

“外周型”与“中枢型”苯二氮草受体在化学修饰上的差别¹

乐 飞、张兆耕、周廷冲 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提要 本文报道了大鼠肾脏存在苯二氮草受体(BZ-R), 一些能以高亲和力与中枢 BZ-R 结合的氟硝西洋、艾司他唑仑、flumazepil、delorazepam 等苯二氮草类药物几乎不与“外周型”BZ-R 结合, Ro 5-4864 对“外周型”BZ-R 亲和力较高, 却对中枢 BZ-R 无亲和力。中枢 BZ-R 能与 [³H]FNZP (氟硝西洋 flunitrazepam) 发生光亲和标记, “外周型”BZ-R 则否, 但“外周型”BZ-R 对巯基化学修饰敏感。

关键词 GABA-苯二氮草受体; 光亲和标记; 化学修饰; [³H]氟硝西洋

在中枢苯二氮草受体(BZ-R)发现^(1,2)后, 在肾、肺、肝等外周组织也存在 [³H]安定特异结合部位, 称为“外周型”苯二氮草(BZ)结合部位⁽³⁾。有趣的是, 中枢神经系统也有这种“外周型”BZ 结合部位, 从结合性质上看, 它完全符合受体条件^(4,5), 与中枢 BZ-R 相比, 性质并不完全相同, 是否为同一受体的不同分型, 这是一个引人关注的问题。本文用一些化学修饰剂对“外周型”BZ 结合部位和中枢 BZ-R 进行化学修饰, 发现他们在修饰行为上存在差别。

材料与方 法

[³H]FNZP (放射比活性 3415.1 GBq/mmol) 系 NEN 公司产品, 艾司他唑仑(esta-zolam)由湖北制药厂赠送, 地洛西洋(delorazepam)系作者合成, 其余 BZ 药物均系 Hoffman La-Roche 公司赠送。光亲和标记照射光源用上海科艺光学仪器厂生产的 254 nm 的 uv 分析仪, 过滤膜片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。

大鼠脑、肾匀浆制备 Wistar 大鼠 10 只 (本院动物饲养场提供), 体重及♀♂不拘, 断头后立即取脑和肾, 以 1:10 (wt:vol) 加入冰

冷的磷酸盐缓冲液(K_2HPO_4 - KH_2PO_4 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, 离心(30 000 × g, 35 min), 沉淀用 20 mmol/L 的 Tris-柠檬酸缓冲液悬浮(缓冲液 A, pH 7.1), Teflon 玻璃匀浆器匀浆, 充分洗涤后再离心(30 000 × g, 20 min)。此洗涤过程重复 3 次, 所得沉淀置于 -30°C (可稳定数月)。用前加适量缓冲液 A 悬浮, 使其蛋白质浓度为 2-5 mg/ml, 蛋白质含量测定按比色法⁽⁶⁾。

受体结合实验 取 0.1 ml 匀浆悬浮液, 加入适量的放射配体 [³H]FNZP, 除饱和实验外, 其余实验的 [³H]FNZP 终浓度均为 1 nmol/L。反应管终容量为 0.5 ml。对非特异结合管, 加入大量非标记 FNZP, 终浓度 25 μmol/L, 反应体系在冰浴中保温 40 min。负压抽滤。滤膜用 1.5 ml 缓冲液 A 淋洗 3 次后, 置红外灯下烤 20-30 min。装入闪烁瓶, 加入 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(仪器效率约 38%)。特异结合等于总结合管与非特异结合管之差。竞争性抑制结合实验在反应管中加入不同浓度的非标记 BZ 药物。

光亲和标记实验及化学修饰实验 同文献(7), 只是非标记 BZ 药用的是 FNZP, 而不是氟西洋。

结 果

[³H]FNZP 与肾匀浆结合的动力学研究及饱和结合实验 肾匀浆与 [³H]FNZP 在冰浴中孵育不同时间(2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60 min)后, 过滤、计数。结果(图 1)表明, 放射结合量随时间延长逐渐增加, 10 min 趋至恒值, 到达最大结合量一半所需时间约 4 min,

