

神经递质生理生化

神经生理学手册(2)

陈国治 孙以安 张德星

8

C.3

神经递质生理生化学

神经生理学手册(2)

B. COLLIER 等著

陈国治 孙以安 张德星 译

上海科学技术出版社

神经递质生理生化学

神经生理学手册(2)

B. COLLIER 等著

陈国治 孙以安 张德星译

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

总发行所上海发行所发行 上海东方印刷厂印刷

开本787×1092 1/16 印张18 字数438,000

1984年10月第1版 1984年10月第1次印刷

印数1—6,500

统一书号: 14119·1677 定价: 2.75元

内 容 提 要

本书主要阐明神经递质受体的生化概况,胆碱能、儿茶酚胺能、5-羟色胺能、氨基酸类神经递质的生化和生理学,以及神经分泌神经元的细胞生物学和神经元的轴突运输,反映了神经递质和神经分泌神经元的最新科研成果。

本书可作为大专院校生物学、生物化学、生物物理学、生理学、医学及药理学专业的大学生、研究生的补充教材,教学和科研人员必读的参考书。

目 录

第一章	神经递质受体的生物化学概况	1
第二章	胆碱能传递的生物化学和生理学	29
第三章	儿茶酚胺能神经元的细胞方面	56
第四章	5-羟色胺能传递的生物化学和生理学	101
第五章	氨基酸类神经递质的生物化学和生理学	140
第六章	神经分泌神经元的细胞生物学	161
第七章	轴突运输：神经元的细胞内的运输线	192
参考文献		217

第一章 神经递质受体的生物化学概况

A. Maelicke B. W. Fulpus E. Reich

本章内容

烟碱受体.....2	与神经毒素的相互作用.....9
分离的受体.....2	受体与胆碱能小配体的相互作用14
提纯的先决条件.....2	神经毒素-受体复合物的解离,由胆碱能
提纯步骤.....3	小配体所加速19
纯化的受体性质.....4	配体结合与受体功能21
配体结合.....6	膜-结合受体.....23
方法和要求.....6	受体的生物合成和代谢24
数据处理.....8	附录26

从许多特殊的和一般的观点来看,研究神经递质是很有意义的。可兴奋细胞的受体是化学识别链中的关键成分。在神经系统和多数受神经支配的组织,例如各种类型的肌肉和许多腺体中,化学识别链实现着细胞间的通讯。在神经系统中,受体常集中于接头区域,如突触,它是整合功能的部位。由于神经元间的信息传递,是以递质分子的释放、识别和移去为基础的,所以,诸如记忆和整合等“高级”神经活动的特征,必须反映到突触中所出现的现象以及所参与的分子,包括受体在内的性质。因此,仔细地研究受体,有助于明确某些更为复杂的神经现象的物理基础和物理范围的条件。从一般的水平上来说,研究得较好的神经递质受体是完整的膜蛋白。膜蛋白可控制质膜的某些通透性,因此它对许多其他的受体和膜蛋白是有价值的模型,特别是对那些能调节与兴奋性无关的各种离子和其他运输功能的受体和膜蛋白,此外,神经递质和激素受体之间还可能存在着有用的平行关系。

本章将简要地叙述脊椎动物神经递质受体生化方面的某些现状。由于在 Chang 和 Lee^[9,47]发现眼镜蛇蛇毒的神经毒素的箭毒碱性质,并由此用作烟碱受体一切生化研究的唯一工具之前,没有能见到这个领域的明显进展,因此,关于这一类受体的生化知识仍处于很低的水平。这种神经毒素的利用,仅在近五年左右发展起来的,因此受体的生物化学尚不成熟,如同二十年前,五十年代我们对 DNA 复制和环核苷酸代谢的认识情况相仿。

由于神经递质受体能调节突触后膜的通透性,因此摆在生化学家面前的最紧迫的问题包括如下几个方面:

1. 某一特定受体的结构是什么?它对特异的递质的识别和反应的基础是什么?

2. 递质分子的结合和识别是怎样导致通透性改变的,这些过程又是怎样耦联的?特别是与递质识别和受体反应有关的理化反应的本质是什么?它们的速度怎样?这些反应能用来解释接头所测得的生理特性吗?反应速度与由电生理技术所建立的极限条件相符吗?

3. 受体对递质结合产生反应的哪一步,是启动突触后通透性改变的限速步骤?什么因素决定限速?它们会发生改变吗?

4. 受体分子和其他相邻的膜成分,如磷脂、甾醇、膜蛋白之间的结构关系是什么?

5. 什么是受体代谢?什么是受体生物合成的途径?它又是怎样受调控的?受体是怎样嵌入膜的?用什么来说明它们的定位?什么是受体的转换率?

6. 是什么因素决定一种细胞合成一种特定的受体,并赋予对刺激进行反应的能力,而且其反应方式又与其在特定的细胞通讯回路中的位置相适应?

由于有了眼镜蛇神经毒素,我们开始在某些水平上以实验词汇来阐述这些问题中的一部分,但这仅限于烟碱受体,因为其它神经递质受体,还不能以现代生化方法加以研究。

为了对受体功能作出令人满意的理化词汇的定量说明,部分实验需要在生理条件下,在膜环境中对天然受体进行直接研究,至少要对用较简单的制备物所获得的某些数据加以验证。现有的生物化学和生物物理方法的灵敏度和分辨力,还远远不能适应在这些困难条件下对少量分子的行为作直接监控,看来要解决上列问题的进展不会很快,并有待于新技术的突破。

烟碱受体

分离的受体

提纯的先决条件

虽然许多受体已用生理学和(或)药理学技术进行了很好分析,但至今只有一种神经递质受体,即电鱼的烟碱受体,以相当纯的形式被分离出来,并能有适当的量供生物化学或生物物理鉴定^[5,10,25,28,29,39,40,45,51,57,58,62,65,75]。其所以如此,是因为只有烟碱受体才能满足成功提纯所必需的一切先决条件。

