

用化学修饰法探讨苯二氮䓬受体的结合区域^{1,2}

乐 飞、张兆耕、周廷冲 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100800)

提要 本文首次报道用化学修饰法研究 BZ-R 结合区域的性质。结果提示, 赖氨酸或精氨酸残基和半胱氨酸残基与 BZ-R 的可逆结合可能无关, 但与 BZ-R 的光亲和标记密切相关。色氨酸残基可能位于 BZ-R 结合区域, 为 BZ-R 可逆结合和光亲和标记两者所必需。此外, 本文结果还表明, BZ-R 可逆结合较之光亲和标记更依赖于构象的完整性。

关键词 GABA-苯二氮䓬受体; 化学修饰; 光亲和标记; 苯并二氮䓬类; [甲基-³H]氟硝西泮

自 1977 年提出苯二氮䓬受体 (benzodiazepine receptor, BZ-R) 以来^(1,2), 已对它研究了结合动力学、定位、分型、分离纯化等等。但迄今为止, 由于很难获得高纯度的 BZ-R, 有关 BZ-R 结合活性区域性质的研究未见文献报道。本文用配体 [甲基-³H] 氟硝西泮 ([methyl-³H] flunitrazepam, 即 [³H] FNZP) 与 BZ-R 有高度专一结合的性质, 用 P₂ 膜制剂上的 BZ-R, 采用化学修饰法, 比较 BZ-R 在修饰前后可逆结合活性和光亲和标记活性 (在 uv 光照射下, BZ-R 与配体发生的一种不可逆结合), 对 BZ-R 结合区域的性质及光亲和标记的可能机理作了初步探讨。此外, 在蛋白质变性剂和扰动剂影响下, 还比较了构象变化时, BZ-R 可逆结合和光亲和标记的差别。

材料与方 法

[³H] FNZP (放射比活性 3415.1 GBq/mmol) 系 NEN 公司产品, 氟西泮 (flurazepam) 由上海大众制药厂赠送, 牛大脑购自北京牛羊

1986年3月3日收稿 1986年11月21日修回

¹ 中国科学院科学基金资助的课题 № 152

² 本文曾在 1986 年 10 月中国药学会举办的“青年药理学工作者最新研究成果学术交流会”上宣读, 并获优秀论文二等奖

肉加工厂, 光亲和标记照射源为上海科艺光学仪器厂生产的 uv 分析仪 254 nm, 过滤膜系上海红光造纸厂生产的玻璃纤维滤纸, 其余试剂均为 AR 级。

牛大脑 P₂ 膜制备⁽³⁾ 取 50 g 牛大脑, 加 500 ml 冰冷的磷酸缓冲液 (KH₂PO₄-K₂HPO₄, 10 mmol/L, 二硫苏糖醇 0.5 mmol/L, 苯甲磺酰氯 0.3 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, 蔗糖 300 mmol/L, pH 7.1), 电动匀浆 20 s 共 4 次, 离心 (1000 × g 15 min), 取上清液再离心 (31 000 × g 35 min), 得沉淀部分 (P₂ 膜), 保存于 -30℃, 可稳定数月。用前加 20 mmol/L Tris-柠檬酸缓冲液 (缓冲液 A, pH 7.1) 悬浮, 使蛋白质浓度在 2-5 mg/ml。上述操作均在 4℃ 进行。

[³H] FNZP 与 BZ-R 可逆结合实验⁽⁴⁾ 取悬浮 P₂ 膜 100 μl 加入反应管中, 放射配体 [³H] FNZP 终浓度为 1 nmol/L, 非特导结合管同时加入大量非标记氟西泮 (终浓度 0.1 mmol/L) 反应总容量 0.5 ml, 反应体系在冰浴中保温 40 min, 负压抽滤, 1.5 ml 缓冲液 A 淋洗三次, 滤膜置红外灯下烤 30 min, 加 4 ml 闪烁液 (4 g PPO + 0.1 g POPOP/L 二甲苯), 用 LKB 双道自动液闪仪计数。

光亲和标记实验 按文献 (5) 法作如下改良, 可逆结合反应完成后, 反应体系置 254 nm (文献中为 366 nm) uv 光下垂直照射 25 min, 总结合管在光照后加入氟西泮 0.1 mmol/L, 0℃ 保温 90 min, 以竞争可能存在的可逆结合。抽滤至计数等步骤同实验项 2。

化学修饰实验

1. 氨基修饰 丙酮-四氢硼钠 (NaBH₄) 修饰氨基实验基本按照文献 (6) 法, 取 P₂ 悬浮液

6 ml (用 pH 9.0, 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液悬浮), 加 15% 丙酮 1 ml, 搅拌下分次加入 NaBH_4 50 mg, 25°C 反应 90 min.

