

SCATCHARD式与量效比式的比较

金正均 俞霭瑛 (上海第二医学院药理教研室, 上海 200025)

摘要 Scatchard (S) 式广泛用于受体结合动力学研究。本文证明 S 式与 D/R 式均来自 Michaelis-Menton (M-M) 式且呈倒置关系。试用两式于受体配基研究, 所得动力学参数极为接近。在配基取代实验中, D/R 式与 S 式相比, 得出结果较合逻辑, 易用 Hill 式处理。数学模型研究证明 D/R 式对低反应误差的偏离远较 S 式为小, 其 $E_{A \max}$ 值尤为稳定。D/R 式运算方便。当实验误差较大或并不涉及多种受体时, D/R 式较 S 式更为适合。

关键词 Scatchard 式; 量效比 D/R 式; Hill 系数 (n_H); 放射性配基; 结合试验; 配基取代试验

在药物与受体作用的定量研究中, 标记配基与受体结合试验已成为一种经典的方法⁽¹⁾。如何正确、迅速、简便地处理实验数据乃是所有研究者十分关心的问题。我们在实际工作中发现常用的 Scatchard 式有不足之处, 有时造成无法进一步用 Hill 式求 n_H 的局面。D/R 式在这种场合不止一次地给我们介决了问题。本文试图从理论及实践上将 S 式与 D/R 式作一比较(仅在占领学说成立的范围内)。

论证 Scatchard 式与 D/R 式之间的关系

Scatchard 式如下:

$$\frac{LR}{L} = \frac{R_0}{K_D} - \frac{LR}{K_D} \quad [1]$$

LR: 为某一配基剂量所能结合的受体数。按占领学说, 相当于效应 E_A ⁽²⁾, 两者间关系可用常数 α 表示。

$$LR \times \alpha = E_A$$

L: 为产生 E_A 的配基剂量, 即 [A]。

R_0 : 为配基可能结合的受体总量, 相当于理论上最大的反应 $E_{A \max}$; $E_{A \max} = R_0 \times \alpha$ 。

K_D 介离常数, 相当于 $\frac{1}{2}E_{A \max}$ 时配基的剂量或浓度。

如将 S 式中符号用受体动力学式中常用的

对应符号代入, 即得下式:

$$\frac{E_A}{[A]} = \frac{E_{A \max}}{K_D} - \frac{E_A}{K_D} \quad [2]$$

D/R 式如下:

$$\frac{[A]}{E_A} = \frac{K_A}{E_{A \max}} + \frac{1}{E_{A \max}} \cdot [A] \quad [3]$$

D/R 式来自 M-M 式, 业已证明⁽³⁾。S 式亦然, 见下。从 [2] 式可得:

$$E_A = \frac{E_{A \max}}{\frac{K_D}{[A]} + 1} = E_{A \max} \cdot \frac{[A]}{K_D + [A]} \quad [4]$$

分母移项, 得: $E_A \cdot K_D + E_A \cdot [A] = E_{A \max} \cdot [A]$
两边除以 [A], 得:

$$\frac{E_A}{[A]} \cdot K_D + E_A = E_{A \max}$$

移位得:

$$\frac{E_A}{[A]} = \frac{E_{A \max}}{K_D} - \frac{E_A}{K_D} \quad [5]$$

式 [5] 与式 [2] 完全一致。由此从理论上表明 S 式与 D/R 式一样亦来自 M-M 式。然而在 D/R 式中, 自变量乃是配基剂量 [A], 而 S 式中, 自变量乃是效应 E_A , 即 LR。因变量在 D/R 式中是 $\frac{[A]}{E_A}$ (量/效) 而 S 式中乃是 $\frac{E_A}{[A]}$ (效/量), 因此两式有着倒置关系: S 式是效量比对效应作图, 而 D/R 式乃是量效比对剂量 (浓度) 作图。

Table 1. Model data based on adjusted values of an actual experiment. (\hat{y} : expected value)

mg*	\hat{y} (cpm)
0.25	1310
0.50	2034
1.00	2812
2.00	3476
4.00	3942

* Protein content in homogenate of guinea-pig ileum longitudinal muscle

Table 2. Parameters derived from data in table 1 using Scatchard and D/R formulae

Parameters	Scatchard formula	D/R formula	% change*
K_D	0.6187 nM	0.6261 nM	+1.1961
$E_{A \max}$	4551.5 cpm	4575.4 cpm	+0.5251
r^2	0.999999	0.999982	-0.0017
n_H	1.01	0.97	-3.96

* Compared to Scatchard's outcome

S 式与 D/R 式对误差耐受性的比较 作者根据具体实验数据, 整理后以理论 S 式推算出一系列理想数据, 分别用 S 式与 D/R 式计算受体动力学参数作为比较, 见表 1 及表 2.

