Fmin。细胞自身荧光的测定与此类似，唯不加入 Fura-2/AM。

五、计算 应用双波长荧光分光光度计可同时测定 340 和 380 这两个波长激发的荧光强度，Ca^{2+} 浓度用这二者的比值（R = F340/F380）来计算。其计算公式如下：

$$[Ca^{2+}]=Kd\cdot\frac{R-R_{min}}{R_{max}-R}\cdot\frac{F_{f2}}{F_{b2}}$$

kd 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数，文献报道在生理条件下其为 224nm，R、R min、R max分别为测得的荧光比值，最小荧光比值和最大荧光比值，F_{f2}、F_{b2}分别为零 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 饱和时 380nm 激发光产生的荧光强度，Ca^{2+} 浓度单位为 nm（10^{-9}M）。由于目前国内大多数荧光分光光度计均为单波长装置，无法用 R 值来计算〔Ca^{2+}〕，因而沿用 quin-2 的计算公式，即$[Ca^{2+}]=kd\cdot\frac{F-F_{min}}{F_{max}-F}$，式中 F、F min和 F max均为用 340nm 激发光测得的样品荧光值、最小荧光值和最大荧光值，Kd 值仍为 224nm。

参考文献

[1]Grynkewiex G, et al. J Biol chem, 1985,260:3440
[2]Tsiem R Y, et al. J Cell Biology, 1982,94:325
[3]Tsien R Y, et al. Cell Calcium, 1985,6:145
[4]Li Q, et al. Biochem Biophy Res Comm, 1987,147:120
[5]Al-Mohanna F A. Cell Calcium, 1988,9(1):17

血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ）受体的研究进展

戴生明 朱铨英 苏定冯
（第二军医大学药理学教研室 上海 200433）

摘要 血管紧张素Ⅱ（AⅡ）受体按照其与选择性拮抗剂的亲和力不同，至少可分为 AT_1 和 AT_2 受体两种。AT_1、AT_2 受体的分布、氨基酸序列已经清楚。AT_1 受体是 G 蛋白偶联受体，可能通过抑制腺苷酸环化酶、激活磷脂酶 C 而促进磷脂酰肌醇水解起作用。AⅡ的已知作用均是由 AT_1 受体介导的。AT_2 受体的生理功能及其信息跨膜转导机制迄今尚不清楚。

关键词 血管紧张素Ⅱ；受体

血管紧张素Ⅱ（AⅡ）最初因参与调节血压和水钠平衡而引起人们的兴趣。近年来发现AⅡ作为内分泌、旁分泌、自分泌和胞内分泌（intracrine）的激素可能对各种细胞、组织、器官都有作用。生物化学和药理学研究早已提示在机体不同组织或同一组织存在不同类型的AⅡ受体。但由于实验技术和方法的限制未能深入研究AⅡ受体。1988 年以来两类高选择性的非肽类AⅡ受体拮抗剂的问世[1,2]，为AⅡ受体的研究提供了良好的工具。分子生物学技术的发展使得从分子水平认识AⅡ受体成为可能。因此，近年来AⅡ受体的研究取得了巨大进展。

一、AⅡ受体的分型

1989 年 Whitebread 等[3]首先用放射性配基结合试验和非肽类AⅡ受体拮抗剂研究证实，人和大鼠的肾上腺球状带存在两种AⅡ受体。因AⅡ受体类型的命名一时较混乱，1990 年美国心脏学会高血压研究理事会统一了AⅡ受体类型的命名，规定用 AT 表示AⅡ受体的缩写，用 1,2 等区分不同类型；用 A,B 等表示不同亚型。把对罗沙藤（losartan，DuP753）敏感的受体定为 AT_1 受体（曾命名为AⅡ受体 1 型，B 型，α 型）；对

PD123177 敏感的受体定为 AT_2 受体(曾命名为 A Ⅱ 受体 2 型,A 型,β 型[2,4])。罗沙藤与 AT_1 受体的亲和力比 AT_2 受体强 3×10^4 倍;PD123177 与 AT_2 受体的亲和力比 AT_1 受体强 3500 倍。AT_1 受体拮抗剂有罗沙藤及其代谢产物 EXP3174, DuP532, L-158809, SC51895, SC51316, SR47436, I-CID6888, ICID8731, GR117289, SK & F108566, TCV-116 (CV-11974), A81282, CGP48933 等;AT_2 受体拮抗剂有 PD123177 (EXP655), PD123319, PD121981(WL-19), CGP42112A 等。非选择性拮抗剂 BIBS39 和 BIBS222 对 AT_1/AT_3 受体的 IC_{50}(半抑制浓度)之比值分别是 17 和 37。

