

苯二氮䓬受体与配体相互作用的热力学分析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 苯二氮䓬类药物及其受体(BZ-R)的结合随温度的增高而降低, K_d 值增大, 但最大结合部位(B_{max})并不受温度的影响。热力学分析表明 BZ-R 和苯二氮䓬类药物的结合为自发进行的放热反应。比较激动剂、拮抗剂与 BZ-R 相互作用的熵值变化, 发现激动剂反应熵值为负值, 而拮抗剂则为正值, 由此可知, 激动剂、拮抗剂与 BZ-R 的反应分别为焓和熵所驱动。

关键词 氟硝西洋; GABA-苯二氮䓬受体; 热力学; 焓; 牛大脑皮质

[³H]地西洋 (diazepam) 与大鼠脑苯二氮䓬受体(benzodiazepine receptors, BZ-R)的结合随温度的增加明显减少^(1,2), [³H]氟硝西洋(flunitrazepam, FNZP)与 BZ-R 的结合也随温度的增加而减少, 认为温度的升高使受体结合量减少是由于离解速率常数值(K_{-1})增加, 导致表观离解常数(K_d)增大, 受体亲和力下降⁽³⁾, 但是, 并未论述温度升高增加离解速率常数的原因。本文从热力学角度进行研究, 比较了激动剂和拮抗剂与受体相互作用的热力学性质, 这有助于阐明受体与配体结合的分子机理。

材料与 方法

[³H]FNZP (3415 GBq/mmol) 系美国 NEN 公司产品, 氟西洋(flurazepam)和艾司它唑仑(estazolam)分别由上海大众制药厂和湖北制药厂赠送, 地洛西洋(delorazepam)由作者合成, 氯硝西洋(clonazepam), flumazepil 和地西洋为均美国 Hoffman-La Roche 公司惠赠。LKB 双道自动液闪计数仪(LKB 公司, 仪器效率约38%)。牛大脑购自北京牛羊肉加工厂。

牛大脑突触膜(P_2)制备及受体结合实验

方法同文献(4)。

受体与配体在不同温度下的结合实验

选 0, 20, 30 和 37°C 四个温度进行结合、竞争结合和饱和结合实验。竞争药物为材料项中述及的6个非标记 BZ(0.1 nmol/L-10 μmol/L), 饱和结合实验用 [³H] FNZP 0.4-17 nmol/L, 非特异结合是加入氟西洋 100 μmol/L, 特异结合为总结合计数与非特异计数之差。

结果与 讨论

在 0-37°C 受体的结合量随温度的升高而降低, 0, 20, 37°C 受体与 BZ-R 的结合分别为 4024±98, 3120±210 和 1221±50 cpm。这种结合随温度的升高而降低可能有两个原因: 一是温度升高可能加速放射配体 [³H]FNZP 的分解, 但预先把 [³H]FNZP 置于 37°C 水浴中 1 h, 然后再在 0°C 进行结合实验, 结果表明这一处理并不降低 [³H]FNZP 与 BZ-R 的结合。二是温度对 BZ-R 的影响, 包括影响 BZ-R 亲和力或结合数目。在不同温度条件下进行饱和结合实验, BZ-R 的表观离解常数 K_d 在 37°C 明显大于 0°C ($p < 0.01$), 但最大结合量 B_{max} 并未变化(图 1, 表 1)。由此可见, 温度的升高是明显降低了 BZ-R 的亲和力, 从而影响其与配体的结合。

竞争结合实验中也观察到温度对 BZ-R 结合的影响。Flumazepil (Ro 15-1788), 地洛西洋, 氯硝西洋和艾司它唑仑在 37°C 的抑制曲线向右下方偏移(图 2)从竞争结合实验所得 IC_{50} 再算出 K_d (从公式 $K_d = IC_{50} / (1 + L / K_L)$)⁽⁶⁾, L 是 [³H]FNZP 浓度, K_L 是 [³H]FNZP 经饱和实验算得的平衡离解常数) 6 种 BZ 药的 K_d 值随温度的增加而增加。

实验数据满足 Van't Hoff 方程式⁽⁶⁾, 表明 BZ-R 与配体反应的热焓值不依赖温度的变

1986年8月11日收稿 1988年2月23日接受

¹ 本文是中国科学院科学基金资助的课题 № 152

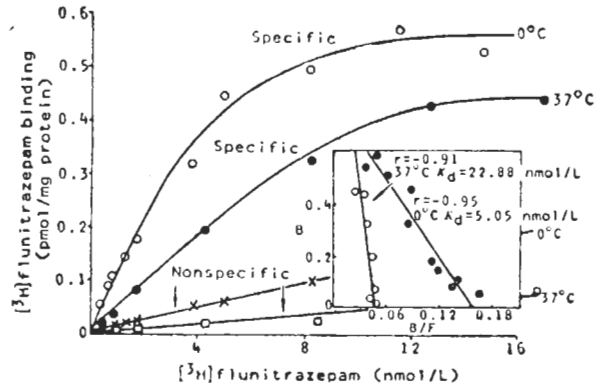


Fig 1. Saturation isotherm and Scatchard analysis (inset) of [³H]flunitrazepam (FNZP) binding to bovine cerebral cortical membranes. Membranes were incubated with [³H]FNZP 0.4–17 nmol/L for 40 min at 0 and 37°C

