

兔脑额叶皮质苯二氮䓬受体的溶脱及其特性¹

林 军、胡本荣 (中山医科大学药理学教研室, 广州 510089, 中国)

Solubilization and characterization of benzodiazepine receptors in frontal cortex of rabbit brain

LIN Jun, HU Ben-Rong

(Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract [³H]Flunitrazepam binding to benzodiazepine receptors solubilized by the detergent 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-*l*-propanesulfonate (CHAPS) was saturable and showed non-linear Scatchard plot with K_{D1} 0.31 nmol/L and K_{D2} 6.7 nmol/L. The affinities of soluble receptors to benzodiazepine were consistent with P_2 membrane. One radioactive zone was found by SDS-PAGE after photoaffinity labelling of soluble membrane and the apparent molecular weight of 55 000 was reported. [³H]Flunitrazepam binding to soluble receptors was enhanced by GABA, NaCl or KCl and barbiturates, but inhibited by bicuculline and picrotoxinin. The enhancement of GABA on [³H]flunitrazepam binding was amplified by NaCl or KCl and antagonized by bicuculline and picrotoxinin. These results suggest that the benzodiazepine receptors solubilized by CHAPS have their pharmacological properties and are still associated with GABA receptors and chloride channel.

Key words GABA-benzodiazepine receptors; detergents; soluble membrane; photoaffinity labelling; picrotoxinin; polyacrylamide gel electrophoresis

提要 1% CHAPS 所溶脱的兔额叶皮质苯二氮䓬受体和苯二氮䓬化合物结合的特征与 P_2 膜基本一致。GABA、NaCl 或 KCl 及巴比妥类可促进 [³H] 氟硝西泮与溶膜结合, 而印防己毒素内酯则抑制之。光亲和标记后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得受体 M_r 为 55 000。

关键词 γ -氨基丁酸-苯并二氮䓬受体; 去垢剂; 溶膜; 光亲和标记; 印防己毒素内酯; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

哺乳类动物脑内存在着高亲和力和特异性的苯二氮䓬受体 (benzodiazepine receptors, BZ-R), 介导该类药物的中枢作用⁽¹⁾。电生理和受体结合实验均提示 BZ-R 与 γ 氨基丁酸 (GABA) 受体及氯通道之间有着密切联系, 认为三者所形成的复合体是有关药物产生药理效应的作用点⁽²⁾。纯化重组建复合体对于阐明其本质是必要的, 而溶脱出具有活性的复合体是首先的一步。本文选用新型去垢剂 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio] -*l*-propanesulfonate (CHAPS) 溶脱兔额叶皮质 BZ-R, 以 [³H] 氟硝西泮 ([³H]flunitrazepam, [³H]FNP) 受体结合分析及 GABA 等化合物的调节作用的观察为手段, 探讨所溶脱 BZ-R 的基本药理学特性, 并用光亲和标记结合 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定受体亚基分子量。本文试图制备分析适合于纯化重组建受体复合体的溶膜。

Materials and methods[³H]FNP (New England Corp), 比放

射强度 2701 GBq/mmol。聚乙二醇 6000 (Nippol Oil & Fats Co.)、GF/B 型微孔玻璃纤维滤纸(Whatman)、Triton X-100、GABA、牛血清白蛋白均为 Serva 产品。蝇蕈醇(musci-mol)、荷包牡丹碱(bicuculline)、印防己毒素内酯(picrotoxinin)、卵清蛋白、糜蛋白酶原、细胞色素 C、十二烷基硫酸钠(SDS)、CHAPS 均为 Sigma 产品。安定、硝基安定、三唑安定、氟安定疏磺喷钠、苯巴比妥、巴比妥均为国产试剂。丙烯酰胺、N, N'-甲叉双丙烯酰胺系国产重结晶试剂。

溶膜制备 兔 4 只, ♂, 5 月龄。颈动脉放血处死, 立即取大脑额叶皮质, 于冰冷的 Tris-citrate 缓冲液 (pH 7.4) 中洗去血污。称重后按 1:10(wt/vol) 加入 0.32 mol/L 的蔗糖溶液, 冰浴中用玻璃匀浆器上下手动 3 次, 再电动匀浆使组织成为均匀状态。匀浆液以 $1000 \times g$ 离心 10 min, 弃沉淀, 上清液再以 $34\,000 \times g$ 离心 30 min, 沉淀用含 0.05% Triton X-100 的 Tris-citrate 缓冲液洗出, 制成匀浆再离心 $34\,000 \times g$ 。随后用同容量的 Tris-citrate 缓冲液洗涤离心 3 次。收集沉淀加入适量的缓冲液和 CHAPS 溶液, 4°C 静置 30 min, 以 $100\,000 \times g$ 离心 60 min。上清部分代表溶膜, 分装后置于 -20°C 备用 4 wk。蛋白质定量按 Folin 酚法⁽³⁾。

