

DOI: 10.13376/j.cblls/2015035

文章编号: 1004-0374(2015)03-0249-13



肖瑞平, 现任北京大学分子医学研究所所长, 长江特聘教授、国家杰出青年基金获得者、国家“千人计划”特聘专家, 北京大学终生讲席教授。2010年3月辞去美国NIH终身资深研究员职位, 全职在北京大学工作。肖瑞平教授兼具分子生物学和转化医学背景, 长期从事心血管及代谢疾病药物靶点研究; 迄今已在国际一流学术刊物上发表论文100余篇, 引用8000余次。担任包括 *The New England Journal of Medicine* 副主编在内的多个国际权威杂志副主编/编委。课题组以基础医学研究为主, 重视学科交叉, 走基础与临床相结合之路, 总的研究目标是在基因、蛋白质和整体水平上探讨心血管及代谢疾病的发病机理及临床防治的同时, 有效整合分子医学研究所在心血管疾病机理研究、药理及灵长类动物模型等优势 and 潜力, 推进转化医学。目前的研究着重于 Mitsugumin 53 (MG 53) 作为代谢综合征、2型糖尿病及其心血管并发症治疗靶点的基础及应用研究。

β 肾上腺素受体与心力衰竭

宋颖, 胡耀豪, 肖瑞平*

(北京大学分子医学研究所, 生命科学联合中心, 代谢及心血管分子医学北京市重点实验室, 北京 100871)

摘要: β 肾上腺素受体中的 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 亚型是调节心脏功能最重要的两种蛋白。在此将阐述 β 肾上腺素受体亚型信号转导对心脏的生理功能与心力衰竭的关系, 并综合介绍 β 肾上腺素受体系统中一些关键蛋白的基因多态性与心力衰竭的易感性、预后及药物治疗效果的关联。最后, 将探讨如何应用功能选择理论和基因组学发现新的心衰治疗靶点和新药, 为新药研发和个体化医疗提供思路。

关键词: $\beta 1$ 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; 基因多态性; 心力衰竭; 药物治疗

中图分类号: R541.6 文献标志码: A

β -adrenergic receptors and heart failure

SONG Ying, WOO Yiu-ho Anthony, XIAO Rui-Ping*

(Beijing Key Laboratory of Cardiometabolic Molecular Medicine, Center for Life Sciences, Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: β -adrenergic receptors, particularly the $\beta 1$ and the $\beta 2$ subtypes, are the most important regulators of cardiac function. Here, we review the roles of β -adrenergic receptor subtype signaling in heart physiology and heart failure, and summarize how genetic polymorphism in some of the key proteins in the β -adrenergic system could

收稿日期: 2015-03-16

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81130073); 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2012CB-518000); 国家重大科学研究计划(2012CB910402); 国家科技重大专项“重大新药创制”(2013ZX09508104, 2013ZX09507001); “细胞钙信号研究”创新团队国家自然科学基金(31221002)

*通信作者: E-mail: xiaor@pku.edu.cn

affect susceptibility, prognosis and responses to drug treatment in human heart failure. Finally, we discuss how the concept of functional selectivity and a genomic approach could be applied in the discovery of new targets and new drugs for heart failure, and help set the stage for personalized medicine.

Key words: $\beta 1$ adrenergic receptor; $\beta 2$ adrenergic receptor; G protein-coupled receptor kinase; signal transduction; genetic polymorphism; heart failure; drug treatment

β 肾上腺素受体 (β adrenergic receptor, β AR) 是 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 超家族的一个典型成员。G 蛋白偶联受体是一类非常普遍的七次跨膜细胞膜受体, 是现代医学最成功的药物靶点。当前, 市场上约有 36% 的药物是以人类的 G 蛋白偶联受体为靶点的^[1]。 β 肾上腺素受体广泛参与包括生长控制、细胞生存、代谢调节、肌肉收缩和细胞死亡等在内的多种生理功能。在心脏中, β 肾上腺素受体的生理功能主要体现在身体对外界压力的应激反应, 或称为“战斗或逃跑”反应。因为, 应激时, 由肾上腺分泌的儿茶酚胺作用于心脏中的 β 肾上腺素受体, 能强而有力地增强心肌收缩力 (正性肌力作用) 及加快心率 (正时性作用), 增加的心输出量使身体能更有效地调动其应激效能。

1 心脏中不同 β 肾上腺素受体亚型的信号体系和亚型特异性功能

心脏表达的 β 肾上腺素受体亚型包括 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 三种。其中, $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 两种亚型对调节心脏的功能及多种生理和病理过程至关重要。

1.1 正常生理条件下不同 β 肾上腺素受体亚型的信号体系和功能

在正常的状态下, 分别激活 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 肾上腺素受体会表现出不同的效果。在成年大鼠心肌细胞中, 特异性单独激活内源 $\beta 1$ 肾上腺素受体或单独激活 $\beta 2$ 肾上腺素受体, 均可增强细胞收缩的幅度, 表现出相似的正性肌力作用; 而激活内源 $\beta 1$ 肾上腺素受体有更明显的正时性作用, 可以更有效地缩短收缩的时程^[2]。

具体到上述效果的信号通路, 主要是由于 β 肾上腺素受体偶联的 Gs 信号通路的活化。心肌细胞中 $\beta 1$ 肾上腺素受体的激活是通过激动剂引起受体结构的改变, 进而激活 Gs 蛋白, 引起第二信使 cAMP (环腺苷酸) 的合成, 活化蛋白激酶 A (PKA) 和下游的信号分子。而 PKA 底物 (包括 L 型钙离子通道、受磷蛋白、利阿诺定、心源性肌钙蛋白 I 和心源性肌球蛋白结合蛋白 C) 的磷酸化能够增强心肌细胞的收缩。 $\beta 2$ 肾上腺素受体的激活可以引发

与 $\beta 1$ 肾上腺素受体类似时程的 Gs 蛋白 - 腺苷酸环化酶 - 环腺苷酸 - 蛋白激酶 A (Gs-AC-cAMP-PKA) 信号级联, 但是, $\beta 2$ 肾上腺素受体激活引发的膜结合 cAMP 聚集量只有 $\beta 1$ 肾上腺素受体激活引发的一半。在心肌细胞收缩、底物蛋白磷酸化等方面, $\beta 2$ 肾上腺素受体的激活也有与 $\beta 1$ 肾上腺素受体激活不同的表现^[3]。

为什么同样的 Gs-AC-cAMP-PKA 通路在这两个不同的亚型中有所不同呢? 稍后的研究令这个答案水落石出: $\beta 1$ 肾上腺素受体只与 Gs 蛋白偶联, 而 $\beta 2$ 肾上腺素受体同时与 Gs 和 Gi 两种蛋白偶联。首先, 在大鼠心肌细胞中, 百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX; 一种 Gi 抑制剂) 可以增强 $\beta 2$ 肾上腺素受体的正力作用, 而对 $\beta 1$ 受体的正力作用无影响, 暗示 $\beta 2$ 肾上腺素受体在偶联 Gs 蛋白的同时, 也偶联对 PTX 敏感的 Gi 蛋白^[4]。随后, 通过放射性同位素 ^{32}P 标记 GTP, 证实在生理系统中的确有 Gi 活化^[5]。 $\beta 2$ 肾上腺素受体激活的 Gi 蛋白信号在一定程度上可以抵消激活 Gs-AC-cAMP-PKA 信号途径引起的正性肌力作用, 所以, 只有在 Gi 蛋白通路被抑制的情况下, $\beta 2$ 肾上腺素受体才能显示出它全部的正性肌力作用。