2,4-二硝基氟苯(DNFB)修饰氨基实验⁽⁷⁾, 取适量 P_2 膜制剂, 加碳酸盐缓冲液(pH 9.0)悬浮, 加入 DNFB 0.1 mmol/L, 25°C 反应 2.5 h, 对照组同样处理, 但不加修饰剂.

2. 巯基修饰 此项实验参考文献(8)法, 在用缓冲液悬浮的 P_2 膜中加入修饰剂对氯汞苯甲酸(PCMB), 25°C 反应 90 min, 以不加修饰剂 P_2 膜为对照.

3. 色氨酸残基修饰 用溴代琥珀酰亚胺(NBS)为修饰剂, 依据文献(9)法.

上述各项反应完成后, 均离心 (30 000 × g 20 min) 除去过量的修饰剂, 沉淀部分即为修饰后 P_2 膜, 用前加适量缓冲液 A 悬浮.

受体构象变化实验 在可逆结合实验和光亲和标记实验反应管中同时加入一定量蛋白质变性剂和蛋白质扰动剂, 按前述步聚操作. 蛋白质变性剂为尿素、盐酸胍, 蛋白质扰动剂为乙二醇、1,2-丙二醇.

结 果

丙酮-NaBH₄ 和 DNFB 修饰氨基对 [³H]FNZP 与 BZ-R 结合的影响 采用丙酮-NaBH₄ 为修饰剂, 并设未修饰 P_2 膜为空白对照组, 单加丙酮或单加 NaBH₄ 为试剂对照组, 丙酮-NaBH₄ 为修饰组, 均同时进行可逆结合实验和光亲和标记实验以比较修饰前后结合活性的变化. 结果可见, 丙酮-NaBH₄ 修饰组的可逆结合活性较之对照组无差异 ($p > 0.05$), 而修饰组的光亲和标记明显低于对照组 ($p < 0.01$). 试剂本身对实验无影响. 用另一氨基修饰剂 DNFB 所得结果与前一实验结果一致 (表 1).

PCMB 修饰巯基对 [³H]FNZP 与 BZ-R 结合的影响 选用 PCMB 1 mmol/L 为巯基修饰剂修饰 BZ-R 的巯基后, 可明显降低 BZ-R 的光亲和标记, 但不影响可逆结合, 结果见表 1,

Tab 1. Effects of chemical modification on benzo-diazepine receptors (BZ-R) specific binding activity. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SD}(\text{cpm})$. * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$ compared with control

| | Reversible binding | Photo-labeling |
|------------------------------------|--------------------|----------------|
| Modification of amino group | | |
| Control | 3898 ± 319 | 4631 ± 364 |
| NaBH ₄ | 3502 ± 270* | 4840 ± 348* |
| Acetone | 3582 ± 434* | 4114 ± 496* |
| Acetone-NaBH ₄ | 4226 ± 193* | 516 ± 56*** |
| Control | 1707 ± 71 | 2834 ± 96 |
| DNFB 0.1 mmol/L | 1766 ± 11* | 1253 ± 38*** |
| Modification of thiol group | | |
| Control | 2216 ± 342 | 3022 ± 500 |
| PCMB 1 mmol/L | 2264 ± 9* | 1452 ± 127*** |
| Modification of tryptophan residue | | |
| Control | 5874 ± 756 | 5703 ± 17 |
| NBS 5 mmol/L | 847 ± 216*** | 525 ± 52*** |

修饰色氨酸残基对 [³H]FNZP 与 BZ-R 结合的影响 用系列浓度的 NBS 对 BZ-R 的色氨酸残基进行修饰, 实验结果表明 NBS 在 0.1-5 mmol/L 浓度范围内, 其抑制 BZ-R 与配体的可逆结合与剂量相关 (图 1). 同时 NBS 修饰也显著影响光亲和标记, 如 5 mmol/L 的 NBS 可使光亲和标记结合百分率降至 9%. 若修饰前给予 [³H]FNZP 5 nmol/L 使其与 BZ-R 结合以保护受体的结合区域, 可明显对抗 NBS 的修饰, [³H]FNZP 10 nmol/L 几乎起到完全的保护作用 (图 2).

蛋白质的构象变化对 [³H]FNZP 与 BZ-R 结合的影响 蛋白质变性剂尿素、盐酸胍及蛋白质扰动剂乙二醇、1,2-丙二醇因引起受体蛋白的构象变化或膜组分形态的改变可不同程度地影响 [³H]FNZP 与 BZ-R 的结合, 效应与剂量相关 (图 3). 比较上述试剂对可逆结合和光亲和标记的影响可见, 蛋白质变性剂对二者均有抑制作用, 但对前者的影响强于后者; 蛋白质扰动剂对可逆结合有抑制, 却对光亲和标记几无影响. 结果列于表 2.

