

研究论文

临床常用 β -肾上腺素受体激动剂和拮抗剂对 β -arrestin2招募作用的研究

王怡然¹, 程德琴², 马兰¹, 刘星^{1,*}

复旦大学¹上海医学院药理研究中心; ²脑科学研究院, 上海 200032

摘要: 大量 β -肾上腺素受体(β -adrenergic receptor, β -AR)药物被应用于心血管疾病等临床疾病的治疗, 但许多常用的 β -AR药物对下游 β -arrestin偏向性信号通路的激活特性和作用并不清楚。本文旨在检测临床常用的 β -AR药物对 β -arrestin的招募作用。我们采用TANGO (transcriptional activation following arrestin translocation)方法在稳定转染四环素反式激活因子(tetracycline transactivator protein, tTA)依赖荧光素酶报告子和 β -arrestin2-TEV融合基因的HEK293细胞系(HTLA细胞)中检测 β -AR配体对 β -arrestin2的招募情况。 β -AR被其配体激活后, β -arrestin2被募集到受体的C端, 随后G蛋白耦联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)融合蛋白在TEV蛋白酶裂解位点发生裂解。裂解导致tTA的释放, tTA转移到细胞核后可激活荧光素酶报告基因的转录。结果显示, 非选择性 β -AR激动剂肾上腺素、去甲肾上腺素和异丙肾上腺素能通过 β 1-AR和 β 2-AR招募 β -arrestin2。选择性 β 1-AR激动剂多巴酚丁胺和得诺巴明能通过 β 1-AR招募 β -arrestin2。选择性 β 2-AR激动剂沙丁胺醇和丙卡特罗能通过 β 2-AR招募 β -arrestin2。非选择性 β -AR拮抗剂阿普洛尔和吲哚洛尔能通过 β 1-AR招募 β -arrestin2。选择性 β 1-AR拮抗剂塞利洛尔和贝凡洛尔能够通过 β 1-AR招募 β -arrestin2。选择性 β 2-AR拮抗剂布托沙明能够通过 β 1-AR产生 β -arrestin2招募作用。上述结果为 β -AR药物的潜在作用研究提供线索, 也为后续 β -arrestin偏向性 β -AR药物的筛选奠定研究基础。

关键词: β -肾上腺素受体; β -arrestin2; G蛋白耦联受体; 荧光素酶报告基因

β -arrestin2 recruitment by β -adrenergic receptor agonists and antagonists

WANG Yi-Ran¹, CHENG De-Qin², MA Lan¹, LIU Xing^{1,*}

¹Pharmacology Research Center, Shanghai Medical College; ²Institutes of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: A large number of β -adrenergic receptor (β -AR) agonists and antagonists are widely used in the treatment of cardiovascular diseases and other diseases. Nonetheless, it remains unclear whether these commonly used β -AR drugs can activate downstream β -arrestin-biased signaling pathways. The objective of this study was to investigate β -arrestin2 recruitment effects of β -AR agonists and antagonists that were commonly used in clinical practice. We used TANGO (transcriptional activation following arrestin translocation) assay to detect the β -arrestin2 recruitment by β -AR ligands in HEK293 cell line (HTLA cells) stably transfected with tetracycline transactivator protein (tTA) dependent luciferase reporter and β -arrestin2-TEV fusion gene. Upon activation of β -AR by a β -AR ligand, β -arrestin2 was recruited to the C terminus of the receptor, followed by cleavage of the G protein-coupled receptors (GPCRs) fusion protein at the TEV protease-cleavage site. The cleavage resulted in the release of tTA, which, after being transported to the nucleus, activated transcription of the luciferase reporter gene. The results showed that β -AR non-selective agonists epinephrine, noradrenaline and isoprenaline all promoted β -arrestin2 recruitment at β 1-AR and β 2-AR. β 1-AR selective agonists dobutamine and denopamine both promoted β -arrestin2 recruitment at β 1-AR. β 2-AR selective agonists procaterol and salbutamol promoted β -arrestin2 recruitment at β 2-AR. β -AR non-selective antagonists alprenolol and pindolol promoted β -arrestin2 recruitment at β 1-AR. β 1-AR selective antagonists celiprolol and bevantolol showed β -arrestin2 recruitment at β 1-AR. β 2-AR selective antagonists butoxamine showed β -arrestin2 recruitment at β 1-AR. These results provide some clues for the potential action of β -AR drugs, and lay a foundation for the screening of β -arrestin-biased β -AR ligands.

Key words: β -adrenergic receptors; β -arrestin2; G protein-coupled receptors; luciferase reporter gene

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31771176, 32171041).

*Corresponding author. Tel: +86-21-54237680; E-mail: xingliu@fudan.edu.cn

G 蛋白耦联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 是含有七个跨膜结构的细胞膜表面受体超家族, 是目前市场上药物研究和开发中最多的一类受体, 将近二分之一的药物都是靶向 GPCRs^[1]。GPCRs 的经典信号通路是受体被激活后促进受体下游 G 蛋白 (G_s 、 G_i 、 G_q 或 $G_{12/13}$) 依赖的第二信使的形成, 激活下游 MAPK 等激酶和一系列酶促效应因子, 进而调节目的基因的转录。近年来研究发现 GPCRs 激活同时招募负性调节因子 β -arrestin, 进而引起 GPCRs 和 G 蛋白的解耦联以及 β -arrestin 介导的受体内吞, GPCRs 依赖的信号通路被终止。而 β -arrestin 作为支架蛋白, 也独立介导信号通路的激活^[2]。因此 β -arrestin 既是介导 GPCRs 脱敏的关键分子, 参与 GPCRs 信号通路的负性调节, 也是除了 G 蛋白以外介导 GPCRs 下游信号通路激活的另一个信号分子^[3]。过去的研究主要集中于 G 蛋白信号通路, GPCRs 激动剂和拮抗剂的分类主要取决于 G 蛋白信号通路的激活和抑制。最近一些研究发现了偏向性激动剂和拮抗剂, 它们可以稳定不同受体构象, 选择性地促进受体与 G 蛋白或 β -arrestin 的相互作用并促进下游信号通路的激活, 这些能够偏向性激活或抑制 G 蛋白或 β -arrestin 信号通路的配体被称为偏向性激动剂或拮抗剂^[4]。这类配体对信号转导的作用不同于传统的激动剂, 能偏向性作用于 G 蛋白或 β -arrestin 信号通路, 发挥不同于传统配体的临床作用。

β -肾上腺素受体 (β -adrenergic receptor, β -AR) 属于 GPCRs 超家族重要成员, 分为 β_1 -AR、 β_2 -AR、 β_3 -AR 三个亚型, 是肾上腺素及去甲肾上腺素等内源性配体的受体。 β -AR 在体内分布广泛, β -AR 介导的信号通路在心血管、呼吸、神经、代谢等系统中发挥广泛生理作用^[5]。 β -AR 分布的广泛性以及生理功能的重要性使其成为治疗多种疾病的基本药物靶点, 并且围绕这些受体的药物研发产生了一系列不同作用的药物^[6]。我们前期工作证实, 卡维地洛通过 β_1 -AR/ β -arrestin2/ERK 信号通路介导了物体辨别记忆的再巩固过程^[7]。而且 β -AR/ β -arrestin 偏向性信号通路在可卡因成瘾记忆的消退学习中也发挥了关键性作用^[8], 揭示了 β -AR/ β -arrestin 偏向性信号通路在学习记忆中的作用新机制。但是仍有诸多 β -AR 药物特别是临床常用的 β -AR 激动剂和拮抗剂是否具有 β -arrestin 偏向性作用尚不清楚。

