

生物科学参考资料

第二十四集

科学出版社

内 容 简 介

本集共选译了最近两年来有关受体研究的进展和药理方面的综述性文章。其主要内容着重介绍研究受体的方法、受体研究与新药发现的关系、用受体学说阐明药物的药理作用以及拟议中的受体,如P物质受体、白三烯类受体、转铁蛋白受体的研究动向等问题。对阿片受体、肾上腺素能受体及胰岛素受体的研究近况也作了详细介绍。可供生物学、生理学、药理学工作者、高等医学院校有关专业师生及临床医生参考。

生物科学参考资料

第二十四集

责任编辑 吴爱珍

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1987年10月第一版 开本:787×1092 1/16

1987年10月第一次印刷 印张:14

印数:0001—1,700 字数:322,000

统一书号:14031·117

本社书号:5265·14

定价: 3.35 元

译 者 的 话

近年来受体研究的进展十分迅速,随着放射性配体受体结合法的应用,对受体的分布、数量和性能的研究取得了广泛而深入的进展,新的受体种类的发现也日趋增多。对受体多型性的研究,使人们研制成功了一些作用于不同亚型受体的特异性药物,为临床增添了新药。受体数目及其调节功能的异常和某些疾病发生的关系问题亦越来越受到人们的重视。总之,受体的研究已成为当前国内外的重要研究课题之一。

为便于广大的科技工作者能了解受体方面的研究近况,我们组织翻译了近两年来有关的综述性论文,以供参考。

本集由暨南大学医学院、中山医科大学的陈芷芳、黄永楷、颜光美、张振、王建刚翻译;潘文正、潘启超、马润泉、王子栋、黄永楷校对,罗潜审阅。

由于本集内容涉及的知识面较广,又限于我们的业务水平,译文中有不妥或错误之处,恳请读者批评指正。

译 者

1985年10月于广州

目 录

结合研究中确定受体部位的标准·····	1
神经递质受体的结合和新药的发现·····	10
受体的轴突运输：与神经递质共存和再循环·····	18
膜受体调节作用的机制·····	26
人体肾上腺素能受体·····	39
心脏的 β 肾上腺素能受体·····	56
脑中阿片受体的分布和生理意义·····	65
阿片受体的分类·····	74
阿片受体的分子特性·····	84
阿片类，第二信使和细胞反应·····	98
类固醇受体的药理学：从分子与细胞研究到高效抗激素药物·····	108
类固醇受体和激素的作用：生理性和合成的雄激素类和孕激素类可介导非相应的 生物效应·····	117
胰岛素受体：结构和功能·····	128
白三烯类的药理学受体·····	136
拟议中的P物质受体亚型是P物质受体吗？·····	142
在细胞水平上检测组胺受体·····	152
血管的5-羟色胺受体——与5-HT ₁ 和5-HT ₂ 结合受点的相互关系·····	157
转铁蛋白受体：结构和功能·····	163
细胞内钠、膜受体和高血压关联的假说·····	172
嘌呤能神经传递和神经调节·····	176
钙通道抑制剂的作用部位·····	185
烟碱型乙酰胆碱受体·····	197

结合研究中确定受体部位的标准

结合研究,特别是引进滤过技术及出现高效价标记配体以来,正成为热门课题。结合检定法是容易的,或者可以说是很容易操作,但对其结果的解释却仍是相当复杂的,这就是许多争论的来源。其理由相当简单:因为没有生化标准去评价结合的特异性,即用以确定结合部位真正与受体部位相对应。与此相反,在酶学上反应产物的证实,一般就足以证明酶反应的本质。即使以动力学分析、Scatchard 或 Hill 图解、饱和度及可逆性等仍不足以证明结合部位即是受体部位。

如作者已在另一文中指出^[1],当人们开始任何的结合研究时,应清醒地记住下述两个假设:首先,结合部位与受体部位之间不是等效的,许多配体标记的部位与受体无关;第2是受体均一性的假设提出受体部位是均一的,因此在身体的所有部分都是同样的。这是工作假说,但作者认为是相当有效的,因为这样迫使我们更仔细地检查某些诱惑人的或反常的结果的理由,而不会被诱入多种部位的圈套。事实上结合研究已产生令人印象深刻的许多“受体亚型”,这些亚型一般是相应于可被取代的结合部位,但与生理受体是完全无关的。

我试图确定称为神经传递中的受体概念,这是与受体部位的概念相反的。然后我们将提出把结合部位作为受体部位的标准,最后(但不是只限于)将讨论结合研究中的某些常犯的主要错误。在其后的一篇文章中,Zenon Bacq^[2]重述了法国作曲家 Maurice Ravel 的故事,他要求其同事 Georges Auric 与他合写一篇关于管弦乐的论文,用大量的例子显示哪一些应该避免的;Bacq 认为这是很好的想法,因为失败常常较成功更有指导性,因为当人们认识它的产生时,即指出其错误的地方。

怎样确定一个受体?

受体一词已被许多科学家以许多不同的意义应用,实际上不可能提出一个能把涉及受体在内的整个生物过程完全包括在内的单一定义,甚至烟碱受体亦与孕酮受体有显著不同。但是,毫无疑问,这一个术语在许多方面已被滥用。例如 LDL 受体应是接受部位,而不应称为受体。事实上,并无信号从结合部位进入细胞内部。分子的入胞作用并不都需要受体中介的,过氧化酶不结合特异的受体。在二十世纪早期 John Newport Langley^[3]首先提出受体的定义。在研究烟碱及箭毒对肌肉收缩的过程,Langley 认为两者必须在相同的“接受物质”或受体作竞争。这种接受物质的正常功能是把刺激从神经传向肌肉。因此,根据此定义,受体是激动剂与拮抗剂竞争的部位,激动剂通过一种仍未能解释的机制产生的刺激导致一种生理反应。如图 1 所示,受体应含有 3 个过程,而接受部位仅是一个结合点,并无信号传递,因此不产生生理反应。通常把由神经递质产生的 cAMP 增加视为生理反应,这是很容易在试管内测定到的。事实上,cAMP 是与有关生理反应所必需的

生化效应。因为由一种神经递质所刺激或抑制的酶（在本例子中酶就是腺苷酸环化酶），并不能证明这种过程包括在神经传递过程内。如果相反过程是正确的话，人们可以考虑酪氨酸羟化酶作为一个受体，因为多巴胺及去甲肾上腺素等神经递质抑制此酶。

