

# 心脏 $\beta$ 肾上腺素受体信号转导研究与相关药物研发

王怡玫<sup>1</sup>, 胡耀豪<sup>2\*</sup>, 肖瑞平<sup>1,3\*\*</sup>

(1. 北京大学分子医学研究所, 北京 100871; 2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016; 3. 北京大学-清华大学生命科学联合中心, 北京 100871)

**[摘要]**  $\beta$  肾上腺素受体作为重要的 G 蛋白偶联受体家族成员, 在血液循环、代谢调节、肌肉收缩和舒张中都具有重要的作用。在心脏中, 急性激活  $\beta$  肾上腺素受体能够促进心脏功能, 持续性激活  $\beta$  肾上腺素受体在心脏重构的病理生理过程中具有重要作用。心脏中的  $\beta$  肾上腺素受体包括 3 个亚型:  $\beta_1$  肾上腺素受体、 $\beta_2$  肾上腺素受体和  $\beta_3$  肾上腺素受体。文章重点讨论了  $\beta_1$  和  $\beta_2$  肾上腺素受体二者在心脏中不同甚至截然相反的作用。在此基础上, 提出基于  $\beta$  肾上腺素受体信号转导亚型特异性的治疗新方法。

**[关键词]** 心力衰竭;  $\beta_1$  肾上腺素受体;  $\beta_2$  肾上腺素受体; G 蛋白偶联受体激酶; 信号转导; 新药研发

**[中图分类号]** R972

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1001-5094 (2017) 03-0170-07

## $\beta$ -Adrenergic Receptors in the Heart : Signal Transduction and Drug Discovery

WANG Yimei<sup>1</sup>, HU Yaohao<sup>2</sup>, XIAO Ruiping<sup>1,3</sup>

(1. Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China; 2. School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Peking-Tsinghua Center for Life Science, Beijing 100871, China)

**[Abstract]** As important members of the G protein-coupled receptor superfamily,  $\beta$ -adrenergic receptors are involved in the regulation of key physiological processes such as circulation, metabolism and muscle contraction/relaxation.  $\beta$ -Adrenergic receptors are abundantly expressed in the heart and include three subtypes:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ . Acute stimulation of these receptors enhances cardiac function while chronic stimulation leads to both structural and functional abnormalities of the heart. In this review, we discussed the differences between the signaling pathways of  $\beta_1$ -adrenergic receptor and  $\beta_2$ -adrenergic receptor in the heart and proposed a novel strategy for treating heart failure based on subtype-specific  $\beta$ -adrenergic receptor signal transduction.

**[Key words]** heart failure;  $\beta_1$ -adrenergic receptor;  $\beta_2$ -adrenergic receptor; G protein-coupled receptor kinase; signal transduction; new drug R&D

心血管疾病已经成为威胁人类健康的第一大杀手, 也是威胁我国人民健康的重大公共医学问题。根据《中国心血管病报告 2015》, 中国人的心血管疾病发病率和死亡率自 2002 年有记录开始一直呈现上升趋势。心力衰竭 (heart failure) 是众多心血管疾病的终末表现形式, 衰竭的心脏逐渐丧失对全身的供血能力, 5 年死亡率高达 50%<sup>[1]</sup>。冠心病、心率失常、高血压和糖尿病是心衰的重要诱因。

G 蛋白偶联受体 (GPCRs), 具有七次跨膜结构, 因此也称为七次跨膜受体。GPCRs 是已知最大的受体家族, 在人类基因组中有大约 800 个成员, 在细胞膜

上分布广泛, 参与许多重要的生理过程。GPCRs 已成为当前最重要的药物靶点, 占有药物靶点的 36.2%<sup>[2]</sup>; 在心血管药物治疗中尤为重要, 占心血管系统中所有受体的 72.9%, 心血管治疗药物中有大约 52 个作用于 GPCRs<sup>[3]</sup>。其中,  $\beta$  肾上腺素受体阻断剂、血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体阻断剂直接或间接作用于相应的 GPCR, 已成为治疗包括心力衰竭在内的多种心血管疾病的基本药物。因此, 以 GPCR 作为主要靶点研发新一代心血管药物仍然是药物开发者的首选。

$\beta$  肾上腺素受体是 GPCR 家族的典型成员, 是心脏中表达量最丰富的受体<sup>[4]</sup>, 心脏的  $\beta$  肾上腺素受体包括 3 个亚型:  $\beta_1$ 、 $\beta_2$  和  $\beta_3$  肾上腺素受体。其中,  $\beta_1$  和  $\beta_2$  肾上腺素受体在心肌细胞兴奋收缩偶联中发挥重要的调节作用,  $\beta_3$  肾上腺素受体在不同物种中差异表达, 虽然在人和犬的心脏中都能检测到  $\beta_3$  肾上腺素受体, 但大鼠中却表达缺失<sup>[5]</sup>。