现已有一些方法能量化 β -arrestin 招募情况, 包

括生物发光共振能量转移 (bioluminescence resonance energy transfer, BRET)^[9]、荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)^[10]、酶片段互补法 (enzyme fragment complementation, EFC)^[11] 和 arrestin 转位后转录激活法 (transcriptional activation following arrestin translocation assay, TANGO assay)^[12]。其中, TANGO 方法具有高稳定性、高灵敏度、信噪比高等优点, 其原理是当 GPCRs 被配体激活时, β -arrestin2-TEV 融合蛋白被招募到受体的 C 端, 然后 GPCRs 融合蛋白的 TEV 蛋白酶位点裂解, 释放四环素反式激活因子 (tetracycline transactivator protein, tTA), tTA 转移至细胞核中后激活 tTA 依赖的荧光素酶报告基因的转录^[13]。本研究便运用 TANGO 方法研究临床上常用 β -AR 激动剂和拮抗剂对 β -arrestin2 的招募情况, 为后续 β -AR 偏向性配体筛选奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 去甲肾上腺素 (noradrenaline)、扎莫特罗 (xamoterol)、丙卡特罗 (procaterol)、阿普洛尔 (alprenolol)、吲哚洛尔 (pindolol)、噻吗洛尔 (timolol)、奈比洛尔 (nebivolol)、阿替洛尔 (atenolol)、美托洛尔 (metoprolol)、倍他洛尔 (betaxolol) 等药物购自英国 TOCRIS 公司; 肾上腺素 (epinephrine)、异丙肾上腺素 (isoproterenol)、多巴酚丁胺 (dobutamine)、得诺巴明 (denopamine)、沙丁胺醇 (salbutamol)、普萘洛尔 (propranolol)、索他洛尔 (sotalol)、比索洛尔 (bisoprolol)、塞利洛尔 (celiprolol)、布托沙明 (butoxamine)、ICI 118,551 等药物购自 Sigma-Aldrich 公司; 贝凡洛尔 (bevantolol) 购自 CSNpharm 公司; 纳多洛尔 (nadolol) 购自上海国药集团化学试剂有限公司; 质粒提取试剂盒、*E. coli* Trans 5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司 (TransGen Biotech); 去内毒素质粒大量提取试剂盒购自 Qiagen; DMEM 培养基、胰蛋白酶、PBS、嘌呤霉素、Opti-MEM 低血清培养基购自 Gibco; 胎牛血清购自 Ausbian; DMSO、多聚 L-赖氨酸 (poly-L-lysine) 购自 Sigma-Aldrich; 潮霉素 B、脂质体 Lipofectamine[®] 2000 Reagent 购自 Thermo Fisher Scientific; 无血清细胞冻存液购自苏州新赛美生物科技有限公司; Bright-Glo[™] Luciferase Assay System 购自 Promega。

1.2 主要设备 循环气流垂直净化工作台 (CA-920, 上海上净净化设备有限公司), 生物安全柜 (AC2-3E1,

新加坡艺思高科技有限公司), 自动细胞计数器 (TC10, Bio-Rad), Milli-Q Biocel 超纯水仪 (Millipore), 电子精密天平 (B6002, 上海良平仪器仪表有限公司), 电子天平 (BS124S, 北京赛多利斯仪器系统有限公司), CO_2 细胞培养箱 (HF151UV, 上海力新仪器有限公司), 倒置显微镜 (IX51, OLYMPUS), Spark 多功能酶标仪 (Spark, TECAN)。

1.3 质粒转化 采用热激法将 Adrb1-tango 或者 Adrb2-tango 质粒 (中国科学院生物化学与细胞生物学研究所汪胜研究员课题组赠送) 转化 *E. coli* Trans 5 α 感受态细胞。将 100 μL 感受态细胞悬液 (-80°C) 置冰上解冻 1~2 min, 加入质粒 DNA 溶液, 冰上放置 30 min, 42°C 水浴中热击 90 s, 然后迅速置冰上 3 min。加入 200 μL LB 液体培养基, 混匀后 37°C 振荡培养 1 h, 将菌液摇匀后涂布于含氨苄霉素的 LB 琼脂平板上 37°C 倒置培养 12~16 h。

1.4 质粒小量抽提 使用质粒提取试剂盒进行少量质粒抽提。挑取平板上的单克隆菌落, 接种于 5 mL 含氨苄霉素的 LB 液体培养基试管, 试管置于恒温摇床 300 r/min、 37°C 培养 8 h。取 1.5~2 mL 菌液离心沉淀加入缓冲液 P1 重悬, 加入缓冲液 P2 置于冰上, 加入缓冲液 P3 离心取上清, 加入无水乙醇静置离心弃上清, 加入 70% 乙醇, 漂洗沉淀, 离心弃上清, 溶解沉淀, 测质粒浓度。

1.5 质粒大量抽提 使用质粒提取试剂盒 (Qiagen) 进行大量质粒抽提。克隆菌液, 接种到 200 mL 含氨苄霉素的 LB 液体培养基锥形瓶中, 恒温摇床 260 r/min、 37°C 培养 14~16 h。菌液离心弃上清, 加入缓冲液 P1 混匀, 加入缓冲液 P2 静置后加入缓冲液 P3 混匀冰浴, 离心后过吸附柱中, 用异丙醇润洗吸附柱, 吸附柱中加入缓冲液 QF, 离心后沉淀 70% 乙醇重悬和漂洗, 溶解沉淀, 测质粒浓度。

1.6 细胞培养 HTLA 细胞由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所汪胜研究员赠送, 是一种稳定表达 tTA 依赖的荧光素酶报告基因和 β -arrestin2-TEV 融合基因的 HEK293 细胞系, 用 DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素), 在培养箱中于 5% CO_2 、 37°C 条件下培养。

1.7 TANGO 方法 将 1×10^6 个 HTLA 细胞接种于 6 cm 培养皿, 16~20 h 后进行细胞转染, 每个 6 cm 培养皿的细胞转染 6 μg Adrb1-tango 或者 Adrb2-tango 质粒, 按照 1:1.5~2 (DNA 质量: 脂质体体积

比例) 将质粒和脂质体 Lipofectamine[®] 2000 Reagent 加入到 200 μL Opti-MEM 中混匀, 室温静置 10~15 min 后, 细胞培养液更换为 Opti-MEM, 将混合液均匀缓慢地加入到 6 cm 培养皿中。6 h 后, 将 Opti-MEM 更换为 HTLA 培养基。第二天, 将转染的细胞消化后接种到 96 孔细胞板, $5 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个细胞/孔, 每孔 100 μL 细胞悬液。第三天, 96 孔细胞板加药, 加药浓度梯度为 0 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、300 nmol/L、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。24 h 后, 待 96 孔细胞板平衡至室温后, 每孔加入 50 μL Promega Bright-Glo[™] luciferase assay system, 孵育 10 min 后, 用酶标仪测定结果 (发光值), 结果以相对发光单位 (relative luminescence unit, RLU) 表示, 使用 GraphPad Prism 进行分析。

1.8 统计学分析 数据以 mean \pm SEM 表示。采用 Shapiro-Wilk test 对数据的正态分布进行检测。剂量反应曲线采用 GraphPad Prism 8.0 软件中的 Black and Leff operational model 进行分析。半数有效浓度负对数值 (pEC_{50}) 和最大效能 (maximal effect, E_{max}) 的计算采用标准 logistic 方程^[14, 15]。