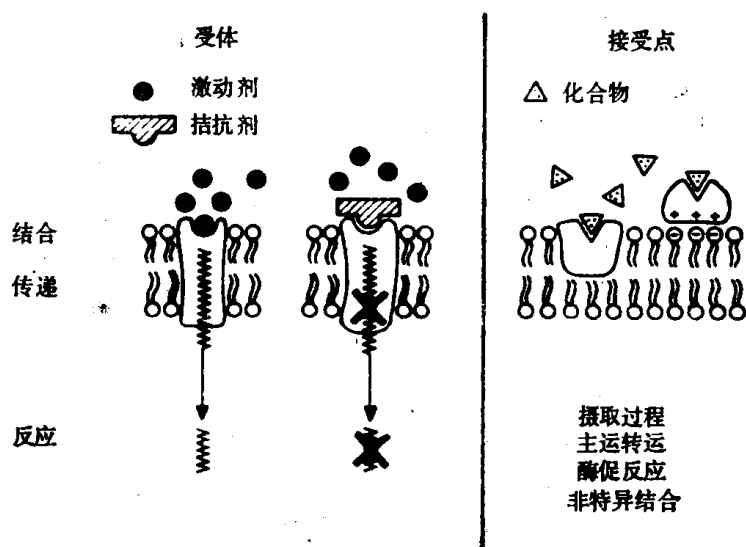


图1 受体部位与结合部位的图解

显然，生理及药理反应是确定一个受体的基本要求，结合研究还要求多方面途径，这不是新问题。从事受体领域工作的先驱者，他们从鱼的电器官分离胆碱受体亦面临同样的难题，正如 Changeux^[4] 所说：“另一个严格的要求是要确定在‘简化’系统的全部阶段是否被分离的结构均具生理意义。换言之，在每一步（包括结合至膜、溶解、纯化、分离亚单位等）均需在一个平行的、系统化的模式上进行生化及生理（药理）的实验”。

参与神经传递的受体对内源性神经递质的亲和力低，但此递质大量释放入突触间隙。相反，激素对其受体的亲和力高，但其血浓度相对的低。同样，内源性神经递质的拮抗剂的作用类似于激素，血浓度低，但对受体的亲和力高。这可解释为什么一般用强的拮抗剂作为标记神经递质受体的配体。

作为确定受体部位的特殊标准

最近^[5]，我们提出有特异性的标准，表1列出其不同的次序。在当时根据古典观念^[6]，首先提出生化标准（高亲和力、可逆性、立体特异性、饱和性……等）。由于这些标准远非决定性的，但这些标准对受体部位也是有价值的。现在以新的次序提出这些标准，并更强调那些认为是最重要和更具有决定性的标准——药物替代与药理活性相关的。仅当这几点得到满足后，结合部位才可称为受体部位。

药物替代包括在体外用结合检定法去测定各种药物（包括激动药与拮抗药）的亲和力，这些药物归于不同的药理分类，但作为标记的配体具有相同的药理学特性。当人们去建立一个结合检定法时，需要做的第一件事（肯定是在进行 Scatchard 分析以前）是小心检查药物替代标准。当报道以 ³H-甲氟咪胺标记组织胺 H₂ 受体时^[7,8]，我们决定去检查结合实验。第一天，以未标记的甲氟咪胺、甲硫咪胺及丁咪胺作替换曲线。第2天把雷尼

表1 受体部位的特殊标准

1. 药物替换(激动剂与拮抗剂属于不同的化学及药理类型)
2. 药物的体外亲和力与体内药理活性的相关性
3. 区域分布或组织特异性
4. 亚细胞分布
5. 立体特异性
6. 饱和性
7. 可逆性
8. 高亲和力

替丁(ranitidine)亦列入替换剂中。奇怪的是,早已认为在药理试验上较甲氰咪胺强10倍的雷尼替丁在结合检定上不与 ^3H -甲氰咪胺竞争。从更多的研究,现已明确证明甲氰咪胺仅结合于咪唑辨认点上,而 ^3H -甲氰咪胺则结合于咪喃辨认点上,两者的竞争与 H_2 受体无关^[9-11]。当一种配体成为无任何生理意义时,常常仍有人提出新的受体亚型,如想象的可乐宁敏感的 H_2 受体^[12]。最近发现 ^3H -硫替丁(tiotidine)是具有较特异性标记 H_2 受体的配体^[13]。

需要采用属于不同化学系列的药物进行解释的另一例子,是用 ^3H -去甲丙咪嗪作结合实验。图2示6种化合物对 ^3H -去甲丙咪嗪结合与去甲肾上腺素摄取的 IC_{50} 值。根据是否在这两系统中等效或在结合上较摄取的活性有所差异而把这些药物分为三类。丙咪嗪、去甲丙咪嗪属第一类,即是在两种试验系统中其 IC_{50} 值实际上是相同。相反,氯丙咪嗪对 ^3H -去甲丙咪嗪结合的影响大于对去甲肾上腺素的摄取。尽管它不是抗抑郁药,但它对 ^3H -去甲丙咪嗪结合的影响较丙咪嗪强。第三类则是对去甲肾上腺素摄取的影响更

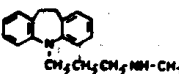
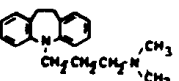
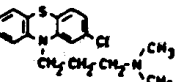
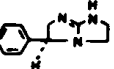
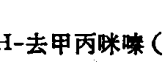
		IC_{50} (nmol/L)	
		^3H -DMI结合	NA摄取
去甲丙咪嗪		30	20
丙咪嗪		360	790
氯丙咪嗪		130	1,800
L-依咪吩		700	30
D-依咪吩		1,400	2
(+)-苯丙胺		12,000	70

图2 各种药物对 ^3H -去甲丙咪嗪(^3H -DMI)与去甲肾上腺素(NA)摄取的作用

强的,如依咪吩(imafen)的D-对映体对去甲肾上腺素摄取的影响较对结合的影响强1,000倍。这是很奇怪的,因依咪吩作为利血平试验的眼睑下垂的拮抗药与去甲丙咪嗪几乎相等^[14]。在去甲肾上腺素摄取试验上观察到的、对依咪吩的对映体的立体特异性则不见于结合检定上。在两种体外试验上的这种矛盾,亦见用苯异丙胺所观察到的。已发现苯异丙胺作为去甲肾上腺素摄取的阻断剂较作为 ^3H -去甲丙咪嗪的取代剂强200倍。因

此可以得出, ^3H -去甲丙咪嗪的结合不象以前不同研究组提出的是与去甲肾上腺素摄取有特殊关系的结论^[15-17], 此结合只不过仅发现三环药物的辨认部位而已。我们近来进行的分部研究与这种缺乏特异性相符^[18]。同样, 已报道作为 5-羟色胺结合部位的拮抗剂配体的 ^3H -四氢三唑酮, 肯定也不是特异性 5-羟色胺的结合部位, 因为去甲肾上腺素较 5-羟色胺具有较大的活性^[19]。