心脏的功能受神经内分泌调控, 其中, 交感神经系统兴奋时释放的儿茶酚胺作用于  $\beta$  肾上腺素受体是

**接受日期:** 2017-02-20

**项目资助:** 国家自然科学基金 (No.81673355)

**\* 通讯作者:** 胡耀豪, 副教授;

**研究方向:** G 蛋白偶联受体研究, 心血管药理;

**Tel:** 024-23986375; **E-mail:** yihowoo@syphu.edu.cn

**\*\* 通讯作者:** 肖瑞平, 教授;

**研究方向:** 心血管及代谢疾病的基础和转化研究;

**Tel:** 010-62757243; **E-mail:** xiaor@pku.edu.cn

机体激活心脏的最强大机制。心肌细胞中的 $\beta$ 肾上腺素受体能够响应儿茶酚胺的激活, 增加心肌收缩力。窦房结和房室结的自律细胞中的 $\beta$ 肾上腺素受体也能够响应儿茶酚胺的激活, 提高自律性和房室传导, 从而加快心率。由于心脏的做功增加, 心输出量(每搏排出量 $\times$ 心率)亦随之增加。相较心脏而言,  $\alpha$ 肾上腺素受体在血管系统中表达更多。在血管平滑肌中, 儿茶酚胺激活 $\alpha$ 肾上腺素受体, 导致血管收缩; 激活 $\beta_2$ 肾上腺素受体, 导致血管扩张。由于血管的阻力和心输出量均增加, 交感神经系统激活一般能使血压上升; 但是,  $\alpha$ 和 $\beta$ 肾上腺素受体在不同血管的表达量不同, 血管直径会在儿茶酚胺的作用下发生变化, 从而达到调节脏器供血的作用, 比如, 心脏和骨骼肌的供血会增加, 而胃肠道的供血则减少。

心力衰竭是继发于各种原因导致的心脏结构与功能损害。交感神经系统和肾素-血管紧张素系统的激活在心力衰竭的病理过程中发挥至关重要的作用<sup>[6-8]</sup>, 而 $\beta$ 肾上腺素受体阻断剂、血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体阻断剂的单独或联合使用, 则能有效缓解左心室结构和功能退化, 改善患者的血液动力学, 降低住院率及死亡率<sup>[9-12]</sup>。然而, 上述药品并非对所有患者均有效, 部分患者甚至出现了严重的副作用。因此, 研发治疗心衰的新药靶点迫在眉睫。本文总结了心脏中 $\beta$ 肾上腺素受体信号通路的研究进展, 并对相关药物的研发提出了思路。

## 1 心脏中 $\beta$ 肾上腺素受体的信号转导

### 1.1 $\beta$ 肾上腺素受体的G蛋白信号通路

$\beta$ 肾上腺素受体通过偶联G蛋白介导信号级联反应, 产生特定的胞内效应。即使在相同的配体刺激下, 不同亚型的 $\beta$ 肾上腺素受体也能介导不同的生物学反应。 $\beta_1$ 肾上腺素受体占心肌细胞中肾上腺素受体总量的70%~80%<sup>[13]</sup>。 $\beta_1$ 肾上腺素受体偶联 $G_s$ 蛋白, 激活腺苷酸环化酶(AC)、cAMP的合成以及蛋白激酶A(PKA)活化。在心肌细胞中, PKA磷酸化激活多种胞内蛋白, 例如受磷蛋白(PLB)、ryanodine受体等来调动胞内钙含量。胞浆中的钙离子增加, 进一步加强心肌细胞收缩。虽然 $\beta_2$ 肾上腺素受体在心室肌的表达丰度仅约为 $\beta_1$ 肾上腺素受体的1/4, 但同样对调节心功能, 特别是对于钙环境的调节发挥重要作用<sup>[14]</sup>。 $\beta_2$ 肾上腺素受体在细胞膜上不同区域表达丰度不同, 在细胞膜的

小窝处尤为富集, 而 $\beta_1$ 肾上腺素受体广泛分布于心肌细胞膜上<sup>[15]</sup>。一方面,  $\beta_2$ 肾上腺素受体与 $G_s$ 蛋白偶联, 激活cAMP-PKA信号级联反应<sup>[16]</sup>; 另一方面, 在激活 $\beta_2$ 肾上腺素受体后, PKA介导 $\beta_2$ 肾上腺素受体磷酸化, 使 $\beta_2$ 肾上腺素受体与百日咳毒素(PTX)敏感的 $G_i$ 蛋白偶联<sup>[17]</sup>, 抑制AC活性及其下游的cAMP合成, 限制 $G_s$ -AC-cAMP信号通路介导的心肌细胞收缩<sup>[18-19]</sup>。有趣的是,  $\beta_2$ 肾上腺素受体转基因小鼠在应对持续性的交感神经刺激时显示出更好的心功能<sup>[20]</sup>, 这让我们对 $\beta_2$ 肾上腺素受体- $G_i$ 偶联信号通路产生浓厚兴趣。当 $\beta_2$ 肾上腺素受体的过表达水平大于本底水平60倍时,  $\beta_2$ 肾上腺素受体转基因小鼠表现出很好的抗心衰能力, 而 $\beta_2$ 肾上腺素受体过表达水平超过本底水平100倍时, 则展现出与 $\beta_1$ 肾上腺素受体过表达相似的心脏毒性, 导致纤维化心肌病和心力衰竭<sup>[20-21]</sup>。这提示我们,  $\beta_2$ 肾上腺素受体在细胞膜表面特定区域的富集是其产生心肌细胞保护作用的关键因素。 $\beta_2$ 肾上腺素受体- $G_i$ 偶联信号通路可以激活蛋白激酶B(AKT), 从而减少心肌细胞凋亡<sup>[22]</sup>。近期的研究表明, 胰岛素可以通过胰岛素受体/ $\beta_2$ 肾上腺素受体复合物发挥功能, 直接影响心脏收缩相关肾上腺素信号通路<sup>[23]</sup>。心脏中的 $\beta_3$ 肾上腺素受体能够与 $G_s$ 蛋白偶联, 表现出增强心肌收缩力; 另一方面,  $\beta_3$ 肾上腺素受体能够通过偶联 $G_i$ 蛋白激活内皮一氧化氮合成酶(eNOS), 产生NO, 并通过此途径增强心肌收缩力<sup>[24-25]</sup>。