1.2 病理条件下不同 β 肾上腺素受体亚型的信号体系和功能

心力衰竭 (heart failure) 又称心肌衰竭, 是指心脏不能搏出同静脉回流及身体组织代谢所需相称的血液供应的一种复杂的临床综合征。它的高死亡率和持续上升的高发病率使其成为人类健康的一个重大课题, 其高昂的治疗费用也给患者和社会带来沉重的负担。心力衰竭中, 交感神经系统和肾素 - 血管紧张素系统均呈现活跃, 这些系统活动的增强在疾病发生之初代偿降低了的血压和心输出量, 短期内较为有效。但是, 长期在血液循环中高浓度的儿茶酚胺和血管紧张素增加了心脏工作量, 导致适应不良性心脏重塑和心肌细胞死亡。心力衰竭的一个重要特征就是 β 肾上腺素受体的系统异常, 包括血液中儿茶酚胺水平的持续升高^[6]。以下, 将要展开阐述心衰时 β 肾上腺素受体的变化和下游信号通路

的变化。

1.2.1 激活 β 1肾上腺素受体导致心肌细胞的凋亡与病理性心脏重塑

在心力衰竭等多种病理情况下, 持续性激动 β 1肾上腺素受体和 β 2肾上腺素受体显示出截然不同的结果。在体外 (*in vitro*) 分离的 β 1 β 2肾上腺素受体双敲除的小鼠心肌细胞上过表达 β 1肾上腺素受体, 持续性用异丙肾上腺素 (isoproterenol) 激动 β 1肾上腺素受体能够诱导心肌细胞凋亡^[7]。它并非通过之前提及的经典 PKA 信号通路, 而是通过钙/钙调素依赖蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II, CaMKII) 途径导致的^[8]。该信号 (β 1AR-CaMKII) 还参与儿茶酚胺诱导的乳鼠心肌细胞肥大 (cardiomyocyte hypertrophy) 和异常增生, 这也是扩张型心肌病的成因之一^[9]。在体 (*in vivo*) 水平观察心脏特异性过表达 β 1肾上腺素受体转基因小鼠的心脏, 同样看到持续性激活 β 1肾上腺素受体导致病理性心脏重塑、心肌肥大、扩张型心肌病和心功能失常^[10], 部分转基因小鼠伴有腹腔积液和提前死亡^[11]。所以, 长时间激动 β 1受体可以导致心脏毒性作用。在 CaMKII 的 δ C 亚型转基因小鼠中, 也出现了扩张型心肌病和心力衰竭, 这表明 CaMKII 确实参与到心肌肥大中^[12]。在 β 1肾上腺素受体敲除的小鼠模型中, 异丙肾上腺素诱导的 CaMKII 活性变化显著降低, 而 β 2肾上腺素受体敲除的小鼠则和野生型小鼠的结果一样。这证明 β 1肾上腺素受体是儿茶酚胺介导心肌收缩和 CaMKII 活性增高的必需要素^[13]。

回到经典 PKA 信号通路, 病理条件下持续性激动 β 1肾上腺素受体导致的 PKA 通路激活是否导致类似的心脏毒性作用呢? 在成年大鼠心肌细胞中, 长时间激动 β 1肾上腺素受体可以通过 AC-cAMP 通路增加凋亡^[14]。在心脏中过表达 PKA 催化亚基的转基因小鼠会出现扩张型心肌病, 伴随着收缩下降、心律失常和骤死^[15]。过表达 G α 蛋白的转基因小鼠也出现了心肌病变、扩张型心肌病、心律失常和死亡率的上升^[16]。然而, 腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 的两种亚型却呈现不同的功能。V 型 AC 敲除小鼠应对长期儿茶酚胺刺激能使受体脱敏更有效, 从而保护心肌^[17]。在胸主动脉结扎介导的压力过载和心力衰竭的发展中, V 型 AC 敲除小鼠模型显示心脏保护功能^[18], 说明 V 型 AC 有心脏毒性作用。而激活缺血性心肌病及严重充血性心力衰竭的小鼠中过表达的 VI 型 AC, 可以回复

cAMP 产生的能力^[19], 提高衰竭心脏的功能^[20-21]并改善心肌肥大^[22], 表示 VI 型 AC 有心脏保护作用。这使得病理条件下心肌细胞 PKA 通路的好坏产生分歧。

1.2.2 激活 β 2肾上腺素受体导致心肌保护

与持续性激活 β 1肾上腺素受体导致心肌细胞的凋亡和病理性心脏重塑不同, 持续性激活 β 2肾上腺素受体对心脏有保护作用。从 β 1 β 2肾上腺素受体双敲除的小鼠中分离心肌细胞, 用腺病毒转染 β 2肾上腺素受体, 用异丙肾上腺素激活后可以激活 Gi-磷酸肌醇 3 激酶 (phosphoinositol 3-kinase, PI3K) 通路, 从而提高 Akt 的活性, 达到保护心脏的效果^[8]。人们发现, 持续激活 β 2肾上腺素受体可以减少冠状动脉结扎带来的梗死和左心室扩大, 从而保护心肌, 减缓扩张型心肌病^[23]。大鼠乳鼠心肌细胞中低氧损伤或过氧化氢损伤模型也证明了 β 2肾上腺素受体的心脏保护作用^[24]。小鼠心脏中, 较低水平 (60 倍以下) 过表达 β 2肾上腺素受体可以增强心功能, 降低死亡率^[25]; 而高水平 (100 倍) 过表达 β 2肾上腺素受体, 会导致纤维化心肌病^[25]和心力衰竭^[26]。反之, β 2肾上腺素受体敲除的小鼠被异丙肾上腺素刺激后, 比野生型小鼠出现更高的死亡率和心肌凋亡^[27]。在阿霉素 (doxorubicin) 诱导心脏毒性模型中, β 2肾上腺素受体敲除小鼠全部在 0.5 h 内死亡, 而 β 1肾上腺素受体敲除小鼠、 β 1 β 2肾上腺素受体双敲除小鼠和野生型小鼠都没有心血管方面的严重影响^[28]。这也表明了 β 2受体的心脏保护作用。

1.2.3 心力衰竭时 β 肾上腺素受体系统的病理学变化

在健康人群的心室组织中, β 1和 β 2肾上腺素受体的比率分别为 77% 和 23%, 而在衰竭心脏中比率变为 60:40。造成这种变化的原因是心衰时 β 1肾上腺素受体在蛋白质水平和 mRNA 水平均下调^[29], β 2肾上腺素受体的量几乎未产生变化^[30]。健康心肌中, β 1在激动剂引起的收缩反应中占主要作用, 在衰竭心脏中则相反^[31]。从而, 在衰竭的心脏中, β 2肾上腺素受体更加重要, β 激动剂的激活也因为 β 1的脱敏效应而主要是在 β 2上起作用。

早在 1988 年, 人们就发现衰竭心脏中 Gi 蛋白的上调^[32-33]。心衰时, β 2肾上腺素受体-Gi 蛋白信号通路明显增强。 β 2肾上腺素受体通过偶联 Gi 蛋白, 并激活下游 G $\beta\gamma$ -PI3K-Akt 细胞存活通路, 保护心脏的作用也因此增强^[7,24]。但在另一方面, 上调的 Gi 蛋白及信号不仅会削弱 β 2肾上腺素受体本身的 Gs-cAMP-PKA 信号通路对心肌收缩的刺激效

应,还减弱了 $\beta 1$ 肾上腺素受体的Gs下游信号的作用,通过抑制L型钙离子通道的活性^[34-36]来降低正性肌力作用,最终抑制了收缩反应^[37]。综上所述, $\beta 2$ 肾上腺素受体-Gi信号确实有抗凋亡的心肌保护作用,但却是以妥协了心肌的收缩反应为代价的^[38]。