事实上, 在结合研究上, 最主要的错误之一是相信替代性结合是特异的, 因而与受体部位有关。对替换曲线的解释必须小心, 如果结合部位可以阿托品或右旋苯哌酮 (dextimide) 所替代, 但不被纳克范围的左旋苯哌酮 (levitimide) 所取代, 那么关于这些结合部位的毒蕈碱特性是不可否认的。相反, 当阿托品与右旋苯哌酮的 IC_{50} 值约为 10^{-6}mol/L 时, 则它们肯定不能发现毒蕈碱 (M) 受体部位^[20-22]。

如前所述, 无生理或药理反应是不存在受体的。当在体外获得药物替换特性时, 则必须比较在结合检定上发现的, 药物亲和力与在体内或体外进行的药理学试验上获得的药物强度的关系。在体外的药理试验可能获得最好的相互关系, 因为两者均是在体外进行的试验。最近报告的 ^3H -克羟色宁 (ketanserin) 对 5-羟色胺 S_2 受体的结合与 5-羟色胺引起大鼠尾动脉血管收缩之间的关系, 是这种相关性的最好例子^[23]。令人惊奇的是当进行体内药理试验时, 如色胺引起的阵挛性惊厥发作或三甲氧苯乙胺 (mescaline) 引起的头抽动, 这种相互关系仍保持高度显著性。这种出乎意料的事实, 是由于试验药物的药物动力学特性不同以及试验药在脑内的分布不一致引起的。对于多巴胺受体的 D_2 部位同样亦是真实的。超过 17 种药理的、行为的及生化指标与至少 20 种化合物在体外与 ^3H -氟哌啶醇作结合检定获得的 IC_{50} 值有很好的相关^[1]。相反, 对于 D_1 部位 (多巴胺敏感的腺苷酸环化酶) 以及 D_3 部位都是完全缺乏相关关系的, D_3 部位是儿茶酚衍生物的接受部位。因此可以认为仅 D_2 部位是多巴胺的生理受体部位。

必须指出, 应小心解释相关关系; 有时候相关可能是假阳性, 因为所试药物的种类太少或存在二群化合物; 一群是有效的 (IC_{50} 值在 10 与 100nmol/L 之间); 另一群是无效的 (IC_{50} 值在 1,000 nmol/L 以上)。无可置疑, 相关关系是极有用的, 甚至基本上可以确定结合部位是否可称为受体位置。

多巴胺及 5-羟色胺受体的区域性分布特别得到证明, 这些受体特异地局限于脑的几个区域。正如作者们最近指出的^[19], 当在肝内的结合部位的数目如在脑内那样多时, 人们肯定不会认为这些部位与 5-羟色胺 S_1 部位有关。

在结合研究上的某些问题

毫不夸大地说, 在结合研究上遇到的问题是围绕一个基本的问题: 即是怎样可以把特异性结合 (即与受体有关的结合) 与非特异性结合相区别; 非特异性结合中包括受体或辨认部位。当解释体外的结合研究时这是极困难的。事实上人们必须说明不同的因素, 如配体本身 (特异性与亲和力)、所用物质的异源性 (如膜, 完整细胞等……)、可取代或不可取代的结合之间的比例或平衡、实验的条件 (温度, 缓冲液, 离子等……), “特异性”结合的生理关系等。让我们分别检查这些方面。

配体缺乏特异性

按理,一个配体是指能特异地标记一个特定的受体部位;有时可以标记两个不同的受体部位——如螺哌隆 (spiperone)——但在这里可采用选择性替换药或单纯用不同的脑区域的方法来达到。但是,许多配体未达到足够的选择性,例如氯丙嗪可与 5 种不同的受体部位结合。非选择性配体的一个很好的例子是 ^3H -丙咪嗪。表 2 列出丙咪嗪对肾上腺素及 5-羟色胺摄取、组胺 H_1 受体及 5-羟色胺 S_2 受体部位的亲和力。令人惊奇的是,丙咪嗪对

表 2 丙咪嗪在各种体外生化模型上的强度

	IC ₅₀ 值 (nmol/L)
^3H -去甲肾上腺素的摄取	46 ¹⁾ 20 ²⁾
^3H 5-羟色胺摄取	550 ¹⁾ 240 ²⁾
^3H -新安替根的结合 (H_1)	63
^3H -WB 4101 的结合 (α_1)	300
^3H -螺哌隆的结合 (S_2)	100

1) 来自参考文献 24; 2) 取自参考文献 25。

去甲肾上腺素的摄取及 H_1 与 S_2 部位的活性大于作为 5-羟色胺重摄取的阻断剂。所以不能奢望 ^3H -丙咪嗪特异地标记 5-羟色胺的摄取部位。事实上许多方面支持这一观点。首先已发现在 ^3H -丙咪嗪的结合研究上,新安替根 (pyrilamine) 及酚妥拉明是强的替代剂^[26]。同样,一种强的 5-羟色胺重摄取阻断剂——齐美利啉 (zimelidine) 对 ^3H -丙咪嗪与人血小板的结合活性低,甚至比新安替根及氯丙嗪低,据我所知,这些药物不是抗抑郁药^[27]。其次,有大量证据表明 5-羟色胺的摄取与 ^3H -丙咪嗪的结合部位不是相同的分子部位。发现患酒精中毒性肝硬化的病人,其血小板摄取 5-羟色胺显著减少,但与对照的志愿者相比则 ^3H -丙咪嗪的结合无改变^[28]。在大鼠的脑亦观察到结合与摄取之间的这种矛盾^[29]。当个体发育时,这两者均有显著不同^[30]。在我们研究的亚细胞分部上,5-羟色胺的摄取主要发现于线粒体(M 及人)部分,而 ^3H -丙咪嗪的结合主要集中在核的部分^[31],表明占据两个不同的实体。后来的研究虽然未完全证实我们的结果^[31,32],但亦无找到此两个实体的理想的亚细胞轮廓。事实上这些研究更增强了关于 ^3H -丙咪嗪结合缺乏特异性的想法。首先,大部分的 ^3H -丙咪嗪的部位发现于微粒体部分,奇怪的是给予 5, 7-二羟色胺作化学去神经后,它从微粒体的消失较从线粒体的多^[33]。而且化学去神经后, ^3H -丙咪嗪的结合减少 36%, 而 90% 以上的色胺能神经原消失。在第 2 个研究上,没有使用标记酶以区分亚细胞部位 (由此不能称此实验为亚细胞分部); 而且髓磷脂及线粒体部分定位在错误的位置上,亦发现 ^3H -丙咪嗪的结合及 5-羟色胺的摄取呈不同的分布。因此可以肯定 ^3H -丙咪嗪不是标记 5-羟色胺摄取部位的特异性配体,而是结合至三环药物的辨认部位。这些高亲和部位甚至亦见于肝脏,其肝内的亚细胞定位完全在于线粒体(未发表的结果)。由于缺乏特异性,故对丙咪嗪可与电鳐^[33] 的烟碱受体的离子通道相互作用及在大肠杆菌上发现 ^3H -丙咪嗪的结合部位是不会感到奇怪的^[34]。

