

# 肾上腺素能 $\beta_1$ 受体亚型特异性抗体的制备及鉴定

任京力<sup>1</sup>, 赵树进<sup>2</sup>, 杨太成<sup>2</sup>, 陈汝筑<sup>1</sup>, 孙桂玲<sup>3</sup>

(1. 中山医科大学药理教研室, 广东 广州 510089; 2. 广州军区广州总医院药学部, 广东 广州 510010;  
3. 广州市药检所, 广东 广州 510160)

**摘要:**【目的】制备和鉴定  $\beta_1$  受体亚型特异性抗体。【方法】人工合成  $\beta_1$  受体细胞膜外第二环 197-222 位氨基酸序列作为抗原。连接钥孔贝血蓝蛋白(KLH)增加抗原性后免疫兔获得抗血清。通过凝胶双扩散实验和 ELISA 法鉴定其效价; 通过免疫荧光法及 ELISA 法鉴定其特异性; 通过离体蛙心灌流实验鉴定其药理活性。【结果】该抗血清效价高(分别为  $1:64$  和  $1:10^6$ )、特异性强, 能和心肌  $\beta_1$  受体发生特异性结合( $1:10^4 \sim 1:10^5$ ), 为异丙肾上腺素的非竞争性拮抗剂。( $pD_2' = 1.62$ )。【结论】成功制备的  $\beta_1$  受体亚型特异性抗体可能成为进一步研究  $\beta_1$  受体分布、功能和定量的有力工具。

**关键词:** 受体, 肾上腺素能  $\beta_1$ ; 多克隆抗体/分离和提纯

中图分类号: R392-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0037-03

**Preparation and Identification of Subtype Specific Antibody Against Beta-1 Adrenergic Receptor** REN Jing-li<sup>1</sup>, ZHAO Shu-jin<sup>2</sup>, YANG Tai-cheng<sup>2</sup>, CHEN Ru-zhu<sup>1</sup>, SUN Gui-ling<sup>3</sup>. (1. Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pharmacy, General hospital of Guangzhou Army, Guangzhou 510010, China; 3. Institute for Drug Control of Guangzhou, Guangzhou 510160, China)

**Abstract:** 【Objective】To prepare and identify subtype specific antibody against beta-1 adrenergic receptor. 【Methods】The antigen was artificially synthesized according to the amino acid sequence of the second extra cellular loop of beta-1 adrenergic receptor(197-222) and coupled to KLH to improve its antigenicity. The antibody was obtained after immunizing rabbits by peptide-KLH compound. The titre of the antibody was determined by double agarose diffusion and ELISA, the specificity by immunofluorescence and ELISA, and pharmacological activity by isolated toad heart irrigation test. 【Results】The antibody was proved to be high titre ( $1:10^6$  for ELISA and  $1:64$  for double agarose diffusion), specific( $1:10^4 \sim 1:10^5$  for ELISA) and able to non-competitively antagonize isoprenaline's interaction with beta adrenergic receptor( $pD_2' = 1.62$ ). 【Conclusion】The subtype specific antibody against beta-1 adrenergic receptor was successfully prepared and be served as a valuable tool for further study on quantity, distribution, and function of beta-1 adrenergic receptor.

**Key words:** receptors, adrenergic, beta-1; polyclonal antibody/ isolation & purification

$\beta$  肾上腺素能受体介导许多重要的生物学效应。目前的研究表明,  $\beta$  肾上腺素能受体至少有 3 个亚型存在, 即  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  和  $\beta_3$ <sup>[1]</sup>。 $\beta_1$  受体对现有的亚型选择性配基的选择性均不高<sup>[2]</sup>。应用亚型受体核苷酸探针检测受体的方法存在着一些缺点<sup>[3,4]</sup>, 只有亚型特异性抗体法检测受体亚型的分布、含量、功能才是最精确的<sup>[5,6]</sup>。受体抗体可能具有配基的特性, 但是否具有配基药理学活性, 目前国内尚未见报道。我们根据  $\beta_1$  受体细胞膜外第二环部分氨基酸序列人工合成多肽抗原, 制备出特异性  $\beta_1$  受体抗体, 旨在为进一步研究  $\beta_1$  受体的分子作用机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物及试剂

