DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1989.0028

溶性苯二氮䓬受体的制备与分析*

林 军 胡本荣

（药理学教研室）

提 要 采用新型去垢剂CHAPS制备兔大脑前叶皮质溶性苯二氮䓬受体。溶膜受体放射配基结合分析，见苯二氮䓬受体具有可饱和性，与[^{3}H]FNP结合的亲和力KD_1为0.31nml/L，KD_2为6.7nmol/L。光亲和标记结合SDS电泳测得亚基分子量为55000；凝胶过滤层析测得受体分子量为632000。

关键词 苯二氮䓬受体 溶脱 去垢剂 分子量

苯二氮䓬化合物具有高效的镇静、抗焦虑，抗惊厥和肌肉松弛作用，中枢神经系统内特异性的苯二氮䓬受体（BZ-R）介导本类药物的中枢效应[1]。对BZ-R的研究不但可指导新药的合成和筛选，也促进对焦虑等精神神经机制的探索。为了阐明BZ-R的本质及其分子机制，制备和分析纯度较高的溶性BZ-R是必要的。本文采用新型去垢剂CHAPS溶脱兔大脑前叶皮质BZ-R，并用放射配基受体结合分析、光亲和结合SDS电泳、凝胶过滤层析等方法分析鉴定受体特性。

实 验 材 料

[^{3}H]flunitrazepam（[^{3}H]FNP）是New England Corp产品，比放射强度2701 GBq/mmol。聚二乙醇6,000为Nippon oil & fat Co产品。GF/B滤纸产自Whatman。去垢剂3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]1-propanesulfonate(CHAPS)购自Sigma。液闪剂PPO为Serva产品，POPOP为进口分装试剂。丙烯酰胺(Acr)、N.N'-甲叉双丙烯酰胺(Bis)为国产重结晶试剂。Sephadex G200乃进口分装试剂。其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

方 法 和 结 果

一、溶膜制备 兔4只，♂，5月龄。颈动脉放血处死后立即剖出大脑前叶皮质。用冰冷的Tris-citrate（pH7.4）洗去血污，按1:10（w/v）加入0.32mol/L蔗糖溶液，手动匀浆3次后电动匀浆 4,000rpm×2 min。匀浆离心1,000g×10min，取上清部分离心 34,000g×30min，沉淀以含0.05%TritonX-1000的Tris-citrate洗出，制成匀浆再离心34,000g×30min，随后用原体积的Tris-citrate洗涤离心3次。收集沉淀部分加入适量的CHAPS溶液，4℃静置30min后离心100,000g×60min。离心完毕，上清部分代表溶膜，分装后置于-20℃备用4周，蛋白质定量按Folin酚法[2]。

CHAPS溶脱作用的量效关系见图1。以下实验采用1%CHAPS制备溶膜。所有结合试验采用3管测定，重复2次。

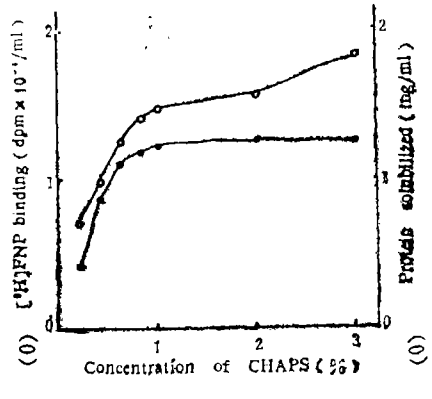


图1 不同浓度CHAPS对兔前叶皮质苯二氮䓬受体及总蛋白的溶脱作用

二、溶膜BZ-R放射配基结合分析 一定量溶膜，加入50μl[^{3}H]FNP，非特异性结合管加入安定100μmol/L。最后用Tris-citrate调终体积为500μl。反应达到平衡后，加入200μl的

* 本文为中国科学院科学基金资助课题

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

人体血浆丙种球蛋白溶液(10mg/ml)和500μl的30%聚二乙醇6,000溶液，充分混匀后滴加于GF/B滤纸上负压抽滤。并用8.5%的聚二乙醇6,000溶液10ml冲洗2次。滤纸烘干后加入5ml含PPO，POPOP和二甲苯的液闪液。暗适应8小时以减少化学发光。LKB双道自动液闪仪测量其放射性(dpm)。

[^{3}H]FNP受体复合体生成量以pH7.4最多。4℃下复合体生成量在孵育时间60～150 min间十分稳定。以下实验按此条件进行。溶膜蛋白质含量与[^{3}H]FNP受体复合体呈良好的正相关关系($r = 168 + 23X$，$r = 0.999$，$P < 0.01$)。