2 结果

2.1 β -肾上腺素受体激动剂对 β -arrestin2招募活性的筛选

2.1.1 非选择性 β -AR激动剂对 β -arrestin2的招募作用

我们首先选用非选择性 β -AR 激动剂肾上腺素、去甲肾上腺素和异丙肾上腺素进行 TANGO 实验。实验结果显示, 无论是在表达 $\beta 1$ -AR 还是表达 $\beta 2$ -AR 的 HTLA 细胞中, 肾上腺素 ($n = 9$)、去甲肾上腺素 ($n = 9$) 和异丙肾上腺素 ($n = 9$) 均能招募 β -arrestin2。在表达 $\beta 1$ -AR 的 HTLA 细胞中, 肾上腺素的 pEC_{50} 为 5.40 ± 0.04 , E_{max} 为 1131184 ± 44807 (图 1A、表 1), 去甲肾上腺素的 pEC_{50} 为 5.68 ± 0.03 , E_{max} 为 1252284 ± 19199 (图 1A、表 1), 异丙肾上腺素的 pEC_{50} 为 5.98 ± 0.05 , E_{max} 为 1449615 ± 76954 (图 1A、表 1)。在表达 $\beta 2$ -AR 的 HTLA 细胞中, 肾上腺素的 pEC_{50} 为 5.79 ± 0.02 , E_{max} 为 143019 ± 2030 (图 1B、表 1), 去甲肾上腺素的 pEC_{50} 为 4.77 ± 0.19 , E_{max} 为 112846 ± 28228 (图 1B、表 1), 异丙肾上腺素的 pEC_{50} 为 6.08 ± 0.03 , E_{max} 为 241824 ± 4128 (图 1B、表 1)。上述结果提示非选择性 β -AR 激动剂肾上腺素、去甲肾上腺素和异丙肾上腺素均能通过

β 1-AR 或 β 2-AR 招募 β -arrestin2。

2.1.2 选择性 β 1-AR激动剂对 β -arrestin2的招募作用

我们选用选择性 β 1-AR 激动剂多巴酚丁胺、得诺巴明和扎莫特罗进行 TANGO 实验。实验结果显示，只有在表达 β 1-AR 的 HTLA 细胞中，多巴酚丁胺才显示出对 β -arrestin2 的招募作用，根据标准 logistic 方程模拟，其 pEC_{50} 约为 4.72 ± 0.25 ， E_{max} 未能检测出 ($n = 9$) (图 2A、表 1)。同样，只有在表达 β 1-AR 的 HTLA 细胞中，得诺巴明才显示出对 β -arrestin2 的招募作用，得诺巴明的 pEC_{50} 为 6.38 ± 0.08 ， E_{max} 为 77250 ± 1854 ($n = 9$) (图 2A、表 1)。TANGO 实验结果显示，无论在表达 β 1-AR 还是 β 2-AR 的 HTLA 细胞中，扎莫特罗对 β -arrestin2 均无明显招募现象 ($n = 9$) (图 2、表 1)。上述结果提

示，多巴酚丁胺和得诺巴明能通过激活 β 1-AR 招募 β -arrestin2，而扎莫特罗对 β -arrestin2 无明显招募作用。

2.1.3 选择性 β 2-AR激动剂对 β -arrestin2的招募作用

我们选用选择性 β 2-AR 激动剂沙丁胺醇和丙卡特罗进行 TANGO 实验。实验结果显示，在表达 β 1-AR 的 HTLA 细胞中，丙卡特罗 ($n = 9$) 未表现出明显的 β -arrestin2 招募能力 (图 3A、表 1)；沙丁胺醇 ($n = 9$) 具有微弱的 β -arrestin2 招募能力，其 pEC_{50} 为 4.76 ± 0.23 ， E_{max} 未能检测出 (图 3A、表 1)。在表达 β 2-AR 的 HTLA 细胞中，丙卡特罗 ($n = 9$) 的 pEC_{50} 为 7.05 ± 0.19 ， E_{max} 为 149639 ± 5108 (图 3B、表 1)；沙丁胺醇 ($n = 9$) 的 pEC_{50} 为 6.02 ± 0.06 ， E_{max} 为 58413 ± 1829 (图 3B、表 1)。上述结果提示

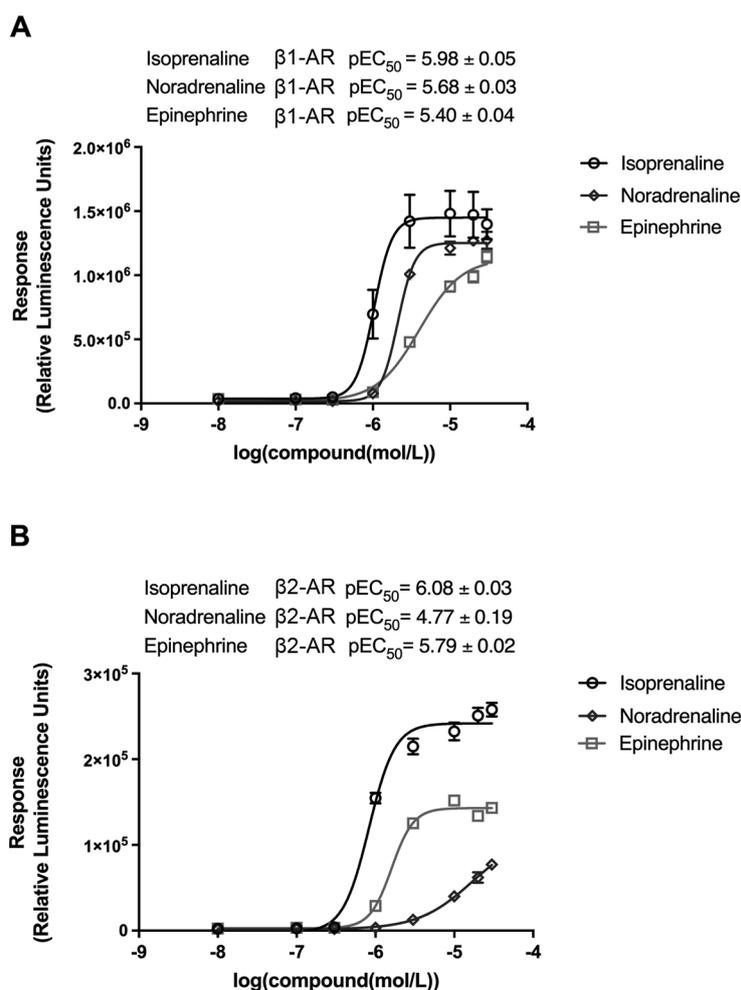


图 1. 非选择性 β -AR激动剂对 β -arrestin2招募的活性筛选

Fig. 1. β -Arrestin2 recruitment by β -AR nonselective agonists. Concentration-response curve of epinephrine, noradrenaline, and isoproterenol (0 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 300 nmol/L, 1 μ mol/L, 3 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 30 μ mol/L) at β 1-AR (A) or β 2-AR (B) in the TANGO assay. Mean \pm SEM, $n = 9$.