溶膜放射配体受体结合分析法 反应系统加入溶膜 100 μl , [^3H]FNP 50 μl , 按需加入其他物质溶液。非特异性结合管加入安定 100 $\mu\text{mol/L}$, 总结合管不加。最后用 Tris-citrate 缓冲液调终容量为 500 μl , 4°C 孵育 60 min, 加入 200 μl 的人体血浆丙种球蛋白溶液 (10 mg/ml) 和 500 μl 的 30% 聚乙二醇 6000 溶液。充分混匀后滴加于 GF/B 滤纸上负压抽滤, 并用浓度 8.5% 的聚乙二醇 6000 溶液 10 ml 冲洗 2 次。滤纸在 70°C 烘烤, 转移至 20 ml 液闪瓶内, 加入含 PPO, POPOP 和二甲苯的液闪液 5 ml, 暗适应至少 8 h 以减少化学发光。LKB 双道自动液闪仪测定放射性

(dpm)。特异性结合为总结合减去非特异性结合。

溶膜 BZ-R 光亲和标记结合 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 取一定量溶膜, [^3H]FNP 终浓度 6.04 nmol/L, 4°C 暗室孵育 90 min, 253.7 nm uv 灭菌灯照射 10 min, 然后转移至透析袋 (5000) 中, 用 50 倍容量的 Tris-citrate 缓冲液 (含 1% CHAPS) 透析 9 次。垂直板状不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳⁽⁴⁾ 完毕后, 按样品纵切凝胶, 再顺序横切成 1 mm 的小块, 各加入 H_2O_2 (30%) 0.5 ml 超声震荡 60 min \times 2, 再加入含 PPO, POPOP, 乙二醇乙醚、萘、二氧六环的液闪液 5 ml, 均相测量。 [^3H]FNP 与 BZ-R 在 uv 照射下可发生光亲和反应, 形成特异性的不可逆的结合产物⁽⁵⁾, 故根据受体结合放射峰的位置可求得 BZ-R 分子量。迁移率按下式计算: 样品平均迁移距离 \times 染色前凝胶长度 / 染料平均迁移距离 \times 染色后凝胶长度。

Results

预实验表明 1% CHAPS 可获得高结合活性的 BZ-R 及良好保留其 GABA 促进结合功能。以下实验均采用 1% CHAPS 制备溶膜。

[^3H]FNP 与兔额叶皮质溶膜的饱和结合分析 以 0.125 至 30.11 nmol/L 的 [^3H]FNP 与 100 μl 溶膜进行结合反应, 得到总结合曲线。另一组加入安定 100 $\mu\text{mol/L}$ 获得非特异性结合曲线。校正非特异性结合得到特异性结合曲线 (Fig 1)。

可见 [^3H]FNP 结合呈可饱和性, 同一资料作 Scatchard 分析, 曲线呈下凹状, 用 IBM PC 微电脑进行曲线拟合, 得方程 $Y = -0.0874 - 0.155 \ln X$ ($r = 0.874$)。参考渐进线法⁽⁶⁾ 求得两组参数 (Fig 2)。

苯二氮革化合物对 [^3H]FNP 受体结合的抑制 安定、硝基安定、氟安定及三唑安定抑制 [^3H]FNP 受体结合的 IC_{50} 分别为 9.7, 3.3, 42.3 及 20.4 nmol/L。

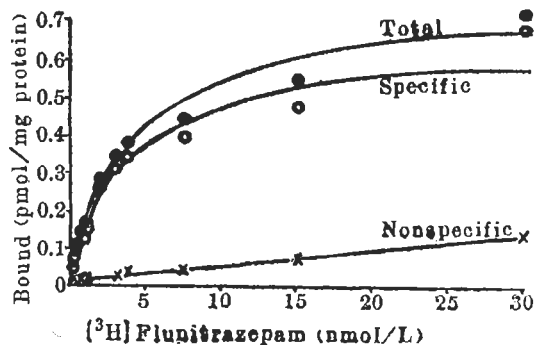


Fig 1. Saturation binding of $[^3\text{H}]$ flunitrazepam to soluble fraction of rabbit frontal synaptosomal membranes.