Tab 1. Equilibrium dissociation constant K_d (nmol/L) of benzodiazepine ligands at 0°C and 37°C

Benzodiazepines	0°C	37°C
Flumazepil	1.01±0.08	15±10**
Delorazepam	1.02±0.06	14.5±0.6***
Clonazepam	1.27±0.23	38±15**
Estazolam	2.01±0.08	65.5±0.3***
Diazepam	58±5	483±133***
Flurazepam	49±34	364±25***
Flunitrazepam	5.7±1.0	26±4***
B_{max} (pmol/mg protein)	(0.90±0.13)	(1.3±0.1)*

IC_{50} values were determined from logit-log plot of the inhibition of specific [³H]FNZP binding. K_d values were calculated from IC_{50} values⁽²⁾. Density of binding sites in parentheses, indicating no variation with temperature. n=3 or 4, $\bar{x} \pm SD$. *p>0.05, ***<0.05, **p<0.01 vs 0°C.

化。表 2 列出了 6 个 BZ 在 37°C 与 BZ-R 反应的三个重要热力学参数。由于 R 与 T 为正值， $\ln K_a$ 在本实验均为正数(图 3)，故 ΔG^0 全为负值，这说明 BZ 和 BZ-R 的结合是自发进行的。 ΔH^0 全为负值(表 2)，故可知 BZ 与 BZ-R 的结合为放热反应。

Speth 等⁽³⁾发现温度的升高可使缔合速率常数(K_{+1})和 K_{-1} 增大，但 K_{-1} 增加较快，因此 K_a 值增加，受体亲和力降低。但他们并未

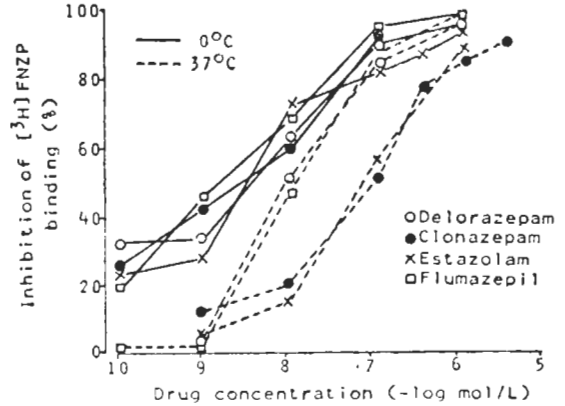


Fig 2. Inhibition of [³H]FNZP binding to bovine cerebral cortical membranes by benzodiazepines. Membranes were incubated for 40 min at 0 and 37°C with [³H]FNZP (1 nmol/L) in the presence of unlabeled benzodiazepines.

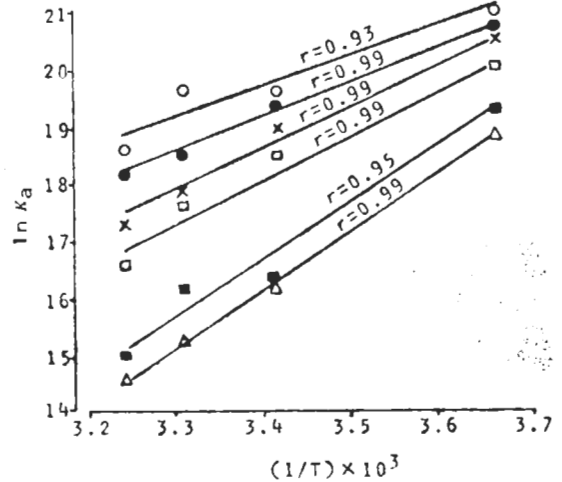


Fig 3. Van't Hoff plots of $\ln K_a$ vs $(1/T) \times 10^3$ where K_a values were calculated from the equilibrium dissociation constants ($K_a = 1/K_d$) in Tab 1. The slope of line is equal to $-\Delta H^0/R$, T, expressed by K (Kelvin degree). (○) Flumazepil, (●) Delorazepam, (×) Clonazepam, (□) Estazolam, (■) Flurazepam, (△) Diazepam.

说明使 K_{-1} 增加快于 K_{+1} 的原因。本文结果表明 K_d 值在 37°C 明显大于 0°C，此点和他们的结果是一致的。而且测得 BZ 与 BZ-R 进行的反应为放热反应，所以增加反应温度必然有利于逆反应，从而满意地解释了使 K_{-1} 增加较快的原因。在 6 种 BZ 配体中，BZ-R 激动剂的

Tab 2. Thermodynamic parameters of ligand binding to the benzodiazepine receptors of bovine cerebral cortex at 37°C.