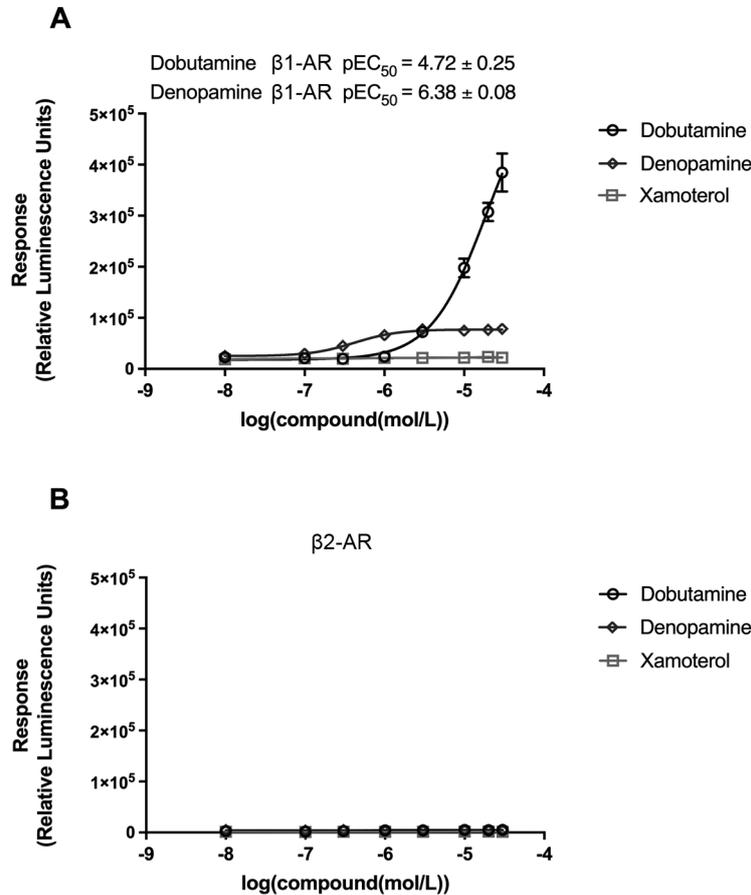


图 2. 选择性β1-AR激动剂对β-arrestin2招募的活性筛选

Fig. 2. β-Arrestin2 recruitment by β1-AR selective agonists. Concentration-response curve of dobutamine, denopamine, and xamoterol (0 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 300 nmol/L, 1 μmol/L, 3 μmol/L, 10 μmol/L, 20 μmol/L, 30 μmol/L) at β1-AR (A) or β2-AR (B) in the TANGO assay. Mean ± SEM, $n = 9$.

丙卡特罗和沙丁胺醇均能通过 β2-AR 招募 β-arrestin2。

2.2 β-肾上腺素受体拮抗剂对β-arrestin2招募活性的筛选

2.2.1 非选择性β-AR拮抗剂对β-arrestin2的招募作用

我们选用非选择性 β-AR 拮抗剂阿普洛尔、普萘洛尔、索他洛尔、吲哚洛尔、纳多洛尔和噻吗洛尔进行 TANGO 实验。实验结果显示，在表达 β1-AR 的 HTLA 细胞中，阿普洛尔和吲哚洛尔具有招募 β-arrestin2 的能力 ($n = 9$)，阿普洛尔的 pEC_{50} 为 6.21 ± 0.55 ， E_{max} 为 23303 ± 2140 (图 4A、表 1)，吲哚洛尔的 pEC_{50} 为 6.07 ± 0.25 ， E_{max} 为 26507 ± 1274 (图 4A、表 1)。噻吗洛尔 ($n = 9$)、索他洛尔 ($n = 9$)、普萘洛尔 ($n = 9$)、纳多洛尔 ($n = 9$) 均未表现出 β-arrestin2 招募作用 (图 4A、C、表 1)。在表达 β2-AR 的 HTLA 细胞中，非选择性 β-AR 拮抗剂阿普洛尔、普萘洛尔、吲哚洛尔、纳多洛尔、

噻吗洛尔和索他洛尔均未表现出招募 β-arrestin2 的能力 (图 4B、D、表 1)。上述结果提示阿普洛尔和吲哚洛尔均能通过 β1-AR 招募 β-arrestin2。

2.2.2 选择性β1-AR拮抗剂对β-arrestin2的招募作用

我们选用选择性 β1-AR 拮抗剂塞利洛尔、贝凡洛尔、奈比洛尔、比索洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔和美托洛尔进行 TANGO 实验。实验结果显示，在表达 β1-AR 的 HTLA 细胞中，塞利洛尔的 pEC_{50} 值为 5.36 ± 0.13 ，贝凡洛尔的 pEC_{50} 为 4.93 ± 0.36 ， E_{max} 均未能检测出 ($n = 9$)，其他拮抗剂未表现出对 β-arrestin2 的招募作用 (图 5A、C、表 1)。在表达 β2-AR 的 HTLA 细胞中，这些拮抗剂均未表现出对 β-arrestin2 的招募 ($n = 9$) (图 5B、D、表 1)。上述结果提示，塞利洛尔、贝凡洛尔能够通过 β1-AR 对 β-arrestin2 产生一定的招募作用。奈比洛尔、比索洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔和美托洛尔均未表现出

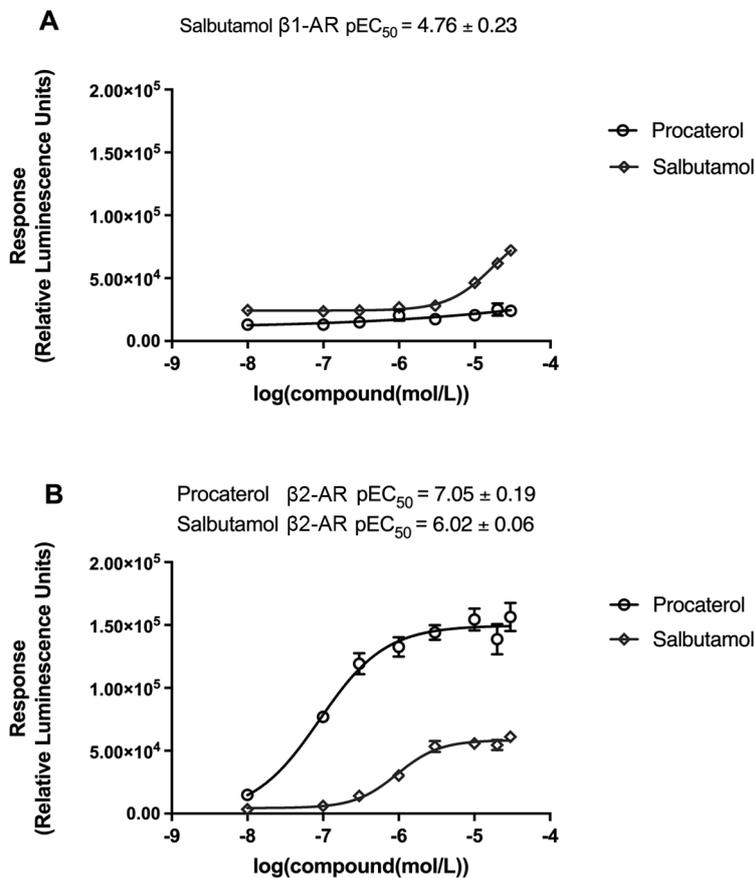


图 3. 选择性 $\beta 2$ -AR激动剂对 β -arrestin2招募的活性筛选

Fig. 3. β -Arrestin2 recruitment by $\beta 2$ -AR selective agonists. Concentration-response curve of procaterol and salbutamol (0 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 300 nmol/L, 1 μ mol/L, 3 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 30 μ mol/L) at $\beta 1$ -AR (A) or $\beta 2$ -AR (B) in the TANGO assay. Mean \pm SEM, $n = 9$.

