

白三烯 B₄ 放射受体结合测定方法的建立及其特性的分析

赵 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)

白三烯 B₄ (leukotriene B₄, LTB₄) 是花生四烯酸 (arachidonic acid) 5-脂氧酶代谢产物,它是体内产生的最强的白细胞趋化因子之一,参与了体内多种免疫和炎症的发生和发展过程^[1,2]。阻断白三烯 B₄ 受体应能减弱甚或消除炎症反应。目前国外已发现了多种白三烯 B₄ 受体拮抗剂,但尚未正式用于临床。本文建立了白三烯 B₄ 放射受体结合测定方法,对该受体的特性进行了分析,并以去甲二氢愈创木酸 (nordihydroguaiaretic acid, NDGA) 为阳性对照,对该方法的可靠性进行了考查。

豚鼠(♀, 180~220 g), 断头后取出脾脏, 在冰冷的生理盐水中洗净并剪去结缔组织, 称重后加入 10 倍体积 (w/v) 的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol·L⁻¹, 20℃, pH 7.0, 下同), 冰浴冷却下制备组织匀浆 (Polytron 匀浆器, 第六档, 10 s×3), 得到 10% 的膜受体粗提物^[3]。将该粗提物于 4℃ 下 1 000 g 离心 15 min, 取上清液, 于沉淀中加入适量 Tris-HCl 缓冲液, 用滴管轻轻抽吸混匀后, 与上述同等条件下离心。合并两次离心的上清液, 再于 4℃ 40 000 g 离心 10 min, 弃上清液, 取沉淀加入 Tris-HCl 缓冲液, 用滴管轻轻抽吸混匀, 以牛血清白蛋白为标准, 依 Lowry 法测定蛋白质含量, 并将蛋白质浓度调至 3.0 mg·ml⁻¹。

考察了不同条件, 如膜蛋白浓度、温孵时间及非标记 LTB₄ 浓度对³H-LTB₄ 与脾脏细胞膜受体结合的影响。在饱和实验中^[5], 总反应体积为 150 μl, 总结合管加入 75 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 20 μl (终浓度为 10 mmol·L⁻¹), 甲醇 15 μl (终浓度为 10%, v/v), 3.0 mg·ml⁻¹ 膜蛋白 50 μl (终浓度为 1.0 mg·ml⁻¹), 特异性结合管加入不同浓度的³H-LTB₄ 20 μl (使终浓度为 0.1~5.0 nmol·L⁻¹), Tris-HCl 缓冲液 45 μl; 非特异性结合管另加 16.5 μmol·L⁻¹ LTB₄ 20 μl (终浓度为 2.2 μmol·L⁻¹) 及 Tris-HCl 缓冲液 25 μl。混匀后于 25℃ 水浴中温孵 60 min。反应毕, 迅速抽滤并加入 4 ml 冰冷的 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液重复洗 3 次, 以除去反应管中的游离标记配体。将滤膜烘干后加 5 ml 闪烁液 (POPOP 100 mg, PPO 5 g, 加二甲苯至 1000 ml), 用液体闪烁计数器测定滤膜上的放射性强度 (dpm)。

在竞争结合实验中, 对照管加入甲醇、³H-LTB₄、MgCl₂、LTB₄、膜蛋白 (体积和终浓度与上述实验同) 并补充体积至 150 μl。测定管以 20 μl 7.5×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 的待测样品 (终浓度为 1×10⁻⁵ mol·L⁻¹) 取代 LTB₄。反应条件、处理过程及测定均与饱和实验相同。以 1×10⁻⁵ mol·L⁻¹ NDGA 对本方法的可靠性进行了考验。采用 GPIP 程序对实验数据进行处理。