对非特异结合呈高亲和力的激动剂

一般地说,前人的错误往往是其他科学家取得成功的借鉴。但在结合研究上,情况却非如此。例如,试图用标记的激动剂去证实受体部位的错误,实际上已在所有的神经递质上重犯。起初已明确用标记儿茶酚胺^[35]的结合检定法是不适合证实 β 肾上腺素能受体的^[36,37]。尽管这样,还有人一再标记的儿茶酚胺企图标记 α 受体^[38]。此后,曾报道用³H-多巴胺^[39]、³H-5-羟色胺^[40]、³H-组胺^[41]及³H-烟碱^[42]去结合“受体”部位,通常这些部位是对抗剂不可接近的部位。一般想法认为,由于结合是可饱和的、可逆的以及大多数呈高度亲和性等特点,这些部位可能有重要作用,但与拮抗剂标记的受体部位不同,此部位对激动剂仅呈低亲和力。但主要问题是,这些激动剂在生理条件下没有一种在这样低浓度(纳摩尔)作用的,不仅在整体(包括脑内注射),而且当应用标记的对抗剂作配体的结合检定上,所有激动剂至少需微摩尔浓度。事实上,激动剂对非特异部位具有高度亲和力。到目前为止,所有这些称为激动剂的部位仅是儿茶酚、吲哚或咪唑结构的辨认部位,完全失去任何的生理或病理活性关系。显然多巴胺 D₂ 及 5-羟色胺 S₁ 部位肯定不参与神经传递^[1,43]。

这些激动剂部位确实已造成大量推测存在的“受体”亚型^[39,44,45]。更奇怪的或完全不奇怪的是抗抑郁药引起的 S₁ 结构状态的改变,可能是通过立体异构过程及由 GTP 使其稳定化产生的^[46]。最后这些 S₁ 部位甚至在试管内产生^[47]。事实上,溶液化后,所发现的 S₁ 部位达到极大的值是 217%! 有关 GTP 调节这些激动剂部位的发现仍有些奇怪。这表明 GTP 也可与非特异结合部位相互作用,此现象与核苷酸的去污剂特性相一致^[48]。

可替换性并不表明特异性

典型的公式: 替换=特异的,非替换=非特异的,肯定地说这是不对的;激动剂的结合是可替换非特异结合的好例子。这种过分简单化不仅造成很多笑话,而且大部分与所谓发现“受体”亚型有关。这个问题在另一篇文章已作详细讨论^[49]。

问题在于这种非特异性结合如何间接影响受体部位的特异性结合。当发现³H-它莫西芬(tamoxifen)标记雌激素受体,并区分抗雌激素结合部位时,作者恰当地下结论,认为这些结合部位,可能不直接参与已认识的典型的抗雌激素的雌激素拮抗现象。但它们可能影响体内的抗雌激素作用,大概是通过改变这些药物的分布,由此产生其生物强度的改变的被动形式^[50]。设想在体外结合检定本身可能也是真实的。图 3 表示在两种不同条件下³H-新安替根检定上阿斯咪唑(astemizole)的抑制曲线。奇怪的是当温育容积从 1.1ml 增至 10 ml 时,阿斯咪唑的亲和力从 40 增至 4nmol/L。对这种观察的解释还无理论基础。但已知³H-阿斯咪唑与非特异部位(甚至玻璃品)呈高度结合^[51]。因此人们可以设想在较大的温育液中可用相对多的药物,这样非特异部位较易被“饱和”。必须记住,当在体外试验一种药物抑制特异的配体结合的能力时,则必须设想(有时是错误的)这种药对非特异结合部位的结合低至不影响对受体部位的特异结合。对于阿斯咪唑来说,情况恰好相反。让我们再次提出这个重要性,即在结合研究上,冷药对非特异部位的亲和力几

乎常常是未知指标,有时会影响对受体部位的结合。

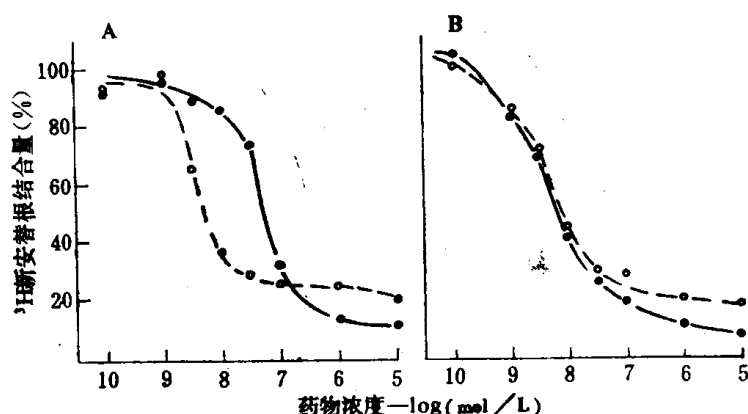


图3 在标准(1.1ml)条件下(●—●)或在容量达10 ml条件下(○---○)阿斯咪唑(A)及新安替根(B)抑制³H-新安替根结合的剂量反应曲线图^[51]。

膜的异源性及多受体部位

根据分析途径进行的脑分部研究发现,受体的亚细胞分布是双相的^[52]。一般在微粒体部分发现最大量的受体,而神经末梢的受体量较少。显然,神经递质受体具有多突触后定位的性质^[52,53]。

相当重要的是,应了解到在解释在膜制备上进行结合研究所产生的结合部位有膜结构的异源性。事实上,由于所用的生物学性质是异质的,所以可以预计在不同膜结构上,标记的或替换的药物的结合必然不是以相同的方式进行结合。图4以图解形式解释受体部位可能存在的亚细胞位置:神经末梢外膜、神经末梢内及用轴索流实验证明的小囊泡