招募 β -arrestin2 的能力。

2.2.3 选择性 $\beta 2$ -AR拮抗剂对 β -arrestin2的招募作用

我们选用选择性 $\beta 2$ -AR 拮抗剂布托沙明和 ICI 118,551 进行 TANGO 实验。实验结果显示, 在表达 $\beta 1$ -AR 的 HTLA 细胞中, 布托沙明表现出一定的 β -arrestin2 招募能力, 其 pEC_{50} 值为 5.32 ± 0.51 , E_{max} 为 29873 ± 6052 (图 6A、表 1)。在表达 $\beta 2$ -AR 的 HTLA 细胞中, 布托沙明和 ICI 118,551 对 β -arrestin2 无明显招募 ($n = 9$) (图 6B、表 1)。

3 讨论

目前, GPCRs 是临床上应用最为广泛的药物靶标, β -AR 作为 GPCRs 超家族成员, 其配体也是临床常用药物。例如, 大部分非选择性 β -AR 和选择性 $\beta 1$ -AR 拮抗剂能抗心律失常和降血压, $\beta 2$ -AR 选择性激动剂沙丁胺醇则是最常用的平喘药。研究发

现常用降压药 β -AR 拮抗剂卡维地洛能偏向性激动 β -arrestin 依赖的信号通路^[16, 17]。而大部分作用于 β -AR 药物的偏向性并不清楚。本文采用 TANGO 方法检测临床上常用的 β -AR 药物通过 β -AR 对 β -arrestin2 的招募作用, 为后续筛选出具有 β -arrestin 偏向性的 β -AR 药物的研究奠定基础。

对于非选择性 β -AR 激动剂, Casella 等^[18] 采用 BRET 方法发现肾上腺素、去甲肾上腺素和异丙肾上腺素既能通过 $\beta 1$ -AR 招募 β -arrestin, 又能通过 $\beta 2$ -AR 招募 β -arrestin。本研究采用 TANGO 方法证实了这一结果。与此同时, 我们发现这三种激动剂通过 $\beta 1$ -AR 对 β -arrestin2 的招募作用强于通过 $\beta 2$ -AR 对 β -arrestin2 的招募作用。

多巴酚丁胺、得诺巴明和扎莫特罗是选择性 $\beta 1$ -AR 激动剂。多巴酚丁胺能激活心肌细胞 $\beta 1$ -AR, 增强心肌收缩力, 增加心排血量, 临床上主

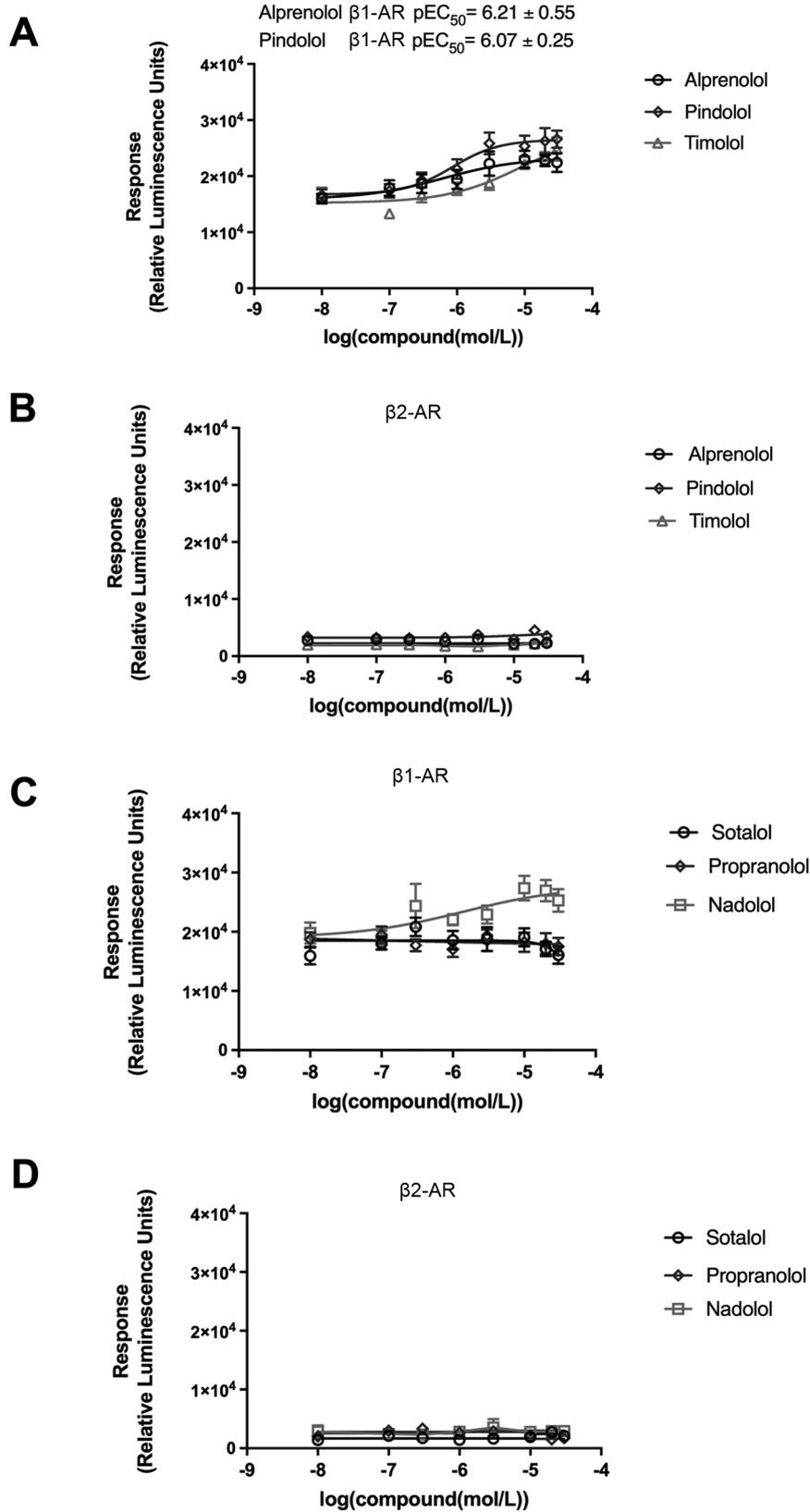


图 4. 非选择性β-AR拮抗剂对β-arrestin2招募的活性筛选

Fig. 4. β-Arrestin2 recruitment by β-AR nonselective antagonists. Concentration-response curve of alprenolol, pindolol, timolol, sotalol, propranolol, or nadolol (0 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 300 nmol/L, 1 μmol/L, 3 μmol/L, 10 μmol/L, 20 μmol/L, 30 μmol/L) at β1-AR (A, C) or β2-AR (B, D) in the TANGO assay. Mean ± SEM, n = 9.

