

Scatchard 式和量-效式的比较及应用

杨 纯 (河北省医学科学院药物研究室, 石家庄 050021)

提要 比较了6种处理放射配基受体结合实验数据的直线化公式, 数据处理的关键在于选择受体模型和公式。饱和法数据常用 Scatchard 式和 Hill 式; 取代实验数据可用 Hill 式, Cheng-Prusoff 式, Rugg 式或 Roskoski 式。量-效式易把双受体模型误判为单受体模型, 且不利于作图示意, 用于处理取代法数据亦缺乏严密的理论基础。

关键词 放射配基测定; 结合位点; Scatchard 式; 药物剂量-效应关系

放射配基受体结合实验广泛用于受体研究工作。对可靠的实验数据进行恰当的分析处理才能正确理解受体-配基间的相互作用。利用非线性最小二乘法电子计算机拟合程序, 直接对未经转换的数据按质量作用定律进行处理, 可以提高参数估计的准确性^(1,2)。但是该法尚未普及而且作图示意性较差, 所以利用直线化公式图解仍不失为常用的简单方法。本文就各公式的应用进行讨论。

放射配基受体结合实验有两种常用方法。一为饱和法, 反应体系只涉及一种配基。另一种为取代法或竞争法, 涉及非标记配基与标记配基同受体竞争结合。两种方法对实验条件的

要求, 数据处理方式都有明显的不同。

放射配基受体饱和和实验数据分析 配基 F^* 和受体的相互作用可表达为:

$$B^* = \frac{B_{max}F^*}{F^* + K_d} \quad [1]$$

B_{max} : 受体密度; B^* : 与受体结合的配基浓度; F^* : 游离配基浓度; K_d : 平衡离解常数; *为放射性标志。按公式[1]用 B^* 对 F^* 作图得到双曲线的一部分, 故难于准确地从图中决定 B_{max} 和 K_d 的值。为了从有限的数据中更准确地估计参数, 已经从公式[1]中推导出十余种直线化公式⁽³⁻⁵⁾, 其中重要者列于 Tab 1。值得指出的是各公式的 F 是近似值, 带有一定的误差。因为通常并不测量游离配基浓度, 而是以加入的配基总量 T 代替 F 。 T 实际上等于 F , B 及非特异结合三者总和。当非特异结合很小而且受体密度小于 K_d 的十分之一, 则只有不足 10% 的配基处于结合状态, 即可认为 T 近似等于 F 。但是当 K_d 很小, 加之标记配基放射比度较低时, 上述条件难于满足, 就不宜用 Tab 1 中的公式处理⁽⁶⁾。否则, 计算出的参数误差过大。

Tab 1. Methods for analysis of a rectangular hyperbola

Designation	Equation	Axes
Scatchard	$B/F = B_{max}/K_d - B/K_d$	B/F vs B
Hill	$\log\left(\frac{B}{B_{max} - B}\right) = n_H \log F - \log K_d$	$\log\left(\frac{B}{B_{max} - B}\right)$ vs $\log F$
Lineweaver-Burke	$1/B = 1/B_{max} + (K_d/B_{max})(1/F)$	$1/B$ vs $1/F$
Hanes(D-R)	$F/B = K_d/B_{max} + F/B_{max}$	F/B vs F

B : bound ligand. F : free ligand. B_{max} : receptor concentration.
 K_d : dissociation constant of the ligand.

实验数据的处理首先需确定受体模型,例如单一受体,多受体,或受体间存在合作性。只有单一受体模型才能应用 Tab 1 中的公式计算 B_{\max} 和 K_d 。利用 Scatchard 式(S 式)的相关系数 r 值可以作判断。 r 值接近于 1 提示为单受体模型,作图得到一直线。 r 值明显小于 1 且作图为凹线时,提示双受体模型或存在负合作性。作图为凸线时提示存在正合作性。用 S 式求出 B_{\max} 后,再利用 Hill 式求 Hill 系数 n_H 。 n_H 小于等于 1 时,和 S 式的 r 值具同样判断意义,但是两者的数值并不一定相同。理论上 r 值不可能大于 1,而 n_H 可大于 1,这时提示正合作性。在某些条件下(涉及组织中两种亚型受体密度的比值,实验设计等因素), n_H 是更灵敏的指标。值得指出,图解法所得非直线性图形也可能系实验设计和方法不当所造成的,推论时宜慎重。用 S 式作图得到明显凹线的数据用双倒数式和量效式作图往往近于直线,易把双受体模型误判为单受体模型⁽⁵⁾。有学者认为双倒数式是最差的一个公式,量-效式(Hanes)稍强一些,但亦不如 S 式及 Hofstee 式⁽⁴⁾。