由饱和曲线 (图 1), 经 Scatchard (图 2) 及 Hill (图 3) 作图分析可知, 在上述条件下, ³H-LTB₄ 与豚鼠脾脏细胞膜受体结合呈现特异、饱和、可逆的特点, 并为单一结合位点。在 25℃ 条件下, 其 K_d 值为 1.55×10⁻⁹ mol·L⁻¹, B_{max} 值为 2.59×10⁻¹³ mol·mg⁻¹ 蛋白。

* 本文于 1995 年 12 月 20 日收到。

本研究为自然科学基金资助项目

* 现在通信处: 中国医学科学院、中国协和医科大学阜外医院生化室, 北京 100037

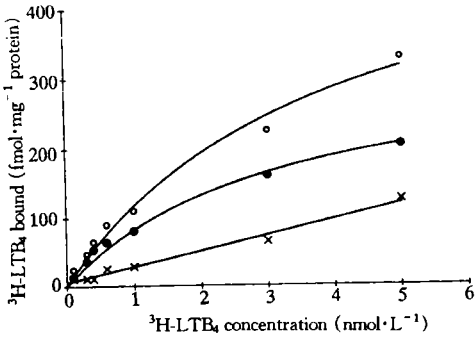


Fig 1 The saturation isotherm of guinea-pig splenocytes membrane $^3\text{H-LTB}_4$ binding. The $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ membrane protein was incubated with $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, 10% methanol and in the presence or absence of $2.2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ LTB}_4$ for 60 min at 25°C . (\circ) Total binding, (\bullet) Specific binding, (\times) Nonspecific binding.

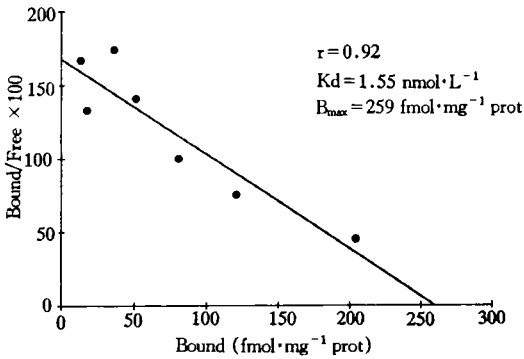


Fig 2 Scatchard analysis of $^3\text{H-LTB}_4$ binding to guinea-pig splenocytes membrane protein.

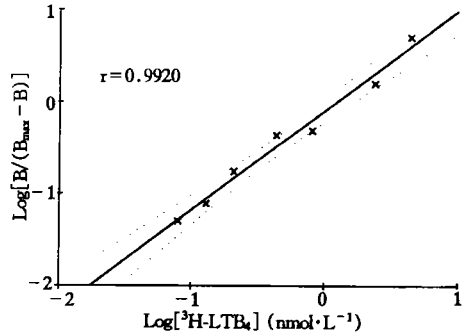


Fig 3 Hill analysis of $^3\text{H-LTB}_4$ binding to guinea-pig splenocytes membrane protein (with 95% confidence).

在人的多形核白细胞膜上存在两类特异性 LTB_4 受体, 根据配体与受体结合的 K_d 值, 分为高亲和力受体 (high affinity receptor, HAR, $K_d = 0.39 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和低亲和力受体 (low affinity receptor, LAR, $K_d = 61 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。不同的受体亚型介导不同的效应。HAR 介导细胞内钙短暂升高及白细胞的聚集趋化反应; LAR 介导溶酶体酶的释放, 加速氧化代谢。 LTB_4 与受体结合后, 主要表现为膜去极化, 细胞内 pH 值改变, 溶酶体酶释放等^[4]。豚鼠的肺泡巨噬细胞也存在这两类受体, 主要表现为高亲和力受体。由本文饱和实验的测定结果, 通过与人及其它动物的 K_d 值比较, 表明豚鼠脾脏细胞膜受体表现为高亲和力受体。