除了 AT_1 和 AT_2 受体外,还存在一些不典型的 A Ⅱ 结合位点,与选择性 AT_1 或 AT_2 受体拮抗剂均不表现出特异结合。有人把小鼠神经细胞瘤细胞上的 A Ⅱ 受体定为 AT_3 受体(Chaki, Inagami, 1992),血管紧张素 Ⅳ 的特异结合位点定为 AT_4 受体(Sardinia 等,1993)。

二、AT_1 和 AT_2 受体的分布

AT_1 和 AT_2 受体的分布由组织的功能所决定,且存在种属差异[5]。人的心脏、血管、肾上腺皮质、肾脏中 AT_1 受体占绝对优势;肾上腺髓质、脑动脉、卵巢中 AT_2 受体占优势;子宫只存在 AT_2 受体。在大鼠脑内,穹窿下区、室旁核、室周核、垂体前叶、迷走神经运动背核、孤束核、最后区、海马腹侧、三叉神经核、外侧嗅束、梨状皮质和内侧视前神经核中以 AT_1 受体占优势。丘脑、下橄榄体、隔的外侧面、蓝斑、内侧膝状体、杏仁核中 AT_2 受体占优势。上丘、下丘和嗅球中 AT_1、AT_2 受体数量相当[6]。

不同生长期大鼠的 AT_1、AT_2 受体数量与分布有所不同,AT_1 和 AT_2 受体总数:胚胎期>幼年期>成年期。胚胎期 AT_2 受体比 AT_1 受体多 10 倍以上。与成年期分布不同,胚胎期骨骼肌、皮肤、膈肌、支气管和胃中也有 A Ⅱ 受体分布,以 AT_2 受体为主[7]。未治疗的高血压患者血小板 AT_1 受体数目较血压正常者和高血压已治疗者少[7]。环孢霉素 A 诱发的高血压大鼠主动脉平滑肌细胞中,AT_1 受体数目增加[9]。提示高血压时 AT_1 受体数目将发生变化。增多还是减少视病因不同而异。

三、AT_1、AT_2 受体的分子生物学研究

(一)AT_1 受体

1991 年 A Ⅱ 受体的生物学研究取得重大突破。Murphy 等[10]和 Sasaki 等[11]分别从大鼠血管和肾上腺球状带克隆出 AT_1 受体 cDNA。此后,大鼠肾脏[12]和人肝脏[13]的 AT_1 受体 cDNA 也被克隆。AT_1 受体属于 G 蛋白偶联受体超家族,有 7 个跨膜段,肽链由 359 个氨基酸组成,分子量约为 41kDa,肽链在翻译后经糖基化修饰,最终分子量约为 65kDa。AT_1 受体的第 2 个跨膜段 74 号位上的 Asp 对于受体的亲和力和信息转导作用非常重要。胞外域含四个 cys,能形成两对二硫键,这些 cys 对受体的功能是必需的。与其他 G 蛋白偶联受体一样,AT_1 受体也易脱敏,可能因胞内域的 Ser 和 Thr 磷酸化而脱敏。在大鼠和小鼠中又克隆出 AT_{1A} 和 AT_{1B} 受体的 cDNA。把大鼠血管中 AT_1 受体定为 AT_{1A} 受体,肾上腺中 AT_1 受体定为 AT_{1B} 受体。这两种受体亚型高度保守,均含 359 个氨基酸残基,同源性为 94%,仅 17 个氨基酸不同,主要集中在羧基末端的胞外域和胞内域,跨膜段变异非常小[14]。但是 AT_{1A} 和 AT_{1B} 受体基因的开放阅读框的 3'端和 5'端的非编码序列的同源性只有 35%。AT_{1A} 和 AT_{1B} 受体在大鼠和小鼠间虽然同源性很高,但也有细微差别,变异主要集中在羧基末端,受体基因 3'端的非编码序列则有显著差异。肝、肾、主动脉、脾、肺中存在丰富的 AT_{1A} 受体 mRNA,下丘脑和穹窿下区也有 AT_{1A} 受体 mRNA;AT_{1B} 受体 mRNA 主要存在于垂体、肾上腺、肾、肝;心、脑、脾中无 AT_{1B} 受体 mR-