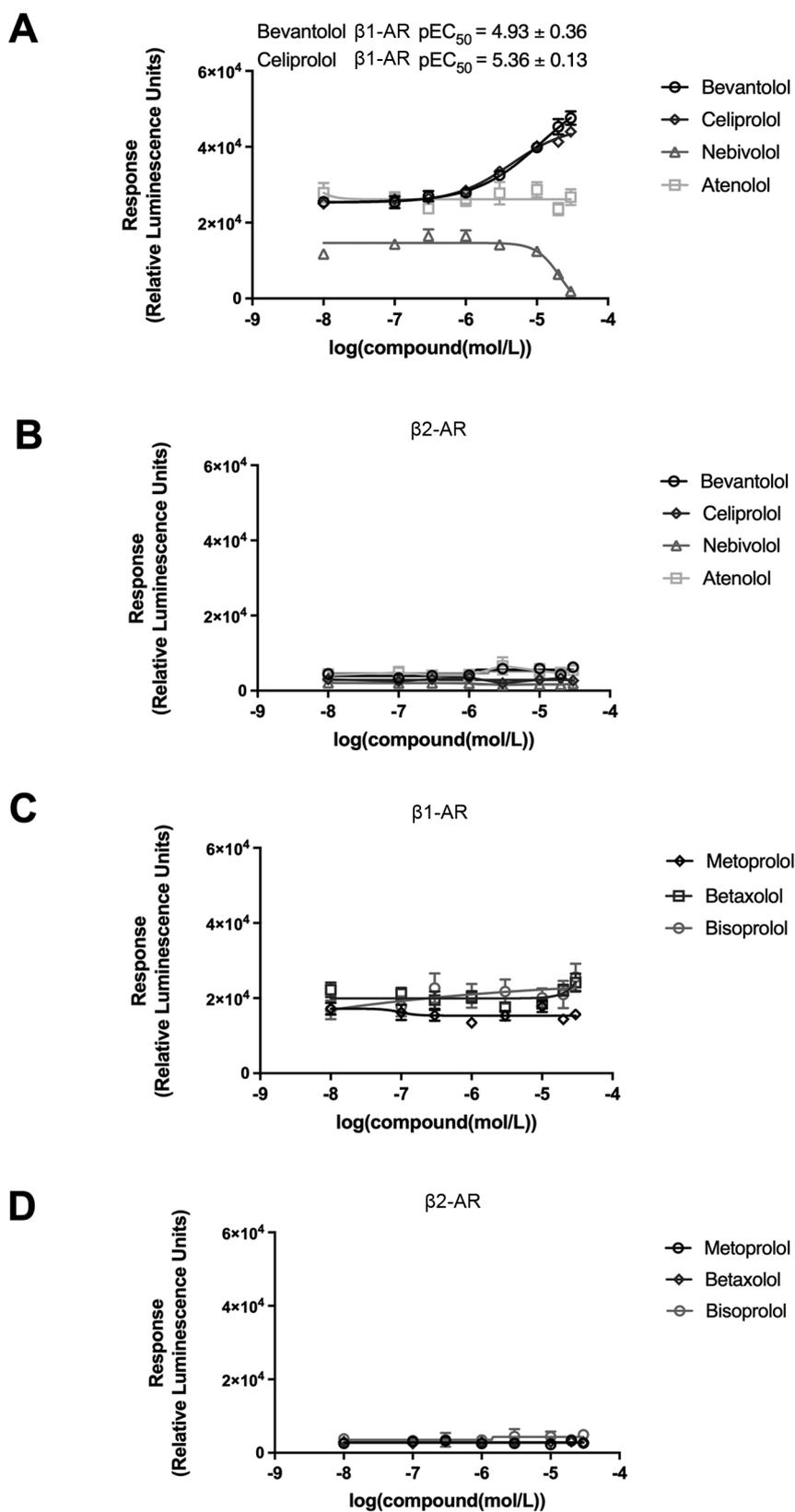


图 5. 选择性 β 1-AR拮抗剂对 β -arrestin2招募的活性筛选

Fig. 5. β -Arrestin2 recruitment by β 1-AR selective antagonists. Concentration-response curve of celiprolol, bevantolol, nebivolol, atenolol, metoprolol, betaxolol, or bisoprolol (0 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 300 nmol/L, 1 μ mol/L, 3 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 30 μ mol/L) at β 1-AR (A, C) or β 2-AR (B, D) in the TANGO assay. Mean \pm SEM, $n = 9$.

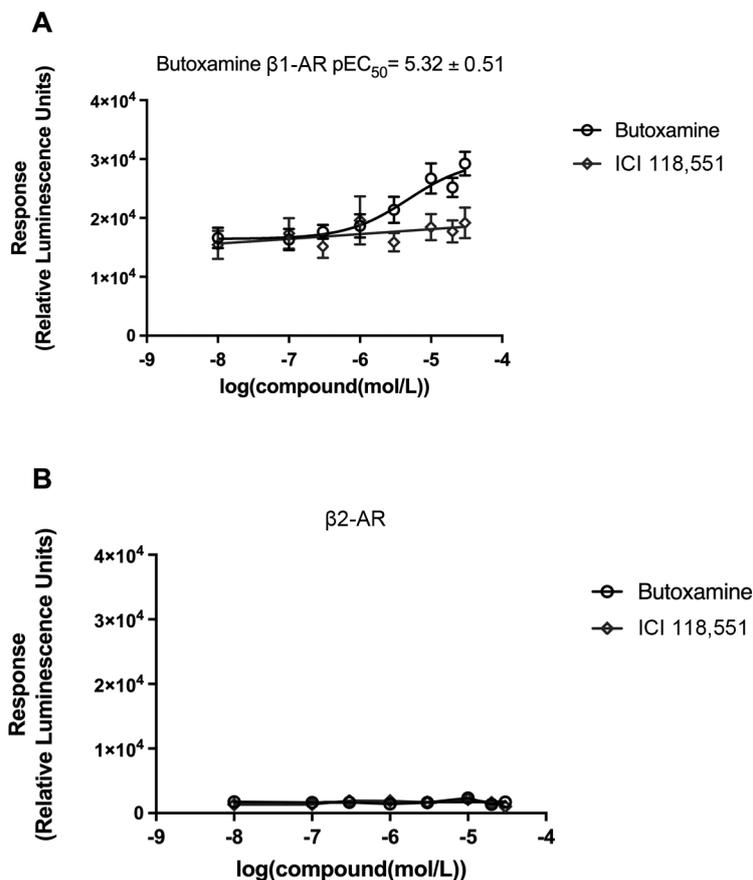


图 6. 选择性 β 2-AR拮抗剂对 β -arrestin2招募的活性筛选

Fig. 6. β -Arrestin2 recruitment by β 2-AR selective antagonists. Concentration-response curve of butoxamine or ICI 118,551 (0 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 300 nmol/L, 1 μ mol/L, 3 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 30 μ mol/L) at β 1-AR (A) or β 2-AR (B) in the TANGO assay. Mean \pm SEM, $n = 9$.

要用于心排量低和心率慢的心力衰竭患者的治疗^[19]。得诺巴明可以激活心肌细胞 β 1-AR,使心肌收缩力持续加强^[20,21]。扎莫特罗主要用于治疗慢性心功能不全,也适用于气喘及疲劳症状而活动受限的患者的治疗^[22]。Casella等^[18]还发现多巴酚丁胺能通过 β 1-AR招募 β -arrestin,与本研究结果一致。本研究表明扎莫特罗对 β -arrestin2无明显招募作用,与Ardestani等^[23]利用PathHunter方法研究发现的结果一致。但关于得诺巴明对 β -arrestin的招募情况尚无其他参考文献报道,本研究发现得诺巴明能够通过 β 1-AR招募 β -arrestin2。

短效 β 2-AR激动剂沙丁胺醇是一种常用的平喘药,能有效治疗支气管哮喘、支气管痉挛等病症^[24]。选择性 β 2-AR激动剂丙卡特罗对支气管的 β 2-AR具有高度选择性,具有支气管扩张和抗过敏作用^[25]。Rajagopal等^[26]采用TANGO方法发现沙丁胺醇具

有通过 β 2-AR招募 β -arrestin的能力。本研究结果显示沙丁胺醇不仅能通过 β 2-AR,还能通过 β 1-AR招募 β -arrestin2。本研究首次发现丙卡特罗也能招募 β -arrestin2,而且该作用主要是通过 β 2-AR发挥的。