### 1.2 $\beta$ 肾上腺素受体的脱敏与内化

持续刺激导致 $\beta$ 肾上腺素受体通过一系列调节分子的协同作用改变自身修饰从而降低敏感性, 称为脱敏<sup>[4,26]</sup>。GPCR激酶(GRKs)是G蛋白偶联受体最重要的下游分子之一, 直接参与GPCR的脱敏, 其中GRK2在心肌细胞中的表达量最多<sup>[27]</sup>。GRKs家族包含7个成员, 目前的研究表明GRK2为其中最重要的成员, 在心肌梗死<sup>[28]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[29]</sup>、炎性疼痛<sup>[30]</sup>等疾病中有重要作用。GRK2对激活的 $\beta$ 肾上腺素受体具有特异性, 能把受体碳末端中多个氨基酸磷酸化, 影响受体与G蛋白的偶联, 从而减弱 $G_s$ 蛋白信号通路。另外, 磷酸化后的 $\beta$ 肾上腺素受体可以通过招募 $\beta$ 休止蛋白(一种细胞内的脚手架蛋白)实现受体内化<sup>[31]</sup>。内化后的肾上腺素受体一部分去磷酸化, 重新循环到细胞膜上发挥作用, 另一部分受体则进入降解途径。GRKs仅能磷酸化激活后的受体, 与此不同的是, cAMP依赖的

PKA 可以磷酸化静息/激活状态下的受体, 实现非同源的 $\beta$ 肾上腺素受体脱敏<sup>[4]</sup>。综上所述, GRKs 和 $\beta$ 休止蛋白参与的调节机制降低 $\beta$ 肾上腺素受体在细胞膜的蛋白含量, 抵抗长时间的交感神经刺激。

## 2 病理情况下 $\beta$ 肾上腺素受体信号通路的变化

在心衰早期, 为了代偿心输出量的减少, 交感神经系统和肾素-血管紧张素系统均呈现活跃, 以增加的心脏负荷来维持机体的代谢需求。心衰病理过程中, 神经内分泌系统长期处于活跃状态, 心脏长时间暴露于高水平的儿茶酚胺和血管紧张素环境中, 最终导致心脏重构和心肌细胞死亡<sup>[7-8]</sup>。受体作为细胞信号传导的重要环节, 在其中起到了极为重要的作用。

### 2.1 $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 肾上腺素受体在心肌细胞存活和死亡中的相反效应

$\beta_1$  和  $\beta_2$  肾上腺素受体在信号通路上虽有相似之处, 但值得注意的是, 在心衰等特殊病理情况下, 持续性地激活 $\beta_1$  与  $\beta_2$  肾上腺素受体表现出截然不同的级联反应。 $\beta_1$  肾上腺素受体可以通过  $G_s$ -AC-PKA 通路调节心肌细胞的收缩, 但是, 长期激活 $\beta_1$  肾上腺素受体时, 却会促进细胞凋亡; 这可能和钙/钙调素蛋白依赖激酶 II (CaMKII) 信号通路有关。持续性地激活 $\beta_1$  肾上腺素受体会激活导致细胞凋亡的 CaMKII 信号通路, 这并不通过 PKA 通路<sup>[32]</sup>。Mangmool 等<sup>[33]</sup> 发现, 激活 $\beta_1$  肾上腺素受体可以促进 $\beta$ -休止蛋白-CaMKII-Epac1 复合物形成, 从而激活 CaMKII。进一步的研究发现,  $\beta_1$  肾上腺素受体的碳末端具有 $\beta$ -休止蛋白结合功能,  $\beta$ -休止蛋白则进一步募集 Epac 和 CaMKII。然而,  $\beta_2$  肾上腺素受体并没有这种效果<sup>[33]</sup>。进一步地, 离体情况下儿茶酚胺诱导的心肌细胞肥大与 $\beta_1$  肾上腺素受体-CaMKII 信号通路有关, 且不依赖 PKA 通路<sup>[34]</sup>; 同样的情况在在体心脏重构模型中得到了验证<sup>[35-36]</sup>。另一方面, 近期的研究发现, 晚期终末糖基化产物受体 (RAGE) 与 $\beta_1$  肾上腺素受体在分子水平上有相互作用, 并产生信号的交集 (crosstalk), 通过 CaMKII 作为共同中介引起心肌细胞的死亡和心脏重构<sup>[37]</sup>。与持续性刺激 $\beta_1$  肾上腺素受体导致的心肌毒性作用相反, 持续性地激活 $\beta_2$  肾上腺素受体具有抗凋亡作用。这种保护作用与 $\beta_2$  肾上腺素受体- $G_i$  蛋白偶联有关, 因为其可以进一步激活 PI3K (磷酸肌醇 3 激酶)-AKT 细胞生存通路<sup>[22,38]</sup>。尽管激活 $\beta_2$  肾上腺素受体可以提高心肌细胞的生存力,