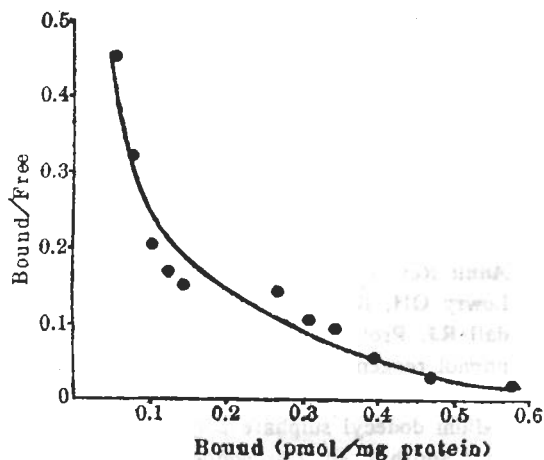


Fig 2. Scatchard plot of $[^3\text{H}]$ flunitrazepam to soluble fraction of rabbit frontal synaptosomal membranes. $K_{D1} = 0.31$ nmol/L, $B_{max1} = 0.15$ pmol/mg protein; $K_{D2} = 6.7$ nmol/L, $B_{max2} = 0.52$ pmol/mg protein.

GABA 受体激动剂及拮抗剂对 $[^3\text{H}]$ FNP 受体结合的调节 GABA 和 蝇蕈醇可促进 $[^3\text{H}]$ FNP 与溶膜结合, 此作用被 NaCl 或 KCl 加强, 被荷包牡丹碱及印防己毒素内酯阻断或抑制。NaCl 或 KCl 可促进、印防己毒素内酯可抑制 $[^3\text{H}]$ FNP 与溶膜结合 (Tab 1)。

巴比妥类对 $[^3\text{H}]$ FNP 受体结合的促进 用所制备的溶膜进行实验, 未见巴比妥类有促进 $[^3\text{H}]$ FNP 结合作用; 若不经 0.05% Triton X-100 处理, 则可观察到巴比妥类对 $[^3\text{H}]$ FNP 结合有促进作用 (Tab 1)。

Tab 1. Effects of GABA receptors agonists and antagonists and barbiturates on $[^3\text{H}]$ flunitrazepam binding to soluble fraction of rabbit frontal synaptosomal membranes. $\bar{x} \pm \text{SD}$. $^{**}P < 0.05$, $^{***}P < 0.01$ vs control, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ vs GABA.

Compounds (mmol/L)	n	Radioactivity ($10^{-4} \times \text{dpm/mg protein}$)
Control	6	1.66 ± 0.09
GABA (0.1)	6	$2.96 \pm 0.12^{***}$
Muscimol (0.01)	6	$2.82 \pm 0.14^{***}$
Bicuculline (0.1)	6	$1.22 \pm 0.10^{***}$
GABA (0.1) + Bicuculline (0.1)	6	$1.58 \pm 0.13^{\dagger\dagger}$
Picrotoxinin (0.1)	6	$1.13 \pm 0.09^{***}$
GABA (0.1) + Picrotoxinin (0.1)	6	$2.09 \pm 0.23^{\dagger\dagger}$
NaCl or KCl (0.2)	6	$1.94 \pm 0.11^{***}$
GABA (0.1) + NaCl or KCl (0.2)	6	$3.52 \pm 0.21^{\dagger\dagger}$
Control	4	1.55 ± 0.09
Barbital (5)	4	$2.35 \pm 0.11^{***}$
Phenobarbital (5)	4	$1.84 \pm 0.13^{**}$
Thiopental (5)	4	$2.14 \pm 0.12^{***}$

兔额叶皮质 BZ-R 分子量测定 对溶膜用 $[^3\text{H}]$ FNP 进行光亲和标记后, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳出现一个放射峰 (Fig 3)。用 4 种标准蛋白计算出 $[^3\text{H}]$ FNP 受体复合物 M_r 为 55 000 (Fig 4)。

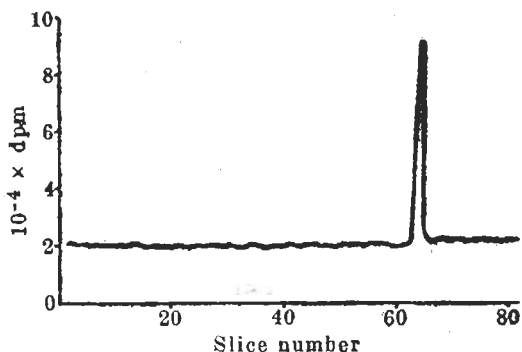


Fig 3. The radioactive peak of $[^3\text{H}]$ flunitrazepam binding site in soluble fraction of rabbit frontal synaptosomal membranes after photoaffinity labelling and electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels.