动物: 新西兰大耳兔, ( $2.5 \pm 0.5$ ) kg, 雄性, 普通级; SD 大鼠, 220~250 g, 雌雄兼用, 普通级; 蟾蜍( $90 \pm 10$ ) g, 雄性; 均由中山医科大学实验动物中心提供。试剂: 钥孔贝血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanine, KLH), 美国 Calbiochem 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG,  $1:2000$ , 军事医学科学院提供; 合成多肽用氨基酸, 美国 Sigma 公司, FITC 标记的山羊抗兔 IgG, 华美生物工程公司。

### 1.2 多肽链的选择及合成

$\beta_1$  受体共有 7 个跨膜区, 分为膜外多肽链和膜内多肽链。文献表明<sup>[2~4]</sup>  $\beta_1$  受体细胞外第二环氨基酸序列具有抗原表位, 故选择第二环氨基酸序列

收稿日期: 2001-06-13

基金项目: 全军“九五”医学科研规划科研基金资助项目(98M037)

作者简介: 任京力(1971-), 男, 河南新乡人, 讲师, 博士生, 现在新乡医学院药理教研室工作(453003)。

(197-222)作为人工抗原。其序列为-H-W-W-R-A-E-S-D-E-A-R-R-C-Y-N-D-P-K-C-C-D-F-V-T-N-R。用多肽合成仪合成多肽<sup>[5]</sup>,并通过反相 HPLC 纯化,纯度>90%,氨基酸组成分析、紫外及荧光扫描结果满意。

### 1.3 抗原抗体的制备

按照 Green 等人的方法<sup>[6]</sup>,将多肽与钥孔胃贝血蓝蛋白联结,经过 Sephadex G<sub>50</sub> 柱层析分离,收集第一峰,即肽-KLH 复合物, -20℃保存。肽-KLH 复合物用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L pH7.4)配成 2 g/L 溶液作为抗原,免疫新西兰大耳兔。免疫方法,第一次用肽-KLH 复合物加福氏完全佐剂(1:1),皮下及皮内多点注射,每兔 2 mg。以后每隔 3 周用同样方法加强免疫(福氏完全佐剂换成福氏不完全佐剂)。共免疫 5 次。第 3 次后开始耳缘静脉取血测定抗血清效价。最后 1 次采用直接耳缘静脉注射肽-KLH 复合物,每兔 1 mg,作为冲击免疫。1 周后颈总动脉放血,常规方法分离血清,饱和硫酸铵分段盐析法纯化。Lowry 法测定蛋白含量, -20℃保存。

### 1.4 抗血清的鉴定

1.4.1 凝胶双扩散实验 制备琼脂糖凝胶平皿(10 g/L)。每块平皿中打两组梅花型孔(其中 1 组为正常兔血清对照组)。中间孔分别加入  $\beta_1$  抗原肽、肽-KLH 复合物及 KLH,周围孔中分别加入倍比稀释的抗血清或正常兔血清(1:2~1:64),湿盒中室温反应 24 h,观察是否有免疫沉淀线出现。

1.4.2 肽作为免疫吸附剂对兔抗血清的 ELISA 测定 将合成多肽作为抗原包被到 96 孔反应板中,1.0  $\mu$ g/孔,包被液为 pH9.6 的碳酸缓冲液,4℃过夜,充分洗涤后用 100 g/L 牛血清白蛋白封闭,37℃温育 2 h,4℃过夜。充分洗涤后加入不同稀释度的多抗血清或正常兔血清或无关血清,37℃温育 2 h,充分洗涤后加入过氧化物酶标羊抗兔 IgG,37℃,1 h,充分洗涤后加入邻苯二胺底物反应液,37℃,20 min 后加入 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,在酶标仪上 490 nm 处读取吸光度。

1.4.3 大鼠心肌细胞膜作为吸附剂对抗血清的 ELISA 测定 成年 SD 大鼠,处死,迅速取出心脏,除血污、心包,将心肌组织剪碎,置于内切式匀浆器中,加入适量 PBS(内含 0.25 mol/L 蔗糖),匀浆 2 min(以上操作均在冰浴中进行)后,离心 7 000 r/min( $r=3.8$  cm),10 min,将上清转入另一试管

中,离心 10 000 r/min( $r=11$  cm),15 min,沉淀用适量包埋液(碳酸缓冲液)混匀,包埋至 96 孔反应板中,其余过程同 1.4.2 操作。