但不可忽视的是, 这种保护作用是以牺牲心肌细胞的收缩力为代价的。

### 2.2 心衰时 $\beta$ 肾上腺素受体信号通路的变化

在心衰的发生发展过程中, 慢性儿茶酚胺水平的上升促使 $\beta$ 肾上腺素受体功能异常,  $\beta_1$  肾上腺素受体在心脏中的含量被显著下调<sup>[39-41]</sup>, 细胞膜上的 $\beta_1$  肾上腺素受体密度下调 50%, 而 $\beta_2$  肾上腺素受体却没有表现出这种变化<sup>[39,42]</sup>。因此, 细胞膜上 $\beta_1$  和 $\beta_2$  肾上腺素受体之比由静息状态时的 80:20 调整到心衰时的 60:40。上述变化提示,  $\beta_2$  肾上腺素受体或许在心衰过程中发挥着重要作用。在心衰时, GRK2 的水平上调, GRK2 胞内含量的上升也在一定程度上导致了心衰过程中 $\beta_1$  肾上腺素受体的脱敏<sup>[43]</sup>, 进一步导致 $\beta_1$  肾上腺素受体信号通路被抑制<sup>[41]</sup>。另一方面, 伴随着 $\beta_1$  肾上腺素受体信号通路被抑制, 虽然 $\beta_2$  肾上腺素受体的含量没有显著变化,  $G_i$  蛋白却显著上调,  $\beta_2$  肾上腺素受体- $G_i$  信号通路被显著激活<sup>[44-45]</sup>。激活的 $\beta_2$  肾上腺素受体- $G_i$  信号通路进一步抑制 $\beta$  肾上腺素受体- $G_s$  信号通路导致的细胞持续过度兴奋<sup>[46-48]</sup>。 $\beta$  肾上腺素受体信号通路变化的结果可能激活心肌重构相关的信号通路, 例如 PI3K 级联反应等<sup>[49]</sup>。

上述结论在心衰病人或动物心衰模型中得到进一步验证。首先, GRK2 的上调在心衰相关的 $\beta$  肾上腺素受体信号通路及心脏功能变化中具有中心地位<sup>[50-51]</sup>。再者,  $G_i$  的上调是心衰发生发展的重要成因<sup>[46-47]</sup>。而笔者所在课题组进一步的研究发现,  $G_i$  和 GRK2 在心衰的发展是具有协同作用的, GRK2 介导的 $\beta_2$  肾上腺素受体磷酸化程度增加能促进 $G_i$  偏向性信号转导, 从而促成心脏异常重构<sup>[52]</sup>。使用 PTX 抑制 $G_i$  信号通路或使用 GRK2 的抑制剂 Bark-ct 后, 能够重建 $\beta$  肾上腺素受体调控下多种心衰模型中的细胞收缩反应<sup>[51-55]</sup>。上述这些研究表明,  $G_i$  和 GRK2 在心脏异常重构及心衰早期都发挥了关键作用。

## 3 基于 $\beta$ 肾上腺素受体信号转导的药物研发

在经典的 GPCR 信号通路中, 配体结合导致受体构象变化使其与异元三聚体 (由  $G_\alpha$  与  $G_\beta$ 、 $G_\gamma$  三种亚基组成) G 蛋白结合, 进而分别释放  $G_\alpha$  亚基与  $G_{\beta\gamma}$  二聚体。不同的亚基分别激活各自的下游效应器, 如 AC、磷脂酶或离子通道。因此, 受体激活后可以通过 G 蛋白不同的下游分子发挥多种生物学功能。激动剂能够全部

或部分激活下游分子, 而拮抗剂则可以与受体结合但不产生下游信号。拮抗剂与激动剂根据与受体的亲和力不同, 竞争性地结合受体, 调节 G 蛋白介导的下游信号通路。

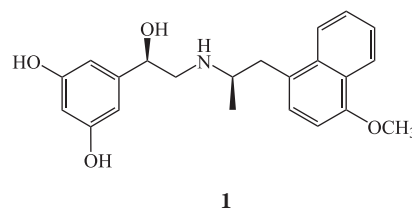
在过去 20 年的研究中, 越来越多的证据表明, GPCRs 的配体能够根据下游信号分子的不同, 介导多种生物学功能。GPCRs 可以通过被偏向性配体 (biased ligand) 激活, 特异性地介导下游某一信号通路子集。人们发现 GPCR 可以被特异激活介导  $\beta$  休止蛋白依赖、非 G 蛋白依赖的信号通路, 这不同于之前发现的  $\beta$  休止蛋白依赖的受体脱敏。目前认为  $\beta$  休止蛋白依赖的信号通路会使受体构象不同于静息时的 R 状态和激活时的 R\* 状态, 呈现一种 R\* 的构象。在进一步研究中, 受体在不同配体刺激下可以呈现出 R\*<sup>1</sup>-R\*<sup>N</sup> 的不同构象, 与不同的下游信号配合行使生物学功能。近期的研究发现,  $\beta$  肾上腺素受体阻断剂卡维地洛 (carvedilol) 在心衰发生发展进程中具有心脏保护作用<sup>[56]</sup>。其通过抑制  $\beta_2$  肾上腺素受体介导的 G 蛋白依赖信号通路的同时, 微弱地激活  $\beta$  休止蛋白信号通路<sup>[57]</sup>。提示我们, 开发偏向性配体可能为治疗心脏疾病提供新的思路。