NA。大鼠 AT_{1A}受体基因在 17 号染色体上，AT_{1B}受体基因在 2 号染色体上(Lewis 等，1993)。

人 AT_1 受体长度与大鼠和小鼠的 AT_1 受体相同，同源性分别为 94.4%和 95.3%。过去认为仅啮齿类动物存在两种 AT_1 受体，人只有一种 AT_1 受体。人 AT_1 受体与大鼠 AT_{1A}受体的跨膜段同源性非常高，胞外域的氨基酸变化与 AT_{1B}受体相同，但跨膜段和胞内域的氨基酸变化与 AT_{1B}受体不同。因此很难把人 AT_1 受体归为哪种亚型。这种观点现又受到挑战，因 Konishi 等[15]从人胎盘中克隆出另一种 AT_1 受体 cDNA，并把胎盘 AT_1 受体定为 AT_{1B}受体，肝和肾上腺中 AT_1 受体定为 AT_{1A}受体。人 AT_{1B}受体也由 359 个氨基酸组成，与人 AT_{1A}受体有 97.2%的相同序列，人 AT_{1B}受体 mRNA 仅在胎盘组织中较丰富。

AT_1 受体 cDNA 的开放阅读框由 1080 bp 组成，含起始密码子 ATG、终止密码子 TGA。AT_1 受体基因 5'端有非编码序列，大鼠 AT_{1A}受体 88bp 的可变顺序插入其间，人 AT_{1A}受体有 22bp 的可变顺序插入其间。3'端也有非碥码序列，含许多重复的 ATTTA 序列，可能与 mRNA 的稳定性或翻译效率有关。大鼠 AT_{1A}受体基因含三个外显子和四个内含子，编码序列在第 3 外显子。基因组 DNA 的编码序列不含内含子，因此不会因蛋白质翻译时选择性拼接而产生不同受体。启动子序列已清楚，含 TATA 盒，启动子与编码区相隔数千个碱基。

调节 AT_1 受体基因表达的因素较为复杂，其主要调节物是 AⅡ，AⅡ的急性作用是使受体隐蔽或内在化，慢性作用是使受体向下调节。Forskolin 和霍乱毒素等升高胞内 cAMP 水平的物质可抑制 AT_1 受体 mRNA 转录，双侧肾切除可使肝内 AT_{1A}受体 mRNA 表达降低而使 AT_{1B}受体 mRNA 表达升高。体内缺钠时，肾小球区域细胞的 AT_1 受体增加，而血管平滑肌细胞的 AT_1 受体减少。体内缺钾时血管平滑肌细胞的 AT_1 受体表达也减少。地塞米松能促进 AT_1 受体 mRNA 转录(Sato 等，1994)。

(二)AT_2 受体

Mukoyama 等[16]于 1993 年从大鼠胚胎组织中克隆出 AT_2 受体的 cDNA。AT_2 受体由 363 个氨基酸组成，与 AT_1 受体有 34%的相同序列，也具有 7 个跨膜段，但第 3 个胞内环与经典的 G 蛋白偶联受体不同。因此 AT_2 受体可能不与 G 蛋白偶联。Ichiki 等[17]从小鼠胚胎 cDNA 文库也克隆出 AT_2 受体 cDNA。小鼠 AT_2 受体的核苷酸序列与氨基酸序列和大鼠 AT_2 受体分别有 97%和 98%的同源性。AT_2 受体 cDNA 的开放阅读框由 1089bp 组成，编码序列在第 3 外显子，为单拷贝，也不含插入顺序。生长活跃的细胞，AT_2 受体 mRNA 表达较少；而融合的、静止期的细胞 AT_2 受体 mRNA 表达较多。

四、AT_1、AT_2 受体的功能

(一)AT_1 受体的功能

大量研究表明，AT_1 受体与血管收缩、心肌收缩力增强、口渴、垂体激素分泌、醛固酮分泌和肾小管的水钠重吸收功能有关。AT_1 受体的分布部位也间接地证明了这一点。AⅡ能促进细胞增殖和肥大，刺激蛋白质、胶原、DNA 的合成。这些作用可被罗沙藤拮抗，说明也是由 AT_1 受体介导的。AT_{1A}、AT_{1B}受体与 AⅡ的亲和力相似，均与 G 蛋白偶联。这两种受体在功能上是否有差别，目前尚不清楚。Chiu 等(1993)认为这两种受体在药理学上没有差别。另有研究表明 AT_{1A}、AT_{1B}受体在中枢调节体液平衡中起不同作用(Sandberg 等，1994)。