普萘洛尔为临床常用的非选择性 β -AR拮抗剂。Wisler等^[16]通过细胞融合表达 β -arrestin2-GFP,并利用共聚焦显微镜成像方法发现普萘洛尔不能通过 β 2-AR招募 β -arrestin,但Azzi等^[9]利用BRET方法发现普萘洛尔能通过 β 2-AR招募 β -arrestin,而本研究未发现普萘洛尔具有招募 β -arrestin2的能力。Littmann等^[27]采用基于荧光素酶片段互补的BRET方法发现非选择性 β -AR拮抗剂纳多洛尔、噻吗洛尔、索他洛尔均不能通过 β 2-AR招募 β -arrestin;Casella等^[18]发现噻吗洛尔、索他洛尔不能通过 β 1-AR或 β 2-AR招募 β -arrestin,本研究结果与上述

表1. β -AR配体对 β -arrestin2招募活性的汇总Table 1. Summary of β -Arrestin2 recruitment by β -AR ligands

Classification		Drug	β 1-AR pEC ₅₀	β 1-AR E _{max}	β 2-AR pEC ₅₀	β 2-AR E _{max}	
Agonist	β -AR nonselective agonist	Isoprenaline	5.98 ± 0.05	1449615 ± 76954	6.08 ± 0.03	241824 ± 4128	
		Noradrenaline	5.68 ± 0.03	1252284 ± 19199	4.77 ± 0.19	112846 ± 28228	
		Epinephrine	5.40 ± 0.04	1131184 ± 44807	5.79 ± 0.02	143019 ± 2030	
	β 1-AR selective agonist	Dobutamine	4.72 ± 0.25*	-	-	-	
		Denopamine	6.38 ± 0.08	77250 ± 1854	-	-	
		Xamoterol	-	-	-	-	
	β 2-AR selective agonist	Procaterol	-	-	7.05 ± 0.19	149639 ± 5108	
		Salbutamol	4.76 ± 0.23*	-	6.02 ± 0.06	58413 ± 1829	
	Antagonist	β -AR nonselective antagonist	Alprenolol	6.21 ± 0.55	23303 ± 2140	-	-
			Pindolol	6.07 ± 0.25	26507 ± 1274	-	-
Timolol			-	-	-	-	
Nadolol			-	-	-	-	
Propranolol			-	-	-	-	
Sotalol			-	-	-	-	
β 1-AR selective antagonist		Celiprolol	5.36 ± 0.13*	-	-	-	
		Bevantolol	4.93 ± 0.36*	-	-	-	
		Nebivolol	-	-	-	-	
		Betaxolol	-	-	-	-	
		Atenolol	-	-	-	-	
		Metoprolol	-	-	-	-	
β 2-AR selective antagonist		Butoxamine	5.32 ± 0.51	29873 ± 6052	-	-	
		ICI 118,551	-	-	-	-	

pEC₅₀, negative logarithm of the EC₅₀; E_{max}, maximal effect. *: Software prediction values.

研究一致。Casella 等^[18]和 Littmann 等^[27]发现阿普洛尔和吲哚洛尔不能通过 β 1-AR 或 β 2-AR 招募 β -arrestin, Wisler 等^[16]也证明阿普洛尔不能通过 β 2-AR 招募 β -arrestin, Kim 等^[17]通过免疫印迹方法发现阿普洛尔能通过 β 1-AR 招募 β -arrestin, 本研究发现阿普洛尔和吲哚洛尔均通过 β 1-AR 对 β -arrestin2 具有一定的招募能力。

Erickson 等^[28]通过 siRNA 沉默 β -arrestin 表达, 检测 ERK 磷酸化变化以及利用免疫荧光细胞化学技术等方法发现选择性 β 1-AR 拮抗剂奈比洛尔能通过 β 1-AR 和 β 2-AR 招募 β -arrestin, 并具有 β -arrestin 偏向性, 而 Littmann 等^[27]发现奈比洛尔不能通过 β 2-AR 招募 β -arrestin。本研究结果显示奈比洛尔对 β -arrestin2 招募作用不明显。Littmann 等^[27]发现选择性 β 1-AR 拮抗剂阿替洛尔、美托洛尔、比索洛尔、倍他洛尔通过 β 2-AR 对 β -arrestin 均无明显招募作用, Casella 等^[18]发现阿替洛尔、比索洛尔通过 β 1-AR 或 β 2-AR 对 β -arrestin 均无明显招募作用,

和本研究结果一致。目前尚无文献报道选择性 β 1-AR 拮抗剂塞利洛尔和贝凡洛尔对 β -arrestin 的招募情况。本研究发现塞利洛尔、贝凡洛尔均能通过 β 1-AR 发挥招募 β -arrestin2 的作用。

本研究发现选择性 β 2-AR 拮抗剂布托沙明能通过作用于 β 1-AR 来招募 β -arrestin2, 而 Casella 等^[18]的研究报道布托沙明不招募 β -arrestin。本研究发现选择性 β 2-AR 拮抗剂 ICI 118,551 无论是通过 β 1-AR 还是 β 2-AR 均不招募 β -arrestin2, 与文献报道一致^[18,27]。为进一步证明这些临床常用的 β -AR 激动剂和拮抗剂对 β -arrestin 的招募和 β -arrestin 偏向性信号通路的激活, 我们还将后续研究中采用免疫印迹等方法检测这些配体对 ERK 激活的情况以及对 cAMP 活性的影响, 以进一步验证这些药物是否具有 β -arrestin 偏向性。

目前, 已有多种检测方法被用于 GPCRs 配体的筛选, 包括放射性配体结合方法、鸟嘌呤核苷酸结合方法、第二信使方法、蛋白再分配方法^[29]和

TANGO 方法。然而, 放射性配体结合方法有几个主要缺点: 程序复杂, 对操作人员要求较高; 完全依赖于放射性标记的配体; 不能轻易区分配体的功能特性。因此, 目前的方法主要是以细胞为基础的 GPCRs 配体筛选。大多数传统的第二信使信号分析方法使用了混杂嵌合的 G 蛋白, 可能会改变受体的信号通路, 也可能改变化合物的药效。因此, 相比之下, 不依赖于 G 蛋白耦联的 TANGO 方法可直接测量目标受体, 也减少了潜在的内源性受体非特异性通路激活的影响, 更具有信号特异性^[12]。而且 TANGO 方法不依赖受体内化, 所以缓慢回收和快速回收的 GPCRs 都可以被该方法检测到。除了 TANGO 方法, 基于 β -arrestin 招募而设计的 GPCRs 配体筛选方法还有 BRET 方法^[30]、Transfluor 方法^[31]和 PathHunter 方法^[32]。BRET 方法具有良好的信噪比, 还适用于高通量筛选。但传统 BRET 方法底物的不稳定性限制了 BRET 在长时程实时动力学实验中的应用, 而且 BRET 的输出信号较低, 限制了 BRET 应用于成像的分辨率。Transfluor 方法可以作为 GPCRs 激活的通用筛查, 并且不依赖于 GPCRs 的特定 G 蛋白信号通路方式、激活配体的性质或受体的序列, 但 Transfluor 方法不仅需要利用能进行细胞自动成像的高通量成像系统, 还需要定量荧光显微镜来进行分析, 而且由于相对较低的局部荧光增加和较高的细胞间差异, 该方法的稳定性受到限制。PathHunter 技术非常适合激动剂和拮抗剂的高通量筛选应用, 但 PathHunter 方法采用的 EFC 技术需要报告酶的两个部分必须保持接触才能产生一个功能性酶, 而这种微弱的瞬时相互作用可能会被错失, 所以 PathHunter 技术依赖于 2 个报告酶片段的相互亲和力, 而由于两个片段之间的自然亲和力可能出现与配体无关的相互作用而造成背景信号增加。因此, 相比之下, TANGO 方法可以将瞬态信号事件转换为更为稳定且经过放大的细胞反应, 具有高稳定性、高灵敏度、信噪比高等优点^[12]。

