

白三烯 C₄ (LTC₄) 放射受体结合方法的建立及二苯乙烯低聚体和 LTC₄ 受体结合特性

侯艳宁* , 朱秀媛** , 程桂芳

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 建立 LTC₄ 放射受体结合实验方法, 并比较二苯乙烯低聚体(Gr3)和 LTC₄ 受体的结合特性。方法: 以豚鼠肺膜为实验材料, 采用 ³H-LTC₄ 为放射配体, 以 FPL₅₅₇₁₂ 作阳性对照药物, Gr3 为实验药物, 进行药物竞争结合实验。采用离体器官生物检测法鉴定 Gr3 对 LTC₄ 受体的拮抗作用。结果: ³H-LTC₄ 与其相应受体呈现单一结合位点, Gr3 可明显取代 ³H-LTC₄ 与其受体结合。生物学检定法证实 Gr3 可抑制 LTC₄ 引起的生物学效应。结论: 豚鼠肺膜 LTC₄ 受体为单一结合位点受体, Gr3 为高活性的 LTC₄ 受体拮抗剂。

关键词 白三烯 C₄; 放射受体结合; 二苯乙烯低聚体(Gr3)

白三烯 C₄ (LTC₄) 是过敏性慢反应物质(SRS-A)的主要成分之一, 是花生四烯酸(AA)经 5-脂氧酶代谢产生的物质, 是炎症、过敏反应中的重要介质, 参与多种疾病的发病过程^[1~3]。因此, 研制 LTC₄ 合成抑制剂或受体拮抗剂从而消除其有害的生物学效应, 在多种疾病的防治方面具有重要意义。本文以豚鼠肺组织为实验材料, 建立 LTC₄ 放射受体结合实验方法, 分析该受体有关特征, 研究了从我国民间草药小叶买麻藤中分离出的一种分子量为 514 的新型化合物二苯乙烯低聚体(Gr3)^[4,5]对 LTC₄ 放射受体结合的影响, 并用生物学方法确定其生物学作用。

材料和方 法

动物 实验采用 8 豚鼠, 体重 180 ~ 220 g, 由北京崇文门实验动物养殖场提供。

试剂和药品 LTC₄ 标准品为 Sigma 产品; ³H-LTC₄ 购自 Amersham; FPL₅₅₇₁₂ 由天津药物研究院魏月芳教授赠送; 二苯乙烯低聚体(Gr3, HPLC 分析为单峰, TLC 检查为一点, 分子量为 514) 由本所植化室林茂教授提供; 其他溶剂和试剂均为分析纯, 国内市售。

肺膜受体制备^[6,7] 豚鼠断头后取出肺脏, 于冰水浴中将肺组织剪成细小碎块, 以 1:10 (w:v) 比例加入 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4), 制备匀浆(Polytron 匀浆器, 第 6 档, 30 s), 经纱布过滤, 4℃ 下 1 000 × g 离心, 10 min, 取上清液, 再 45 000 × g 离心, 10 min, 沉淀加入 Tris-HCl 缓冲液(含丝氨酸 50 mmol·L⁻¹), 混匀, 蛋白质浓度调至 1.5 mg·mL⁻¹, 用于 ³H-LTC₄ 放射受体结合实验。

³H-LTC₄ 放射受体结合实验^[6,7]

饱和实验 每个反应管加入膜蛋白 75 μg, 再分别加入不同浓度的 ³H-LTC₄ (0.02 ~ 0.5 μmol·L⁻¹), 非特异结合管加非标记 LTC₄ 1 μmol·L⁻¹, 最后用 Tris-HCl 缓冲液(内含 CaCl₂ 20 mmol·L⁻¹, 丝氨酸 20 mmol·L⁻¹) 补充总反应容积至 250 μL, 混匀后于 30℃ 水浴温孵 40 min, 反应毕, 迅速抽滤并加冰冷 Tris-HCl 缓冲液 5 mL 洗 3 次, 除去各管中游离标记配体。将不同浓度的 ³H-LTC₄ 分别直接滴于滤膜上, 测定放射总活性。将滤膜烤干后加 5 mL 闪烁液(POPOP 100 mg, PPO 5 g, 加二甲苯至 1 000 mL), 用液闪计数器测定滤膜上的放射性强度。用 GPIP 程序作图并求算 B_{max} 和 K_d 值。