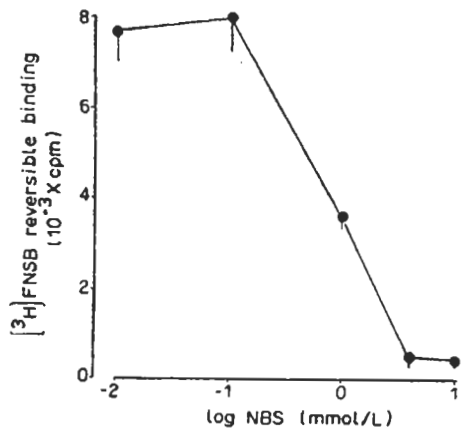


Fig 1. Concentration-inhibitory effects of chemical modification by *N*-bromosuccinimide (NBS) on benzodiazepine receptors (BZ-R) specific binding activity ($n = 3$, $\bar{x} \pm SD$).

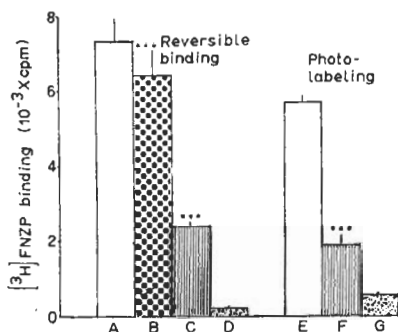


Fig 2. Protective role of specific ligand flunitrazepam (FNZP) in preventing BZ-R from chemical modification (NBS, 5 mmol/L). A, E) Control (no NBS modification). C, F) In the presence of $[^3H]$ FNZP (5 nmol/L) before NBS modification. B) In the presence of $[^3H]$ FNZP (10 nmol/L) before NBS modification. D, G) NBS modification. *** $p < 0.01$ compared with D or G. $n = 3$, $\bar{x} \pm SD$.

讨 论

本实验用已知氨基修饰剂丙酮- NaBH_4 、DNFB 和巯基修饰剂 PCMB 比较分析了赖氨酸或精氨酸残基(均含氨基)和半胱氨酸残基(含巯基)在 BZ-R 与配体可逆结合和光亲和标记中的作用。根据光亲和标记与可逆结合发生在 BZ-R 同一结合部位⁽¹⁰⁾, 作者推测赖氨酸或精氨酸残基和半胱氨酸残基可能位于 BZ-R 的结

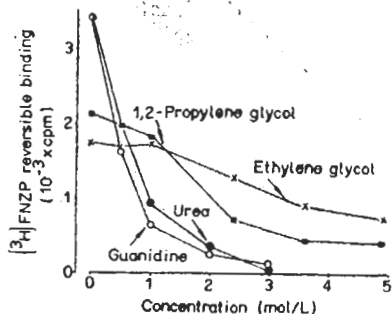


Fig 3. Concentration-inhibitory effects of some denaturing and perturbing agents of protein on BZ-R specific reversible binding activity. This experiment was repeated twice with similar results.

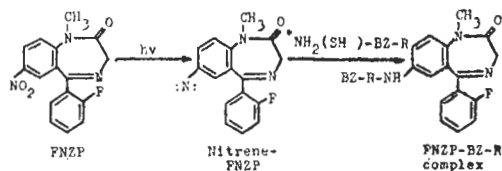


Fig 4. The hypothetical mechanism of photolabeling between FNZP and BZ-R. $^*NH_2(SH)-BZ-R$ means the amino group or the thiol group of BZ-R binding area.

合区域, 但不参与受体的可逆结合, 却与光亲和和标记密切相关。有关 BZ-R 与配体光亲和和标记发生机理目前不甚清楚。据报道⁽¹¹⁾, 光亲和和标记的基本原理是: 芳香族叠氮可被光激活产生一种活性氮烯(nitrene), 后者可与氨基($-NH_2$)或巯基($-SH$)等基团发生共价结合, 从而完成光亲和和标记反应历程。又有人对多种苯二氮草类药物进行过研究, 发现只有 7 位上有硝基的 FNZP、氯硝西洋、硝西洋 才能进行光亲和和标记⁽¹²⁾。综合这些资料, 再分析我们的实验结果, 推测 FNZP 与 BZ-R 发生光亲和和标记的过程可能是这样: FNZP 7 位上的硝基在 uv 光作用下经清楚的反应历程产生活性中间体——氮烯, 这种活泼的氮烯与 BZ-R 结合区域的 $-NH_2$ (赖氨酸或精氨酸残基提供) 或 $-SH$ (半胱氨酸残基提供) 迅速发生共价连接。图 4 表示这一可能的反应过程。