1.4.4 免疫荧光法对多抗血清的鉴定 大鼠颈椎脱臼处死后迅速取出心脏,去血污心包,用羧甲基纤维素包埋后置液氮中冷冻 30 min,在冷冻切片机上冠状切片,切片条件:箱温-16℃,刀温-16℃,切片厚度 8  $\mu$ m,将 1:100 多抗血清或正常兔血清(含 50 g/L 牛血清白蛋白)分别均匀滴加在切片表面,于湿盒中 4℃过夜,次日用 PBS 充分洗涤后,在切片表面均匀滴加异硫氰酸盐(FITC)标记的羊抗兔 IgG(1:100),于湿盒,暗室中 37℃60 min, PBS 充分洗涤后,于荧光显微镜下观察。

1.4.5 多抗血清的药理活性鉴定 以异丙肾上腺素做离体蛙心的浓度-效应关系蓄积曲线(采用离体蛙心灌流实验)后,分别用不同浓度的心得安及多抗血清观察它们对异丙肾上腺素的浓度-效应关系曲线的影响。每个浓度组均做 8 只蟾蜍。不同药物之间充分换液,并使蛙心收缩基本恢复至基线水平。

### 1.5 统计

计量资料以均数±标准差表示,两组数据比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 凝胶双扩散结果

经过 24 h 自然扩散,实验组均出现了免疫沉淀线,对照组全是阴性。说明免疫是成功的,抗血清的效价满意(1:64)。

### 2.2 肽作为免疫吸附剂对抗血清的鉴定

可以明显看到抗血清能和多肽的结合呈现出高亲和力(1:10<sup>-6</sup>)和特异性(各种对照均几乎不与肽结合)(图 1)。

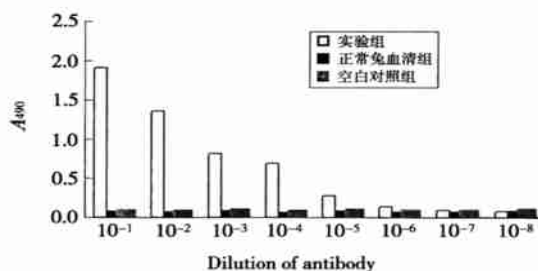


图 1 人工抗原作为免疫吸附剂对多抗血清的 ELISA 鉴定  
Fig. 1 Identification of polydonal antibody by ELISA with synthesized peptide as immunosorbent

### 2.3 大鼠心肌细胞膜蛋白作为免疫吸附剂对抗血清的鉴定

抗血清能和完整受体蛋白结合,且效价满意( $10^{-4} \sim 10^{-5}$ ),对照组几乎没有结合,说明抗血清的结合是特异的(图2)。

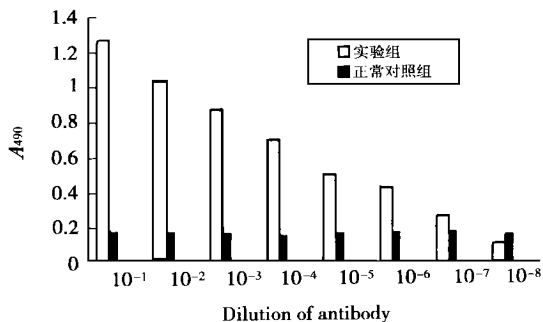


图2 大鼠心肌细胞膜为抗原的ELISA检测

Fig. 2 Identification of polyclonal antibody by ELISA with cell membrane of rat's heart muscle as immunosorbent

### 2.4 大鼠心肌组织免疫荧光法对抗血清的鉴定

实验组切片有强的荧光,对照组却没有荧光,进一步证实了抗血清的特异性结合作用,见图3。



图3 大鼠心肌组织免疫荧光对抗血清的鉴定

Fig. 3 Immunofluorescent identification of polyclonal antibody with rat's heart muscle as antigen (fluorescence microscope, 20 $\times$  10)

### 2.5 离体蛙心灌流实验

图4可以看出多抗能使异丙肾上腺素的浓度-效应曲线压低,而心得安则可使之平行右移。这证明抗血清具有药理学活性,能非竞争地拮抗异丙肾上腺素与 $\beta$ 肾上腺素能受体的相互作用。按照孙瑞元编《定量药理学》介绍的方法进行计算<sup>[3]</sup>。