竞争结合实验 将每个反应管加入膜蛋白 75 μg 和 0.25 nmol·L⁻¹ ³H-LTC₄, 竞争结合管加入不同浓度的受试药物(FPL₅₅₇₁₂ 或 Gr3)。非特异结合管加 1 μmol·L⁻¹ 非标记 LTC₄, 反应条件和处理过程同饱和实验。采用 GPIP 程序作图, 并计算 K_i 和 IC₅₀ 值。

收稿日期: 1999-03-31

* 现址: 白求恩国际和平医院, 石家庄市 050082

** 联系人 Tel: (010) 63165192, Fax: (010) 63017757

离体器官生物检定 同参考文献方法^[8],观察 Gr-3 对 LTC₄ 诱导的回肠肌收缩的影响。

结 果

1 温孵时间对³H LTC₄ 结合的影响

在膜蛋白量固定(75 μg),30 °C恒温条件下,³H-LTC₄ 与其受体结合在 30 min 达峰,至 60 min 时结合量开始下降,故温孵时间宜选择在 40 min,见图 1。

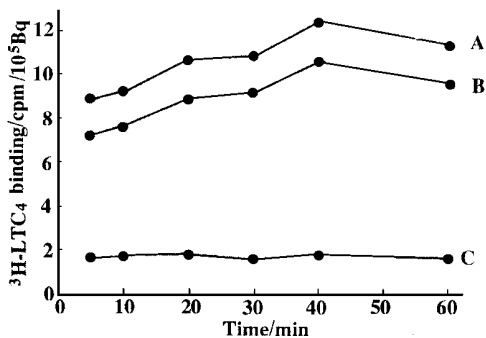


Fig 1 Effect of incubation time on the binding of ³H-LTC₄ to guinea pig lung membrane. A. Total binding; B. Specific binding; C. Nonspecific binding.

2 膜蛋白量对³H LTC₄ 结合的影响

在 30 °C条件下温孵 40 min,加入膜蛋白量 37.5 μg 或 300 μg 时,非特异性结合较高(20%左右),加入膜量在 75 ~ 150 μg 之间时,非特异性结合较低,见图 2。

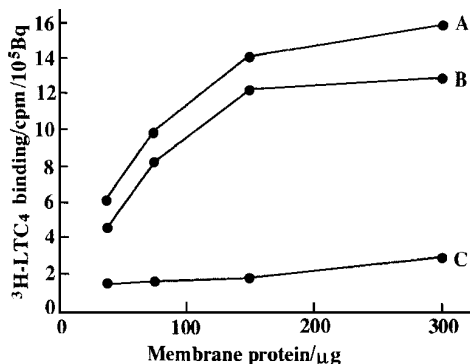


Fig 2 Effect of concentration of membrane protein on the binding of ³H-LTC₄ to guinea pig lung membrane. A. Total binding; B. Specific binding; C. Nonspecific binding.

3 ³H LTC₄ 的饱和曲线及受体特征

图 3 为³H-LTC₄ 的饱和曲线和 Scatchard 作图。数据处理和曲线拟合结果表明,³H-LTC₄ 与其豚鼠肺膜受体的结合呈单一位点,并呈现出特异、饱和和可逆的特点。在 30 °C条件下,³H-LTC₄ 的 K_d 和 B_{max} 值分别为 2.7 × 10⁻¹⁰ mol · L⁻¹ 和 3.55 × 10⁻¹³ mol · mg⁻¹ 蛋白。

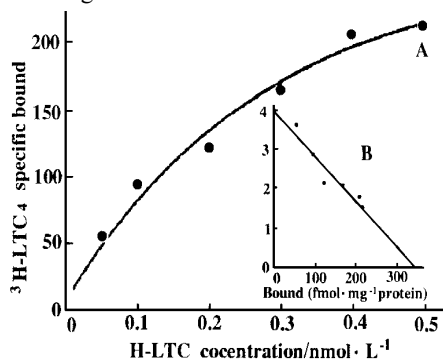


Fig 3 Saturation curve(A) and Scatchard plot(B) for the specific binding of ³H-LTC₄ to guinea pig lung membranes.