1. 必须有大量的含有相当高浓度受体的组织可供应用。这一点很重要,因为蛋白质的提纯常连续采用许多独立的和相对效力不高的分离手段,而且在每一步骤势必要丢失一部分蛋白质。电鳐和电鳗的电器官含有大量的烟碱受体^[8],它们提供了提纯受体的唯一现实的原料,这也说明了为什么这种蛋白质在许多实验室里都被分离成功。

2. 为了在粗抽提物检测这种蛋白,受体从膜上溶脱和分离后,必须保留其配体-结合专一性特征。在这一阶段,溶液中受体的浓度必须足以能用常规的配体-结合研究方法进行检测和定量。基于小配体对受体的高亲和力(如十烷基季铵)和高比放射性(氘标记至少1居里/毫摩尔),要求粗抽提物中可检测的受体浓度实际下限为 10^{-9} 摩尔。这个限度部分是由检测中高本底放射活性所决定的,因为检测是以小配体的可逆结合为基础。用降低本底的方法,可以满意地测出 10^{-11} 至 10^{-12} 摩尔浓度的受体。而降低本底的方法有:用递质的反应类似物进行共价标记^[88,89,96],或用被标记成极高比放射性的特异的和慢解离的大分子配体(如蛇毒神经毒素^[18,47,56,78])。

3. 应有一种快速、特异而又方便的离体检测受体的方法。这点转而需要配体在与受体

结合中具有相当高的特异性和亲和力,并可被标记为高比放射性的。由于大分子相互作用的高度特异性和放射性同位素容易引入蛋白质内,如果有了象蛇毒神经毒素那样一类化合物,那就提供了最灵敏和最有用的检测试剂。

4. 一般需要采用具有高分辨力的提纯蛋白的适当方法。毫无疑问,如果不用亲和层析法,大多数神经递质受体恐怕很难分离成功。为此目的,为了得到最合适而又便利的检测方法,仅具有配体对受体的高亲和力是不够的,还需要有配体-受体复合物解离速度缓慢这一条件。也就是说,从提纯观点来看,配体-受体复合物适宜的缓慢的解脱速度(off-rate),是一种比平衡解离常数本身更为重要的性质^[52]。

烟碱受体能满足上述所有条件。如已指出,电组织含有丰富的受体,在市场上可得到所需的数量。烟碱受体当用非离子去垢剂溶解后,仍保留其全部配体-结合特性。虽然烟碱受体有这些有利因素,但若不是 Chang 和 Lee^[9]发现银环蛇毒有麻痹性神经毒素的显著特性,它们还无法得到分离和提纯。这些毒素是小分子蛋白质(分子量 6,000~8,000)。它们作为强烈的箭毒碱制剂与神经肌肉接头处的烟碱受体形成复合物。虽然它们对受体的亲和力并不比某些小分子配体高,然而受体-毒素复合物的形成和解离都是慢反应,因此神经毒素是检测和提纯烟碱受体的理想的亲和试剂。

利用神经毒素的性质,已经设计了一种既方便又通用检测受体的方法。它是根据这一事实:即毒素是一个强阳离子性的小分子,它不与 DEAE-纤维素纸结合,而受体是强阴离子性的大分子,它决定受体-毒素复合物的性质,并可与 DEAE 牢固地结合。因此用 DEAE-纤维素纸所滞留的放射性毒素分子,全部是由于神经毒素-受体复合物所致的,并提供了一种测定制备物受体含量的方法。其他方法还有:受体-毒素复合物的选择性盐沉淀^[29]和用醋酸纤维素滤纸使这些复合物选择性滞留^[16]。然而,与 DEAE-滤纸检测法比较,这些方法就显得麻烦和不够灵敏了,而且它们在什么条件下使用还不很明确。

同样,在有些实验室里,他们利用神经毒素的有利性质来制备用于受体提纯的亲和层析柱^[19],并发展了可重复的方法用来常规制备以毫克量计的受体^[25,28,40,45,65]。还有些采用其它方法提纯胆碱受体的报道,他们不是采用含有固定的神经毒素柱的亲和层析法,而是采用另一种层析法,以含有季铵基团的树脂既作为阴离子交换剂,又作为乙酰胆碱结合部位的亲和配体^[5,10,39,64,78]。这种方法的成功最终还取决于用神经毒素作全面监控、检测和特性鉴定。

如果手头有相当数量可供使用的受体,又有方便的常规检测方法,就有可能鉴定受体的某些性质,和研究受体与神经毒素和受体与胆碱能小配体相互作用的某些细节。

提纯步骤

由于受体被认为有调节膜的一种称为离子通量的特殊性质,则假定受体嵌入于脂性的双层膜之内,也可能穿出于双层膜,因此,推断它直接与膜上脂质的疏水部分相互作用,并符合完整的膜蛋白的定义^[80],即在细胞分级分离过程中,仍同膜牢固地结合在一起。在多数的分离过程中,第一步往往是将整理过的电组织制成匀浆,接着是通过离心和洗涤回收膜碎片。虽然受体蛋白可用脱氧胆酸盐从膜碎片上提取,但这种去垢剂的阴离子特性对进一步提纯是不利的,而且受体在脱氧胆酸盐抽提物中的状态也不明确,特别是它几乎总是同膜脂质保持某种程度的结合。非离子性去垢剂,如: Tweens, Triton X-100, Nonidet-NP-40, Emulphogene(最后浓度为 0.5~1%)等都能使受体有效地溶解,便于进一步提纯和以后的