目前国外已发表几十种 LTB_4 受体拮抗剂和 LTB_4 生成抑制剂, 如 SC-45694 及 RG-14893 等^[5,6]。国内在这方面的研究起步较晚, 本实验室分别于 1988 年和 1994 年发现氟灭酸及紫草素为 LTB_4 生成抑制剂^[7,8]。NGDA 是一种用于保存油脂的抗氧化剂, 文献报道它能抑制 LTB_4 的产生, 也能抑制 LTB_4 与人多形核细胞受体的特异结合且呈剂量相关方式, $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 达最大抑制, $\text{IC}_{50} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。NGDA 体外实验可抑制 LTB_4 引起的 PMNL 趋化和溶酶体酶释放, 体内给药可抑制由 LTB_4 所致的小鼠耳部炎症^[9]。实验结果表明建立的放射受体结合方法特异性强, 灵敏度高, 重现性较好 (阳性对照药 NGDA 在 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 $^3\text{H-LTB}_4$ 与受体结合的抑制率为 $44.7\% \pm 7.2\%$, $n = 6$)。该方法所需的测定样品量很少, 仅几毫克即可, 是药理学研究 LTB_4 受体和寻找 LTB_4 受体拮抗剂的较理想的方法。

关键词 白三烯 B_4 受体; 放射受体结合测定法

参 考 文 献

- 1 Micheal AB. The pharmacology and pathophysiology of leukotriene B₄. *Br Med Bulletin*, 1983, **79**:249
- 2 Kohi F, Agrawal DK, Cheng JB, *et al.* The development of a sensitive and specific radioreceptor assay for leukotriene B₄. *Life Sci*, 1988, **42**:2241
- 3 Cheng JB, Cheng EIP, Kohi F, *et al.* [³H]Leukotriene B₄ binding to the guinea pig spleen membrane preparation: A rich tissue source for a high-affinity leukotriene B₄ receptor site. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986, **236**:126
- 4 Goldman DW, Goetzel EJ. Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocytes receptor for leukotriene B₄. *J Exp Med*, 1984, **159**:1027
- 5 Tsai BS, Keith RH, Price DV, *et al.* The leukotriene B₄ receptor agonist/antagonist activities of SC-45694 in human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, **268**:1493
- 6 Huang FH, Chan WK, Warus JD, *et al.* 4-[2-[Methyl(2-phenethyl) amino]-2-oxoethyl]-8-(phenylmethoxy)-2-naphthalene carboxylic acid: A high affinity, competitive, orally active, leukotriene B₄ receptor antagonist. *J Med Chem*, 1992, **35**:4253
- 7 李宁元,朱秀媛.几种抗炎药物对白三烯 B₄ 生物合成的影响.药学报,1988, **23**:104
- 8 王文杰,白金叶.紫草素抗炎及对白三烯 B₄ 生物合成的抑制作用.药学报,1994, **29**:161
- 9 Maloff BL, Fefer D, Cooke GM. Inhibition of LTB₄ to human neutrophils by nordihydroguaiaretic acid. *Agents Actions*, 1987, **21**:358

STUDIES ON THE CHARACTERISTICS OF LEUKOTRIENE B₄ RECEPTOR WITH RADIO-LIGAND BINDING ASSAY

N Zhao*, XY Zhu and GF Cheng

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

ABSTRACT Leukotriene B₄ (LTB₄), one of the metabolites of arachidonic acid via 5-lipoxygenase (5-LO), plays important role in some inflammatory diseases as one of the most potent chemotaxis factor. A radio-ligand binding assay was set up and the characteristics of LTB₄ receptor on guinea-pig splenocytes membrane were studied. At 25°C, the K_d was found to be 1.55×10^{-9} mol·L⁻¹ and the B_{max} was 2.59×10^{-13} mol·mg⁻¹ protein. The assay established was evaluated by nordihydroguaiaretic acid (NDGA) as positive control.

Key words Leukotriene B₄ receptor, Radio-ligand receptor binding assay

* Division of Biochemistry, Institute of Cardiovascular Disease, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037