## 3 讨论

$\beta$ 肾上腺素能受体有3种亚型,即 $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 和 $\beta_3$ ,其中 $\beta_3$ 受体与 $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 受体氨基酸序列的同源性较低,人 $\beta_3$ 受体与 $\beta_1$ 受体基因仅有51%相同,与

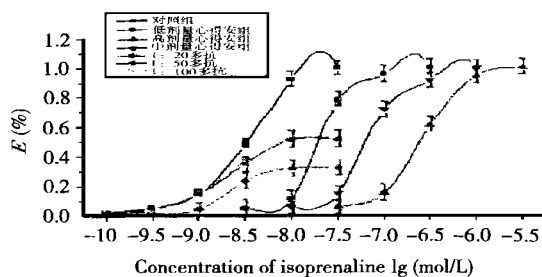


图4 心得安及多抗对异丙肾上腺素量效关系的影响

Fig. 4 Effects of propranolol and polydonal antibody on isoprenaline's dose effect relation

*E*: efficacy

$\beta_2$ 受体基因仅有46%相同,且其最强的选择性激动剂BRL类对 $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 的介导作用都很小。目前 $\beta_1$ 最强的选择性拮抗剂GCP20712A和 $\beta_2$ 最强的选择性拮抗剂ICI118551几乎不对 $\beta_3$ 受体起作用。因此可首先将 $\beta_3$ 受体排除在特异性问题之外。而 $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 受体的同源性为54%,那么我们制备的抗 $\beta_1$ 多抗是否会与 $\beta_2$ 受体发生交叉反应呢?事实上,经Northern blot分析证明<sup>[2]</sup>, $\beta_1$ 受体的DNA探针不能与 $\beta_2$ 受体的mRNA结合, $\beta_2$ 受体的DNA探针也不能与 $\beta_1$ 受体的mRNA结合。更加精细的研究发现<sup>[8]</sup>,以 $\beta_1$ 受体26肽(197-222位)或其中片段作为抗原免疫动物产生的多抗不能与 $\beta_2$ 受体发生交叉反应。已证实 $\beta_1$ 受体细胞外第二环部分序列中含有能诱导免疫反应的T和B细胞表位(抗原决定簇),因此,我们选择了 $\beta_1$ 受体细胞膜外197-222位氨基酸序列作为人工抗原。

我们以上述人工抗原免疫动物后,制备出的抗 $\beta_1$ 受体抗体,效价高,特异性强,具有药理学活性。抗血清可能成为鉴定选择性配基的一个新手段,特别是对于目前尚无亚型高度选择性配基的受体;也可能推广到所有膜受体研究中去,并可能发现新的受体亚型;还可能成为筛选新药的一个有力工具。同时,我们将免疫学和受体研究结合了起来,在不影响灵敏度的情况下,克服了常用的放射性同位素标记法诸如半衰期短,同位素污染,脱标等缺点。这为进一步研究 $\beta_1$ 受体的生理功能和分布以及与疾病之间的关系奠定了基础。

参考文献:

[1] 余细勇,林曙光,饶曼人,等.肾上腺素受体亚型的调节及其交

(下转第43页 to page 43)

- cer, 1995, 62(3): 345.
- [2] Collins S J, Rusoetti F W, Gallagher R E, *et al.* Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethyl sulfoxide [ J ]. *J Exp Med*, 1979, 149(4): 969.
- [3] 黄 炜, 陈 涛, 廖兆全 等. 维甲酸对人体肝癌细胞几种酶活性的影响 [ J ]. *广州医学院学报*, 2000, 27(3): 5.
- [4] 朱文渊, 黄 炜, 黄济群. 丁酸钠对 BEL-7402 人肝癌细胞几种酶活性的影响 [ J ]. *实用癌症杂志*, 1998, 13(3): 187.
- [5] 彭 安, 黄 炜, 黄济群. 维甲酸对 BEL-7402 人肝癌细胞的诱导分化作用 [ J ]. *中国现代医学杂志*, 2000, 10(2): 15.
- [6] Kumagai H, Tajima M, Ueno Y. Effect of cyclic RGD peptide on

- cell adhesion and tumor metastasis [ J ]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1991, 177(1): 74.
- [7] Kantor J O, McCormick B, Steeg P S, *et al.* Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells [ J ]. *Cancer Res*, 1993, 53(9): 1971.
- [8] Albin A, Iwamoto Y, Kleinman H K, *et al.* A rapid in vitro assay for quantitating the invasion potential of tumor cells [ J ]. *Cancer Res*, 1987, 47(5): 3239.
- [9] Stetler-Stevenson W G, Liotta L A. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis [ J ]. *Cancer*, 1993, 71(4): 1368.