除去脂质。如果需要的话,所有受体基本上用两次这样的抽提就可全部回收。

在羟磷灰石柱上,用凝胶过滤,阴离子交换或亲和层析法,粗抽提物很容易被进一步分级分离,但在所有离析过程中必须有去垢剂。为了溶解从膜抽提出来的电鳐和电鳗受体,仍然绝对需有去垢剂,而且由于去垢剂在水介质中保持多聚胶束形式,看来被溶解的单个受体分子是混在富有去垢剂的胶束之中,而不是自由扩散到水相中去。有关去垢剂和受体分子组成胶束的其他发现还有:(1)当去垢剂的胶束浓度低于临界值时,受体不能再保留在溶液里;(2)在凝胶过滤中,发现有极大的表观分子量^[57,78]。因此,看来受体分子与吸附剂(如DEAE-纤维素)可能相互作用,并使它结合和介入用层析柱滞留其周围的去垢剂胶束。尽管有这种复杂性,但在层析柱上受体的行为与其他许多蛋白质没有什么根本的区别。

用固定的神经毒素作为层析的亲和试剂也遇到一些复杂问题,其中之一是受体-毒素复合物的解离速度。如果这种解离速度太慢,如在 α -银环蛇毒素^[12,59]或黑颈眼镜蛇 α -毒素^[64]情况下,分离柱上结合受体的回收率很低,甚至完全没有。相反的,如果解离速度太快,也就丧失了亲和层析的选择性和分辨力。眼镜蛇 α -神经毒素兼有慢速解离和易被竞争性小配体所置换的有利性质,因而可方便地用于受体的亲和层析^[46]。用氰的被溴化激活的葡聚糖作为连接亲和试剂的支柱所产生的第二个变通办法是,这种层析柱具有明显的阴离子交换能力。对受体来说,其本身是一强的阴离子,这样它在柱上的吸附,可能是由阴离子交换和亲和部位的结合所完成的。这可部分地说明个别报道提到的,以神经毒素为基础的分选过程之低产率的缘故。这种相互作用的综合,可能是烟碱受体层析法中季铵基团有效性的原因。在任何情况下,用上述的任何一个方法,再结合一个或几个已提及的附加方法,就能获得相当数量的高度提纯的受体。例如,在适宜的条件下,从电鳐和电鳗的电器官中所得到的受体,其最后产率可在5~50%范围之内,神经毒素-结合的比活性,为每毫克蛋白12毫微摩尔毒素。从哺乳动物肌肉中分离的烟碱受体值远比它低得多(即每毫克蛋白结合0.19~0.53毫微摩尔毒素^[6]),这表明哺乳动物受体,在提纯过程中更易于失活。

纯化的受体性质

从电鳐和电鳗中提纯的烟碱受体是对热不稳定的蛋白质。它们的氨基酸组成表明,这些蛋白质与乙酰胆碱酯酶有所不同,但不是很显著的,其疏水氨基酸含量高于平均水平,而半胱氨酸水平则相当低^[25,45,58]。

鉴于保持受体的可溶性,必须要有去垢剂,因此用通常的方法精确地测定其分子量,至今仍极困难。这是因为通常用来测定分子量的物理方法,部分依赖于测定所测溶质的粒子密度或粒子数。受体与去垢剂胶束相结合,势必影响受体的表观密度,何况每个胶束中受体数量也不知道。但是,水介质中去垢剂胶束的大小现已可精确测定^[82],预见不久的将来,用现有的物理方法可望得到分子量的正确估计。

我们可以确定受体分子量的可能上限小于380,000。这是以凝胶过滤所得的外观斯托克氏(Stoke)半径为根据的,它的自身最小数值为480,000,既然在同一浓度上,去垢剂胶束的表观分子量为100,000,那么受体所占的最多只有380,000。要正确估计受体分子量的可能下限更为困难。用测量渗透压,再用假设的去垢剂化学计量校正,所得出的数值为270,000^[64]。而在亚基的最大交叉连接后,根据SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳泳动度,测得的最小值为230,000^[5,86]。但后一种情况,结合的糖类和残存的去垢剂的影响均无法估及^[4,81,87,79]。

根据神经毒素和胆碱能配体结合的化学计量,最小分子量的粗略估计值为 180,000。这个数值是从眼镜蛇神经毒素每个结合部位的最小受体重量(分子量 90,000^[45])和从每个胆碱能小配体取代两个神经毒素残基这一事实得出的^[10,52,53,58]。

目前,分子量的不确定性也适用于亚基组成,这反映了,到目前为止,我们对受体蛋白的化学研究还是很有限的,也反映了制备方法的不同,以及用各种独立的方法去验证如受体纯度或均一性等重要参数的困难性。关于亚基结构,一般公认,受体含有一个亚基,它的表现分子量,在 SDS- β 巯基乙醇-聚丙烯酰胺凝胶电泳上为 $42,000 \pm 3,000$ ^[45]。具有这个电泳移动率的多肽链,不论在膜-结合和被溶解的受体中,都可用亲和配体共价标记,它也是至今所报道的所有纯化受体制剂的主要组分^[58]。表 1 列出了不同实验室所得出的观察范围。这些数值代表了在还原条件下,SDS-聚丙烯酰胺凝胶中各单个泳区带的表现分子量。

表 1 乙酰胆碱受体亚基的表现分子量

来 源	亚 基	参考文献
电鳗	40,000; 47,000; 53,000;	[75]
电鳗	39,000; 48,000; 58,000; 64,000; 100,000;	[86]
电鳗	40,000; 49,000; 60,000; 67,000	[74]
电鳗	40,000; 50,000; 65,000;	[71]
电鳗	38,000; 42,000	[33]
电鳗	45,000; 50,000	[32a]被33代替
电鳗	44,000; 50,000; 100,000	[5]
电鳗	45,000; 54,000; (90,000)	[36]
电鳗	48,000; 54,000; 60,000	[67],代替[51]
	110,000	[51]
电鳗	42,000; 54,000	[51]
电鳗	(26,000); 34,000; 42,000	[78]
电鳗	50,000	[45]
电鳗	34,000; 36,000; 39,000; 44,000	[65]