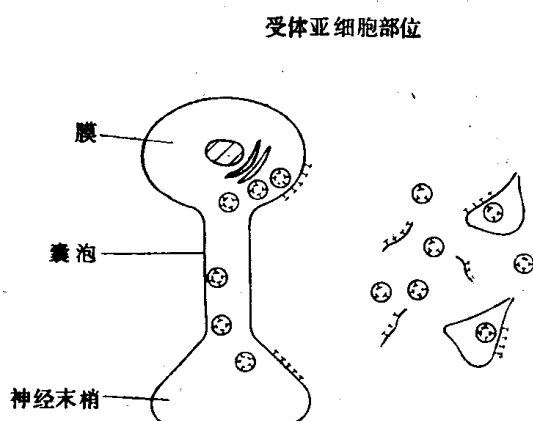


图4 图解受体点的多种可能部位:在神经末梢的外膜;位于末梢的小囊泡或不在神经末梢内而在膜部分。匀浆后受体分布于不同的膜结构内。

部位^[54]。不同的药物进入所有的细胞内膜结构,可能不会是相同的。类似于激动剂的药物因被摄入囊泡或神经末梢,所以它们在某些受体附近的浓度较在培养液的高。另一个可能性是,所给的药物妨碍标记的配体掺入某些受体部位。在这方面,即亲水或亲脂性物质的行为与已知的低疏水性的激动剂不相同。因此,在解释不可靠的结果时(如平坦的、双相的或多相的替换曲线)应考虑所有这些可能性。我认为膜上的受体异源性,对于解释

受体结合研究能提供更有弹性的解释。如据此提出的毒蕈碱受体的理论亚型(如超亲和力的,高及低亲和力的位点或 M_1 与 M_2 亚型)^[55,56]。离子浓度的改变足以改变结合的性质^[57],以及溶液化后,不能发现这种反常的替换曲线的事实支持此观点。

在完整细胞上的配体捕获

在完整细胞上进行的结合研究比在膜制备上的更要小心。如 ^3H -配体也可通过捕获现象摄入溶酶体内。已知许多碱类可通过捕获而进入溶酶体^[58]。最近进行体外的 ^3H -螺哌隆^[59]及二氢心得舒(dihydroalprenolol)^[60]结合时,在淋巴细胞上亦观察到这种捕获现象,在成纤维细胞、肝细胞及神经母细胞瘤细胞上亦有此现象。通常,已认识的向溶酶体药——氯喹啉是替换已捕获的 ^3H -配体的最强效药物。在另一报告中已指出^[59],当在完整细胞上进行结合研究时,应把此捕获现象视为一种严重的障碍。

[黄永楷译自 Laduron P. M.: *Biochemical pharmacology*,
33(6): 833—839, 1984. 马润泉校]

参 考 文 献

- [1] Laduron, P., In *Advances in Dopamine Research* (Eds. Kohsaka M. et al.), Vol. 37, p. 245, Pergamon Press, Oxford (1982).
- [2] Bacq, Z. M., *Trends Pharmac. Sci.* 1, 141 (1980).
- [3] Langley, J. N., *Proc. R. Soc. B* 78, 170 (1906).
- [4] Changeux, J. P., *Harvey Lect.* 75, 85 (1981).
- [5] Laduron, P. M. and Ilien, B., *Biochem. Pharmac.* 31, 2145 (1982).
- [6] Cuatrecasas, P., *Biochem. Pharmac.* 23, 2353 (1974).
- [7] Burkard, W. P., *Eur. J. Pharmac.* 50, 449 (1978).
- [8] Kendall, D. A., Ferkany J. W. and Enna, S. J., *Life Sci.* 26, 1293 (1980).
- [9] Smith, I. R., Cleverley, M. T., Ganellin, C. R. and Metters, K. M., *Agents Actions* 10, 422 (1980).
- [10] Bristow, D. R., Hare, J. R., Hearn J. R. and Martin, L. E., *Br. J. Pharmac.* 72, 547p (1981).
- [11] Rising, T. J., Norris, D. B., Warrender, S. E. and Wood, T. P., *Life Sci.* 27, 199 (1980).
- [12] Subramanian, N. and Slotkin, T. A., *Molec. Pharmac.* 20, 240 (1981).
- [13] Gajtkowski, G. A., Norris, D. B., Rising T. J. and Wood, T. P., *Nature* 304, 65 (1983).
- [14] Colpaert, F. C., Lenaerts, F. M., Niemegeers, C. J. E. and Janssen, P. A. J., *Archs. int. Pharmacodyn. Ther.* 125, 40 (1975).
- [15] Lee, C. H. and Snyder, S. H., *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5250 (1981).
- [16] Langer, S. Z., Raisman, R. and Briley, M., *Eur. J. Pharmac.* 72, 423 (1981).
- [17] Rehavi, M., Skolnick, P., Hulikan, B. and Paul, S. M., *Eur. J. Pharmac.* 70, 597 (1981).
- [18] Laduron, P. M., Robyns M. and Schotte, A., *Eur. J. Pharmac.* 78, 491 (1982).
- [19] Kendall, D. A., Taylor, D. P. and Enna, S. J., *Molec. Pharmac.* 23, 594 (1983).
- [20] Bulis, B. H., Gordon, M. A. and Wilson, I. B., *Biochem. Biophys. Acta.* 643, 398 (1980).
- [21] Zalcman, S. J., Neckers, L. M., Kaayalp, O. and Wyatt, R. J., *Life. Sci.* 29, 69 (1981).
- [22] Bidart, J. M., Moninger, C. and Bohuon, C., *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.* 39, 169 (1983).
- [23] Leysen, J. E., Miemegeers, C. J. E., Van Nueten, J. M. and Laduron, P. M., *Molec. Pharmac.* 21, 301 (1982).
- [24] Maitre, L., Moser, P., Baumann, P. A. and Waldmeier, P. C., in *Biogenic Amines and Affective Disorders* (Eds. Svensson and Carlsson), *Acta Physiol. Scand.* 280, suppl. 61, 97 (1980).
- [25] Raisman, R., Briley, M. and Langer, S. Z., *Nature* 281, 148 (1979).
- [26] Raisman, R., Briley, M. S. and Langer, S. Z., *Eur. J. Pharmac.* 61, 373 (1980).
- [27] Paul, S. M., Rehavi, M., Skolnick, P. and Goodwin, F. K., *Life Sci.* 26, 953 (1980).
- [28] Ahtee, L., Briley, M., Raisman, R., Lehuic, D. and Langer, S. Z., *Life Sci.* 29, 2323 (1981).
- [29] Arora, R. C., Tong, C., Jackman, H. L., Stoof, D. and Meltzer, H. Y., *Life Sci.* 33, 437 (1983).