[^{3}H]FNP浓度自0.125至30.11nmol/L进行饱和结合分析，见其结合具有可饱和性，同一资料作Scatchard分析，曲线下凹状，拟合得方程$Y = -0.0874 - 0.155\ln X$($r = 0.874$)。参考渐近线法[3]求得两组参数。若进行Hill分析，可得Hill系数0.77($Y = 0.45 + 0.77X$，$r = 0.99$)。

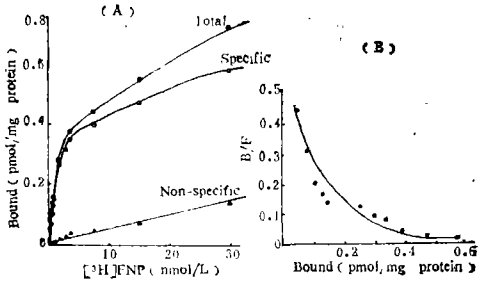


图2 (A) [^{3}H]FNP与兔前叶皮质溶性受体的结合；(B) [^{3}H]FNP结合的Scatchard分析。$K_{D1} = 0.31$ nmol/L，$Bmax1 = 0.15$ pmol/mg protein；$K_{D2} = 6.7$nmol/L，$Bmax2 = 0.52$pmol/mg protein

苯二氮䓬化合物可抑制[^{3}H]FNP与受体结合，硝基安定，安定、氟安定和三唑安定抑制其结合的IC_{50}分别为3.3、9.7、42.3、20.4nmol/L。

三、溶膜BZ-R光亲和标记结合SDS电泳测定分子量 一定量溶膜，[^{3}H]FNP终浓度60.4nmol/L。4℃暗室孵育90min，253.7nm紫外灭菌灯照射10min。于透析袋(5000)中，用50倍体积的Tris-citrate(含1%CHAPS)透析9次。取100μl加入含PPO、POPOP、乙二醇乙醚、萘、二氧六环的液闪液5ml测得其不可逆结合为41,660dpm/mg。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳[4]后，按样品纵切凝胶，再顺序横切成1mm的小块，各用30%的H_2O_2超声震荡60min×2，加入液闪液，测定其放射性。迁移率(R)按下式计算：样品平均迁移距离×染色前凝胶长度／染料平均迁移距离×染色后凝胶长度。分子量的对数对迁移率回归得标准曲线。

电泳出现一个[^{3}H]FNP放射结合峰，根据其位置，依标准曲线求得分子量为55,000。

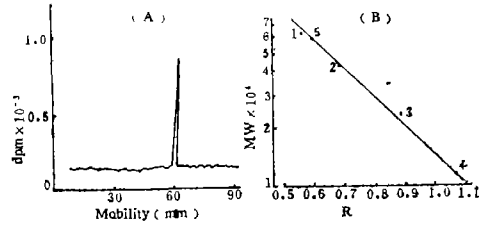


图3 光亲和标记结合SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳测定兔前叶皮质苯二氮䓬受体分子量。(A) [^{3}H]FNP不可逆结合电泳放射峰；(B) 受体分子量测定。1. 牛血清白蛋白 2. 卵清蛋白 3. 糜蛋白酶原 4. 细胞色素C 5. 苯二氮䓬受体

四、凝胶过滤层析测量BZ-R分子量 Sephadex G200柱内径1.7cm，长70cm。层析缓冲液：0.1mol/L KCl，1%CHPS，50mmol/L Tris-citrate，pH7.4。取标准蛋白各5mg混溶于2ml缓冲液后上样。层析温度4℃，流速16ml/h，收集4ml/管。323紫外分光光度计280nm处测定各管光密度。洗脱体积(Ve)对分子量对数(logM)回归得标准曲线。样品处理：取20ml溶膜，加入固体硫酸铵，至饱和状态后离心，取出凝块，加入2ml缓冲液重新溶解后上样。层析条件同标准蛋白。层析完毕后每管取450μl作结管实验，测定BZ-R结合活性。

溶膜Sephadex G200层析后出现2个放射峰，根据放射峰位置，按其洗脱体积通过标准曲线可求得分子量分别为632,000和58,000。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

经凝胶过滤层析后，受体结合活性可提高。P_2膜对照的结合量为14,147dpm/mg，溶膜为18,418dpm/mg，层析后最高可达 114,444dpm/mg。