4 Gr-3 对³H LTC₄ 的竞争结合影响及生物学方法检定

实验结果显示,Gr-3 明显拮抗³H-LTC₄ 与其受体的结合,其作用程度明显高于阳性对照药 FPL₅₅₇₁₂,两者的 IC₅₀ 值分别为 6.39 × 10⁻⁷ 和 8.23 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹。K_i 值分别为 3.32 × 10⁻⁷ 和 4.27 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹。竞争结合曲线见图 4。离体器官生物测定法进一步证实 Gr-3 能有效抑制 LTC₄ 诱导的豚鼠回肠肌收缩。

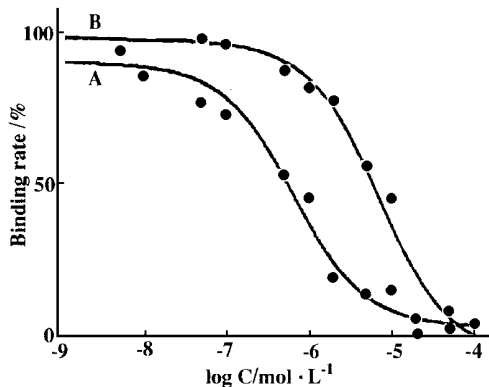


Fig 4 Competition of Gr-3(A) and FPL₅₅₇₁₂(B) for the binding of ³H-LTC₄ to guinea pig lung membranes.

讨 论

70年代末的研究证实,LTs是AA代谢产物及炎症介质,在此之前LTs被认为是一种SRS-A,于1938年首次使用该名词,直到40年后才搞清楚SRS-A是由LTC₄,D₄及E₄等组成,近年来对LTs的研究日趋深入。LTs的生物学效应主要通过和其特异性膜受体结合而起作用。鉴于LTs在人类疾病(如炎症,过敏)中的重要作用,可以合理地推测抑制LTs的生物学效应有益于临床,故促使人们致力于研制出新的药物以对抗其作用,抑制LTs作用的策略包括抑制LTs的合成和拮抗LTs受体,以LTs受体拮抗剂的研究在国外进展尤为迅速。在LTs受体拮抗剂的发展过程中,早期的化合物活性较弱。第一个羟苯乙酮类LTs受体拮抗剂称为FPL₅₅₇₁₂^[9],它的生物效能较弱,半衰期短。同一类的其他化合物已合成的有LY₁₇₁₈₈₃,L-649,923和YM16638等,但均不具有足够的效力作为LTs受体的有效拮抗剂。L-649,923除了对抗原诱导的反应无作用外,还因胃肠道反应发生率高,很难使病人耐受^[10]。此后又有一系列新一代的LTs受体拮抗剂问世,如扎鲁司特zafirlukast(商品名为“安可来”accolate),quinolones MK-571和RG-12,525,ONO-1078(pranlukast)和SK&F104,353为走向临床带来希望。SK&F104,353口服几乎没有活性,通过吸入途径的研究证实其效力至少比早期的LTs受体拮抗剂高200倍^[11]。最近,扎鲁司特作为一种新的一线哮喘控制性药物在国外正式批准用于临床^[12]。国内有关这方面的研究晚于国外,至今我国尚无自行研制LTs受体拮抗剂的报道。本文采用豚鼠肺组织为实验材料,建立了³H-LTC₄放射受体结合法并分析其有关特性,实验结果表明,³H-LTC₄在肺膜受体是单一结合位点,在30℃条件下,其K_d和B_{max}值分别为 $2.7 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.55 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白。和国外文献报道基本一致。