饱和实验要求 F^* 浓度介于 $0.1-10K_d$ 之间,且均匀地分布于 K_d 的两侧。用量-效式作图时, F^* 小于 K_d 的点被压缩在坐标图的左下方,分布不均匀。在直线回归时,低浓度点的作用被削弱,而高浓度点被强调。由于高浓度点的 B^* 值实验误差较大,易增大参数计算的误差。同样的数据用 S 式作图,点的分布较均匀,参数计算亦较准确⁽⁷⁾。如以相关系数 r 值的大小作为判别公式的优劣标准⁽³⁾是不恰当的。 r 值仅说明变量之间线性相关的密切程度。Tab 1 中各公式则是利用直线方程中的斜率和截距计算有关参数。 r 值的大小并不决定斜率和截距的准确程度。

至于“常用的 S 式有不足之处,有时造成无法进一步用 Hill 式求 n_H 的局面”⁽³⁾,可能系把双受体模型误认为单受体模型,或高浓度数据点实验误差较大之故。对于大于 B_{\max} 的个别 B^* 值,应用 Hill 式时可以舍弃;改用-效

式求出一个更大的 B_{\max} ,也必然得到一个更大的 K_d 值,其结果可能离真值更远。

如何用 S 式图解法分析多受体模型已有详尽的论述⁽⁸⁾。至今为止, S 式是分析饱和法数据中应用最广泛的图解公式。即使利用电子计算机拟合程序直接利用 F 和 B 来分析受体亚型的文章中也常辅以 S 式图解,取其示意性强。

Tab 2. [³H]Spiperone displacement by sulphiride⁽⁹⁾

[³ H]Spiperone (nmol/L)	Sulpiride	
	IC ₅₀	K _i
0.04	95	44
0.13	302	64
0.24	417	53
0.67	1995	99

K_i was calculated by: $K_i = IC_{50} / (1 + F^* / K_d)$.
 $F^* = [^3H]Spiperone$ concentration.

取代实验数据的分析处理 应该注意两点: 1. 反应体系中受体密度应足够小,理由同前。2. 标记配基用量应尽量小,因为计算出的 IC_{50} 和 K_i 值随标记配基的用量增加而增大⁽⁹⁾(Tab 2)。

取代实验的数据处理不能直接套用 Tab 1 的公式。其中游离非标记化合物的浓度 D 是自变量,结合的标记物 B^* 是因变量。 D 等于零时, B^* 值最大,称作 B_0^* , D 取代 B^* 的程度用抑制率 E 表示如下⁽⁵⁾:

$$E = \frac{B_0^* - B^*}{B_0^*} \times 100\% = \frac{D}{K_i(1 + F^*/K_d) + D} \quad [2]$$

计算时 D 一般用加入的非标记配基的总浓度 T 代替, F^* 用加入的标记配基的总浓度 T^* 代替,故可视为常数。 K_i : 抑制常数。 K_d : 一般根据饱和实验数据用 S 式求出。当 $E = 50\%$ 时, D 的浓度为 IC_{50} , 公式[2]则化为 Cheng-Prusoff 公式⁽¹⁰⁾:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + F^*/K_d} \quad [3]$$

取代实验的数据处理首先亦需决定受体模型,可用 Hill 公式判断。 n_H 接近 1 时为单

受体模型；明显小于1时提示双受体模型或负合作性。对于单受体模型则可按机率单位法或概率单位法计算 IC_{50} ，然后以公式[3]求 K_i 。用 Hill 式既可求 n_H 又可求 IC_{50} 一举两得。