上文已经论述过  $\beta_2$  肾上腺素受体-G<sub>i</sub> 蛋白信号通路的过度激活是心力衰竭的致病因素, 而心力衰竭的功能损害体现于心肌细胞的  $\beta_1$  和  $\beta_2$  肾上腺素受体对激动剂的刺激失去敏感性, 形成收缩功能障碍<sup>[41,58]</sup>。基于 GPCR 功能选择理论, 可以选择偏向激活 G<sub>s</sub> 通路的  $\beta_2$  肾上腺素受体激动剂, 而非对激活 G<sub>s</sub> 和 G<sub>i</sub> 通路无偏向性的  $\beta_2$  肾上腺素受体激动剂, 作为治疗心力衰竭的候选药物。我们从 20 多个  $\beta_2$  肾上腺素受体激动剂中筛选了偏向激活 G<sub>s</sub> 通路的非诺特罗 (fenoterol)<sup>[58]</sup>。使用非诺特罗处理心力衰竭的大鼠或心肌细胞, 观察到非诺特罗不仅增强心肌细胞的收缩功能<sup>[58]</sup>, 并且显著抑制了心肌细胞凋亡<sup>[59]</sup>。在扩张型心肌病大鼠模型中, 联合使用  $\beta_2$  肾上腺素受体激动剂和  $\beta_1$  肾上腺素受体阻断剂比单用  $\beta_1$  肾上腺素受体阻断剂能够更有效地降低死亡率和梗死面积的扩大<sup>[60]</sup>; 而且, 联合使用  $\beta_2$  肾上腺素受体激动剂和  $\beta_1$  肾上腺素受体阻断剂比联合使用血管紧张素受体阻断剂和  $\beta_1$  肾上腺素受体阻断剂治疗心衰的效果更好<sup>[61]</sup>。类似的结果在犬心衰模型中得到验证<sup>[55]</sup>, 在没有使用 PTX 的实验组, 非诺特罗可以在本应偏向  $\beta_2$  肾上腺素受体-G<sub>i</sub> 通路的情况下偏向性地激活  $\beta$  肾上腺素受体-G<sub>s</sub> 通路, 增强心肌细胞的收缩功能,

凸显非诺特罗的独特药理作用和应用前景<sup>[55]</sup>。

非诺特罗在心衰治疗中的作用被后续多篇文章报道<sup>[59-62]</sup>, 长时间使用非诺特罗不仅提高了心功能, 同时减缓了心脏的异常重构。总体上讲, 非诺特罗在心肌梗死引起的扩张型心肌病的治疗中, 表现得比  $\beta_1$  肾上腺素受体阻断剂更为有效<sup>[59]</sup>。这项研究进一步证明, 偏向性激活  $\beta_2$  肾上腺素受体-G<sub>s</sub> 信号通路可能成为治疗充血性心衰的重要手段。我们有理由相信, 如非诺特罗等  $\beta_2$  肾上腺素受体-G<sub>s</sub> 偏向性激动剂在缓解衰竭心脏结构和功能的退化具有重要作用, 将可能成为治疗心衰的潜在药物。

GPCR 的结构解析是继功能选择性信号转导后 GPCR 领域中另一个研究热点。 $\beta_2$  肾上腺素受体与拮抗剂的共晶结构及  $\beta_2$  肾上腺素受体与激动剂和 G<sub>s</sub> 蛋白复合物的共晶结构已分别于 2007 年<sup>[63]</sup> 和 2011 年<sup>[64]</sup> 获得。随着结构生物学的发展和计算水平的提高, 计算机辅助药物设计已成为药物发现的重要手段。首先, 笔者所在课题组合成了非诺特罗的不同空间异构体<sup>[65]</sup>。随后, 我们改变了非诺特罗的仲胺取代基团, 合成了一系列非诺特罗衍生物。笔者课题组对这些化合物进行定量构效关系分析, 利用比较分子力场分析 (CoMFA) 模型研究并发现了几个具有高  $\beta_2$  肾上腺素受体亚型特异性的激动剂<sup>[66-68]</sup>, 其中包括 *R,R'*-4-甲氧基-1-萘基-非诺特罗 (*R,R'*-4-methoxy-1-naphthylfenoterol, **1**), 其对  $\beta_2$  和  $\beta_1$  的  $K_i$  分别为 0.28 和 160.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在心肌细胞实验中, 我们研究了这些  $\beta_2$  肾上腺素受体激动剂的正性肌力作用及对 PTX 的敏感度<sup>[69-70]</sup>, 有如下发现。



① *R,R'*-非诺特罗比消旋非诺特罗药效更高, 临床药物制剂含有 *R,R'*-非诺特罗和 *S,S'*-非诺特罗, 其中, *R,R'*-异构体是活性部分, *S,S'*-异构体基本无活性;

② *S,R'*-非诺特罗和 *S,R'*-甲氧基非诺特罗能够同时激活 G<sub>s</sub> 和 G<sub>i</sub> 两种 G 蛋白, *R,R'*-非诺特罗和 *R,R'*-甲氧基非诺特罗选择性激活  $\beta_2$  肾上腺素受体的 G<sub>s</sub> 通路;

③以萘基取代苯基, 化合物对  $\beta_2$  肾上腺素受体的特异性增加, 苯基或萘基如带有 4-羟基、4-甲氧基或 4-

氨基, 能增加化合物对 $\beta_2$ 肾上腺素受体的特异性;

④  $G_s$  偏向性 $\beta_2$ 肾上腺素受体激动剂需要具备  $R,R'$ -构型、苯基和 4-羟基、4-甲氧基或 4-氨基其中之一。

展望未来, 我们希望能通过受体的分子模型发现结构全新的  $G_s$  偏向性 $\beta_2$ 肾上腺素受体激动剂, 并发现化合物的结构如何影响受体的构象、不同激动剂的受体信号传导, 及其与心肌细胞收缩功能和存活的相关<sup>[71]</sup>。