- [30] Mocchetti, I., Brunello, N. and Racagni, G., *Eur. J. Pharmac.* **83**, 151 (1982).
- [31] Sette, M., Ruberg, M., Raisman, R., Scatton, B., Zivkovic, B., Agid Y. and Langer, S. Z., *Eur. J. Pharmac.* in press (1983).
- [32] Rehavi, M., Skolnick, P. and Paul, S. M., *Eur. J. Pharmac.* **87**, 335 (1983).
- [33] Eldefrawi, M. E., Waenick, J. E., Schofield, G. G., Abbouquerque, E. X. and Eldefrawi, A. T., *Biochem. Pharmac.* **30**, 1391 (1981).
- [34] Molnar, J., Csiszar, K. and Toth, G., *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.* **39**, 127 (1983).
- [35] Lefkowitz, R. J. and Haber, E., *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 1773 (1971).
- [36] Cuatrecasas, P., Tell, G. P. E., Sica, V., Parikh I and Chang, K. J., *Nature* **247**, 92 (1974).
- [37] Lefkowitz, R. J., Limbird, L. E., Mukherice, C. and Caron, M. C., *Biochem. biophys. Acta*, **457** 1(1976).
- [38] U'Prichard, D. C. and Snyder, S. H., *Life Sci.* **20**, 527 (1977).
- [39] Seeman, F., *Pharmac. Rec.* **32**, 229 (1980).
- [40] Fillion, G., Fillion, M. P., Spirakis, C., Bakeys, J. M. and Jacob, J., *Life Sci.* **18**, 65 (1976).
- [41] Barbin, G., Palacios, J. M., Rodergas, E., Schwartz J. C. and Garbarg, M., *Molec. Pharmac.* **18**, 1(1980).
- [42] Romano, C. and Goldstein, A., *Science* **210**, 647 (1980).
- [43] Leysen, J. E. and Tollenaere, J. P., In *Annual Report in Medicinal Chem.* (Ed. McDermed J), Vol. 17, p. 1 Acad. Press, New York (1982).
- [44] Snyder, S. H. and Goodman, R. R., *J. Neurochem.* **35**, 5 (1980).
- [45] Nelson, D. L., Pedigo, N., W., and Yamamura, H L., in *Psychopharmac. and Biochem. of Neurotransmitter Receptors* (Ed. Yamamura, H. I., Olsen, R. W. and Usdin, E.) p. 325. Elsevier North-Holland, Amsterdam (1980).
- [46] Fillion, G. and Fillion, M. P., *Nature* **292**, 349 (1981).
- [47] Vanderberg, S. R., Allgren, R. L. Todd, R. D. and Ciaranello, R. D., *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 3508 (1983).
- [48] Godelaine, D., Beaufay, H., Wibo, M. and Ravoet, A. M., *J. Cell. Biol.* **97**, 340 (1983).
- [49] Laduron, P., *Trends Pharmac. Sci.* **4**, 333 (1983).
- [50] Sudo, K., Monsma, F. J. and Katzenellenbogen, B. S., *Endocrinology* **112**, 425 (1983).
- [51] Laduron, P. M., Janssen, P. F. M., Gommeren, W. and Leysen, J. E., *Molec. Pharmac.* **21**, 294(1982).
- [52] Laduron, P. M., Janssen, P. F. M. and Ilien, B., *J. Neurochem.* **41**, 84 (1983).
- [53] Laduron, P., In *Apomorphine and Other Dopaminomimetics*. Vol. 1 *Basic Pharmacology* (Eds. Gessa G. L. and Corsini G. U.), p. 95. Raven Press, New York (1981).
- [54] Laduron, P. M., *Biochem. Pharmac.* **33**, 897 (1984).
- [55] Birdsall, N. J. M. and Hulme, E. C., *Trends Pharmac. Sci.* **4**, (1983).
- [56] Watson, M., Yamamura, H. I. and Roeske, W. R *Life Sci.* **32**, 3001 (1983).
- [57] Leysen, J. E. and Gommeren, W., *J. Neurochem.* **36**, 201 (1981).
- [58] Duve, C. de., Barsy, T. de., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P. and Van Hoof, P., *Biochem. Pharmac.* **23**, 2495 (1974).
- [59] Maloteaux, J. M., Gossuin, A., Waterkeyn, C. and Laduron, P. M., *Biochem. Pharmac.* in Press (1983).
- [60] Meurs, H., Bogaard, W., Van den., Kauffman, H. F. and Bruynzeel, P. L. B., *Eur. J. Pharmac.* **85**, 185 (1982).

神经递质受体的结合和新药的发现

很多向精神性药物以及心血管药物,通过影响突触机制而发挥其治疗作用。由于不能在分子水平上解释药物的作用机制,所以目前还未能把这类新药的发现与神经递质的基础研究联系起来。因此在很多情况下,人们还没有找出一套完整的方法,从体外检测其生化作用而辨别新药。

药物可以从几方面影响神经递质系统。它们可以干扰酶的合成或降解,影响递质的贮存或释放,以及拟似或阻断神经递质在受体部位的作用。很多向精神性药物和心血管药物,均作用于受体。因此,为了从分子水平角度发现新药就需要用一种简单的生化检定法来确定受体的部位。

十年前,除无脊椎动物电器官的烟碱样胆碱能受体外,仍不能用简单的,可用于药物筛选的结合方式监测神经递质受体。

成功地确定电器官上烟碱样胆碱能受体的特征取决于极强烈的毒素的应用,如 ^{125}I 标记的 α -银环蛇毒以及高度密集的烟碱样胆碱能受体。这些受体几乎占了电鳗(*Tropedlo marmota*)电器官膜蛋白的20%。相反地,人们可以计算出药物及神经递质受体的量绝不会超过心或脑重量的百万分之一;如阿片受体即如此。令人惊奇的是,人们可以采用简单的可逆性结合药物来标记取自脑或其他组织的相对粗糙的膜制备物上的受体。这种方法首先成功地用于阿片受体的分离^[1-4]。此后不久,人们采用同样的原理用合适的配体去标记甘氨酸受体^[5]、毒蕈碱胆碱能受体^[6,7]、 γ -氨基丁酸(GABA)受体^[8,9]、 β 肾上腺素能受体^[10-12]、多巴胺受体^[13-15]和 α 肾上腺素能受体^[16-18]以及各种拟为多肽神经递质的受体^[19]。这些简单的敏感的特异性检测方法,为评价被测物质的活性提供了有价值的筛选方法。