Rugg 公式又称改良 Scatchard 式或 Hofstee 式，亦可用于处理取代实验数据⁽¹¹⁾。公式为：

$$E = 100\% - IC_{50} \cdot E/D$$

该公式用于受体亚型研究时需注意：1. 标记物对亚型受体的亲和力相同，即为非选择性配基。其饱和法数据经 S 式作图应为直线。2. 每次实验应包括均匀分布的 15 个左右数据点，同样的实验应重复数次，以提高数据的准确性。3. 对实验方法的可靠性应进行充分验证，只含一种受体的组织，Rugg 式作图应得一直线，其斜率为 $-IC_{50}$ 。经 Hill 式计算 n_H 应接近 1。含有两种亚型受体的组织，当用非选择性配基竞争时，作图应为直线；用选择性配基时作图为凹线，可分段计算高、低亲合力受体的 IC_{50} ，然后以 Cheng-Prusoff 式求出各自的 K_i 。如果实验结果与本条不符，则应进行详细的实验探究原因。

Roskoski 最近也提出一个处理取代实验数据的直线公式⁽¹²⁾：

$$B^*(1 + K_d/F^*) = B_{max} - (1/K_i)(B^*K_dD/F^*)$$

应用该公式需先用饱和法实验求出标记配基的 K_d 值。标记配基为非选择性的，即对各亚型受体的亲合力相同。 $B^*(1 + K_d/F^*)$ 对 B^*K_dD/F^* 作图得到直线时，说明为单受体模型。该直线的斜率为 $-1/K_i$ ，Y 轴截距为 B_{max} 。若作图为一凹线时提示双受体模型，可分段用该公式。用 Rugg 公式或 Roskoski 公式处理双受体模型的作图示意性强。用目测法把凹线分为二段以求高低亲合力的 K_i 值，误差较大。可用有关的电子计算机程序以提高参数估计的准确性⁽¹⁾。

如果标记物和取代物为同一种化合物，如用 QNB 取代 [3H]QNB，它们的离解常数相同，数据转换后亦可用 S 式处理⁽¹³⁾：

$$B'/F' = B_{max}/K_d - B'/K_d$$

B' 为结合的标记配基与结合的非标记配基之和； F' 为游离的标记配基与游离的非标记配基之和。 B'/F' 对 B' 作图为一一直线，说明为单受体模型。 B'/F' 和 B' 计算如下：

$$B' = B^*(1 + D/F^*) \quad B'/F' = B^*/F^*$$

本法常见于放射免疫测定的数据处理。在受体研究中仍以用饱和实验数据，按 S 式计算 B_{max} 和 K_d 较为正确可靠。

量-效式处理取代实验的公式为⁽³⁾：

$$D/E = D/E_{max} + K_d/E_{max}$$

式中 E_{max} 为最大抑制率。用上式处理取代实验缺乏充实的理论基础：1. 式中的 K_d 是标记配基-受体复合物的离解常数，还是非标记物的抑制常数？在计算 E 时已经把 E_{max} 定为 100%，式中的 E_{max} 又何以存在？Tab 1 中的量效式可用于处理饱和法数据，因为它和表达自变量 F 与因变量 B 间的相互关系的公式 [1] 是同源的。但不能简单地把其中的 F 换为 D，B 换为 E 就用来处理取代法数据。因为表达 E 的函数关系的是公式 [2]，而不再是 [1] 了。量-效式中没有公式 [2] 中的 K_i 和 F^* 这两个常数，却多了一个 E_{max} 显然和公式 [2] 在数学上不同源。但从公式 [2] 中还是可以推导出 Rugg 公式或 Roskoski 公式的。2. 即使认为式中的 K_d 是 IC_{50} ，用量效式来计算 IC_{50} 也未必准确和简便。且 D/E 与 D 的相关系数为 1 也不等于 E 和 D 的相关系数为 1。根据文献 (3) 提供的 QNB 竞争 [3H]QNB 的数据 (Tab 3)，分别用常规法和量-效式计算 IC_{50} 。结果表明量-效式的 IC_{50} 远较其它方法求出的值为小 (Tab 4)。

Tab 3. [3H]QNB displacement by QNB⁽³⁾

QNB (nmol/L)	B* (cpm)	E (% inhibition)
0.01	2954	3 (4)
0.10	2823	7 (8)
1.00	2159	29 (33)
10.0	857	72 (82)
100	539	82 (93)

Starting radio activity: 3048 cpm (100 %).
Original data of % inhibition were miscalculated
(in the parentheses)

Tab 4. IC_{50} calculated using data in Tab 3.