在不同组织器官介导 AT_1 受体功能的细胞机制不完全相同。GTP 可通过 G 蛋白影响 AⅡ与肾上腺、心脏、肝脏、肾脏、血管平滑肌中 AT_1 受体结合。肝、肾上腺、肾脏的 AT_1 受体与 G 蛋白偶联可以抑制腺苷酸环化酶，

降低cAMP水平。肾近曲小管上的AT_1受体激活可使胞内cAMP生成减少，H^+/Na^+交换和Na^+/HCO_3^-协同运输增加；另一方面，AT_1受体又使磷脂酶A_2活化，花生四烯酸释放增加，5,6-环氧二十碳三烯酸生成增加，从而促进Ca^{2+}外流和抑制Na^+运输。肝、心、血管、肾上腺皮质中AT_1受体与G蛋白偶联可激活磷脂酶C，促进磷脂酰肌醇水解成1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3)和二酰基甘油(DG)。IP_3使胞内贮存钙释放，Ca^{2+}和DG共同激活蛋白激酶C，使胞内蛋白质磷酸化。AT_1受体还与磷脂酶D和磷脂酶A_2激活有关。磷脂酶D激活促使磷脂酰胆碱水解生成磷脂酸，磷脂酸是DG生成的来源之一。磷脂酶A_2激活后增加前列环素的释放。

(二)AT_2受体的功能

AT_2受体的确切功能至今尚未弄清。PD123319或PD123177单独应用时不能抑制外源性AⅡ的升压效应，但是它们可以增强罗沙藤抑制AⅡ的升压作用，其可能原因是它们能升高血浆游离罗沙藤浓度。有人推测AT_2受体与心房肽C型受体功能相似，可清除血浆中AⅡ。但若预先给AT_2受体拮抗剂并不能增强AⅡ引起的心血管效应，说明这种可能性不大。子宫、卵巢内AT_2受体含量丰富，提示AT_2受体与妊娠有关。在胚胎期AT_2受体含量丰富，而生后急剧减少，提示AT_2受体对胚胎组织的生长、发育、分化起重要作用。Cogan[18]发现PD123177与罗沙藤一样能减少肾近曲小管对碳酸氢钠、氯化钠和水的重吸收，提示AT_2受体可能参与肾小管的重吸收功能。PD123319脑室内注射(icv)可以抑制AⅡicv引起的饮水行为(Widdop等，1993)，也可以抑制NaCl、卡巴可、异丙肾上腺素、低血容量诱发的饮水反应(Rowland等，1992)。提示AT_2受体与饮水行为的调节有关。皮肤损伤后伤口周围皮肤的AⅡ受体明显增加，以AT_2受体为主，提示AT_2受体与组织修复有关。AT_2受体可能还参与脑血流的自动调节(Naveri等，1994)，介导内皮细胞合成一氧化氮(Wiemer等，1993)。

AT_2受体的信息跨膜转导机制目前也不清楚。AT_2受体可能通过抑制腺苷酸环化酶，降低cAMP水平起作用。AT_2受体可能与K^+外流也有关。

参考文献

[1]戴生明，苏定冯．非肽类血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂的研究进展．中国药理学通报，1991；7：413～5

[2]Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT et al. Angiotensin Ⅱ receptors and angiotensin Ⅱ receptor antagonists. Pharmacol Rev, 1993；45：205～51

[3]Whitebread S, Mele M, Kamber B, Gaspars M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin receptor subtypes. Biochem Biophys Res Commun, 1989；163：284～91

[4]Van Meel JCA, Entzeroth M, Hauel N et al. Angiotensin Ⅱ receptor antagonists. Arzeim-Forsch/Drug Res, 1993；4：242～6

[5]Chang RSL, Lotti VJ. Angiotensin Ⅱ receptor subtypes in rat rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. Life Sci, 1991；49：1485～90