G蛋白偶联受体激酶2(G protein-coupled receptor kinase 2, GRK2;又名 β -adrenergic receptor kinase 1, β ARK1)是GRK家族的典型成员,也是心脏中最丰富的GRK^[39]。在 $\beta 1$ 肾上腺素受体激活后,GRK2参与受体的脱敏过程,以终止G蛋白信号。首先,激活的受体与G蛋白偶联,通过活化及解离的G $\beta\gamma$,使GRK2募集到细胞膜;然后,GRK2使 $\beta 1$ 肾上腺素受体磷酸化,从而降低受体对Gs蛋白的亲和力而大大增加对 β 抑制蛋白(β -arrestin)的亲和力;最后, β 抑制蛋白取代Gs蛋白,并使受体内存^[40]。在心脏中, $\beta 1$ 肾上腺素受体的脱敏使Gs偶联减少,cAMP产生减少,导致正性肌力作用降低。在衰竭心脏中,GRK2的表达水平显著上升^[41]。GRK2水平增高还发生在心肌缺血、心肌肥大和高血压等大鼠^[42]或小鼠^[43]实验模型中,而这些疾病最终都会导致心力衰竭。在人类晚期心衰心脏中,GRK2的表达水平和活性显著增高^[41]。GRK2的上调具有降低 $\beta 1$ 肾上腺素受体信号转导效率的作用,能部分抑制衰竭心脏中过度激活的 $\beta 1$ 肾上腺素受体的细胞毒性作用。

GRK2全身敲除的纯合基因型小鼠由于严重的心衰和心畸形,胚胎致死率极高^[44];而心脏特异性GRK2敲除小鼠心脏发育良好,说明GRK2全身敲除小鼠的胚胎发育不全应该归因为心外GRK2敲除的影响。心脏特异性GRK2敲除成年小鼠与野生型小鼠的一系列心脏反应实验表明,心脏GRK2通过使 β 肾上腺素受体脱敏对异丙肾上腺素诱导的心肌病有保护作用^[45]。杂合的GRK2敲除小鼠并未发现心脏畸形,心脏收缩能力反而有所增强^[46]。有研究者令胚胎发育中GRK2表达正常的小鼠在出生后敲除GRK2,可以发现这种GRK2缺失的小鼠提高了对于冠状动脉结扎心肌梗死模型中心力衰竭的存活率,增强了心脏收缩,停止了心室重构^[47]。反之,心脏特异性过表达GRK2的转基因小鼠心脏的肾上腺素受体功能紊乱^[48]。以上说明适当的GRK2对心脏有保护作用,而过量GRK2则促成心力衰竭。

但是,过量的GRK2如何导致心力衰竭?近期,在转基因小鼠的体内研究和心肌细胞体外的研究发现,GRK2过度活化会增加 $\beta 2$ 肾上腺素受体的磷

酸化,使受体偏向性偶联Gi,导致收缩反应降低,在心力衰竭的发展中起到重要作用^[49]。这项研究也意味着Gi偏向性 $\beta 2$ 肾上腺素受体信号是GRK病理性上调导致适应不良性心脏重塑、心力衰竭和心功能障碍的首要事件。因此,在衰竭心脏中,增强的 $\beta 2$ 肾上腺素受体-Gi蛋白信号虽然有抗心肌细胞死亡作用,但也同时参与心力衰竭的病理进程,导致心功能下降。

心脏中另外一种重要的GRK亚型是GRK5,在心衰的动物模型和人类患者中它也同样上调^[50]。过表达或转基因GRK5小鼠证实过多的GRK5会导致病理性心肌肥厚,加速了心力衰竭的进程^[51]。无论是全身还是心脏特异性敲除GRK5,都可以显示心脏保护功能,并减少心肌肥大、心力衰竭和重塑的发生^[52]。以上研究显示GRK5在病理性心肌肥大中扮演一个重要角色。

1.2.4 β 阻断剂在心力衰竭治疗中的应用

多年来,大量临床数据表明,积极、稳妥地使用 β 肾上腺素受体阻断剂能够改善心力衰竭患者的症状并降低死亡率^[53-56]。 β 阻断剂阻滞了儿茶酚胺类物质与心脏 $\beta 1$ 肾上腺素受体的结合,使 $\beta 1$ 肾上腺素受体上调^[57],并通过降低GRK2的表达来恢复受体的敏感性^[58],使 β 肾上腺素受体系统趋于正常。非亚型选择性的 β 阻断剂在早期曾经引发了一些严重的不良反应,比如支气管狭窄^[59]和血管痉挛^[60],这是阻断了呼吸系统和血管中的 $\beta 2$ 肾上腺素受体所致。选用选择性 $\beta 1$ 肾上腺素受体阻断剂,能够部分解决以上问题。有关改善心力衰竭患者预后的研究表示, β 阻断剂中,卡维地洛(carvedilol)对心血管病患的存活最为有益^[61]。

2 β 肾上腺素受体的基因多态性与心力衰竭的关联

随着组学的发展,遗传因素在疾病的发生、发展和药物反应个体差异中的作用也在药物基因组学中得到了越来越多的阐述。药物基因组学研究表明,基因多态性与药物作用多样性之间的关系非常密切,这可以帮助人们更好地认识药物与机体之间的作用。蛋白质的结构决定功能,受体或相关蛋白基因的变异会导致结构不同,可能会导致不同的生理病理功能,进而导致机体对疾病的易患性及药物的治疗反应有所不同。 β 肾上腺素受体的基因多态性在不同种族和地区间存在差异,也与多种心脏疾病有关联。心力衰竭中,心脏 β 肾上腺素受体网络中

不同基因的多态性会导致不同的药物作用。以下将列举突变概率较大、对心脏功能或药物治疗反应有影响的几个 β 肾上腺素受体系统相关蛋白的基因多态性。

2.1 β 1 肾上腺素受体的基因多态性与心衰的关系

对非裔美国人和白人美国人的研究发现, 有两个很普遍的非同义单核苷酸多态性 (nonsynonymous SNPs), 使得 β 1 位于胞内接近 C 端 (对于 G 蛋白偶联非常重要的部位) 的 389 位精氨酸 (Arg) 突变为甘氨酸 (Gly)^[62-63] (白种人突变频率为 0.24~0.34, 黑种人突变频率为 0.39~0.46, 黄种人突变频率为 0.2~0.3), 位于胞外 N 端的 49 位丝氨酸 (Ser) 突变为甘氨酸^[64-65] (白种人突变频率为 0.12~0.16, 黑种人突变频率为 0.23~0.28, 黄种人突变频率为 0.14)^[66], 呈现出两种氨基酸多态性。它们导致的受体结构构象差异使其携带者心脏的生理病理情况和治疗效果显示出种种差异^[67]。

在大多数人种中, β 1 肾上腺素受体 389 位氨基酸以精氨酸为多数, 甘氨酸为少数。而非裔美国人中, 两种基因型的人数大体相当。虽然 389 位氨基酸所在区域序列高度保守, 但只在人类中才会出现甘氨酸。

在细胞水平上的实验表明, 与 389 位甘氨酸基因型相比, 389 位精氨酸基因型与激动剂结合的效能更高^[68], Gs 蛋白偶联更强^[69], 基础情况下膜上腺苷酸环化酶的活性略高, 在异丙肾上腺素等一些激动剂刺激的情况下腺苷酸环化酶活性升高 3 倍^[68], cAMP 水平升高约 30 倍^[69]。磷酸化与蛋白质构象相关, 389 位精氨酸基因型对应的 GRK 导致的受体脱敏更强^[70]。

在转基因小鼠模型中, 3 个月大的小鼠心脏过表达 389 位精氨酸基因型 β 1 肾上腺素受体比甘氨酸基因型的心肌收缩更强, 包括基础收缩以及多巴酚丁胺 (dobutamine) 诱导的收缩; 而 6 个月大的小鼠 389 位精氨酸基因型丧失了对多巴酚丁胺的敏感性, 究其机制在于受体与 Gs 蛋白的偶联亲和力变小了; 9 个月大的时候, 发生心力衰竭, 这种与 β 1 肾上腺素受体相同的心脏毒性作用表明该基因型是获得功能型 (gain-of-function)。 β 受体阻断剂普萘洛尔 (propranolol) 可以使 389 位精氨酸基因型降低收缩能力并减慢心率, 在甘氨酸基因型上则没有如此显著的效果^[68]。