由表 2 可见, 以 S 式所得参数为标准, 依 D/R 式计算所得参数的波动 <4%, 其中 K_D 和 $E_{A \max}$ 的相差仅 1% 至 3%.

表 3 所列乃是将 E_A 作 $\pm 10\%$ 的变化时, 用 2 种公式计算两种参数的比较, 方法参见⁽³⁾. 从总的绝对误差来看, D/R 式在 K_D 方面略大于 S 式 (109.8 对 104.2), 但 D/R 式的 $E_{A \max}$ 却比 S 式优多 (33.4 对 41.8). 在低反应水平方面, 可以看出 D/R 式耐受误差的性

能比 S 式要好. 以 0.25 mg 来看, S 式的总绝对误差为 36.1 而 D/R 式仅为 16.6. 在高反应误差, D/R 式的耐受性比 S 式差. 第 5 档 4 mg 的总绝对误差在 D/R 式是 78.6(%), 而 S 式为 59.9. 然而在实际工作中, 当实验误差较固定, 如放射性的底数, 则反应越小, 误差占比例越大. 反之, 在高反应中, 由于误差值大体稳定而基数变大, 从而相对误差变小. 这就说明为何尽管 D/R 式在理论上对高反应误差敏感, 实践证明 D/R 式总的误差要低得多.

配基取代 (ligand displacement) 试验^(4,5)

配基取代试验乃是近代常用的一种方法. 其原理是先用某放射性配基与受体结合, 然后给以一系列剂量的非放射性配基. 由于两种配基间的竞争作用, 测出的结合放射性就减少, 其 50% 的抑制点即 $ID_{50}(K_D)^{(4)}$. 表 4 即是用 QNB 取代 $[^3H]QNB$ 的实验结果.

由表 4 可见, 随着 QNB 浓度的上升, cpm 随着减少, 其 50% 减少点由表上可见应在 1500 cpm 左右的 QNB 浓度水平, 然而 S 式给出一个 0.37 nM, 按实际结果比最大效应 1/3 还小, 而 D/R 式给出者为 1.16 nM, 合理得

Table 3. % errors due to $\pm 10\%$ changes (simulated variations) in effects. Table of comparative results computed by Scatchard and D/R formulae.

quantity of protein (mg)	Changes in E_A %	Scatchard formula		D/R formula	
		Changes in K_D (%)	Changes in $E_{A \max}$ (%)	Changes in K_D	Changes in $E_{A \max}$ (%)
0.25	+10	-12.4	-3.2	-6.0	-1.0
	-10	+16.2	+4.3	+8.2	+1.4
0.50	+10	-5.2	-0.2	-7.0	-1.1
	-10	+8.6	+1.4	+8.9	+1.4
1.0	+10	+3.2	+3.3	-7.8	-0.8
	-10	+1.3	-1.5	+9.4	+1.0
2.0	+10	+10.1	+6.1	-3.7	+1.2
	-10	-5.1	-4.0	+4.3	-1.4
4.0	+10	+32.1	+11.8	+26.5	+11.7
	-10	-10.0	-6.0	-28.0	-12.4
Absolute total error		104.2	41.8	109.8	33.4

Table 4. Displacement of [^3H]QNB (2 nM) by QNB. Guinea-pig ileum longitudinal muscle homogenate being used as receptor.

Concn of QNB	cpm	% inhibition
0.01 nM	2954	4
0.10 nM	2823	8
1.00 nM	2159	33
10.0 nM	857	82
100 nM	539	93

Starting radio-activity, 3048(100%)

多, 见表 5. 另外理论最大效应 $E_{A \max}$, S 式为 2201 cpm, 比实测值还小 12.26%, 而 D/R 式之 $E_{A \max}$ 为 2536 cpm, 比实测值大 1.08%, 较近理论也合乎逻辑.

r^2 的比较: S 式的 r^2 为 0.4793, 其 r 之 $P > 0.05$, (故为不显著.) 而 D/R 式的 r^2 为 0.9997 其 r 之 P 远小于 0.01, (故为非常显著).

表 6 及表 7 是一个非放射性 M-胆碱拮抗剂(7911)取代另一放射性拮抗剂 [^3H]QNB 的实验结果及参数. 分析表明 S 式所得结果不合逻辑: 按实验结果, ID_{50} 即 K_D 应在 0.1 μM -10 nM 之间, 而 S 式给出的却小于 10 nM, D/R 式所得 K_D 为 36 nM, 较合理. $E_{A \max}$, S 式为 3249 cpm, 远低于实测值 (3616), D/R 式为 3628 cpm 也较合逻辑. r^2 的比较: 化成 r , 则 S 的 r 为 0.777, 其 $P > 0.05$, D/R 式的 r 为 0.9998, 其 $P < 0.01$.