综上所述, 本研究从临床上常用的 β -AR 激动剂和拮抗剂药物, 尤其是 β -AR 拮抗剂中初步筛选出了贝凡洛尔、塞利洛尔等多种可以招募 β -arrestin2 的药物, 从而为后续进一步验证这些药物的 β -arrestin 偏向性奠定了研究基础。

参考文献

- 1 Rosenbaum MI, Clemmensen LS, Bredt DS, Bettler B, Stromgaard K. Targeting receptor complexes: a new dimension in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2020; 19(12): 884–901.
- 2 Zhou XE, He Y, de Waal PW, Gao X, Kang Y, Van Eps N, Yin Y, Pal K, Goswami D, White TA, Barty A, Latorraca NR, Chapman HN, Hubbell WL, Dror RO, Stevens RC, Cherezov V, Gurevich VV, Griffin PR, Ernst OP, Melcher K, Xu HE. Identification of phosphorylation codes for arrestin recruitment by G protein-coupled receptors. *Cell* 2017; 170(3): 457–469.e13.
- 3 Eichel K, Jullie D, Barsi-Rhyne B, Latorraca NR, Masureel M, Sibarita JB, Dror RO, von Zastrow M. Catalytic activation of beta-arrestin by GPCRs. *Nature* 2018; 557(7705): 381–386.
- 4 Ippolito M, Benovic JL. Biased agonism at beta-adrenergic receptors. *Cell Signal* 2021; 80: 109905.
- 5 Gliebus G, Lippa CF. The influence of beta-blockers on delayed memory function in people with cognitive impairment. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2007; 22(1): 57–61.
- 6 Tzingounis AV, von Zastrow M, Yudowski GA. {Beta}-blocker drugs mediate calcium signaling in native central nervous system neurons by {beta}-arrestin-biased agonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(49): 21028–21033.
- 7 Liu X, Ma L, Li HH, Huang B, Li YX, Tao YZ, Ma L. β -Arrestin-biased signaling mediates memory reconsolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(14): 4483–4488.
- 8 Huang B, Li Y, Cheng D, He G, Liu X, Ma L. β -Arrestin-biased β -adrenergic signaling promotes extinction learning of cocaine reward memory. *Sci Signal* 2018; 11(512): eaam-5402.
- 9 Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, Pineyro G. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20): 11406–11411.
- 10 Zhou Y, Meng J, Xu C, Liu J. Multiple GPCR functional assays based on resonance energy transfer sensors. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 611443.
- 11 Zhao CK, Yin Q, Li SY. A high-throughput screening system for G-protein-coupled receptors using beta-lactamase enzyme complementation technology. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31(12): 1618–1624.
- 12 Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(1): 64–69.
- 13 Kroeze WK, Sassano MF, Huang XP, Lansu K, McCorvy JD, Giguere PM, Sciaky N, Roth BL. PRESTO-Tango as an open-source resource for interrogation of the druggable

- human GPCRome. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(5): 362–369.
- 14 Black JW, Gerskowitch VP, Leff P, Shankley NP. Pharmacological analysis of beta-adrenoceptor-mediated agonism in the guinea-pig, isolated, right atrium. *Br J Pharmacol* 1985; 84(3): 779–785.
- 15 Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3(3): 193–203.
- 16 Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ, Violin JD, Drake MT, Ahn S, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(42): 16657–16662.
- 17 Kim IM, Tilley DG, Chen J, Salazar NC, Whalen EJ, Violin JD, Rockman HA. Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(38): 14555–14560.
- 18 Casella I, Ambrosio C, Gro MC, Molinari P, Costa T. Divergent agonist selectivity in activating beta1- and beta2-adrenoceptors for G-protein and arrestin coupling. *Biochem J* 2011; 438(1): 191–202.
- 19 McNally EM. Can we do better than dobutamine? *Circ Res* 2013; 113(4): 355–357.
- 20 Mori A, Sekito A, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Stimulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors dilates retinal blood vessels in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2017; 390(5): 527–533.
- 21 Murai K, Seino Y, Kimata N, Inami T, Murakami D, Abe J, Yodogawa K, Maruyama M, Takano M, Ohba T, Ibuki C, Mizuno K. Efficacy and limitations of oral inotropic agents for the treatment of chronic heart failure. *Int Heart J* 2013; 54(2): 75–81.
- 22 Marlow HF. Xamoterol, a beta 1-adrenoceptor partial agonist: review of the clinical efficacy in heart failure. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 28 Suppl 1(Suppl 1): 23S–30S.
- 23 Ardestani PM, Evans AK, Yi B, Nguyen T, Coutellier L, Shamloo M. Modulation of neuroinflammation and pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease using a biased and selective beta-1 adrenergic receptor partial agonist. *Neuropharmacology* 2017; 116: 371–386.
- 24 Memon BN, Parkash A, Ahmed Khan KM, Gowa MA, Bai C. Response to nebulized salbutamol versus combination with ipratropium bromide in children with acute severe asthma. *J Pak Med Assoc* 2016; 66(3): 243–246.
- 25 Tashimo H, Yamashita N, Ishida H, Nagase H, Adachi T, Nakano J, Yamamura K, Yano T, Yoshihara H, Ohta K. Effect of procaterol, a beta₂ selective adrenergic receptor agonist, on airway inflammation and hyperresponsiveness. *Allergol Int* 2007; 56(3): 241–247.
- 26 Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Lam CM, Dewire SM, Violin JD, Lefkowitz RJ. Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Mol Pharmacol* 2011; 80(3): 367–377.
- 27 Littmann T, Gottle M, Reinartz MT, Kalble S, Wainer IW, Ozawa T, Seifert R. Recruitment of beta-arrestin 1 and 2 to the beta2-adrenoceptor: analysis of 65 ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; 355(2): 183–190.
- 28 Erickson CE, Gul R, Blessing CP, Nguyen J, Liu T, Pulakat L, Bastepe M, Jackson EK, Andresen BT. The beta-blocker Nebivolol is a GRK/beta-arrestin biased agonist. *PLoS One* 2013; 8(8): e71980.
- 29 Doucette C, Vedvik K, Koepnick E, Bergsma A, Thomson B, Turek-Etienne TC. Kappa opioid receptor screen with the Tango beta-arrestin recruitment technology and characterization of hits with second-messenger assays. *J Biomol Screen* 2009; 14(4): 381–394.
- 30 Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairiet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7): 3684–3689.
- 31 Ghosh RN, DeBiasio R, Hudson CC, Ramer ER, Cowan CL, Oakley RH. Quantitative cell-based high-content screening for vasopressin receptor agonists using transfluor technology. *J Biomol Screen* 2005; 10(5): 476–484.
- 32 Zhao X, Jones A, Olson KR, Peng K, Wehrman T, Park A, Mallari R, Nebalasca D, Young SW, Xiao SH. A homogeneous enzyme fragment complementation-based beta-arrestin translocation assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors. *J Biomol Screen* 2008; 13(8): 737–747.