体外人类心脏研究和人类的生理学研究也显示 389 位精氨酸 β 1 肾上腺素受体基因型的信号潜能更

强, 提高了心率和收缩能力, 对 β 阻断剂和 β 1 激动剂的反应都更强^[71-75], 同时增加了患高血压的风险^[76]。在心衰患者中进行渐进性锻炼测试, 心脏中 389 位精氨酸基因型的患者显示出高动力性, 有着更强的心功能^[71,75]。389 位精氨酸基因型的心力衰竭患者在使用 β 阻断剂布新洛尔 (bucindolol) 后心力衰竭发作率、死亡率、住院率显著下降, 而 389 位甘氨酸基因型用药患者与使用安慰剂组没有差别^[68,77]。 β 1 肾上腺素受体多态性与心衰病程发展速度或预后的关系尚无定论^[77-78]。

β 1 肾上腺素受体 49 位氨基酸多态性有丝氨酸和甘氨酸两种。细胞水平上, 两种基因型在基础状态和激动剂诱导的腺苷酸环化酶活性上是否不同仍存在着争议, 但公认的结论是, 激动剂诱导的 49 位甘氨酸基因型受体的膜蛋白下降量比 49 位丝氨酸基因型受体要多^[79]。

在冠状动脉疾病患者群中, β 1 肾上腺素受体的第 49 位等位基因型别与心理应激心肌缺血的产生相关^[80]。49 位丝氨酸患者中心理应激心肌缺血的发生率是 49 位甘氨酸患者的 3 倍。

2.2 β 2 肾上腺素受体的基因多态性与心衰的关系

鉴于 β 2 肾上腺素受体的功能, 可以预料获得功能型基因多态性可以保护心脏, 而丧失功能型 (loss-of-function) 基因多态性或许是疾病的风险因素。以下从细胞、动物、人群三个水平介绍 β 2 肾上腺素受体的三种多态性: 164 位苏氨酸 (Thr) 突变为异亮氨酸 (Ile) (白种人突变频率为 0.02, 黑种人突变频率为 0.004, 黄种人突变频率为 0.0); 16 位精氨酸突变为甘氨酸 (白种人突变频率为 0.62, 黑种人突变频率为 0.52, 黄种人突变频率为 0.43); 27 位谷氨酰胺 (Gln) 突变为谷氨酸 (Glu) (白种人突变频率为 0.44, 黑种人突变频率为 0.19, 黄种人突变频率为 0.1)^[81-82]。

164 位氨基酸位于预测的配体结合口袋区域^[81]。细胞实验中, 异亮氨酸突变体对多种激动剂的结合能力降低, 对 G 蛋白的偶联能力也降低^[83]。在转基因小鼠模型中^[84], 心脏表达突变基因的小鼠腺苷酸环化酶活性基础值和激动剂刺激后的活性均降低, 收缩功能下降, 显示出 Gs 的活化下降。在 β 2 特异性激动剂特布他林 (terbutaline) 的刺激下, 短期实验中突变基因携带者表现出迟钝的变时性和变力性反应, 长期实验中变时性和变力性逐渐与非突变者结果相近但脱敏反应下降^[85]。所以, 该突变是一个丧失功能型多态性。 β 2 肾上腺素受体的第

164 位等位基因的不同型别会影响充血性心力衰竭的生存结果^[86]。在心脏患者中, 164 位突变和心力衰竭结果有着很强的负相关, 突变基因携带者生存率显著低于不携带突变基因的患者^[86-87]。

16 位和 27 位氨基酸均位于胞外 N 末端。有研究表明, 细胞实验中突变体的 Gs 偶联能力不受影响。但 16 位突变体可以提高激动剂导致的受体脱敏, 有可能慢性地减弱 β_2 肾上腺素受体的信号; 27 位突变则并非如此, 受体脱敏被降低, β_2 肾上腺素受体信号通路有可能被增强^[88]。人群中, 两种突变必须结合来看, 因为它们之间存在连锁不平衡 (linkage disequilibrium): 27 位突变的, 16 位一定突变; 而 16 位突变的, 27 位未必突变^[89]。有研究发现, 在健康群体中注射肾上腺素, 16 位突变人群舒张压上升, 而其他所有基因型人群舒张压均下降^[90]。有超过 30 个独立的研究机构检测了 16 位突变和高血压的关系, 只有少部分研究者认为 16 位突变与否和高血压相关^[91-92]; 而大部分研究者^[93]以及样本量最大的四个研究组^[94-97], 认为 16 位突变与否和高血压完全无关。相似的, 绝大多数研究者验证 27 位突变与高血压也不相关^[81]。

在心脏功能方面, 相对于 β_1 肾上腺素受体而言, β_2 肾上腺素受体的 16 位和 27 位突变研究甚少。在人群中, 部分研究者发现 16 位和 27 位突变在特布他林激动的心率、收缩功能和超声心动图心室功能上没有任何改变^[98-99], 有的研究者却发现 16 位突变的心输出量增多^[100], 心室收缩能力增强^[101]。尽管 16 位突变的研究众说纷纭, 27 位突变却被一致认为几乎不影响心脏功能。两种突变也被认为与心力衰竭的获得和病程无关^[102]。

β_2 肾上腺素受体的多态性与心力衰竭中 β 阻断剂使用效果的关系还没有获得一致的共识, 亟待更加广泛和深入的循证。

2.3 GRK 基因多态性与心力衰竭

前面提到, GRK 可以通过磷酸化 β 肾上腺素受体使其结合 β -arrestin, 导致 β 肾上腺素受体脱敏, 那么 GRK 的突变会对心力衰竭等症状有什么不同的结果呢? 在人类的七种 GRK 中, 心脏中以 GRK5 和 GRK2 为主^[103]。检测表明人群中 GRK5 有四种非同义多态性, 其中 41 位突变是唯一在所有人种中突变频率大于 2% 的, 故被广为研究。而 GRK2 中并没有找到非同义多态性突变^[104]。

在非裔美国人中, GRK5 的 41 位谷氨酰胺 (Gln) 被亮氨酸 (Leu) 取代这一获得功能型突变体

非常普遍。虽然在是否患心力衰竭的人群中突变频率没有差别, 但总体来讲突变频率比白种人高出 20 倍之多 (白种人突变频率为 0.01, 黑种人突变频率为 0.23)^[66]。这种突变体会产生类似 β 阻断剂的作用, 促进 β 肾上腺素受体脱敏, 从而保护心脏, 使心脏免受过量儿茶酚胺诱导的心肌病。药物基因组学研究者发现, 在非裔美国人的心力衰竭群体中, 该突变与 β 阻断剂的治疗效果有关, 可以降低死亡率或心脏移植率^[104]。41 位谷氨酰胺基因型心衰患者的死亡率比携带 41 位亮氨酸基因型的患者 (包括纯合子和杂合子) 要高, 使用 β 阻断剂能够显著降低死亡率, 使其接近携带 41 位亮氨酸基因型的患者死亡率; 而携带 41 位亮氨酸基因型的患者使用不使用 β 阻断剂并无差别^[68]。这里有关 GRK5 的药物基因组学数据与前述动物模型中 GRK5 的致心肌肥大作用产生分歧, GRK5 的双重作用机理仍需进一步探索。

3 基于 β 肾上腺素受体的心力衰竭创新治疗手段

目前, 心力衰竭绝大部分仍依靠药物治疗。在非药物治疗中, 心脏移植效果较好, 但由于我国心脏移植的供体极其缺乏, 仍需要在药物治疗中寻求突破。过去的 30 年中, 治疗心力衰竭的主要药物是单独或联合使用 β 阻断剂、血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEIs) 以及血管紧张素 II 受体阻断剂。 β 阻断剂和血管紧张素转化酶抑制剂是当前仅有的一线治疗药物, 改善了症状, 降低了死亡率和住院率^[55-56, 61, 105-109]。然而, 当前的心衰治疗临床指导方针建议对所有心功能不全 III 期患者 (患禁忌症者除外) 一律使用 β 阻断剂^[110]。这些治疗方法忽视了患者的不同遗传背景, 同病同治, 对某些患病群体而言效果有限甚至有不良反应。因此, 发展新的临床治疗方法迫在眉睫。