#### 4 结语

综上所述,  $\beta_1$  和  $\beta_2$  肾上腺素受体在调节心肌细胞存活和心肌重构方面具有不同效果。 $\beta_2$  肾上腺素受体

激活具有心肌保护作用, 而 $\beta_1$ 肾上腺素受体激活却有心肌毒性作用。与 $\beta_1$ 肾上腺素受体只能偶联 $G_s$ 通路不同的是, $\beta_2$ 肾上腺素受体可以偶联 $G_s$ 和 $G_i$ 两种蛋白, 而 $G_i$ 的激活可以负向调节 $G_s$ 激活引起的心肌收缩反应。在心衰衰竭的心脏中, GRK2 和  $G_i$  蛋白的上调进一步激活了  $G_i$  偏向性 $\beta_2$ 肾上腺素受体的信号转导。这些结果表明,  $\beta_2$ 肾上腺素受体- $G_i$ 通路在连接 GRK 上调和心衰病理过程具有重要作用。由于 GRK2 和  $G_i$  偏向性的 $\beta_2$ 肾上腺素受体信号通路是心衰的致病因素, 因此, 促进  $G_s$  偏向性的 $\beta_2$ 肾上腺素受体激活可能在心衰治疗中具有重要意义。

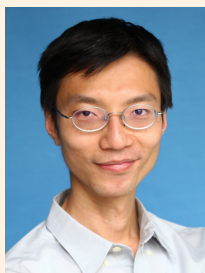
#### [参考文献]

- [1] Yancy C W, Jessup M, Bozkurt B, *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines [J]. *Circulation*, 2013, 128 (16): e240-e327.
- [2] Overington J P, Al-Lazikani B, Hopkins A L. How many drug targets are there? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5 (12): 993-996.
- [3] Li P, Fu Y, Ru J, *et al.* Insights from systems pharmacology into cardiovascular drug discovery and therapy[J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8: 141.
- [4] Rockman H A, Koch W J, Lefkowitz R J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function [J]. *Nature*, 2002, 415 (6868): 206-212.
- [5] Gauthier C, Langin D, Balligand J L.  $\beta_3$ -Adrenoceptors in the cardiovascular system [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21 (11): 426-431.
- [6] Levine T B, Francis G S, Goldsmith S R, *et al.* Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure [J]. *Am J Cardiol*, 1982, 49 (7): 1659-1666.
- [7] Teerlink J R, Pfeffer J M, Pfeffer M A. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats [J]. *Circ Res*, 1994, 75 (1): 105-113.
- [8] Blaufarb I S, Sonnenblick E H. The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling [J]. *Am J Cardiol*, 1996, 77 (13): 8c-16c.
- [9] McMurray J J V, Pfeffer M A. Heart failure [J]. *Lancet*, 2005, 365 (9474): 1877-1889.
- [10] Waagstein F, Hjalmarson A, Swedberg K, *et al.* Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *Lancet*, 1993, 342 (8885): 1441-1446.
- [11] Beckwith C, Munger M A. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on ventricular remodeling and survival following myocardial infarction [J]. *Ann Pharmacother*, 1993, 27 (6): 755-766.
- [12] Lee V C, Rhew D C, Dylan M, *et al.* Meta-analysis: angiotensin-receptor blockers in chronic heart failure and high-risk acute myocardial infarction [J]. *Ann Int Med*, 2004, 141 (9): 693-704.
- [13] Zheng M, Zhu W, Han Q, *et al.* Emerging concepts and therapeutic implications of  $\beta$ -adrenergic receptor subtype signaling [J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 108 (3): 257-268.
- [14] Xiao R P, Lakatta E G. Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic  $Ca^{2+}$ , and  $Ca^{2+}$  current in single rat ventricular cells [J]. *Circ Res*, 1993, 73 (2): 286-300.
- [15] Steinberg S F.  $\beta_2$ -Adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37 (2): 407-415.
- [16] Xiao R P, Hohl C, Altschuld R, *et al.*  $\beta_2$ -Adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in  $Ca^{2+}$  dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (29): 19151-19156.
- [17] Daaka Y, Luttrell L M, Lefkowitz R J. Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different g proteins by protein kinase A [J]. *Nature*, 1997, 390 (6655): 88-91.
- [18] Xiao R P, Ji X, Lakatta E G. Functional coupling of the  $\beta_2$ -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes [J]. *Mol Pharmacol*, 1995, 47 (2): 322-329.
- [19] Xiao R P, Avdonin P, Zhou Y Y, *et al.* Coupling of  $\beta_2$ -adrenoceptor to G(i) proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 1999, 84 (1): 43-52.
- [20] Milano C A, Allen L F, Rockman H A, *et al.* Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor [J]. *Science*, 1994, 264 (5158): 582-586.
- [21] Liggett S B, Tepe N M, Lorenz J N, *et al.* Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level [J]. *Circulation*, 2000, 101 (14):