[6]Gehlert DR, Gackenheimer SL, Schober DA. Autoradiography localization of subtypes of angiotensin Ⅱ antagonist binding in the rat brain. Neuroscience, 1991；44：501～14

[7]Tsutsumi K, Stromberg C, Viswanathan M, Saavedra JM. Angiotensin Ⅱ receptor subtypes in fetal tissues of the rat: autoradiography, guanine nucleotides sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis. Endocrinology, 1991；129：1075～82

[8]Crabos M, Bertschin S, Buehler FR et al. Identification of AT_1 receptors on human platelets and decreased angiotensin Ⅱ binding in hypertension. J Hypertens, 1993；11(suppl 5)：S230～1

[9]Iwai J, Kanayama Y, Negoro N et al. Increased gene expression of angiotensin Ⅱ type 1A receptor in aortic smooth muscle cells of cyclosporin A induced hypertensive rats. J Hypertens, 1993；11(suppl 5)：S122～3

[10]Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK et al. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin Ⅱ receptor. Nature (Lond), 1991；351：233～6

(下转186页)

附表 化合物Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ的^{13}CNMR 化学位移

C	化合物Ⅱ ($CDCl_3$)	化合物Ⅲ ($CDCl_3$)	化合物Ⅳ (DMSO-d6)
1	127.03	127.09	125.71
2	109.78	111.97	115.75
3	149.26	146.67	145.54
4	151.52	149.85	148.11
5	111.04	114.08	115.12
6	114.86	116.27	114.64
7	146.97	144.22	144.60
8	123.12	121.04	121.16
9	172.38	167.81	167.89
$-OCH_3$	55.90	55.63	
$-OCH_3$	55.90		

靛 $\diagdown C{=}O \diagup$)。 ^{1}HNMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 7.48 (m, 2H, 3.5-H), 7.62 (m, 1H, 4-H), 8.15 (m, 2H, 2.6-H)。 ^{13}CNMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 12.47 (C_3, C_5), 129.00 (C_1), 130.20 (C_2, C_6), 133.80 (C_4), 172.26 ($\diagdown C{=}O \diagup$)。以上数据与苯甲酸一致。

讨论

从辽西蜂胶中分离到的 5 种化合物，据文献[2]报道及构效关系分析，均具有抗菌及防腐活性，这与蜂胶在蜂箱中的抑菌、防腐作用是相吻合的，其他方面的作用有待于进一步研究。

致谢：第二军医大学药学院仪器测试中心杨根金协助 NMR 谱测定，王勇协助 IR 谱测定；上海市商检局协助 MS 谱测定。

参考文献

[1]Lloyd A L et al. Amer Bee J. 1967;107(3):90

[2]乔智胜、陈瑞华．河南蜂胶抗菌活性成分研究，中国中药杂志，1991;16(8):481

[3]Grasselli J G et al. Atlas of Spectral Data and Physical Constants for Organic Compound. Vol Ⅲ. 1975:64

(上接 144 页)

[11]Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin Ⅱ type-1 receptor. Nature (Loud), 1991;351:230～2

[12]Iwai N, Yamano Y, Chaki S et al. Rat angiotensin Ⅱ receptor: cDNA sequence and regulation of the gene expression, Biochem Biophys Res Commun, 1991;177:299～304

[13]Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C et al. Cloning and characterization of a human angiotensin Ⅱ type-1 receptor. Biochem Biophys Res Commun, 1992;183:489～95

[14]Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin Ⅱ receptor. FEBS Lett, 1992;298:257～60

[15]Konishi H, Kuroda S, Inada Y, Fujisawa Y. Novel subtype of human angiotensin Ⅱ type 1 receptor: cDNA cloning and expression. Biochem Biophys Res Commun, 1994;199:467～74

[16]Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M et al. Expression cloning of type-2 angiotensin Ⅱ receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. J Biol Chem, 1993;268:24539～42

[17]Ichiki T, Herold CL, Kambayashi Y, Bardhan S. Cloning of the cDNA and the genomic DNA of the mouse angiotensin Ⅱ type 2 receptor. Biochim Biophys Acta, 1994;1189:247～50

[18]Cogan MG, Liu FY, Wong PC, Timmermans PBMWM. Comparison of inhibitory potency by non-peptide angiotensin Ⅱ receptor antagonists PD123177 and DuP753 on proximal nephron and renal transport. J Pharmacol Exp Ther, 1991;259:687～91