3.1 功能选择性 β_2 肾上腺素受体激动剂在心力衰竭新药开发和创新治疗手段中的应用

在前文中已经提到, β_1 和 β_2 肾上腺素受体激活对于心肌细胞生存和心脏重塑起着相反的作用, β_1 肾上腺素受体激活产生不利的影响, 而 β_2 肾上腺素受体能够发挥保护作用^[111]。这一受体亚型特异的信号通路理论可以应用于新药和新疗法的开发。

在过去十几年的研究中, 越来越多的证据表明, G 蛋白偶联受体并不仅仅拥有单一功能, 一个受体根据下游信号通路的不同往往拥有不同的功能。这也反映出 G 蛋白偶联受体可以被“偏向性”配体有

区别地激活下游的不同信号通路产生不同的效应。这就是功能选择理论。主流观点认为, 配体特异性的 G 蛋白偶联受体构型是配体选择性信号的基础^[112], 并已经通过荧光光谱学^[113-116]、X 射线晶体学^[117-118]、核磁共振^[119]、单分子力光谱学^[120]等技术手段得到了证明。具体到 β_2 肾上腺素受体, 最近的研究已经发现它的 308 位酪氨酸位点就是配体是否单一激活 Gs 通路的关键点^[121]。随着越来越多 G 蛋白偶联受体三维结构的解析, 可以直观地看到配体 - 受体 - 下游蛋白的结合情况, 增进人们对功能选择性等偶联过程的物理性理解^[112], 找到新配体, 或者老药新用。

基于功能选择理论, 本课题组假设选择性激活 β_2 肾上腺素受体 Gs 通路对衰竭的心脏有益。因此, 本课题组在心肌细胞模型中筛选了一系列 β_2 肾上腺素受体激动剂。研究发现, 虽然大多数激动剂都能同时与 Gs 和 Gi 蛋白偶联, 但是非诺特罗 (fenoterol) 却选择性地只激活 Gs 通路^[122]。在一系列实验中, 非诺特罗治疗心力衰竭的有效性已经得到证实^[23,123-124]。在大鼠缺血性心力衰竭模型中, 可以看到 Gs 选择性的 β_2 肾上腺素受体激动剂非诺特罗显著抑制心肌细胞的凋亡并改善了心脏的功能^[124]。在大鼠心肌病模型中, 非诺特罗的治疗效果比临床上经常使用的 β_1 阻断剂美托洛尔 (metoprolol) 效果更好, 能够更有效地减缓左心室扩张、心功能下降和心肌细胞凋亡^[23,125]。在狗的心衰模型中, 非诺特罗激动心肌产生完全收缩反应, 保护了心脏^[126]。联合使用 β_2 肾上腺素受体激动剂和 β_1 肾上腺素受体阻断剂治疗心衰更有效。在扩张型心肌病大鼠模型中证明, 长期 (1 年) 使用非诺特罗和 β_1 肾上腺素受体阻断剂美托洛尔联合用药, 比临床组合 (美托洛尔联合血管紧张素转化酶抑制剂) 在减少心脏重塑和心肌梗死范围上更有效^[124-125], 相较于单独应用任一方药物的生存率而言更是显著提高^[123-124]。本课题组希望沿着这一路线研发出更具选择性、药效更好、副作用更小的新疗法。

非诺特罗是一个手性药物, 它的两个手性中心使其存在 R,R-、R,S-、S,R-、S,S- 四种立体异构体。本课题组合成了它的所有异构体和一些衍生物^[127]。非诺特罗的药物制剂是 R,R- 和 S,S- 对映异构体的消旋混合物, 其中 R,R- 异构体是活性成分^[128], 并只激活 Gs 通路。然而, S,R- 非诺特罗却可以同时激活两种 G 蛋白。这在部分衍生物上也同样适用, 如 S,R- 甲氧基非诺特罗可以激活心肌细胞中 β_2 肾

上腺素受体 -Gi 通路, 而 R,R- 甲氧基非诺特罗不可以^[129]。非诺特罗可以在大鼠缺血性心衰模型中增强心肌细胞的收缩, 并延缓心力衰竭的发生, 因此, 类似 R,R- 非诺特罗衍生物并具有 Gs 选择性的 β_2 肾上腺素受体激动剂可能成为治疗心力衰竭的新药物^[130]。

截至目前, 仍然没有临床证据验证 β_2 肾上腺素受体 -Gs-cAMP 通路的激活是否对人类的心力衰竭有益^[131]。所以, Gs 选择性的 β_2 肾上腺素受体激动剂对人类心力衰竭的临床效果也需要更多的研究。

3.2 基因组学在心衰中的应用

在人类基因组学研究中, 人们越来越多地将“研究基因组”转化到“利用基因组”。在遗传流行病学上, 全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 能够了解不同基因序列变异, 即单核苷酸多态性 (SNP) 与心衰的关系。从信号通路上考虑, 两种亚型的 β 肾上腺素受体、Gs、Gi、GRK 等一系列蛋白的基因多态性都有可能影响心力衰竭的病理过程和药物治疗结果, 形成复杂的、多样的调控网络。随着数据技术的发展和不断更新, 科研工作者一定可以在爆炸性增长的样本量中发现新的易感基因, 从而作为新的药物靶点研发出新药。在新药研发的过程中, 人种的区别和受体及作用蛋白表达水平等因素必须列入考虑范围。

如何利用人类基因组寻找潜在的治疗靶点呢? 首先, 通过 GWAS 及全基因组深度测序等技术在基因组 DNA 中寻找人群中已有的突变概率较高的多态性基因作为候选基因, 查看其在不同人种、健康人群与患者群中的概率。然后, 将所有的非同义替换多态性基因 (包括在启动子或其他非编码区的突变基因、低频率突变基因或者多基因突变体) 在体外转染细胞上进行研究, 从中探讨可能的机制。之后, 使用转基因小鼠等动物模型, 在相关的生理或病理条件下研究感兴趣的器官或细胞以及其生理指标。接下来, 在健康人群中进行生理学研究或体外的人体组织研究。动物或人体组织样本通过基因表达谱等技术, 发现和 SNP 蛋白有关的新通路及潜在药物靶点。上升到已知基因型的患者群体, 研究其短期生理和病理表型, 最后进行药物基因组学临床试验, 或为新药进行临床测试^[68]。另一条路径是以光谱学、晶体学等生物物理技术及计算机模拟为手段, 确定突变多态性基因的蛋白质结构变化, 模拟并验证该突变构象是否和功能 (尤其是功能选择性) 有关, 寻找新配体, 通过结构学进行新靶点

和新药研究。下面以 $\beta 1$ 肾上腺素受体 389 位基因多态为例进行说明。

美托洛尔、卡维地洛等 β 阻断剂或 $\beta 1$ 肾上腺素受体部分激动剂与 389 位精氨酸或甘氨酸两种基因型的受体结合亲和力并没有差异^[70]。但是, Rochais 等^[132] 应用荧光共振能量转移 (FRET) 法测量不同 β 阻断剂对以黄荧光蛋白 (YFP) 标记第三内环与蓝荧光蛋白 (CFP) 标记 C 末端的携带 389 位精氨酸的 $\beta 1$ 肾上腺素受体的实验发现, 比索洛尔 (bisoprolol) 或美托洛尔不改变 FRET, 而卡维地洛则引起 FRET 改变。结果表明卡维地洛是该受体特异性的反向激动剂。因此, 389 位的两种基因型对化合物是否有不同的反应, 是要看具体哪种化合物而区别对待的^[67]。这预示了基因多态性与药物功能选择性的关联。