分子量系用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。划线的表示主要区带,括号内为次要区带。

此外,有两个实验室报道了有几个小于 39,000 的区带^[65,71],并推论在同一组织中可能有几种不同的受体蛋白质^[78]。

我们不能解释这种观察结果的多样性。但是,这些结果可能从某种程度上反映了各个制备的纯度和神经毒素结合能力,每摩尔神经毒素可与 90,000 至 360,000 克的受体结合。而且,不同的制备,可能经受了不同程度的蛋白水解过程。实际上 Patrick^[67]早已提示,任何表现分子量低于 48,000 的受体多肽,都是蛋白质降解的产物。

在缺乏关于受体蛋白质基本结构或物理数据的情况下,现在我们还无法对各个结果进行评价。例如,如果有氨基末端残基数和特性,以及胰蛋白酶的肽酶解图谱可供使用,则我们即可在有利的条件下得出天然受体蛋白质亚基结构的合理估计。当我们手中持有 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中各个多肽的可比较数据的资料时,就可立即揭示,到底是天然受体的完整无损的亚基还是部分降解产物。另一方面,甚至准确的分子量和配体结合化学计量相结合,能提供一整套极限条件,那么它们本身虽不是确诊性的,也有助于评定某些已报道的电泳图谱的意义和可靠性。由于缺乏所有这些数据,因此,我们对各种制备的纯度不能采用严格的标准,我们对受体大小和在每一分子中神经毒素或胆碱能配体的结合部位数也不能作出可靠估

计。这些缺陷无疑地在不久的将来会被弥补。

有些实验室曾报道^[88,89,71],受体与其他膜蛋白质相似,也为一种糖蛋白。这个结论是以下面的观察作为根据的:(1)受体在含有共价连接的伴刀豆球蛋白-A的琼脂糖层析柱上被吸附^[88,71],伴刀豆球蛋白-A是属于外源凝集素一类的物质,它能和特异的糖类残基强烈作用,因此常被用来鉴定糖蛋白;(2)某些糖类残基能在纯化受体的酸性水解产物中得到鉴定^[89];(3)某些结合的受体蛋白质,在SDS-聚丙烯酰胺凝胶中得到多糖染色的阳性结果^[71]。然而这些证据还不足以确证受体是糖蛋白。正如 Heilbronn 等^[88]所指出的,由于在受体提纯过程中,多次应用多糖层析柱,比如葡聚糖和纤维素,它们很可能提供糖类,因为葡萄糖在动物糖蛋白中从来没有发现过,而在受体的水解产物中恰被鉴定出来。此外,受体在琼脂糖-伴刀豆球蛋白-A 上的行为也是异常的,因为它既不完全吸附又不完全被过量的竞争性单糖所洗脱。因此在很大程度上还不能肯定,吸附是由受体上外源凝集素结合糖的亲合力,而不是由离子交换或其他机制所中介的。

配 体 结 合

方法和要求

使用不同纯度的可溶性物质,以及特殊制备物和膜结合体,研究了受体和各种配体的相互作用。由于受体对药物结合所产生反应是其生物学功能的中心环节,因此这里将作较详细的讨论。已表明有三类配体可同分离的烟碱受体作用,即蛇神经毒素,小的胆碱性激动剂和拮抗剂,以及局部麻醉剂。虽然局部麻醉剂的效应是颇有意义的,但现有资料很少,这里将不作进一步讨论。

有几种不同的方法可确定配体的结合。

平衡透析 虽然这种方法在理论上是严密的,但是它受到市场上供应的配体比放射性较低和许多其他不利条件的限制。

1. 市场上供应的透析膜的性质是相当多变的。因此,每一批透析膜对每一组实验条件和每一种蛋白质溶液都必须谨慎地加以校正。

2. 透析膜常直接吸收一些配体或蛋白质,或两者都被吸收,因此它们在适合使用之前,需要作多种形式的预处理。

3. 由于配体分子要透过膜的活动而达到平衡,故过程缓慢且费时间,在此期间蛋白质变性和(或)沉淀都可能发生。这种时间上的关系明显地限制了把这种方法应用到表观平衡状态,不能用来独立测定结合速度和解离速度,也不能对不同配体竞争结合进行动力学研究。虽然平衡可用不同方式的温和搅拌和增大膜表面与透析溶液的体积比率予以加速,但这两种方法也都会增加蛋白质的变性速度。溶解的烟碱受体,和去垢剂结合在一起,以一种不确定的胶束形式而存在,必须记住,由于胶束可与透析膜相互作用,使胶束结构有改变的可能,因此,用平衡透析法,在每次实验的开始和结束,必须精确测定活性受体的浓度。

4. 在蛋白质-配体相互作用的多数研究中,那些可被探测的实验变量范围受到蛋白质的实际含量,它的溶解度,和(或)蛋白质溶液的性质所限制。由于可应用的受体是有限的,平衡透析只能在很小的体积和受体浓度在毫微摩尔至微摩尔浓度范围内进行。由于结合配体的浓度必需在同样范围内测定,因此基本上只能使用放射性配体,而且比放射性必需是相当

高的。假如这些配体可从市场上得到,那么平衡解离常数的测量,需要在几个不同游离配体浓度中测定结合的配体。当与游离配体的结合率降低时,这种方法的“讯-噪比率”也随之降低,这样对所研究的配体浓度就可确立一个上限。另一方面,配体浓度越低,要监控它在透析池中的分布所要求的比放射性也就越高;随着比放射性的增高,放射分解率也大大提高,同时由几种非特异性因素所造成的放射性本底值也大大增高。所以,不管平衡透析法理论上多么严格,概念上多么明确,但它对研究受体配体相互作用的实用性是很有限的。