1986年4月14日收稿 1988年1月13日接受

¹ 中国科学院科学基金资助的课题 No 152

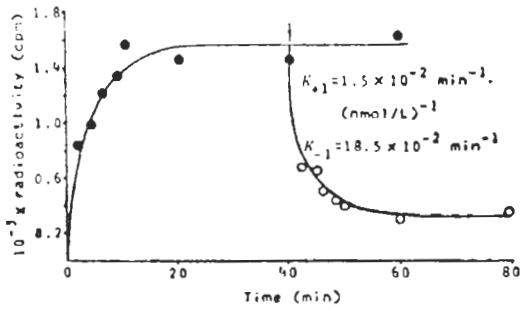


Fig 1. Reversibility of binding of $[^3\text{H}]$ FNZP to the P_2 membranes of rat kidney homogenates. Rat kidney homogenates was incubated with $[^3\text{H}]$ FNZP at 0°C . Unlabeled FNZP ($25\ \mu\text{mol/L}$) was added at the point indicated by the arrow. (●): Association of $[^3\text{H}]$ FNZP and benzodiazepine receptors (BZ-R). (○): Dissociation of $[^3\text{H}]$ FNZP and BZ-R.

结合速率常数 (K_{+1}) 为 $0.015\ \text{min}^{-1} \cdot (\text{nmol/L})^{-1}$, 在 40 min 后加入大量非标记 FNZP ($25\ \mu\text{mol/L}$), 继续孵育 2, 4, 6, 8, 10, 20 及 40 min, 可见受体-配体复合物迅速解离, 解离速率常数 $K_{-1} = 0.185\ \text{min}^{-1}$, 由 K_{-1}/K_{+1} 算得的表观解离常数 (K_D) 为 $12.3\ \text{nmol/L}$.

图 2 表示 $[^3\text{H}]$ FNZP 与肾匀浆的结合呈饱和性质, Scatchard 作图分析, 求得 K_D 为

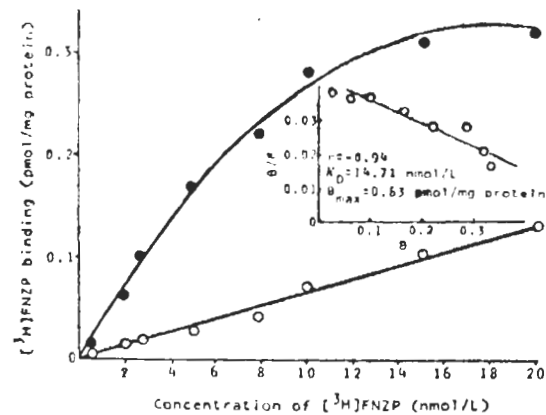


Fig 2. Binding to rat kidney homogenate of $[^3\text{H}]$ FNZP $0.435\text{--}20\ \text{nmol/L}$. Inset is the Scatchard plot, indicating one binding site. All the samples were incubated in duplicate. (○) nonspecific binding. (●) specific binding.

$14.71\ \text{nmol/L}$, 与由结合动力学实验计算所得的 K_D 值非常接近; 最大结合容量 $B_{\text{max}} = 0.63\ \text{pmol/mg}$ 蛋白 (3 次实验所得的统计值 $K_D = 19 \pm 6\ \text{nmol/L}$, $B_{\text{max}} = 0.8 \pm 0.3\ \text{pmol/mg}$ 蛋白) 由 Scatchard 作图得到一条直线暗示结合部位的均一性。这些结果表明肾匀浆与 $[^3\text{H}]$ FNZP 的结合是特异的 (特异结合占 80% 左右)、可逆的和可被饱和的。

一些 BZ 药对 $[^3\text{H}]$ FNZP 与鼠肾、脑匀浆结合的影响 选用 8 种不同的 BZ 药分别竞争抑制 $[^3\text{H}]$ FNZP 与鼠肾、脑匀浆的结合。从表 1 可以看出, Ro 5-4864 对 $[^3\text{H}]$ FNZP 与鼠脑匀浆的结合无抑制作用, 却能非常强地与鼠肾匀浆结合 ($K_i = 11.0 \pm 0.8\ \text{nmol/L}$)。另一方面, 许多能强有力地抑制 $[^3\text{H}]$ FNZP 与鼠脑匀浆结合的 BZ 药, 如 flumazepil (Ro 15-1788), 艾司他唑仑、地洛西洋、氯硝西洋 (clonazepam)、氟西洋 (flurazepam) 却不能抑制 $[^3\text{H}]$ FNZP 与鼠肾匀浆的结合。

Tab 1. Pharmacological specificity of benzodiazepine receptors binding sites (K_i or K_D) of rat kidney and brain homogenates. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SD}$