3.3 大数据时代中的心衰新药研发和个性化医疗

21 世纪是信息爆炸的时代, 在各个领域皆有所渗透, 数据成为一个重要的生产因素。大数据时代的临床信息化应用可以和科研、诊断和治疗紧密结合, 准确挖掘和理解, 来突破临床工作中的挑战。

我国国家心血管病中心承担的“十二五”国家科技支撑课题“心血管病关键技术 - 临床多中心研究信息平台”项目正在建立“国家心血管病注册数据库”, 其中, 心力衰竭数据库是非常重要的组成部分^[133-134]。当前, 心力衰竭的治疗手段较为单一, 并忽视了患者的不同遗传背景。同一种疾病, 同一种治疗手段, 在不同区域或不同人群中的死亡率却会有非常大的差异。可以想象, 在未来, 不同医院内不同患者乃至其不同的基因型及其治疗手段和结果都可以进行比较, 优化出最适宜个人的治疗方法, 变“对症下药”为“对人对症下药”, 医疗质量将会大大提高, 避免误诊和过度治疗。在时程上, 尽早发现, 尽早采取相应措施, 从产前检查开始预警新生儿出生缺陷。而在成年人中, 通过基因测序来预测疾病风险、确定治疗方案, 也成为个性化医疗的关键。基因测序技术的成熟给上述手段带来了可能。药物基因组学可以通过基因测序来预测个体对治疗的反应。还可以开发分子分析手段检测突变型个体, 筛选出哪些患者最可能从治疗中获益, 指导临床合理用药, 进行个性化医疗。

4 未来展望

近年来, 功能选择性理论的发展不仅革新了人们对 GPCR 信号转导的理解, 更为心力衰竭等一系

列疾病的新药研发引入了更多的机会。而不同人群中 β 肾上腺素受体的基因多态性与心脏疾病的关系和机制亟待更为深入的研究, 可以为今后进一步研究不同人群中心脏疾病的发生发展过程提供帮助, 还可为未来以基因为导向的心脏疾病的诊断和个体化治疗方案的选择提供依据。

[参 考 文 献]

- [1] Tang XL, Wang Y, Li DL, et al. Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33: 363-71
- [2] Xiao RP, Lakatta EG. $\beta 1$ -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. *Circ Res*, 1993, 73: 286-300
- [3] Xiao RP, 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 Biol Chem*, 1994, 269: 19151-6
- [4] Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the $\beta 2$ -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol*, 1995, 47: 322-9
- [5] Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, et al. Coupling of $\beta 2$ -adrenoceptor to G_i proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res*, 1999, 84(1): 43-52
- [6] Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*, 1984, 311(13): 819-23
- [7] Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, et al. Dual modulation of cell survival and cell death by $\beta 2$ -adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1607-12
- [8] Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, et al. Linkage of $\beta 1$ -adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II. *J Clin Invest*, 2003, 111: 617-25
- [9] Sucharov CC, Mariner PD, Nunley KR, et al. A $\beta 1$ -adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291: H1299-308
- [10] Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, et al. Myocardial-directed overexpression of the human $\beta 1$ -adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32: 817-30
- [11] Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, et al. Progressive hypertrophy and heart failure in $\beta 1$ -adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 7059-64
- [12] Zhang T, Maier LS, Dalton ND, et al. The δC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*, 2003, 92(8): 912-9

- [13] Yoo B, Lemaire A, Mangmool S, et al. β 1-adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation *in vivo* and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(4): H1377-86
- [14] Communal C, Singh K, Sawyer DB, et al. Opposing effects of β 1- and β 2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation*, 1999, 100: 2210-2
- [15] Antos CL, Frey N, Marx SO, et al. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res*, 2001, 89(11): 997-1004
- [16] Iwase M, Uechi M, Vatner DE, et al. Cardiomyopathy induced by cardiac Gs α overexpression. *Am J Physiol*, 1997, 272: H585-9
- [17] Okumura S, Vatner DE, Kurotani R, et al. Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cyclic a denosine monophosphate signal and increases Akt signal with chronic catecholamine stress. *Circulation*, 2007, 116(16): 1776-83
- [18] Okumura S, Takagi G, Kawabe J, et al. Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(17): 9986-90
- [19] Roth DM, Gao MH, Lai NC, et al. Cardiac-directed adenylyl cyclase expression improves heart function in murine cardiomyopathy. *Circulation*, 1999, 99(24): 3099-102
- [20] Lai NC, Tang T, Gao MH, et al. Activation of cardiac adenylyl cyclase expression increases function of the failing ischemic heart in mice. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(15): 1490-7
- [21] Tang T, Gao MH, Roth DM, et al. Adenylyl cyclase type VI corrects cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake defects in cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(5): H1906-12
- [22] Roth DM, Bayat H, Drumm JD, et al. Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy. *Circulation*, 2002, 105(16): 1989-94
- [23] Ahmet I, Krawczyk M, Heller P, et al. Beneficial effects of chronic pharmacological manipulation of β -adrenoceptor subtype signaling in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 2004, 110: 1083-90
- [24] Chesley A, Lundberg MS, Asai T, et al. The β 2-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res*, 2000, 87(12): 1172-9
- [25] Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, et al. Early and delayed consequences of β 2-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts. *Circulation*, 2000, 101: 1707-14
- [26] Milano CA, Allen LF, Rockman HA, et al. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the β 2-adrenergic receptor. *Science*, 1994, 264(5158): 582-6
- [27] Patterson AJ, Zhu W, Chow A, et al. Protecting the myocardium: a role for the β 2 adrenergic receptor in the heart. *Crit Care Med*, 2004, 32(4):1041-8
- [28] Bernstein D, Fajardo G, Zhao M, et al. Differential cardioprotective/cardiotoxic effects mediated by β adrenergic receptor subtypes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289: H2441-9
- [29] Bristow MR, Minobe WA, Raynolds MV, et al. Reduced β 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest*, 1993, 92: 2737-45
- [30] Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, et al. β 1- and β 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol*, 1989, 35: 295-303
- [31] Bristow MR, Ginsburg R, Fowler M, et al. β 1 and β 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective β 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*, 1986, 59: 297-309
- [32] Feldman AM, Cates AE, Veazey WB, et al. Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest*, 1988, 82: 189-97
- [33] Bohm M, Eschenhagen T, Gierschik P, et al. Radioimmunochemical quantification of Gi α in right and left ventricles from patients with ischaemic and dilated cardiomyopathy and predominant left ventricular failure. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, 26: 133-49
- [34] Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, et al. Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation*, 2005, 111: 988-95
- [35] Sato M, Gong H, Terracciano CM, et al. Loss of β -adrenoceptor response in myocytes overexpressing the Na⁺/Ca²⁺-exchanger. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36: 43-8
- [36] He JQ, Balijepalli RC, Haworth RA, et al. Crosstalk of beta-adrenergic receptor subtypes through Gi blunts β adrenergic stimulation of L-type Ca²⁺ channels in canine heart failure. *Circ Res*, 2005, 97(6): 566-73
- [37] Xiao RP, Balke CW. Na⁺/Ca²⁺ exchange linking β 2-adrenergic Gi signaling to heart failure: associated defect of adrenergic contractile support. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36: 7-11
- [38] Zhu W, Zeng X, Zheng M, et al. The enigma of β 2-adrenergic receptor Gi signaling in the heart: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 2005, 97: 507-9
- [39] Hata JA, Koch WJ. Phosphorylation of G protein-coupled receptors: GPCR kinases in heart disease. *Mol Interv*, 2003, 3: 264-72
- [40] Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*, 1998, 273: 18677-80
- [41] Ungerer M, Bohm M, Elce JS, et al. Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*, 1993, 87: 454-63
- [42] Anderson KM, Eckhart AD, Willette RN, et al. The myocardial β -adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure rats. *Hypertension*, 1999, 33: 402-7
- [43] Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, et al. Mechanism of β -adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy