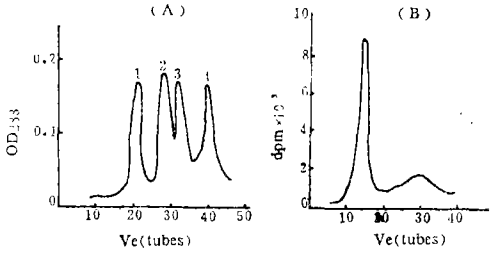


图 4 Sephadex G 200层析。(A) 标准蛋白层析图。标准曲线：Ve = 408 − 605lgM，r = 0.99(P < 0.01)。1. 过氧化氢酶 2. 牛血清白蛋白 3. 卵清蛋白 4. 核糖核酸酶 (B) 兔前叶皮质溶膜层析后与[³H]FNP结合的放射图

讨 论

国外文献报道制备溶性 BZ-R 的动物来源一般为大鼠或牛的脑皮质。本文采用兔前叶皮质为材料，证明也富含 BZ-R，可利于不同种属动物之间的比较。用0.05% TritonX-100 处理P_2膜并反复洗涤离心，据报道可有效地除去内源性GABA等物质[5]，这些物质的存在，可严重干扰受体结合反应及其分析。

去垢剂 CHAPS 电中性，280nM 处无明显吸收，不干扰 Folin 酚显色反应[6]；故本文用其最佳浓度1%进行溶脱，实验表明可获得大量高活性的BZ-R。所用的溶膜BZ-R 放射配基分析法，实验见溶膜蛋白质含量与[³H]FNP受体复合体生成量呈良好的正相关，且基本通过原点，非特异性结合低于10%，并且复合体在孵育时间 60～150min 内稳定，说明此法是可靠的。溶膜 BZ-R与[³H]FNP 结合为可饱和，Scatchard 分析及苯二氮䓬化合物抑制结合的 IC_{50}，均与P_2实验结果相似[7]，可见溶性 BZ-R仍具有其基本药理学特性。Scatchard 曲线下凹状，提示存在不同构象或亚型，但 SDS 聚丙烯凝胶电泳仅出现一个放射峰，故此认为存在两种构象变化。

光亲和标记结合 SDS 电泳测得者应为 BZ-R 亚基分子量。凝胶层析测得应为受体复合体分子量，由于GABA受体、氯通道与BZ-R在结构上有密切联系，故632,000分子量中有可能包括部分或全部的GABA受体及氯通道。

参 考 文 献

[1] Squires RF Braestrup C. Bemzodiazepine receptor in rat brain. Nature 1977; 266: 732.

[2] Lowry, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265.

[3] Rosenthal HE. A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. Anal Biochem 1967; 20:525.

[4] Payne JM. Electrophoresis of proteins on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels. In:Smith I, ed. Chromotographic and electrophoresis techniques. Vol II. Zone Electrophoresis. 4th ed. London:Heineman 1976:321-46.

[5] Fisher TE, et al. A comparison of methods for removal of endogenous GABA from brain membrane prepared for binding assays. Neurochem Res 1986; 11:1.

[6] Hjelmeland LM. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: Design and Synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:6368.

[7] 颜光美 胡本荣．苯二氮䓬衍生物的抗惊厥活性与前叶皮质受体亲和力的关系．中国药理学报 1986; 7:389.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Characterization of Soluble Benzodiazepine Receptors

Lin Jun Hu Benrong

(Department of Pharmacology)

Abstract

The benzodiazepine receptors in frontal lobes of cerebral cortex of rabbits were solubilized with the detergent 3- (3cholamidopropyl)-dimethylammonio propaneslfonate (CHAPS). ^{3}H flunitrazepam binding to soluble receptors was saturable and showed nonlinear Scatchard plot with KD_1 0.31 nmol/L and KD_2 6.7 nmol/L. The molecular weight of the soluble benzodiazepine receptors determined by SDS-PAGE after photoaffinity labelling was 55 000, by chromatography on Sephadex G 200 was 623 000.

Key words Benzodiazeipne receptors Solubilization CHBPS Molecular weight

A Study on the Serum Biochemistry in Carrier Detection of Duchenne Muscular Dystropy

Xie Bing Liu Chaolin Liang Xiuling Pan Yangbang

(Department of Neurology)

Abstract

The serum levels of creatine kinase, creatine kinase isoenzyme (MB), lactate dehydrogenase, pyruvate kinase and myoglobin were studied in 85 carriers of Duchenne muscular dystrophy and 125 normal female controls. The results show that the best single test for carrier detection is myoglobin or creatine kinase, the combination of multiple tests could increase toe effectiveness of carrier detection, in which the best and most rational tests to use in combination are creatine kinase, lactate dehydrogenase and myoglobin.

key words Duchenne muscular dystrophy Carrioer detection Creatine kinase Creatine kinase isoenzyme(MB) Lactate dehydrogenase Pyruvate kinase Myoglobin

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net