	D-R	Hill	Logit	Probit
r	0.9999	0.9889	0.9878	0.9849
IC_{50}	1.17	4.49	4.63	4.26
n_H	-	0.585	-	-

量-效式的 IC_{50} 并不可靠, 理由有 3 点:

1. 当取代物和标记物相同时, $K_d = K_i$, 由公式[3]可推导出 $IC_{50} = F^* + K_d$. 即 IC_{50} 应大于 F^* , [3H]QNB 的用量为 2 nmol/L, 所以 IC_{50} 至少在 2 nmol/L 以上, 而量-效式的 IC_{50} 仅 1.17 nmol/L. 2. 文献中许多类似实验的结果证实 IC_{50} 大于标记物的用量^(9,14). 3. Tab 4 中 $n_H \approx 0.5$ 提示为双受体模型, 不宜当作单受体模型处理. 同样的数据用 Rugg 式计算的 r 值为 0.7038 明显小于 1, 提示双受体模型和 n_H 的判断相符合. 而量-效式的相关系数几乎等于 1, 判断为单受体模型. 取代实验 D 的浓度范围常常跨越 10^4 - 10^6 之多, 无法利用量-效式作图示意. 同样数据却可用 S 式, Rugg 式或 Roskoski 式作图而不受限制. 这也是量-效式极少用于取代实验数据处理的原因之一.

致谢 金荫昌教授给予指正.

参 考 文 献

- 1 Minneman KP, Molinoff PB. Classification and quantitation of β -adrenergic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 1980; 29 : 1317
- 2 Lefkowitz RJ, Michel T. Plasma membrane receptors. *J Clin Invest* 1983; 72 : 1185
- 3 金正均、俞蕊瑶. Scatchard 式与量效比式的比较. *中国药理学报* 1983; 4 : 73
- 4 Zivin JA, Waud DR. How to analyze

- binding, enzyme and uptake data: the simplest case, a single phase. *Life Sci* 1982; 30 : 1407
- 5 陆惠黎、李文杰. 分子酶学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1983 : 200
 - 6 Chang KJ, Jacobs S, Cuatrecasas P. Quantitative aspects of hormone-receptor interactions of high affinity. Effect of receptor concentration and measurement of dissociation constants of labeled and unlabeled hormones. *Biochim Biophys Acta* 1975; 406 : 294
 - 7 Bennett JP Jr. Methods in binding studies. In: Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ, eds. *Neurotransmitter receptor binding*. 1st ed. NY: Raven Press, 1978 : 57-90
 - 8 Rosenthal HE. A graphic method for the determination and representation of binding parameters in a complex system. *Anal Biochem* 1967; 20 : 525
 - 9 Lazareno S, Nahorski SR. Selective labelling of dopamine (D_2) receptors in rat striatum by [3H]domperidone but not by [3H]spiperone. *Eur J Pharmacol* 1982; 81 : 273
 - 10 Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22 : 3099
 - 11 Rugg EL, Barnett DB, Nahorski SR. Coexistence of β_1 and β_2 adrenoceptors in mammalian lung: evidence from direct binding studies. *Mol Pharmacol* 1978; 14 : 996
 - 12 Roskoski R Jr, Reinhardt RR, Enseleit W, Johnson WD, Cook PF. Cardiac cholinergic muscarinic receptors: changes in multiple affinity forms with down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232 : 754
 - 13 Boeynaems JM, Dumont JE. Outlines of receptor theory. 1st ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1980 : 197
 - 14 Chatterjee TK, Bhatnagar RK, Cannon JG, Long JP. Interaction of dihydroxy-2-aminotetralin derivatives at sites labelled with [3H]clonidine, [3H]prazosin and [3H]spiperone in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol* 1984; 98 : 293

Comparison between Scatchard and dose-response ratio equations and their application

YANG Chun

(Dept of Pharmacology, Hebei Academy of Medical Sciences, Shijiazhuang 050021)

ABSTRACT Six linear equations were compared for analysis of radioligand receptor binding data. It is important to choose appropriate receptor model and equations. Scatchard and Hill equations have been widely used for saturation studies, while Hill, Cheng-Prusoff, Rugg and Roskoski equations applied to ligand displacement

experiments. The dose-response ratio equation is worse from graphical point of view and subject to some theoretical limitations in use for analysis of displacement data.

KEY WORDS radioligand assay; binding sites; Scatchard equation; drug dose-response relationship