买麻藤为我国南方民间草药,具有明显的抗炎作用。Grr-3是从草药小叶买麻藤中分离出来的一种二苯乙烯类低聚体^[4,5]。放射受体结合实验研究表明,Grr-3对LTC₄受体具有较高的亲和力,其IC₅₀

值为 $6.39 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,作用强度较FPL₅₅₇₁₂高出一个数量级,生物检定法证实其为高效的LTC₄受体拮抗剂,提示Grr-3可能是买麻藤抗炎作用的主要有效成分之一。Grr-3的发现对今后有关LTs受体理论的研究及抗炎抗过敏药物的研制具有重要价值。有关Grr-3的体内效应有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 1983, **220**: 568
- 2 Borgeat P, Sirois P. Leukotrienes: a major step in understanding immediate hypersensitivity reactions. *J Med Chem*, 1981, **24**: 121
- 3 Henderson WR. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med*, 1994, **121**: 645
- 4 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究. 第3卷. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1997. 156
- 5 Lin M, Li JB, Li SZ, et al. A dimeric stilbene from *Gnetum parvi folium*. *Phytochemistry*, 1992, **3**: 633
- 6 Nicosia S, Rovati G, Oliva D, et al. Binding of leukotriene C₄ to human lung membranes. *Prog Biochem Pharmacol*, 1985, **20**: 101
- 7 Norman P, Carstairs JA, Abram TS. Differential autoradiographic leukotriene binding site in guinea pig airways. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res*, 1987, **17**: 505
- 8 何克勤,程桂芳,奚凤德,等. 查耳酮类化合物对过敏性慢反应物质拮抗作用的构效关系. *药学报*, 1996, **31**: 878
- 9 Lee Th, Walport MJ, Wilkinson AN, et al. Slow reacting substance of anaphylaxis antagonist FPL₅₅₇₁₂ in chronic asthma. *Lancet*, 1981, **2**: 304
- 10 Britton JR, Hanley SP, Tattersfield AE. The effect of an oral leukotriene D₄ antagonist L-649,923 on the response to inhaled antigen in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1987, **79**: 811
- 11 Cheng JB. Early efficacy data with a newer generation of LTD₄ antagonist in antiasthma trials: early promise for a singular mediator antagonist. *Pulm Pharmacol*, 1992, **5**: 77
- 12 Smith LJ, Geller S, Ebright L, et al. Inhibition of leukotriene D₄-induced bronchoconstriction in normal subjects by the oral LTD₄ receptor antagonist ICI204,219. *Am Rev Respir Dis*, 1990, **141**: 988

STUDIES ON THE CHARACTERISTICS OF LTC₄ RECEPTOR WITH RADIO LIGAND BINDING ASSAY AND THE EFFECT OF STILBENE POLYMER(Gnr 3)

Hou Yanning, Zhu Xiuyuan and Cheng Guifang

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and
Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT **AIM:** To set up a radio ligand binding assay of LTC₄ for studying the effect of Gnr3 (a stilbene polymer isolated from *Gnetum parvifolium*) on the LTC₄ receptor. **METHODS:** Guinea pig lung membrane was used as experimental materials, ³H-LTC₄ as radio ligand, FPL₅₅₇₁₂ as positive control drug and Gnr3 as test drug. Bioassay *in vitro* was used to determine the biological function of Gnr3. **RESULTS:** The binding of ³H-LTC₄ to its receptor was shown to be specific, saturable and reversible. The K_i and B_{max} values were $2.7 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3.55 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, respectively, at 30 °C. Gnr3 was found to inhibit ³H-LTC₄ in competing for LTC₄ receptor. The IC₅₀ and K_i values were $6.39 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3.32 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. Gnr3 was also found to be a LTC₄ receptor antagonist by bioassay *in vitro*. **CONCLUSION:** The binding of ³H-LTC₄ on guinea pig lung membrane showed a single binding site. Gnr3 is an effective LTC₄ receptor antagonist.

KEY WORDS LTC₄; radioreceptor assay; Gnr3(stilbene polymer)