(编辑 黄小延)

(上接第 28 页 from page 28)

胞损伤有关。从 ET-1 下降 cTnI 升高的关系推测, ET-1 可能在心脏损伤过程中起一定的作用。

## 参考文献:

- [1] Better O S. History of the crush syndrome: from the earthquakes of Messina Sicily 1909 to Spitak, Armenia 1988 [ J ]. *Am J Nephrol*, 1997, 17(3-4): 392.
- [2] Michaelson M. Crush injury and crush syndrome [ J ]. *World J Surg*, 1992, 16(5): 899.
- [3] Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system [ J ]. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61(1): 391.
- [4] Odeh M. The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome [ J ]. *N Eng J Med*, 1991, 324(20):

- 1417.
- [5] Abassi Z A, Hoffman A, Better O S, *et al.* Acute renal failure complicating muscle crush injury [ J ]. *Semin Nephrol*, 1998, 18(5): 558.
- [6] Huang Y S, Yang Z C, Yan B G, *et al.* Pathogenesis of early cardiac myocyte damage after severe burns [ J ]. *J Trauma*, 1999, 46(3): 428.
- [7] Apple F S. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase MB [ J ]. *Clin Chim Acta*, 1999, 284(2): 151.
- [8] Murphy J T, Horton J W, Purdue G F, *et al.* Evaluation of troponin I as an cardiac dysfunction after thermal injury [ J ]. *J Trauma*, 1998, 45(4): 700.

(编辑 黄小延, 张敏瑞)

(上接第 39 页 from page 39)

- 互作用 [ J ]. *国外医学生理学病理科学与临床分册*, 1998, 18(2): 125.
- [2] 陈 修, 陈维洲, 曾贵云. *心血管药理学* [ M ]. 第 2 版 北京: 人民卫生出版社, 1998. 67~68.
- [3] Dorje F, Levey A I, Bram M R, *et al.* Immunological detection of muscarinic receptor subtype protein(m1-m5) in rabbit peripheral tissues [ J ]. *Mol Pharmacol*, 1991, 40(4): 459.
- [4] Bram M R, Collins R M, Spiegel A. Localization of mRNAs encoding the  $\alpha$ -subunits of signal-transducing G proteins with brain and among peripheral tissues [ J ]. *FEBS Lett*, 1987, 222(1): 181.
- [5] Wall S J, Yasuda R B, Li M, *et al.* Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors; distribution of m4 and m5 receptors in rat brain [ J ]. *Mol Pharmacol*, 1991, 40(5): 783.
- [6] Blake A D, Anthony N M, Chen H H, *et al.* Drosophila nervous system muscarinic acetylcholine receptor: transient functional expression and localization by immunocytochemistry [ J ]. *Mol Pharmacol*, 1993, 44(4): 716.
- [7] Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, *et al.* Mapping of a func-

- tional autoimmune epitope on the beta-1 adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [ J ]. *J Clin Invest*, 1990, 86(5): 1658.
- [8] Magnusson Y, Hoyer S, Lengagne R, *et al.* Antigenic analysis of the second extra-cellular loop of the human beta-adrenergic receptors [ J ]. *Clin Exp Immunol*, 1989, 78(1): 42.
- [9] Fu L X, Magnusson Y, Bergh C H, *et al.* Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor 1 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [ J ]. *J Clin Invest*, 1993, 91(5): 1964.
- [10] Merrifield R B. Solid phase peptide synthesis [ J ]. *J Am Chem Soc*, 1963, 85(2): 2149.
- [11] Green N H, Alexander H, Olson A, *et al.* Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin [ J ]. *Cell*, 1982, 28(3): 477.
- [12] 巴德年. *当代免疫学技术与应用* [ M ]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 158~167.
- [13] 孙瑞元. *定量药理学* [ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 393~452.

(编辑 黄小延)