Diazepines	Thermodynamic parameters(J mol ⁻¹)		
	Free energy ΔG^0	Enthalpy ΔH^0	Entropy ΔS^0
Estazolam	-42747	-64309	-69500
Clonazepam	-44296	-65565	-68664
Delorazepam	-46641	-52796	-19804
Flumazepil	-46850	-43292	+11597
Diazepam	-37639	-86876	-158763
Flurazepam	-38309	-80177	-134899

熵值均为负值，而拮抗剂 flumazepil⁽⁷⁾的熵值为正值。分析方程 $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$ ，自发进行的反应，其 ΔG^0 必须是负值。本文所用激动剂都引起体系熵值减小($\Delta S^0 < 0$)，因此 ΔH^0 必须有较大负值(即热焓须大大减少)以抵消或超出熵值减小所造成的不利，反应才能自发进行。由此推测，激动剂与 BZ-R 的反应受热焓控制驱动，而拮抗剂由于其 ΔS^0 为正值，数值越大 ΔG^0 越负，更有利于反应自发进行，它与 BZ-R 的反应似乎受熵值增加所驱动。

一般地说，简单的结合反应是使熵值增加，有一较大正值，这可能是由于整齐排列在配体和结合部位的水分子在结合反应进行时被取代，导致熵值增加⁽⁸⁾。但是，本文观察到激动剂结合熵值是减少，这可能反映了受体蛋白或周围膜成分在配体诱导下发生了构象变化。这不同于拮抗剂可能仅仅与受体结合，而导致熵值增加。

以上仅是牛大脑 BZ-R 与激动剂和拮抗剂相互作用在热力学性质上表现出的不同，外周组织中的 BZ-R 也值得进一步研究。表观亲和力依赖于温度的变化在肾上腺素能 α -受体⁽⁹⁾， β -受体⁽⁶⁾，组织胺受体^(10,11)也曾观察到。因此，用热力学方法探讨配体、受体(包括激素、受体)相互作用的分子机理可能是一种能普遍

应用的研究方法。由于真正完全的中枢 BZ-R 拮抗剂不易获得，本文论述的观点还需要更多实验予以支持。

参 考 文 献

- 1 Möhler H, Okada T. Properties of ³H-diazepam binding to benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex. *Life Sci* 1977; 20 : 2101
- 2 Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity [³H]diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74 : 3805
- 3 Speth RC, Wastek GJ, Yamamura HI. Benzodiazepine receptors: Temperature dependence of [³H]flunitrazepam binding. *Life Sci* 1979; 24 : 351
- 4 乐飞、张兆耕、周廷冲。用化学修饰法探讨苯二氮革受体的结合区域。中国药理学报 1987; 8 : 293
- 5 Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973 : 22 : 3099
- 6 Weiland GA, Minneman KP, Molinoff PB. Fundamental difference between the molecular interactions of agonists and antagonists with the β -adrenergic receptor. *Nature* 1979; 281 : 114
- 7 Richards JG, Möhler H. Benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology* 1984; 23 : 233
- 8 Klotz IM, Urquhart JM. The binding of organic ions by proteins. Effect of temperature. *J Am Chem Soc* 1949; 71 : 847
- 9 U'Prichard DC, Snyder SH. Binding of ³H-catecholamines to α -noradrenergic receptor sites in calf brain. *J Biol Chem* 1977; 252 : 6450
- 10 Kenakin TP, Krueger CA, Cook DA. Temperature-dependent interconversion of histamine H₁ and H₂ receptors in guinea pig ileum. *Nature* 1974; 252 : 54
- 11 Cook DA, Kenakin TP, Krueger CA. Alterations in temperature and histamine receptor function. *Fed Proc* 1977; 36 : 2584

Thermodynamic analysis of interaction of benzodiazepines and benzodiazepine receptors

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

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

ABSTRACT The characteristics of benzodiazepines (BZ) binding to benzodiazepine receptors (BZ-R) of bovine cerebral cortex were investigated at 0-37°C. The affinity of BZ binding to BZ-R decreased with the increase of temperatures, while the dissociation constant (K_d) determined by Scatchard analysis of saturation isotherm and the competitive inhibition increased with the increase of temperature. However, the maximal binding capacity (B_{max}) did not vary with the temperature. Thermodynamic analysis indicated the reaction of BZ binding to

BZ-R was spontaneous and of heat release. We find that the binding of antagonist yields an increase of entropy, but the agonist binding in a decrease of entropy. Antagonist binding to BZ-R is largely entropy-driven, while the binding of agonist, on the other hand, is associated with a decrease of enthalpy.

KEY WORDS flunitrazepam; GABA-benzodiazepine receptors; thermodynamics; entropy; bovine cerebral cortex