- 1707-1714.
- [22] Chesley A, Lundberg M S, Asai T, *et al.* The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase [J]. *Circ Res*, 2000, 87 (12): 1172-1179.
- [23] Fu Q, Xu B, Liu Y, *et al.* Insulin inhibits cardiac contractility by inducing a G<sub>i</sub>-Biased  $\beta_2$ -adrenergic signaling in hearts [J]. *Diabetes*, 2014, 63 (8): 2676-2689.
- [24] Varghese P, Harrison R W, Lofthouse R A, *et al.*  $\beta_3$ -adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106 (5): 697-703.
- [25] Belge C, Hammond J, Dubois-Deruy E, *et al.* Enhanced expression of  $\beta_3$ -adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase [J]. *Circulation*, 2014, 129 (4): 451-462.
- [26] Gainetdinov R R, Premont R T, Bohn L M, *et al.* Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2004, 27: 107-144.
- [27] Hata J A, Koch W J. Phosphorylation of G protein-coupled receptors: GPCR kinases in heart disease [J]. *Mol Interv*, 2003, 3 (5): 264-272.
- [28] Santulli G, Campanile A, Spinelli L, *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2 in patients with acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiol*, 2011, 107 (8): 1125-1130.
- [29] Suo Z, Wu M, Citron B A, *et al.* Abnormality of G-protein-coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early  $\beta$ -amyloid accumulation [J]. *J Neurosci*, 2004, 24 (13): 3444-3452.
- [30] Singhmar P, Huo X, Eijkelkamp N, *et al.* Critical role for Epac1 in inflammatory pain controlled by GRK2-mediated phosphorylation of Epac1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (11): 3036-3041.
- [31] Lefkowitz R J, Shenoy S K. Transduction of receptor signals by  $\beta$ -arrestins [J]. *Science*, 2005, 308 (5721): 512-517.
- [32] Zhu W Z, Wang S Q, Chakir K, *et al.* Linkage of  $\beta_1$ -adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111 (5): 617-625.
- [33] Mangmool S, Shukla A K, Rockman H A. beta-Arrestin-dependent activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189 (3): 573-587.
- [34] Sucharov C C, Mariner P D, Nunley K R, *et al.* A  $\beta_1$ -adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291 (3): H1299-H1308.
- [35] Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, *et al.* CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116 (7): 1853-1864.
- [36] Ling H, Zhang T, Pereira L, *et al.* Requirement for  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119 (5): 1230-1240.
- [37] Zhu W, Tsang S, Browe D M, *et al.* Interaction of beta1-adrenoceptor with RAGE mediates cardiomyopathy via CaMKII signaling [J]. *JCI Insight*, 2016, 1 (1): e84969.
- [38] Zhu W Z, Zheng M, Koch W J, *et al.* Dual modulation of cell survival and cell death by  $\beta_2$ -adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (4): 1607-1612.
- [39] Bristow M R, Ginsburg R, Umans V, *et al.*  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta_1$ -receptor down-regulation in heart failure [J]. *Circ Res*, 1986, 59 (3): 297-309.
- [40] Bristow M R, Minobe W A, Reynolds M V, *et al.* Reduced  $\beta_1$  receptor messenger RNA abundance in the failing human heart [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92 (6): 2737-2745.
- [41] Bristow M R, Ginsburg R, Minobe W, *et al.* Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts [J]. *N Engl J Med*, 1982, 307 (4): 205-211.
- [42] Bristow M R, Hershberger R E, Port J D, *et al.*  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium [J]. *Mol Pharmacol*, 1989, 35 (3): 295-303.
- [43] Ungerer M, Böhm M, Elce J S, *et al.* Altered expression of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and  $\beta_1$ -adrenergic receptors in the failing human heart [J]. *Circulation*, 1993, 87 (2): 454-463.
- [44] Feldman A M, Cates A E, Veazey W B, *et al.* Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart [J]. *J Clin Invest*, 1988, 82 (1): 189-197.
- [45] Bohm M, Eschenhagen T, Gierschik P, *et al.* Radioimmunochemical quantification of  $G_{i\alpha}$  in right and left ventricles from patients with ischaemic and dilated cardiomyopathy and predominant left ventricular failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, 26 (2): 133-149.
- [46] Zhu W, Zeng X, Zheng M, *et al.* The enigma of  $\beta_2$ -adrenergic receptor  $G_i$  signaling in the heart: the good, the bad, and the ugly [J]. *Circ Res*, 2005, 97 (6): 507-509.
- [47] Xiao R P, Balke C W.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange linking  $\beta_2$ -adrenergic  $G_i$  signaling to heart failure: associated defect of adrenergic contractile support [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36 (1): 7-11.
- [48] Sato M, Gong H, Terracciano C M N, *et al.* Loss of  $\beta$ -adrenoceptor response in myocytes overexpressing the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36 (1): 43-48.
- [49] Shioi T, Kang P M, Douglas P S, *et al.* The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice [J]. *EMBO J*, 2000, 19 (11): 2537-2548.
- [50] Choi D J, Koch W J, Hunter J J, *et al.* Mechanism of  $\beta$ -adrenergic

receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased  $\beta$ -adrenergic receptor kinase [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (27): 17223-17229.

