, *et al*. Tumor necrosis factor-α and tumor necrosis factor receptor in the failing human heart. *Circulation*, 1996,**93**:704
10 Katz SD, Rao R, Berman JW, *et al*. Pathophysiological correlates of increased heart failure: relation to nitric oxide - dependent vasodilation in the forearm circulation. *Circulation*, 1994,**90**:12
11 Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*, 1996,**334**:1717
12 Yokoyama T, Nakano M, Bedarczyk JL, *et al*. Tumor necrosis factor-α provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*, 1997,**95**:1274
13 Nichols M, Weih F, Schimid W, *et al*. Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: Implications for cAMP induced gene transcription. *Eur Mol Bioorg J*, 1992,**9**:3337

BETA-BLOCKERS AND THEIR ENANTIOMERS ANTAGONIZE THE ABERRANT SIGNAL TRANSDUCTION OF RAT MYOCARDIAL CELLS INDUCED BY TUMOR NECROSIS FACTOR-α

Yu Xiyong (Yu XY), Lin Shuguang (Lin SG), Wang Xiaomei (Wang XM) and Wu Shuying (Wu SY)

(*Department of Clinical Pharmacology, Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080*)

ABSTRACT **AIM:** To investigate the effects of β-blockades and their enantiomers on the abnormal signal transduction of cultured myocardial cells of neonatal rats induced by tumor necrosis factor-α (TNFα). **METHODS:** The experiments were carried out in cultured myocardial cells from neonatal Wistar rats and were divided into 8 groups: (1) control; (2) given TNFα; (3) given TNFα plus *S*(-)-propranolol; (4) given TNFα plus *R*(+)-propranolol; (5) given TNFα plus *S*(-)-atenolol; (6) given TNFα plus *R*(+)-atenolol; (7) given TNFα plus carvedilol; (8) given TNFα plus SR59230A. **RESULTS:** The signal transduction of β-adrenergic receptors in rat myocardial cells was altered by TNFα: the densities of β-adrenergic receptors were downregulated (TNFα (0.95±0.31) pmol•mg^{-1}(protein) *vs* control (2.08±0.07) pmol•mg^{-1}(protein), $P=0.004$); Gs-protein was decreased and Gi-protein was increased, resulting in reduction of Gs/Gi ratios (TNFα 1.62±0.83 *vs* control 3.63±1.57, $P<0.01$); intracellular cAMP was raised (TNFα (7.88±0.58) pmol/10^6 cells *vs* control 4.0±0.34 pmol/10^6 cells, $P<0.01$); protein kinase-A (PKA) was activated (TNFα (2119±341) pmol•min^{-1}•mg^{-1}(protein) *vs* control (1182±284) pmol•min^{-1}•mg^{-1}(protein), $P<0.01$), and the levels of total PKA went up (TNFα (2449±390) pmol•min^{-1}•mg^{-1}(protein) *vs* control (1836±311) pmol•min^{-1}•mg^{-1}(protein), $P<0.01$). The effects of TNFα on G-proteins, cAMP and PKA can be weakened significantly by *R*(+)-propranolol, *R*(+)-atenolol and the third generation β-blockade carvedilol, but not weakened by *S*(-)-enantiomers of β-blockers. **CONCLUSION:** The *R*(+)-enantiomer of β-blockers was more effective to antagonize the aberrant effects of TNFα than *S*(-)-enantiomer. The *R*(+)-isomer may be a potential β-blocker to treat heart failure.

KEY WORDS tumor necrosis factor-α; β-blocker; enantiomer; myocardial cells; signal transduction