同荧光胆碱能小配体的竞争作用 这种方法原则上讲较为方便和通用,但多数荧光计对结合配体浓度低于 10^{-8} 摩尔的灵敏度受到限制。这自然要求使用大量的受体,从而在结合紧密的配体所需的低浓度时,限制了对配体结合的鉴定。

通过醋酸纤维素或 DEAE-纸圆盘过滤 这一方便而通用的方法取决于受体和滤纸圆盘紧密结合这一事实,而游离的配体不具有这种能力。因此,如果过滤一种含有受体和配体的混合液,任何与圆盘保持结合的配体可认为是同受体结合的一种复合物。实际上,由于圆盘基质中空隙的体积对吸附的受体量来说是相当大的,因此圆盘必须用相当大体积的缓冲液进行彻底洗涤,以降低任何游离配体的污染水平。由于洗涤过程需用几分钟时间,此时任何结合的配体能从受体上解离开来。这种类型的过滤方法仅适用于某些配体,如神经毒素,它的解离半寿期为数小时,而不是几分几秒。的确,神经毒素-受体结合和解离的缓慢速度,允许用滤纸圆盘试验直接和独立地测定反应的动力学和平衡常数。这一点极为重要,因为 K_D 值常能用平衡方法简便地测定,不过测量的有效性,只能由独立测量反映 $K_D = k_{off}/k_{on}$ 关系的速度常数才能予以验证。事实上,在这种特有的反应中,解离的半寿期可能在一周范围内,所以毒素受体解离的研究应在无菌条件下进行,用以防止微生物的污染和生长,同时要作慎密的对照实验,以排除潜在的伪迹。

毒素结合测定法,由于它的灵敏度和精确性,也是一个极好的研究低分子量配体竞争结合的工具。这种竞争可在几小时保温后处于平衡时进行计算,也可以用毒素结合的动力学测量加以计算。例如,胆碱能小配体同放射性标记的神经毒素的竞争,可通过测定使神经毒素结合的初始速度降低 50% (称为保护常数 K_{prot}) 的小配体浓度来研究。

为了严格应用这种方法,必须具备许多条件:

1. 反应须在一级反应条件下进行,其中神经毒素浓度大大超过有关游离受体。其所以必要,因为只有在一级反应条件下,神经毒素结合的初始速度与游离受体浓度之间呈简单的函数关系,即受体不被竞争的小配体所占据。
2. 毒素结合部位数和毒素与小配体之间竞争结合的部位数都必须知道。
3. 通过探测配体浓度范围,表明 K_{prot} 应与竞争小配体的浓度无关。如果部位对部位相互作用或连续反应发生,就不能保持 K_{prot} 与浓度无关。在这种情况下,这种分析方法就无法区分协同结合方式与并发反应的机制。在出现并发反应时,这个方法仍可被用来测定配体结合的许多参数,但是这种应用要比下述的普通结合检测更为费力。

最适于鉴定受体-配体相互作用所需的条件包括以下几个方面:

1. 配体的结合和解离,可在平衡时用动力学直接测定。如已指出,结合的解离速度的独立测定,对用平衡方法所得到结果的有效性,提供了一个理论上的有效检验。直接研究动力学参数,在概念上是研究受体-配体相互作用的捷径,因为它能排除象采用神经毒素或其他配体竞争这些间接方法潜在的大量伪迹和未经控制的变量。最后,一种合适的直接检验

受体-配体结合的方法,可能适宜采用一系列光谱方法,这种方法可对受体与药物结合所产生反应的机制和中间物进行逐一的分析。

2. 至少在5~95%的受体饱和度内都能观察到反应,因为它能检出结合方式和亲和力的改变,比如它们协同现象的特性,多种类型的结合部位和由结合配体调节的大分子的反应。这个观察范围也有助于与特定浓度范围内配体结合的专一现象,如构型的改变或亲和力的各别改变相联系,这对了解在生理条件下受体反应的基础是有意义的。

3. 复合物的解离常数应适合于所使用的监控方法,它在整个结合范围内允许有一个适宜的讯-噪比和不超过受体的溶解度或可用性。其所以重要,因为一个特定配体在相当于 K_D 浓度范围时,能进行最精确和有实验意义的测量,并能最方便地探测最大量的实验变量。

只有当烟碱激动剂与受体形成荧光复合物和它的结合亲和力在 $K_D \approx 10^{-8}$ 至 10^{-7} 摩尔范围时,才能满足上述所有这些条件,至今还没有这种可供使用的化合物。

数据处理

在药物-受体相互作用的实验分析和讨论中,许多内涵的和明确的设想常从通常的酶动力学方法中引出,尤其是应用与酶抑制有关的方法。但是这两个体系,在它们的内在特征和研究它们的实验条件上都有着显著差异,因此,对这两种相互作用概念上的探讨必须是独立进行的。酶体系的突出性质包括以下几点:(1)酶-底物复合物是在一级反应条件下形成的,即底物大大过量;酶-底物复合物的浓度,游离的和结合的酶之间的比值,以及配体在整个实验中保持稳定。(2)酶与小配体(不论是底物、抑制剂还是辅酶)的相互作用很少直接研究,各种复合物的性质是由酶催化速度推出,即从底物的使用率或产物的积累率推断出来。(3)酶体系几乎从来不在平衡条件下进行观察,也不在各种平衡状态或稳态的转变时期进行观察。

相反,(1)配体同受体结合,特别在生理条件下,常是在二级反应条件下发生的,并可达到平衡,而不是稳态;(2)总体而言,药物-受体复合物的转换率要比酶-底物转换率慢得多;(3)把一个竞争药物加入到药物-受体复合物中去时,对每一配体来说,结合受体和游离受体的比值是连续改变的,直至达到一个新的平衡,并且在考虑两次平衡状态之间的过渡时期的动力学时,必须考虑到每个配体的解离速度。如是,酶模型在很大程度上不适用于药物结合,或者它至少需要有重大的校正和受边界条件的限制。