讨 论

1. S 式要求实验误差小, 在一般条件下均采用作图法求各项参数. 这样固然避免了运算结果易受实验误差影响的缺点, 但也带来二个必然的后果: 一是精度不够, 二是用外推法求 $E_{A \max}$, D/R 式耐受较大的实验误差, 在大多数情况下均可利用最小二乘方原理作回归运算⁽³⁾, 从而提高了参数的正确性与精度. D/R 式通过理论式的运算求出 $E_{A \max}$, 不用外推法,

Table 5. Computation outcomes based on data from table 4.

Receptor dynamics parameters	Scatchard formula	D/R formula
ID_{50}	0.37 nM	1.16 nM
$E_{A \max}$	2201 cpm	2526 cpm
r^2	0.4793	0.9997

Table 6. Displacement of [^3H]QNB (2 nM) by 7911 (a synthetic M-receptor antagonist).

Concn of 7911	Specific binding (cpm)	Inhibition (%)
1.0 nM	317	15
10.0 nM	1135	28
0.1 μM	2660	72
1.0 μM	3385	93
10.0 μM	3616	100

Table 7. Comparison of computation outcomes of data from table 6 with Scatchard and D/R equations.

Parameters	Scatchard equation	D/R equation
K_D	5.5 nM	36 nM
$E_{A \max}$	3249 cpm	3628 cpm
r^2	0.60399	0.9996

从逻辑上讲, 较为合理.

2. S 式与 D/R 式均来自 M-M 式, 故理论价值应相等. D/R 式中 D/R 对 D, 而 S 式中是 R/D 对 R. 由于 D (剂量或物质浓度) 应看作没有或具极少误差, 而 R (反应) 必然有一定的误差, 是以理论上即可说 D/R 式的运算结果误差必然会比 S 式小. 本研究结果证实了这点. 从 D/R 式的 r^2 始终大于 S 式者即可证明这一点.

3. S 式目下最大贡献有三: 一是为求 Hill 系数作准备; 二是观察反应的协作性 (co-operativity); 三是发现受体的亚型. D/R 式的斜率与 S 式者相反. D/R 式自变量是 D, 不能

反映R的变化. 因此D/R式在求 K_D 及 $E_{A \max}$ 上具有优越性, 但在观察协作性方面却无能为力. 如D分档多, 而线偏离直线颇多, 则宜分段用D/R式或S式. 此乃作图与公式运算联合使用.

4. 当只有一种物质, 一种受体系统(或类型), D/R式较S式更为适用. 当有两种以上物质或两种以上的受体系统时, 应采用作图与公式运算联合操作; 若线呈明显弯曲, 应分段用S式或D/R式处理.

5. 当S式正规方法得出不合逻辑结果时, 可试用D/R式.

致谢 实验部分在金国章付研究员指导下进行的.

Acta Pharmacologica Sinica 1983 Jun; 4 (2) : 73-76

COMPARISON BETWEEN SCATCHARD AND DOSE/RESPONSE RATIO EQUATIONS

JIN Zheng-jun (T K King), YU Ai-yao

(Department of Pharmacology, Shanghai Second Medical College, Shanghai 200025)

ABSTRACT Scatchard equation is extensively used in receptor dynamics studies. This equation suffers from its high sensitivity to low-reaction errors and produces an under-estimated $E_{A \max}$, leading to an often bewildering Hill coefficient (n_H). We have shown that both Scatchard formula (S) and the dose/response ratio equation (D/R) derive from Michaelis-Menton equation and are reciprocally related. Both formulae were applied in our studies of radioligand binding experiments and were equally effective as far as K_D , $E_{A \max}$ were concerned. But the D/R formula showed a better compliance with experimental data, gave usually more logical K_D and $E_{A \max}$, and thus was a better preparatory equation to Hill coefficient.

- ### 参 考 文 献
- 1 Williams LT. *Receptor binding studies in pharmacology*. 1st ed. NY: Raven Press, 1978:27
 - 2 Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ, eds. *Neurotransmitter receptor binding*. 1st ed. NY: Raven Press, 1978:57
 - 3 金正均. 中国药理学报 1980年9月; 1(1):3
 - 4 Yamamura HI, Snyder HS. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 Jan; 71(5):1725
 - 5 Yamamura HI, Snyder HS. *Mol Pharmacol* 1974 May; 10 (3); 861
 - 6 Cooper JR. *The biochemical basis of neuropharmacology*. 3rd ed. NY:Oxford University Press 1978:60
 - 7 Limbird LE. *J Biol Chem* 1976 Aug 25; 251 (16):5007

The analysis of the advantages and disadvantages of both formulae shows that in the case of a simple receptor system and ligands of the same nature, the D/R equation often leads to success while S fails. The D/R equation is very simple to use, and is especially useful when excessive experimental errors are suspected. The adjunction of the D/R equation to a standard Scatchard plot is recommended in case of a negative co-operativity or the existence of receptor sub-typing, especially in ligand displacements.

KEY WORDS Scatchard equation; dose/response ratio equation; Hill coefficient; radioligand; binding experiment; ligand displacement