- [51] Koch W J, Rockman H A, Samama P, *et al.* Cardiac function in mice overexpressing the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase or a  $\beta$ ARK inhibitor [J]. *Science*, 1995, 268 (5215): 1350-1353.
- [52] Zhu W, Petrashevskaya N, Ren S, *et al.*  $G_i$ -biased  $\beta_2$ AR signaling links GRK2 upregulation to heart failure [J]. *Circ Res*, 2012, 110 (2): 265-274.
- [53] Chakir K, Daya S K, Aiba T, *et al.* Mechanisms of enhanced  $\beta$ -adrenergic reserve from cardiac resynchronization therapy [J]. *Circulation*, 2009, 119 (9): 1231-1240.
- [54] Perrino C, Prasad S V N, Schroder J N, *et al.* Restoration of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling and contractile function in heart failure by disruption of the  $\beta$ ARK1/phosphoinositide 3-kinase complex [J]. *Circulation*, 2005, 111 (20): 2579-2587.
- [55] Chakir K, Depry C, Dimaano V L, *et al.*  $G_{\alpha s}$ -biased beta2-adrenergic receptor signaling from restoring synchronous contraction in the failing heart [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3 (100): 100ra88.
- [56] Packer M, Coats A J S, Fowler M B, *et al.* Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure [J]. *New Engl J Med*, 2001, 344 (22): 1651-1658.
- [57] Wisler J W, DeWire S M, Whalen E J, *et al.* A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (42): 16657-16662.
- [58] Xiao R P, Zhang S J, Chakir K, *et al.* Enhanced  $G(i)$  signaling selectively negates beta2-adrenergic receptor (AR)--but not beta1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts [J]. *Circulation*, 2003, 108 (13): 1633-1639.
- [59] Ahmet I, Krawczyk M, Heller P, *et al.* Beneficial effects of chronic pharmacological manipulation of  $\beta$ -adrenoreceptor subtype signaling in rodent dilated ischemic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2004, 110 (9): 1083-1090.
- [60] Ahmet I, Krawczyk M, Zhu W, *et al.* Cardioprotective and survival benefits of long-term combined therapy with  $\beta_2$  adrenoreceptor (AR) agonist and  $\beta_1$  AR blocker in dilated cardiomyopathy postmyocardial infarction [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 325 (2): 491-499.
- [61] Ahmet I, Morrell C, Lakatta E G, *et al.* Therapeutic efficacy of a combination of a  $\beta_1$ -adrenoreceptor (AR) blocker and  $\beta_2$ -AR agonist in a rat model of postmyocardial infarction dilated heart failure exceeds that of a  $\beta_1$ -AR blocker plus angiotensin-converting enzyme inhibitor [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 331 (1): 178-185.
- [62] Ahmet I, Lakatta E G, Talan M I. Pharmacological stimulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors ( $\beta_2$ AR) enhances therapeutic effectiveness of  $\beta_1$ AR blockade in rodent dilated ischemic cardiomyopathy [J]. *Heart Fail Rev*, 2005, 10 (4): 289-296.
- [63] Cherezov V, Rosenbaum D M, Hanson M A, *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor [J]. *Science*, 2007, 318 (5854): 1258-1265.
- [64] Rasmussen S G, DeVree B T, Zou Y, *et al.* Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex [J]. *Nature*, 2011, 477 (7366): 549-555.
- [65] Beigi F, Bertucci C, Zhu W, *et al.* Enantioselective separation and online affinity chromatographic characterization of *R,R*- and *S,S*-fenoterol [J]. *Chirality*, 2006, 18 (10): 822-827.
- [66] Jozwiak K, Khalid C, Tanga M J, *et al.* Comparative molecular field analysis of the binding of the stereoisomers of fenoterol and fenoterol derivatives to the  $\beta_2$  adrenergic receptor [J]. *J Med Chem*, 2007, 50 (12): 2903-2915.
- [67] Jozwiak K, Woo A Y H, Tanga M J, *et al.* Comparative molecular field analysis of fenoterol derivatives: a platform towards highly selective and effective  $\beta_2$ -adrenergic receptor agonists [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18 (2): 728-736.
- [68] Plazinska A, Pajak K, Rutkowska E, *et al.* Comparative molecular field analysis of fenoterol derivatives interacting with an agonist-stabilized form of the beta(2)-adrenergic receptor [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22 (1): 234-246.
- [69] Woo A Y, Wang T B, Zeng X, *et al.* Stereochemistry of an agonist determines coupling preference of beta2-adrenoceptor to different G proteins in cardiomyocytes [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75 (1): 158-165.
- [70] Woo A Y, Jozwiak K, Toll L, *et al.* Tyrosine 308 is necessary for ligand-directed  $G_s$  protein-biased signaling of beta2-adrenoceptor [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (28): 19351-19363.
- [71] Woo A Y, Song Y, Zhu W, *et al.* Advances in receptor conformation research: the quest for functionally selective conformations focusing on the beta2-adrenoceptor [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172 (23): 5477-5488.



**【专家介绍】**胡耀豪：副教授，任职于沈阳药科大学药理与毒理系。1993年毕业于香港中文大学，获生物化学学士学位，1998年于同校获生物化学硕士学位，2004年获香港中文大学生物化学博士学位，毕业后赴美国国家卫生研究院（NIH）下的美国国家衰老研究所（National Institute on Aging）进行博士后研究。2010—2015年在北京大学进行访问研究，2015年被聘为沈阳药科大学副教授。目前的主要研究方向为G蛋白偶联受体（GPCR）功能选择性信号转导，细胞的生理、功能及存活以及心血管药理学等。主持国家自然科学基金面上项目1项；参与国家自然科学基金青年基金项目1项；另外，作为项目组子课题组长承担国家科技重大专项项目1项；作为骨干成员承担国家重大科学研究计划项目1项。目前已在 *Circulation*、*Cardiovascular Research*、*Journal of Medicinal Chemistry*、*British Journal of Pharmacology*、*Journal of Biological Chemistry* 等期刊发表论文20余篇。