色氨酸残基修饰实验表明, NBS 对可逆结

Tab 2. Effect of the denaturing agents and the perturbing agents of protein on BZ-R binding activity ($n=3$, $\bar{x}\pm SD$). * $p>0.05$, *** $p<0.01$ compared with control. ††† $p<0.01$ compared reversible binding with photolabeling

| | Reversible binding | | Photolabeling | |
|--------------------------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| | Specific binding (cpm) | % of control | Specific binding (cpm) | % of control |
| Control | 3794±516 | 100 | 3062±200 | 100 |
| Urea 1 mol/L | 1188±301*** | 34±4 | 1607±187*** | 52±4††† |
| Guanidine 0.5 mol/L | 1746±148*** | 46±2 | 2127±243*** | 69±5††† |
| Control | 2292±190 | 100 | 1415±81 | 100 |
| Ethylene glycol 4.8 mol/L | 1219±150*** | 48±9 | 1516±55* | 111±10††† |
| Control | 1443±209 | 100 | 960±78 | 100 |
| 1,2-propylene glycol 2.4 mol/L | 590±148*** | 40±9 | 770±94* | 80±3††† |

合和光亲和标记均有抑制，并与剂量相关。若预先给予专一配体可显著保护受体结合区域免受化学修饰。提示色氨酸残基不仅位于 BZ-R 的结合区域，可能还是受体结合的必需基团。

此外，本文还发现蛋白质变性剂尿素、盐酸胍对可逆结合抑制程度大于光亲和标记，对可逆结合有抑制作用的蛋白质扰动剂乙二醇、1,2-丙二醇对光亲和标记无影响。这一结果提示，BZ-R 可逆结合较之光亲和标记更加依赖于受体构象的完整性或膜组分的完整性。

参 考 文 献

- 1 Squires RF, Braestrup C. Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 1977; 266 : 732
- 2 Möhler H, Okada T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 1977; 198 : 849
- 3 Sigel E, Stephenson FA, Mamalaki C, Barnard EA. A γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. *J Biol Chem* 1983; 258 : 6965
- 4 Speth RC, Wastek GJ, Yamamura HI. Benzodiazepine receptors: temperature dependence of [3H]flunitrazepam binding. *Life Sci* 1979; 24 : 351
- 5 Herblin WF, Mechem CC. Short-wave

ultraviolet irradiation increases photoaffinity labeling of benzodiazepine sites. *Ibid* 1984; 35 : 317

- 6 Means GE, Feeney RE. Reductive alkylation of amino groups in proteins. *Biochemistry* 1968; 7 : 2192
- 7 Haynes R, Osuga DT, Feeney RE. Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic enzymes. *Ibid* 1967; 6 : 541
- 8 张兆耕、周廷冲. 对氯汞苯甲酸对电鳕乙酰胆碱酯酶活性区域的影响. *军事医学科学院院刊* 1980; (3) : 261
- 9 Williams MN. Effect of *N*-bromosuccinimide modification on dihydrofolate reductase from a methotrexate-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1975; 250 : 322
- 10 Möhler H, Battersby MK, Richards JG. Benzodiazepine receptor protein identified and visualized in brain tissue by a photoaffinity label. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77 : 1666
- 11 Lavin TN, Nambi P, Heald SL, Jeffs PW, Lefkowitz RJ, Caron MC. ^{125}I -labeled *p*-azidobenzylcarazolol, a photoaffinity label for the β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1982; 257 : 12332
- 12 Johnson RW, Yamamura HI. Photoaffinity labeling of the benzodiazepine receptor in bovine cerebral cortex. *Life Sci* 1979; 25 : 1613

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jul; 8 (4) : 293-297

Study on binding area of benzodiazepine receptors by chemical modification

LE Fei, ZHANG Zhao-Geng, ZHOU Ting-Chong

(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800*)

ABSTRACT This paper first reports the effect of chemical modification on benzodiazepine receptor (BZ-R) reversible binding and photoaffinity labeling, and the hypothetical mechanism of BZ-R photoaffinity labeling. There was no effect on BZ-R reversible binding activity by modifying the amino group ($-NH_2$) and the thiol group ($-SH$) of BZ-R, while the photoaffinity labeling between BZ-R and [*methyl*- 3H]flunitrazepam ($[^3H]FNZP$) was inactivated. The chemical modification of BZ-R by NBS inhibited both BZ-R reversible binding and photolabeling. The binding was inhibited 85 and 91%, respectively. FNZP added before NBS modification could prevent

BZ-R from chemical modification. These results suggest that lysine (or arginine) and cysteine residues are the active groups in photoaffinity labeling, and tryptophan residue not only locates in BZ-R binding area but also is a necessary group of BZ-R binding. BZ-R reversible binding depends much more on the integration of receptor conformation than the photolabeling reaction.

KEY WORDS GABA-benzodiazepine receptors; chemical modification; photoaffinity labeling; benzodiazepines; [*methyl*- 3H]flunitrazepam