药物研究的一个主要问题,是估计一种试验药物在多大程度上是激动剂或拮抗剂或者是两者的混合物。在几类药物中,某些具有特殊激动剂和拮抗剂活性的药物可能具有极好的效能。因此混合了激动剂与拮抗剂特性的阿片类药物常常具有强烈的止痛作用,但与纯激动剂相比成瘾性较少。在 β 肾上腺素能拮抗剂中,具有一定程度的激动剂,如吲哚心安有其治疗优点。在早期的阿片受体结合研究中未能区分激动剂和拮抗剂。不久人们就发现钠离子能显著地区分激动剂和拮抗剂之间的受体相互作用,并明显减低激动剂对受体的亲和力。对纯拮抗剂的效能则全无影响。而对其激动剂-拮抗剂混合型的阿片类的影响介乎上两者之间^[20]。其后证明鸟嘌呤核苷酸,如GTP可选择性减低阿片激动剂及许多种其他神经递质对受体结合的亲和力,据推测,首先与联结受体与腺苷酸环化酶的N-蛋白相结合,从而改变受体的立体异构结合^[21,22]。在阿片受体中,钠离子与GTP似乎呈相互增强的作用。所以监测它们对药物受体相互作用的结合效力是预测激动剂-拮抗剂效力的最好方法^[23]。

药物的组织选择性也是重要的。获知这种选择性的一种方法是设计一种对受体亚型

具有特异性的药物。通过药理技术,人们区分了毒蕈碱和烟碱样胆碱能受体, α 和 β 肾上腺素能受体, β_1 和 β_2 肾上腺素能受体等等。受体结合技术的出现,增加了受体鉴别的精确性,证实和扩大了通过传统药理方法提示的区别处,并且发现了新的受体亚型。受体结合技术已经证实了阿片受体亚型,如 μ , δ , κ 亚型,可能还有 σ 亚型^[24-26]。一些阿片受体亚型如 μ , κ , σ 是根据药理学基础提出的,其后被结合技术证实,而 μ , δ 亚型的区分则是首先从结合研究工作提出的。通过环化酶效力及受体结合技术,至少可靠地鉴别出两种多巴胺受体亚型, D_1 和 D_2 亚型^[27-29];也鉴别出几种毒蕈碱胆碱能受体亚型及 α_1 和 α_2 肾上腺素能受体^[30-33],并且观察到 α_2 受体存在高及低亲和力亚型^[34,35]。用这些技术不但能区别出几类GABA受体^[36],而且与GABA受体有关的苯二氮䓬受体也至少可分成三类。另外从结合与腺苷酸环化酶研究,至少可把腺苷酸受体细分为两类。

选择针对某一受体亚型的药物可能具有独特的疗效。对于某些类药物,治疗作用可能涉及一种受体亚型,而副作用则是另一型受体。据推测某一类苯二氮䓬受体亚型与减轻焦虑有关,而另一类亚型则与镇静有关。同理,一种阿片受体亚型—— μ 受体主要与阿片的镇痛作用有关,而其他的受体亚型,如 δ 受体,则影响情绪^[37]。 μ 阿片受体亚型已再细分为引起镇痛作用的 μ_1 位点和引起呼吸抑制的 μ_2 受体^[38]。很明显,能选择性与 μ_1 位点结合的阿片类药物可以增加其镇痛作用。

某些受体亚型位于突触的不同部位。大部分 α_1 肾上腺素能受体为突触后的,而 α_2 受体主要是突触前的,这两种受体位于去甲肾上腺素能神经末梢,它们调节去甲肾上腺素的释放^[32]。抗高血压药物——哌唑嗪由于能够选择性地阻断 α_1 受体,所以它不象某些阻断神经末梢 α_2 受体药物那样,引起过量去甲肾上腺素释放而产生心动过速。在大脑的某些部位或整个大脑,苯二氮䓬I型受体似乎均为突触后的,而II型受体则位于突触前^[39]。

某些受体亚型随不同组织而异。例如,肺脏富含 β_2 肾上腺素能受体,心脏则主要含 β_1 受体。选择性 β_1 受体拮抗剂可治疗心血管疾病而不会由于阻断肺脏的 β_2 受体而加重哮喘。同样, β_2 受体激动剂可缓解哮喘而不会由于兴奋了心脏的 β_1 受体引起心动过速。

对于药物发展的另一优点是可以在受体结合试验中测定药物的活性。对于大多数受体来说,人们可以每天筛选100种以上的化学物质,而在体内试验人们可能要花费一天时间才筛选一、二种药物。在整体动物身上评价一种药物几个剂量的作用可能要花费20—40只大鼠,而人们能够利用一只大鼠的脑做几千个受体结合试验。整体动物的给药要耗费几克试验药品,而1毫克药物就足以做大量的受体选筛试验。

更重要的是,受体结合试验为系统构效分析提供了比体内试验更有价值的资料。例如在体内试验组内有4种强度不同的药物,人们不能区分这些差异是由于药物代谢不同或消化道吸收不同,渗透靶器官不同,还是由于对受体部位的亲和力不同所造成的。相反,在体外试验所提供的药物亲和力的精确度达到了摩尔水平。这些资料可以迅速反馈给药物化学家,使他进一步改变药物结构,以增加药物的效能。用这种方式不但可以大幅度提高试验药物的效能,而且比在体内试验更迅速。例如一位研究者用两年以上的时间,从茶碱开始系统地改变黄嘌呤的化学结构,并最终获得一个在阻断腺苷酸受体方面比茶碱要强7万倍的新物质^[40]。药物在受体部位的极高效能可以获得选择性作用,这有助于减少由于影响其他受体而可能产生的副作用。某种物质一旦被确认为对受体有高度的

效能和选择性,必要时人们就可以改变它的结构以发挥其最大的生物利用度。

为了说明如何鉴定神经递质和药物受体是怎样被确定其特性的,并用于新药的发掘过程,详细地研究某些受体是有益的。

苯二氮草受体

采用能成功地证实阿片受体的同类结合技术^[41,42],有两组科学家分别把³H标记的安定结合到大脑膜上,药物对以上结合部位的特异性与它们作为抗焦虑药应用于人和动物的行为试验的相对强度完全一致。

苯二氮草受体系统的几个特征为药物的发展提供了许多机会。首先在简单的结合试验中能够监测药物的潜在治疗活性,使试验者可以筛选一些可能具有抗焦虑作用的非苯二氮草类化学物质。以前,在筛选这类药物的新药初试验须要进行一些动物的行为试验。在大多数这类行为“冲突”模型上,人们可以在相当准确的程度上估计这些具有苯二氮草结构药物的抗焦虑效能。但是,不具有苯二氮草结构的药物,在动物中的行为作用可能与在人中的作用无直接关系。因此监测药物结合到有治疗意义的特异性受体部位的方法,大大扩展了检测可能具有抗焦虑活性化学物质的范围。