Ligands	Kidney (nmol/L)	Brain (nmol/L)
Clonazepam	no	0.81 ± 0.27
Estazolam	no	2.4 ± 0.4
Flumazepil	no	6.7 ± 0.6
Flurazepam	no	140 ± 60
Delorazepam	$>10\ 000$	0.081 ± 0.02
Diazepam	>1000	39.6 ± 2.1
Flunitrazepam	$19 \pm 6^*$	$1.64 \pm 0.13^*$
Ro 5-4864	11.0 ± 0.8	no

* Calculated from Scatchard plots

$[^3\text{H}]$ FNZP 与鼠肾、脑匀浆的光亲和标记

由图 3 可见, $[^3\text{H}]$ FNZP 与鼠脑匀浆中的 BZ-R 在 uv 作用下能发生不可逆结合 (即光亲和标记), 随时间延长, 特异光亲和标记量逐渐增加直至饱和 (约需 25 min), 非特异光亲和标记非常低 (小于 15%)。然而, 用鼠肾匀浆进行同样实验, 却未发现 $[^3\text{H}]$ FNZP 与鼠肾匀浆有特异

光亲和标记。换言之，外周 BZ 结合部位与 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 不发生光亲和标记(表 2)。

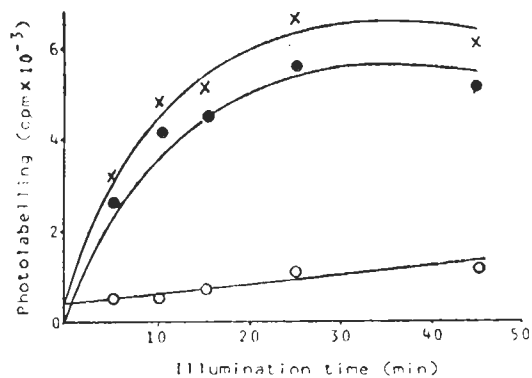


Fig 3. Photoaffinity labeling of $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ and central BZ-R (rat brain homogenates). (×) Total photoaffinity labeling. (●) Specific photoaffinity labeling. (○) Nonspecific photoaffinity labeling.

Tab 2. Photoaffinity labeling of rat kidney homogenates ($n=4$, $\bar{x}\pm\text{SD}$)

Illumination time (min)	Total binding (cpm)	Nonspecific binding (cpm)
5	1421 \pm 123	1316 \pm 158
10	1486 \pm 188	1205 \pm 127
15	1324 \pm 147	1383 \pm 165
25	1339 \pm 124	1439 \pm 124

Tab 3. Effect of chemical modifying agents on $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ binding to rat brain and kidney homogenates. $n=3$, $\bar{x}\pm\text{SD}$. * $p>0.05$, *** $p<0.01$ vs control.

Drug (mmol/L)	Brain (cpm)	Kidney (cpm)
Control	4058 \pm 224	1454 \pm 48
NBS (2)	330 \pm 10***	315 \pm 46***
Control	3695 \pm 5	761 \pm 11
DNFB (0.1)	3552 \pm 186*	740 \pm 108*
Control	3364 \pm 21	1337 \pm 64
PCMB (1)	3138 \pm 414*	868 \pm 101***

化学修饰对 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 与鼠肾、脑匀浆结合的影响 用已知修饰剂对氯汞苯甲酸(PCMB)、2,4-二硝基氟苯(DNFB)、溴代琥珀酰二亚胺(NBS)分别对 BZ-R 的巯基(SH)、氨基(NH_2)和色氨酸残基进行修饰, 实验结果

发现, 用 DNFB 0.1 mmol/L 修饰, 不影响 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 与鼠脑匀浆的结合, 也不影响其与鼠肾匀浆的结合。NBS 2 mmol/L 修饰色氨酸残基使 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 与鼠脑、肾匀浆的结合均大大减少。值得注意的是, PCMB 1 mmol/L 对 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 与鼠脑匀浆结合无影响, 却能使 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 与肾匀浆的结合降低, 较空白对照有明显降低, $p<0.01$ (表 3)。