此外,结合紧密的配体还会遇到一些特殊的问题。这一大类不仅包括象神经毒素那样解离速度极其缓慢的化合物,而且包括平衡解离常数低于 10^{-7} 摩尔的任何配体(如烟碱配体中的alloferin和十烷基季铵)。关于酶的某些困难,Cha^[8]已作了出色的分析,他的叙述一般也适用于药物-受体相互作用。

研究牢固结合物时,必须考虑两个因素。第一,不可忽视由于结合而使游离配体耗竭;第二,结合和解离,两者都可能慢到以致不能应用经典的酶稳态动力学。如果解离常数不太低,即大体为 10^{-7} 摩尔或更高些,则反应体系可在接近稳态条件下研究。但是,如果酶的浓度和抑制剂浓度为同样的数量级,那么即使反应是在准稳态条件下进行的,经典的稳态速度方程也不能应用。在这种场合,使用上述几个方程中的一个时,必须考虑游离酶和游离抑制剂的耗竭。

如果配体是一个具有极低解离常数(10^{-9} 摩尔或更小)的牢固结合物,就不能使用稳态

动力学。例如,如果把酶加到含有底物和低浓度的强烈抑制剂的反应混合液中去,使之反应开始,那么,早在酶和抑制剂之间达到稳态之前,相当数量的底物可能已转变成产物。即使底物耗竭得并不太多,抑制的程度和时间也明显有关,即反应速度随着酶-抑制剂复合物浓度的增加而逐渐降低。在这种场合,“初始速度”这一名词就变得毫无意义。如果有人坚持抑制反应的初始速度的经典概念,并以某种随意方式测定“初始速度”,如用最初二分钟内底物的消耗量来计算初始速度,然后试图用双倒数作图法来分析数据,那么,不仅许多数据无法解释,而且从这些数据中引出的任何结论都可能是错误的。总之,正确评价抑制机理如果不是不可能的话也将是困难的。

Cha 引述的许多问题,可用平衡测量法加以解决。但这些方法将使阐明结合机制的实验机会受到限制。例如,考虑一个含有受体并原先已同特定的配体(A)保持平衡的溶液,加入第二个竞争配体(B)。经过适当的时间,这个体系将达到一个新的热力学平衡终点,其中游离的和结合的受体以及配体的浓度势必反映受体对相应配体的亲和力。从原先平衡到最后平衡的过渡期,通过几种不同途径(包括下列的,但又不受此限)中的任何一种,第二个竞争配体的结合都可能产生。

1. 只有当受体从配体A解离出来呈游离状态时才能够和B结合,并且两者呈函数关系。

2. B可能和原先形成的受体和A复合物相结合,成为一个三元复合物(A-受体-B),A或B各自可以从这三元复合物中解离出来,在加入B后可能加速或可能不加速原来复合物(受体-A)的解离速度。如果我们能观察到受体的转换和各个配体的结合,并由此决定其相应的结合和解离速度常数,那么我们就提出和验证结合模式以及受体对各类配体反应的可能机制。另一方面,如果我们局限于测量反映在反应的终点时各个组分分配的平衡,那么我们只能验证每一配体各自被测定的亲和常数实际上是正确的(进一步详述可见[8,15,30,44])。

由于直至晚近对受体的研究才刚开始,因此对分析受体-配体相互作用,还没有发展出象酶学中所应用的丰富的数据处理方法。在[23]的附录中,我们以最少量的假定为基础,提出了一个简单的定量处理方法。它可用来作为设计分析受体-配体相互作用的实验指导。我们首先详细地叙述了神经毒素-受体相互作用的特征,然后用它作为胆碱能小配体结合的探测器。为了分析我们的结果,我们根据神经毒素和配体之间相互排斥的竞争结合的最简单模型,提出了一组方程。通过一系列的独立测量,证明我们的假定是有效的(对这些问题的其他处理方法见[17,84])。

与神经毒素的相互作用

神经毒素同烟碱受体的结合常被说成是“不可逆的”,但是这种不可逆只是外表而非实在。各个神经毒素一旦与受体相结合,它们能以极缓慢的速度解离,其半寿期超过150小时;因此从一般生理实验的时间标尺来看,结合反应似乎是不可逆的,而实际上,复合物精确地按平衡理论所预期的速度解离。应用电生理学方法,C.Y.Lee(个人通讯)观察了几种神经毒素对各种动物神经肌肉接头的效应,并确定了表观可逆性的程度是特定毒素和特异受体的函数。同某一种动物受体形成不可逆复合物的神经毒素,可迅速地从与之有关的而不同种属动物的受体上解离。有意义的是,可逆方式似乎反映了捕食者和食饵关系的进化因素,因为某一种蛇的神经毒素倾向于同构成其天然食饵的特定两栖类受体结合得最牢固或不可

逆。这些观察指出,神经毒素的多样性,为研究单一受体的反应和配体结合的性质,提供了一整套多用途的工具;它们也着重指出,对每种毒素所形成的复合物,必须进行仔细的鉴定。

在烟碱受体研究中,使用了三种单独的神经毒素。最广泛使用的是 α -银环蛇毒素^[1,9,13,48,49,59],但是除了其显著的专一性和高亲和力外,它与受体的相互作用特点也许是三种神经毒素中知道得最少的。 α -银环蛇毒素的连接速度(on-rate)可用来监控胆碱能小配体的竞争作用^[61]。据报道 α -银环蛇毒素本身反应是很复杂的,它包括快速和可逆的以及慢速和不可逆的成分,这些成分的相互转化使小配体竞争研究的分析变得复杂化^[7,84]。此外,在小配体存在时, α -银环蛇毒素-受体复合物的解离也没有研究过;不论存在小配体与否,对这种反应还没有作过任何平衡研究。因此尚有许多悬而未决的问题。 α -银环蛇毒素从受体复合物上解离仅在发育和鸡胚肌肉培养物中测定过,发现解离的半寿期为3~15天,这一数值可与其他神经毒素相比较。