在苯二氮草受体结合研究的早期,对受体部位具有竞争性结合的许多神经递质进行了筛选,但无一种有活性。后来由于不久前证实脑啡肽作为阿片受体的内源性配体,研究人员才推测可能存在一种新的“内源性安定”神经递质^[41]。很多实验室都试图去证实这种物质,但目前未有明显进展。假如存在内源性苯二氮草样神经递质,那么这可代表一种发掘新药的有价值的模型。

当人们发现作为脑内一种主要抑制神经递质的GABA与苯二氮草受体呈生理性相互作用时,不存在特异性的苯二氮草样神经递质的可能性更显著了。早期的研究是应用高浓度的GABA以寻找一种竞争性作用,因此减少³H标记的苯二氮草的结合量。后来发现毫摩尔的GABA可加强³H苯二氮草结合到受体上的能力,在高浓度的GABA下,这种作用反而不明显^[43-46]。各种与GABA有关的氨基酸拟似GABA的作用,这与它们拟似GABA的突触活性成正比。而且特异性的GABA拮抗剂阻断了GABA增强苯二氮草受体的结合作用。因此事实上苯二氮草受体是包括GABA受体在内的大分子复合物。

起初人们并不清楚GABA和苯二氮草受体是否是立体结构连接在一起的两个完全不同的物质,或仅是一个蛋白质复合物。在受体溶解,甚至经过高度纯化后,GABA仍可激活苯二氮草的结合力,这一点支持两个受体是同一蛋白质复合物的一部分^[47,48]。苯二氮草受体有GABA的识别部位,而热保护试验和直接结合试验表明GABA受体也有苯二氮草的识别部位^[49,50]。

大量的药理资料表明,苯二氮草在很低的药理活性剂量下增加了GABA的突触作用,这就支持GABA和苯二氮草是联接在一起的受体的概念^[51-53]。GABA对苯二氮草结合的影响似乎反映了突触增强作用是在分子水平上的。

进一步的研究也揭示了在GABA-苯二氮草大分子受体复合物上的其他位点^[54]。巴比妥类药物也能激活苯二氮草受体的结合^[54]。但其作用部位与GABA的不同。因为GABA受体拮抗剂荷包牡丹碱不能损害巴比妥类药物的作用。另一方面,可以阻断与

GABA突触有关的氯离子通道的印防己毒素及有关的惊厥药可对抗巴比妥的作用。GABA通过增加突触膜对氯离子的通透性而发挥其抑制突触的活性。因此,巴比妥类药物可能通过作用于氯离子通道而影响苯二氮草受体的结合,氯离子通道与GABA的突触作用有关。人们可以在结合试验中用 [^3H] 印防己毒内酯或惊厥药 [^{35}S] 叔丁基二环磷酸硫酸盐标记出这个位点^[54,55]。

巴比妥类药物对与GABA有关的氯离子通道的明显作用,可能对药物的发展有用。长期应用巴比妥类药物可产生机体依赖性,而且稍为过量即可致死。可以想象作用于巴比妥位点的新结构药物可以具有治疗作用而很少副作用。

混合的激动剂-拮抗剂可能对苯二氮草受体有治疗用途。某些相对纯的苯二氮草拮抗剂与苯二氮草受体有高度的亲和力,但在行为实验中没有苯二氮草样作用^[56]。但是它们可以阻断药物如安定的药理作用。虽然GABA增加苯二氮草激动剂对其结合部位的亲和力,但对纯的苯二氮草拮抗剂与受体结合的亲和力没有影响^[57,58]。对苯二氮草受体具有激动剂-拮抗剂混合作用的药物所受的影响处于中间状态。苯二氮草受体与药物如氟硝苯草发生光亲和烷基化,可明显降低苯二氮草激动剂对受体的效能,但不影响拮抗剂对该受体的亲和力。但对激动-拮抗剂混合物的作用属中等^[59]。

人们对激动剂-拮抗剂混合物的药物特性的希望是什么呢?这些药物可以通过其激动成分产生治疗作用,其拮抗成分则阻断药物的镇静作用。在苯二氮草受体上表现出有激动剂-拮抗剂特性的药物与这种药理特性相符。显然筛选在苯二氮草受体上具有激动剂-拮抗剂混合作用的药物,可能是寻找新药的有用方法。

目前可能存在几种苯二氮草受体亚型。使用 [^3H] 苯二氮草的最初研究时,证实在外周组织如肾、脑等中,存在饱和结合位点^[41]。但是某些强效抗焦虑药,如氯硝安定与大脑结合位点的亲和力是纳摩尔水平,但其在肾脏的活性微不足道。另一方面,一种无抗焦虑作用的苯二氮草类药物 RO54864 对大脑受体的作用极微,但在肾脏的效能却以纳摩尔水平计算,可用 [^3H] RO54864 标记分离的“外周型”苯二氮草受体的生理意义至今未明^[60]。大脑存在某些外周型苯二氮草受体。但在放射自显影研究中发现的一般中枢型苯二氮草受体,位于大脑内有高度选择性的突触区域,特别是在边缘系统,而外周型苯二氮草受体则弥散地分布于全大脑。而实际上以卡因酸破坏神经元后,或患 Huntington's 舞蹈病人的大脑中的外周型苯二氮草受体均明显增加。而 Huntington's 舞蹈病人的大脑中神经胶质细胞增殖^[61]。因此在大部分脑中,外周型的苯二氮草受体不是位于神经元而是主要分布在神经胶质。

在大脑的一部分,外周型苯二氮草受体与神经结构有关。放射自显影表明在嗅球的小球层,有一条 [^3H] RO54864 的结合密集带。这是从鼻部入脑的嗅神经的终端层^[62,63]。用硫酸锌灌注鼻腔以破坏嗅神经可以耗竭 [^3H] RO54864 在嗅球的结合^[63]。但鼻上皮本身就含有极高浓度的 [^3H] RO54864 结合部位,放射自显影研究表明,外周型苯二氮草受体在鼻腔的分布与嗅神经轴突的发出相一致^[63],所以脑的外周型苯二氮草受体是分布在嗅神经。这些受体的功能是什么?假如它们影响嗅觉过程,那么就有可能发展一种治疗部分或全部嗅觉丧失的药物。嗅觉缺乏一般发生在传染性单核细胞增多症及肝炎等病毒感染病例中。因食欲在很大程度上取决于嗅觉刺激,所以改善嗅觉的药物可用于治疗心脏病或癌症所致的厌食及慢性虚弱。外周型苯二氮草受体在外周组织如肾脏中的功能不