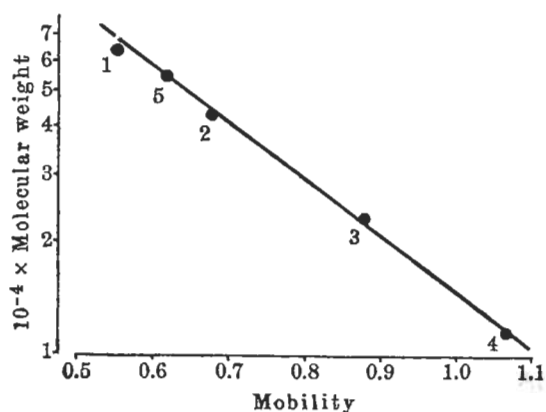


Fig 4. Determination of the molecular weight of [³H]flunitrazepam binding site in soluble fraction of rabbit frontal synaptosomal membranes by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

1) Bovine serum albumin, 2) Ovalbumin, 3) Chymotrypsinogen, 4) Cytochrome C, 5) [³H]Flunitrazepam binding site

Discussion

本文选用 1% CHAPS 溶脱的兔额叶皮质 BZ-R, 与 [³H]FNP 结合呈可饱和性, Scatchard 曲线呈下凹状, 两组亲和力及苯二氮革抑制结合的 IC₅₀ 均与 P₂ 膜结合实验结果⁽⁷⁾ 基本一致。可见所溶脱的 BZ-R 具有其基本药理学特性。文献采用大鼠⁽⁸⁾ 或牛⁽⁹⁾ 脑为材料, CHAPS 溶脱前后 BZ-R 与配体结合的亲和力基本相同。由此可见 CHAPS 一般不引起 BZ-R 结合特性的改变, Scatchard 曲线下凹状, 提示存在不同亚型或构象。结合光亲和标记后 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果, 可认为兔额叶皮质 BZ-R 为一种亚型, 存在两种构象变化。大鼠⁽⁸⁾ 和牛⁽⁹⁾ 脑 BZ-R 饱和结合分析见 Scatchard 曲线为直线型, 与兔额叶皮质不同, 这可能是动物种属差异引起。

P₂ 膜结合实验证明, GABA⁽¹⁰⁾, Cl⁻⁽¹¹⁾ 可促进苯二氮革与受体结合; 作用于氯通道或其附近交联部位的巴比妥类药物也有促进作用⁽¹²⁾; 而印防己毒素内酯则抑制其结合⁽¹³⁾。本文所溶脱的 BZ-R 与配体结合仍可被这些物质调节, 说明溶脱后 BZ-R 与 GABA 受体及氯

通道之间存在着良好的联系。由于这些物质的作用点各不相同, 故本文同时观察其溶脱后调节作用, 与文献^(8,9) 相比, 可更全面地了解溶脱后 BZ-R 的功能状态。溶膜制备若经 Triton X-100 处理, 便观察不到巴比妥类的促进作用, 推测是由于 Triton X-100 去除了有关磷脂或蛋白质所致。

去垢剂可影响 BZ-R 的结合活性和与 GABA 受体及氯通道的联系。本文所溶脱的 BZ-R, 具有其受体结合特性及与 GABA 受体和氯通道的良好联系, 适合于受体复合体的纯化及其重建研究。

References

- 1 Squires RF, Braestrup C. Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 1977; 266 : 732
- 2 Tallman JF, Gallager DW. The GABA-ergic system: A locus of benzodiazepine action. *Annu Rev Neurosci* 1985; 8 : 21
- 3 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 4 Payne JW. Electrophoresis of proteins on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels. In: Smith I, ed. *Chromatographic and electrophoresis techniques*. Vol II. *Zone electrophoresis*. 4th ed. London, Heineman, 1976 : 321-46
- 5 Le F, Zhang MJ, Zhang ZG, Zhou TC. Properties of photoaffinity labeling of benzodiazepine receptors of bovine cerebral cortex. *Chin Pharmacol Toxicol* 1987; 1 : 321
- 6 Rosenthal HE. A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal Biochem* 1967; 20 : 525
- 7 Yan GM, Hu BR. Benzodiazepine derivatives: relationship between anti-convulsant activity and affinity to rabbit frontal cortical receptors. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7 : 389
- 8 Mernoff ST, Cherwinski HM, Becker JW, de Blas AL. Solubilization of brain benzodiazepine receptors with a zwitterionic detergent: Optimal preservation of their functional interaction with the GABA receptors. *J Neurochem* 1983; 43 : 752

- 9 Stephenson FA, Olsen RW. Solubilization by CHAPS detergent of barbiturate-enhanced benzodiazepine-GABA receptor complex. *Ibid* 1982; 39 : 1579
- 10 Tallman JF, Thomas JW, Gallager DW. GABA-ergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature* 1978; 274 : 383
- 11 Costa T, Rodbard D, Pert CB. Is the benzodiazepine receptor coupled to a chloride anion channel? *Ibid* 1979; 277 : 315
- 12 Trifiletti RR, Snowman AM, Snyder SH. Barbiturate recognition site on the GABA/benzodiazepine receptor complex is distinct from the picrotoxinin/TBPS recognition site. *Eur J Pharmacol* 1985; 106 : 441
- 13 Chweh AY, Ulloque RA, Swinyard EA, Wolf HH. Effect of picrotoxinin on benzodiazepine receptor binding. *Neurochem Res* 1985; 10 : 871

* * * * *