- is increased β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem*, 1997, 272: 17223-9
- [44] Jaber M, Koch WJ, Rockman H, et al. Essential role of β -adrenergic receptor kinase1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 12974-9
- [45] Matkovich SJ, Diwan A, Klanke JL, et al. Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and β -adrenergic signaling. *Circ Res*, 2006, 99: 996-1003
- [46] Rockman HA, Choi DJ, Akhter SA, et al. Control of myocardial contractile function by the level of β adrenergic receptor kinase1 in gene-targeted mice. *J Biol Chem*, 1998, 273: 18180-4
- [47] Raake PW, Vinge LE, Gao E, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res*, 2008, 103(4): 413-22
- [48] Koch WJ, Rockman HA, Samama P, et al. Cardiac function in mice overexpressing the β adrenergic receptor kinase or a β ARK inhibitor. *Science*, 1995, 268: 1350-3
- [49] Zhu W, Petrashevskaya N, Ren S, et al. Gi-biased β 2AR signaling links GRK2 upregulation to heart failure. *Circ Res*, 2012, 110: 265-74
- [50] Dzimir N, Muiya P, Andres E, et al. Differential functional expression of human myocardial G protein receptor kinases in left ventricular cardiac diseases. *Eur J Pharmacol*, 2004, 489: 167-77
- [51] Martini JS, Raake P, Vinge LE, et al. Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12457-62
- [52] Gold JI, Gao E, Shang X, et al. Determining the absolute requirement of G protein-coupled receptor kinase 5 for pathological cardiac hypertrophy: short communication. *Circ Res*, 2012, 111(8): 1048-53
- [53] Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, et al. β 1- and β 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective β 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*, 1986, 59: 297-309
- [54] Sabbah HN. The cellular and physiologic effects of beta blockers in heart failure. *Clin Cardiol*, 1999, Suppl 5: V16-20
- [55] Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, et al. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet*, 1993, 342: 1441-6
- [56] McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet*, 2005, 365: 1877-89
- [57] Sigmund M, Jakob H, Becker H, et al. Effects of metoprolol on myocardial β -adrenoceptors and Gi-proteins in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996, 51: 127-32
- [58] Iaccarino G, Tomhave ED, Lefkowitz RJ, et al. Reciprocal *in vivo* regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by β -adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation*, 1998, 98: 1783-9
- [59] Terpstra GK, Raaijmakers JA, Wassink GA. Propranolol-induced bronchoconstriction: a non-specific side-effect of β -adrenergic blocking therapy. *Eur J Pharmacol*, 1981, 73: 107-8
- [60] Eliasson K, Lins LE, Sundqvist K. Vasospastic phenomena in patients treated with β -adrenoceptor blocking agents. *Acta Med Scand Suppl*, 1979, 628: 39-46
- [61] Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, et al. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet*, 2003, 362: 7-13
- [62] Tesson F, Charron P, Peuchmaur M, et al. Characterization of a unique genetic variant in the β 1-adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. CARDIGENE Group. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31: 1025-32
- [63] Mason DA, Moore JD, Green SA, et al. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human β 1-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 1999, 274, 12670-4
- [64] Maqbool A, Hall AS, Ball SG, et al. Common polymorphisms of β 1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *Lancet*, 1999, 353: 897
- [65] Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarsen A, et al. A novel polymorphism in the gene coding for the β 1-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J*, 2000, 21: 1853-8
- [66] Femminella GD, Barrese V, Ferrara N, et al. Tailoring therapy for heart failure: the pharmacogenomics of adrenergic receptor signaling. *Pharmacogenomics Pers Med*, 2014, 7: 267-73
- [67] Ahles A, Engelhardt S. Polymorphisms determine β adrenoceptor conformation: implications for cardiovascular disease and therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30(4): 188-93
- [68] Dorn GW 2nd, Liggett SB. Mechanisms of pharmacogenomic effects of genetic variation within the cardiac adrenergic network in heart failure. *Mol Pharmacol*, 2009, 76(3): 466-80
- [69] Joseph SS, Lynham JA, Grace AA, et al. Markedly reduced effects of (-)-isoprenaline but not of (-)-CGP12177 and unchanged affinity of β -blockers at Gly389- β 1-adrenoceptors compared to Arg389- β 1-adrenoceptors. *Br J Pharmacol*, 2004, 142: 51-6
- [70] Rathz DA, Gregory KN, Fang Y, et al. Hierarchy of polymorphic variation and desensitization permutations relative to β 1- and β 2-adrenergic receptor signaling. *J Biol Chem*, 2003, 278: 10784-9
- [71] Wagoner LE, Craft LL, Zengel P, et al. Polymorphisms of the β 1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *Am Heart J*, 2002, 144: 840-6
- [72] Mialet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, et al. β 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med*, 2003, 9: 1300-5

- [73] Bruck H, Leineweber K, Temme T, et al. The Arg389Gly β 1-adrenoceptor polymorphism and catecholamine effects on plasma-renin activity. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46: 2111-5
- [74] Terra SG, Pauly DF, Lee CR, et al. β -Adrenergic receptor polymorphisms and responses during titration of metoprolol controlled release/extended release in heart failure. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 77: 127-37
- [75] Sandilands AJ, Parameshwar J, Large S, et al. Confirmation of a role for the 389R>G β 1 adrenoceptor polymorphism on exercise capacity in heart failure. *Heart*, 2005, 91: 1613-4
- [76] Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, et al. Polymorphism in the β 1-adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation*, 2001, 104: 187-90
- [77] Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, et al. A polymorphism within a conserved β 1-adrenergic receptor motif alters cardiac function and β -blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(30): 11288-93
- [78] Cresci S, Kelly RJ, Cappola TP, et al. Clinical and genetic modifiers of long-term survival in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(5): 432-44
- [79] Rathz DA, Brown KM, Kramer LA, et al. Amino acid 49 polymorphisms of the human β 1-adrenergic receptor affect agonist-promoted trafficking. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39: 155-60
- [80] Hassan M, York KM, Li H, et al. Association of β 1-adrenergic receptor genetic polymorphism with mental stress-induced myocardial ischemia in patients with coronary artery disease. *Arch Intern Med*, 2008, 168: 763-70
- [81] Dorn GW 2nd. Adrenergic signaling polymorphisms and their impact on cardiovascular disease. *Physiol Rev*, 2010, 90(3): 1013-62
- [82] Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, et al. Complex promoter and coding region β 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict *in vivo* responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(19): 10483-8
- [83] Green SA, Cole G, Jacinto M, et al. A polymorphism of the human β 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem*, 1993, 268: 23116-21
- [84] Turki J, Lorenz JN, Green SA, et al. Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human β 2-adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10483-8
- [85] Brodde OE, Buscher R, Tellkamp R, et al. Blunted cardiac responses to receptor activation in subjects with Thr164Ile β 2-adrenoceptors. *Circulation*, 2001, 103: 1048-50
- [86] Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, et al. The Ile164 β 2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest*, 1998, 102: 1534-9
- [87] Barbato E, Penicka M, Delrue L, et al. Thr164Ile polymorphism of β 2-adrenergic receptor negatively modulates cardiac contractility: implications for prognosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart*, 2007, 93: 856-61
- [88] Green SA, Turki J, Innis M, et al. Amino-terminal polymorphisms of the human β 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry*, 1994, 33: 9414-9
- [89] McGraw DW, Forbes SL, Kramer LA, et al. Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human β 2-adrenergic receptor regulate receptor expression. *J Clin Invest*, 1998, 102: 1927-32
- [90] Snapir A, Koskenvuo J, Toikka J, et al. Effects of common polymorphisms in the α 1A-, α 2B-, β 1- and β 2-adrenoceptors on haemodynamic responses to adrenaline. *Clin Sci*, 2003, 104: 509-20
- [91] Snieder H, Dong Y, Barbeau P, et al. β 2-adrenergic receptor gene and resting hemodynamics in European and African American youth. *Am J Hypertens*, 2002, 15: 973-9
- [92] Wu H, Tang W, Li H, et al. Association of the β 2-adrenergic receptor gene with essential hypertension in the non-Han Chinese Yi minority human population. *J Hypertens*, 2006, 24: 1041-7
- [93] Hahntow IN, Koopmans RP, Michel MC. The β 2-adrenoceptor gene and hypertension: is it the promoter or the coding region or neither? *J Hypertens*, 2006, 24: 1003-7
- [94] Heckbert SR, Hindorff LA, Edwards KL, et al. β 2-adrenergic receptor polymorphisms and risk of incident cardiovascular events in the elderly. *Circulation*, 2003, 107: 2021-4
- [95] Herrmann SM, Nicaud V, Tiret L, et al. Polymorphisms of the β 2-adrenoceptor (ADRB2) gene and essential hypertension: the ECTIM and PEGASE studies. *J Hypertens*, 2002, 20: 229-35
- [96] Kato N, Sugiyama T, Morita H, et al. Association analysis of β 2-adrenergic receptor polymorphisms with hypertension in Japanese. *Hypertension*, 2001, 37: 286-92
- [97] Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Jensen GB, et al. 164Ile allele in the β 2-adrenergic receptor gene is associated with risk of elevated blood pressure in women. The Copenhagen City Heart Study. *Pharmacogenet Genomics*, 2005, 15: 633-45
- [98] Bruck H, Leineweber K, Buscher R, et al. The Gln27Glu β 2-adrenoceptor polymorphism slows the onset of desensitization of cardiac functional responses *in vivo*. *Pharmacogenetics*, 2003, 13: 59-66
- [99] Hoit BD, Suresh DP, Craft L, et al. β 2-adrenergic receptor polymorphisms at amino acid 16 differentially influence agonist-stimulated blood pressure and peripheral blood flow in normal individuals. *Am Heart J*, 2000, 139: 537-42
- [100] Eisenach JH, Barnes SA, Pike TL, et al. Arg16/Gly β 2-adrenergic receptor polymorphism alters the cardiac output response to isometric exercise. *J Appl Physiol*, 2005, 99: 1776-81
- [101] Tang W, Devereux RB, Kitzman DW, et al. The Arg16Gly polymorphism of the β 2-adrenergic receptor and left ventricular systolic function. *Am J Hypertens*, 2003, 16:

- 945-51
- [102] Covolo L, Gelatti U, Metra M, et al. Role of β 1- and β 2-adrenoceptor polymorphisms in heart failure: a case-control study. *Eur Heart J*, 2004, 25: 1534-41
- [103] Premont RT, Koch WJ, Inglese J, et al. Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem*, 1994, 269: 6832-41
- [104] Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, et al. A GRK5 polymorphism that inhibits β -adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nat Med*, 2008, 14(5): 510-7
- [105] Beckwith C, Munger MA. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on ventricular remodeling and survival following myocardial infarction. *Ann Pharmacother*, 1993, 27: 755-66
- [106] Lee VC, Rhew DC, Dylan M, et al. Meta-analysis: angiotensin-receptor blockers in chronic heart failure and high-risk acute myocardial infarction. *Ann Intern Med*, 2004, 141: 693-704
- [107] CIBIS-II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomized trial. *Lancet*, 1999, 353: 9-13
- [108] MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in-Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*, 1999, 353: 2001-7
- [109] Packer M, Coats AJS, Fowler MB, et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, 2001, 344: 1651-8
- [110] Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation*, 2009, 119(14): e391-479
- [111] Xiao RP. β -adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the β 2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE*, 2001, 2001(104): re15
- [112] Woo AY, Song Y, Zhu W, et al. Advances in receptor conformation research: the quest for functionally selective conformations focusing on the β 2-adrenoceptor. *Br J Pharmacol*, 2014 [Epub ahead of print]
- [113] Gether U, Lin S, Ghanouni P, et al. Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the β 2 adrenoceptor. *EMBO J*, 1997, 16: 6737-47
- [114] Ghanouni P, Steenhuis JJ, Farrens DL, et al. Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the β 2 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 5997-6002
- [115] Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, et al. Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the β 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 2001, 276: 24433-6
- [116] Seifert R, Wenzel-Seifert K, Gether U, et al. Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297: 1218-26
- [117] Wang C, Jiang Y, Ma J, et al. Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science*, 2013, 340: 610-4
- [118] Wacker D, Wang C, Katritch V, et al. Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, 2013, 340: 615-9
- [119] Bokoch MP, Zou Y, Rasmussen SG, et al. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2012, 463: 108-12
- [120] Zocher M, Fung JJ, Kobilka BK, et al. Ligand specific interactions modulate kinetic, energetic, and mechanical properties of the human β 2 adrenergic receptor. *Structure*, 2012, 20: 1391-402
- [121] Woo AY, Jozwiak K, Toll L, et al. Tyrosine 308 is necessary for ligand-directed Gs protein-biased signaling of β 2-adrenoceptor. *J Biol Chem*, 2014, 289(28):19351-63
- [122] Xiao RP, Zhang SJ, Chakir K, et al. Enhanced Gi signaling selectively negates β 2-AR- but not β 1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation*, 2003, 108: 1633-9
- [123] Ahmet I, Lakatta EG, Talan M. Pharmacological stimulation of β 2-adrenergic receptors (β 2AR) enhances therapeutic effectiveness of β 1AR blockade in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*, 2005, 10: 289-96
- [124] Ahmet I, Krawczyk M, Zhu W, et al. Cardioprotective and survival benefits of long-term combined therapy with β 2AR agonist and β 1AR blocker in dilated cardiomyopathy post-myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 325: 491-9
- [125] Ahmet I, Morrell C, Lakatta EG, et al. Therapeutic efficacy of a combination of a β 1-adrenoreceptor (AR) blocker and β 2-AR agonist in a rat model of postmyocardial infarction dilated heart failure exceeds that of a β 1-AR blocker plus angiotensin-converting enzyme inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 331: 178-85
- [126] Chakir K, Depry C, Dimaano VL, et al. Galphas-biased β 2-adrenergic receptor signaling from restoring synchronous contraction in the failing heart. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 100ra88
- [127] Jozwiak K, Khalid C, Tanga MJ, et al. Comparative molecular field analysis of the binding of the stereoisomers of fenoterol and fenoterol derivatives to the β 2 adrenergic receptor. *J Med Chem*, 2007, 50: 2903-15
- [128] Beigi F, Bertucci C, Zhu W, et al. Enantioselective separation and online affinity chromatographic characterization of R,R- and S,S-fenoterol. *Chirality*, 2006, 18: 822-7
- [129] Woo AY, Wang TB, Zeng X, et al. Stereochemistry of an agonist determines coupling preference of β 2-adrenoceptor to different G proteins in cardiomyocytes. *Mol Pharmacol*, 2009, 75: 158-65
- [130] Woo AY, Xiao RP. β -Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol*

- Sin, 2012, 33(3): 335-41
- [131] Woo AY, Song Y, Xiao R, et al. Biased β 2-adrenoceptor signalling in heart failure: pathophysiology and drug discovery. *Br J Pharmacol*, 2014 [Epub ahead of print]
- [132] Rochais F, Vilardaga JP, Nikolaev VO, et al. Real-time optical recording of β 1-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 229-35
- [133] 李卫, 杨进刚, 谷鸿秋, 等. 依托“十二·五”项目研发我国的心血管疾病数据标准. *中国循环杂志*, 2012, 27(6): 482
- [134] 刘志学, 胡洋. 预防、转化与合作: 让国人的心脏更健康——访中国医学科学院阜外心血管病医院院长胡盛寿教授[N/OL]. *中国医药导报*, 2012, 9(24): 2-4