讨 论

本文研究了鼠肾匀浆与 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 结合性质, 结果表明它们之间的结合是特异的、可逆的、可饱和的, 并能被 4'-氯西洋、氟硝西洋等 BZ 药所竞争, 这些均符合受体性质。既然外周也存在 BZ-R, 那么它与中枢 BZ-R 有何异同? 本文比较了 8 个 BZ 药对 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 与中枢 BZ-R 和外周 BZ-R 结合的抑制作用。结果表明, 4'-氯西洋对 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 与中枢 BZ-R 的结合无抑制作用, 却对 $[^3\text{H}]\text{FNZP}$ 与外周 BZ-R 的结合有很强抑制; 氟硝西洋是中枢 BZ-R 的强效抑制剂, 却与外周 BZ-R 无亲和力, 这一结果与文献报道一致。另外, 我们还观察到 flumazepil(中枢 BZ-R 拮抗剂)、艾司他唑仑(一种新型三唑类 BZ 药物)、地洛西洋对中枢 BZ-R 与外周 BZ-R 的结合行为类似氟硝西洋, FNZP、安定虽然与中枢、外周 BZ-R 都能结合, 但对两者的亲和力不同。本文的光亲和标记实验也表明外周 BZ-R 不像中枢 BZ-R 能进行光亲和标记。为了进一步比较中枢、外周 BZ-R 的差别, 本文首次采用化学修饰法, 通过修饰受体结合区域的某些基团, 对它们的结合活性进行比较。结果表明: 中枢 BZ-R 和外周 BZ-R 对氨基修饰(结合活性均不变化)及色氨酸残基的修饰(结合活性均明显降低)表现出一致的结果, 而用 PCMB 修饰巯基后, 中枢 BZ-R 结合活性不变, 而外周 BZ-R 结合活性所受影响较大, 提示两种受体在结合区域的某些氨基酸残基(半胱氨酸残基?)可能有异, 这是否就是它们对某些 BZ 药物的结合

表现出明显不同的原因? 本实验结果为“外周型”BZ-R(对4'-氯西洋高亲和力)有别于“中枢型”BZ-R(对氯硝西洋敏感)提供了又一证据。应当指出的是, 本实验使用的放射配体 $[^3\text{H}]$ FNZP并非“外周型”BZ-R特异配体, 也与“中枢型”BZ-R结合, 若能采用特异性“外周型”BZ-R配体, 对“外周型”BZ-R再进行一些研究, 将有利于加强对这方面的认识。

参 考 文 献

- 1 Möhler H, Okada T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 1977; 198 : 849
- 2 Squires RF, Braestrup C. Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 1977; 266 : 732
- 3 Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity $[^3\text{H}]$ diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74 : 3805
- 4 Marangos PJ, Patel J, Boulenger JP, Clark-Rosenberg R. Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using $[^3\text{H}]$ Ro 5-4864. *Mol Pharmacol* 1982; 22 : 26
- 5 Schoemaker H, Boles RG, Horst WD, Yamamura HI. Specific high-affinity binding sites for $[^3\text{H}]$ Ro 5-4864 in rat brain and kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 225 : 61
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RT. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 7 乐飞、张兆耕、周廷冲。用化学修饰法探讨苯二氮草受体的结合区域。中国药理学报 1987; 8 : 293

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Jul; 9 (4) : 289-292

Chemical modification showing the difference between central- and peripheral-type benzodiazepine receptors

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

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT The binding of $[^3\text{H}]$ flunitrazepam ($[^3\text{H}]$ FNZP) to the peripheral-type benzodiazepine binding sites in rat kidney was characterized. The binding was reversible, relatively high-affinity ($K_D = 19 \pm 6$ nmol/L), saturable, and inhibited by some benzodiazepines (BZS) such as Ro 5-4864, FNZP etc. Therefore, these sites could be classified as peripheral benzodiazepine receptors (BZ-R). The differences of peripheral BZ-R and central BZ-R were as follows: Clonazepam was the most, and Ro 5-4864 the least, potent in displacing $[^3\text{H}]$ FNZP from the central BZ-R, while the relative affinities of clonazepam and Ro 5-4864 for the peripheral BZ-R were just the reverse of that

in central BZ-R of rat brain homogenates. Our results indicate that BZS such as estazolam, Ro 15-1788, delorazepam and flurazepam can effectively displace $[^3\text{H}]$ FNZP from central BZ-R but not peripheral BZ-R. The peripheral BZ-R can not be photolabeled with $[^3\text{H}]$ FNZP. The chemical modification suggests that the binding areas of peripheral BZ-R and central BZ-R may be different. The cysteine residue may be a necessary functional group in peripheral BZ-R, but not in central BZ-R.

KEY WORDS GABA-benzodiazepine receptors; photoaffinity labeling; chemical modification; $[^3\text{H}]$ flunitrazepam;