用取自电鳗电器官的膜碎片研究了由黑颈眼镜蛇 α -神经毒素所形成的受体复合物^[84]。凭借放射性毒素的结合,测得正向二级反应速度常数为 $k_2 = 2 \times 10^7$ /分。而一级解离,是在大为过量的非放射毒素中而不是用稀释的方法进行,求得单一的斜率 $k_1 = 2 \times 10^{-4}$ /分。从这些数据中得出解离常数 $k_D = 2 \times 10^{-11}$ 摩尔^[84]。

用严密的化学方法详细研究过的第三个系统是眼镜蛇(*Naja, naja siamensis*) α -神经毒素和电鳗受体之间的作用,这将在下面加以叙述^[52]。

这种反应有意义之处是它可作为激素-受体相互作用的一种可能模型。它既复杂又不完全被理解,但是缓慢的正向和逆向反应对研究是很有用的,它能使某些中间步骤得以证实。

导致复合物生成的正向反应是缓慢的,但也不是异常缓慢。如图1A所示,在多于2个半寿期的反应时间内,复合物生成的实验观察值符合于可逆的二级反应的理论方程。

有两种方法可用来测定受体-毒素复合物的解离速度:原先形成的放射性复合物,或者是(1)用标准缓冲液稀释200倍;或者是(2)用大大过量(500~5000倍)的未标记毒素保温,经过不同的保温时间,测定剩余的放射性复合物的浓度。图2表示稀释实验的结果。动力学曲线由两个不同组分组成,较快组分($k_1 = 2.0 \times 10^{-8}$ /分)令人满意地相当于解离常数 K_D 与连接速度常数 k_2 的积(这里 K_D 用双倒数作图测定^[46,52])。在过量未标记的毒素存在时,测定解脱速度(off-rate)可得类似的结果,只是缓慢的组分现在变得快了一些(τ 值为40小时数量级,通常用简单稀释法为近100小时)。下面结果提供了有关两类复合物性质的补充证据,并且表明这些复合物的存在与受体被神经毒素饱和的程度有关。

1. 如果在受体过量条件下形成复合物,然后在不进一步增加毒素的情况下进行稀释,所观察到的只是一种单指数(图1B)。除了表明神经毒素的均一性之外,它也得出解离速度常数 $k_1 = 1.4 \times 10^{-4}$ /分, $\tau = 83$ 小时。知道 k_2 值,就可得到 $K_D = 3.3 \times 10^{-11}$ 摩尔。这个长寿的、高亲和力复合物用 $(RT)^*$ 来表示。

2. 上述实验也可通过两个各别的修改而完成。第一,稀释前加入足以饱和受体的标记或未标记的毒素;第二,在促使复合物生成的保温期末,加入大大过量的未标记的毒素。这样都能得到双相解离模型。因此,在低饱和时得到一个慢指数,第二部分仅在高饱和时出现。较快解离的种类($k_1 = 4 \times 10^{-8}$ /分, $\tau = 3$ 小时, $K_D = 6 \times 10^{-10}M$),以 (RT) 来表示。

3. (RT) 和 $(RT)^*$ 两种复合物的差别仅是结合毒素的解脱速度不同。当受体以过量

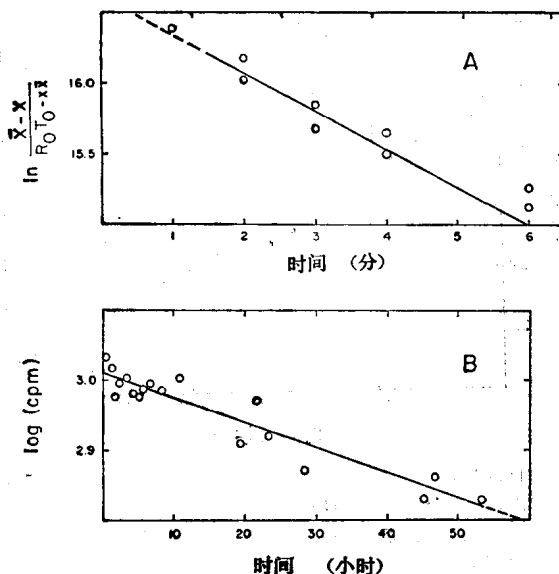


图1 低的受体饱和度的 $[^3\text{H}]$ 神经毒素-受体复合物形成(A)和解离(B)的动力学。A: 连接速度。反应的总体积为1.105毫升,在指定时间之后,取出0.15毫升,随后用含有0.5毫克的未标记溶液稀释以终止反应。然后测定这部分中受体- $[^3\text{H}]$ 神经毒素复合物的含量。受体浓度 $R_0 = 6.33 \times 10^{-8}$ 摩尔,毒素浓度 $T_0 = 1.45 \times 10^{-8}$ 摩尔,60分钟后从实验点计算求得最后的受体-毒素复合物平衡浓度 $\bar{x} = 1.43 \times 10^{-8}$ 摩尔。由图1A中斜率求得二级反应速度常数 $k_2 = 4.3 \times 10^8$ 摩尔 $^{-1}$ /分。第一半寿期 $\tau = 2.54$ 分,速度定律 $k_2 = 1/t [\bar{x}/\bar{x}^2 - R_0 T_0] [\ln(\bar{x} - x)/R_0 T_0 - \bar{x}x) + \ln(R_0 T_0/\bar{x})]$ 。B: 解脱速度。总体积为6.05毫升时,受体(2.6×10^{-8} 摩尔)和 $[^3\text{H}]$ 神经毒素(3.64×10^{-8} 摩尔)在25℃保温95分钟,加入1,000毫升缓冲液,在指定时间里取50毫升,分析剩余的受体-毒素复合物的含量。从图1B的斜率,算得一级反应速度 $k_1 = 1.4 \times 10^{-4}$ /分。从图1A k_2 和图1B的 k_1 ,算得解离常数 $K_D = 3.3 \times 10^{-11}$ 摩尔。

10倍形成复合物(只导致 RT^* 的生成)时,正向二级反应速度常数,与反应在大于95%饱和度和时所得到的相同。

4. 当原先结合的毒素分子以低速(RT)*从未完全饱和受体解离时,也能得到上述结果。更多毒素的相继结合可使速度增加。解离速度的改变(即先存复合物性质的改变)在持续约3小时的保温期间出现,而(RT)*解离半寿期超过100小时。由此得出结论,原先结合残基亲和力的改变,可在没有复合物解离的情况下发生[即(RT)*直接转变为(RT)]。

5. 很有意义的一点是,发现长时间保温时快速解离组分和慢速解离组分的相对比例可发生变化。这可以在未标记毒素解离前,保温事先形成的复合物得到证实。增加预保温时间(1.6~18小时),在减少快速解离组分的条件下,使第二个慢组分逐渐增加。如图3A中可见,第一个快速组分百分率的对数是预保温时间的线性函数。这表明以慢组分代替快速组分是一个一级反应过程,从其斜率得出的半寿期 $\tau = 30$ 小时。直线外推至0时表明,在游离受体和神经毒素最初作用期间,两种组分的形成是平行的,数量也是相仿的。因此,虽然快速解离组分(RT)*是一个潜在的前体,但在形成慢组分(RT)*中的一个必要中间物。

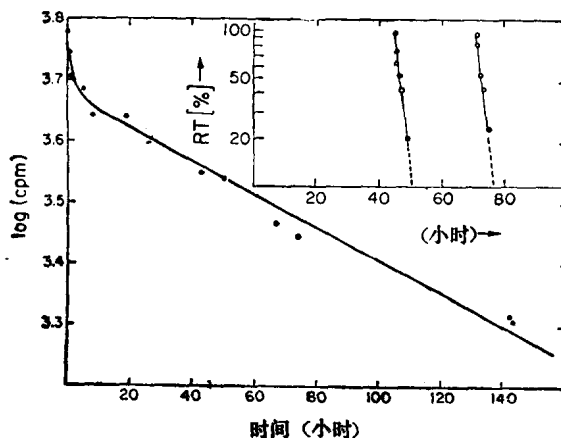


图2 $[^3\text{H}]$ 毒素-受体复合物的解离。在总体积为2.07毫升中,受体 (2.66×10^{-8} 摩尔)和 $[^3\text{H}]$ 神经毒素(4.12×10^{-8} 摩尔)在25℃保温30分钟,随后加入250毫升25℃的缓冲液,在指定时间取出10毫升,并分析剩余的毒素-受体复合物的含量。稀释前后,分别计算求得平衡浓度为 2.52×10^{-8} 摩尔和 5.3×10^{-11} 摩尔。快速组分(对慢速组分的作用校正后) $k_1 = 4 \times 10^{-5}/\text{分}$ ($\tau = 3$ 小时),慢速组分 $k_1 = 9 \times 10^{-5}/\text{分}$ ($\tau = 125$ 小时)。插图:在含有氯化十烷基季铵时的解离速度在45小时和71小时后,分别取50毫升的初始反应混合液(见上面)同60毫升 2.65×10^{-3} 摩尔的氯化十烷基季铵溶液混匀,在指定的时间里取20毫升,用过滤法加以分析。剩余的受体毒素复合物浓度被规定为100%。
 $k_1(\text{十烷基季铵}) = 6.6 \times 10^{-5}/\text{分}$, $\tau = 1.75$ 小时。

这些发现提示,受体对神经毒素的亲合力可作为保温时间的函数而改变,并可由测定不同保温时间的解离常数加以测试。如所预期的, K_D 随时间增加而降低(图3B),半对数表示法表明,这过程是一级反应,它的半寿期 $\tau = 30$ 小时,这刚好同 (RT) 转变成 $(RT)^*$ 的半寿期相吻合(图3A)。

神经毒素-受体复合物的两阶段解离动力学,同不太详细报道的雌激素,胰岛素与它们各自受体所形成复合物的情况相似^[20,77],所以这种模型具有普遍意义。在用神经毒素部分饱和之后,受体亲合力增加极慢,这一点也很有意思;如果确实传递这种行为的构象改变在活体也在同样时间内发生,那么它们可能有助于突触延搁和功效的调节。

可从受体-毒素复合物的性质,得出一种两阶段解离现象(图2和3)的分子解释:(1) (RT) 和 $(RT)^*$ 可互变的;(2)正向二级反应速度常数在整个受体饱和范围内相同,并提示所有结合部位在结构上也相同;(3)当受体用神经毒素快速饱和时, (RT) 和 $(RT)^*$ 最初浓度相等;(4)对每个结合的配体分子来说,多数胆碱能配体可取代二个毒素分子。

我们假设,游离受体的毒素结合部位最初由均一的 R 组成。从上述(2)和(3)中,我们提出,如果毒素结合部位是紧密相邻的,一对相同的组成部分,其中任何一个都可以随机地与一个毒素分子生成 $(RT)^*$ 起作用。这种在一对部位中的一个结合毒素的邻近性,可以暂时地限制第二个生成低亲合力复合物的结合。从脉冲追踪实验表明,最初结合的分子随机地相继解离。由此得出结论,具有每一对饱和的结合部位特性的两个亲合力,在两个结合毒素残基之间摆动。在最初饱和之后,一个缓慢发展的构象改变,使两个毒素以相等的高亲合力结合在每一对结合部位上。因此,根据毒素的结合,随着受体从最初单一的游离态 R 开始,