

# 放射受体测定及其应用的进展

沈君彩

(广东省计划生育科学技术研究所)

近年来,关于受体的研究进展很快。1900年林赖(Langley)和埃利时(Ehrlich)提出活细胞存在着结合化学物质部位的假说后,生物学家、医学家对作用物和拮抗物作用的动力学研究证实活细胞接受激素、神经递质、药物、毒素等的部位存在,这种接受部位称为受体或受点(receptor or receptor site)。受体是生物体维持正常生理机能不可缺少的物质,这方面的研究已有许多报道,其中尤以激素受体的研究处于领先地位。由于激素提纯和免疫技术的发展,60年代建立了放射免疫测定(简称RIA)技术,它具有放射化学和免疫化学的高度灵敏性和特异性,成为目前广泛使用的测定方法。但实践中发现,激素在代谢过程中,分子的免疫活性中心同生物活性中心往往并不吻合,有免疫活性的激素基团有时是一种激素前身化合物,有时连结或吸附在无活性的大分子上,利用RIA测定的某些结果只能代表分子的免疫性,而并非代表激素的生物活性,这些结果往往会给人以错觉。因此,在RIA方法基础上,1970年列夫柯维基(Lefkowitz)首先应用放射受体测定(radioreceptor assay)方法测定ACTH获得成功,指出此方法是测量血浆中多肽类激素的一个新途径。随后,柯林明(Korenmen)肯定了放射受体测定技术对测定固醇类及其他激素是一种敏感方法。利哈德(Redhard)比较了放射受体测定和放射免疫测定两种方法的优缺点,认为放射受体测定是一种比较好的生物鉴定方法。此后,放射受体测定方法被应用于各个领域,并对受体分析的理论 and 实践问题进行了研究。

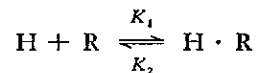
## 一、放射受体测定的基本原理

受体是一种特异性蛋白,它具有以下三个特点 1.在靶组织(或细胞)中受体有一定数目,在一定条件下受体与配体的结合达饱和状态; 2.受体蛋白能识别与它结合的特异配体,而对其他配体没有识别能力; 3.受体蛋白与其特异配体有很高的亲和力。循环在血液中的配体一般都和血浆携带蛋白结合,但其亲和力比较弱,其离解常数为 $10^{-3}$ — $10^{-6}$ 克分子M,当配体随血液循环到靶组织(或细胞)时,与受体蛋白相遇,因受体同其配体的亲和力(其离解常数为 $10^{-10}$ — $10^{-11}$ M)比血浆结合蛋白的亲和力高得多,配体很快脱离血浆携带蛋白与其受体结合,形成配体——受体复合物。受体蛋白的这种特异结合性能,是建立放射受体测定的基础。受体“识别”配体,并能特异性结合的功能取决于配体分子和受体分子的立体结构特异性,受体与配体结合形成复合物后,引起一系列生化反应,产生各种生物效应,这即是“两步机制”:



(活化或抑制)

配体——受体反应的动力学,与酶促反应的动力学极为相似,也符合米彻利斯-敏挺(Michaelis-Menten)二氏方程,即:

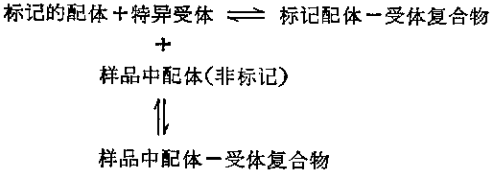


$$\frac{[H][R]}{[H \cdot R]} = \frac{k_2}{k_1} = K_m$$

$K_m$  为离解常数,代表配体——受体的亲和

力,  $K_m$  愈小, 离解愈少, 表示亲和力愈大。大多数受体反应的离解常数 ( $K_m$ ) 都在 100 微微克分子 (100 pM) 至 10 毫微微克分子 (10 nM) 之间。如胰岛素受体的  $K_m$  为  $10^{-10}$  M, LH/HCG 的  $K_m$  为  $4 \times 10^{-10}$  M。

放射受体测定的方法, 可用下列简式表示:

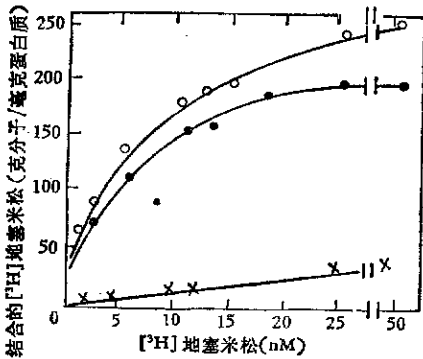


上式的基本原理是: 将标记的配体加入含有受体的样品, 使标记配体和受体的结合达到平衡后, 再测定结合的和游离的标记配体的量, 并由此算出受体的浓度和离解常数。为了去除

非特异性结合, 应于平行测定管内加入标记配体的 1000 倍量以上的未标记配体(这时受体绝大部分都和未标记配体结合), 以平行管的标记配体结合量(为非特异性结合)进行校正。

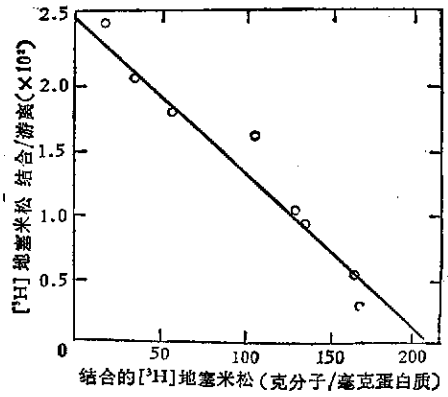
求受体的浓度和离解常数, 则应加不同浓度的配体, 将根据配体——受体反应公式求得最大结合量, 绘成饱和曲线, 它反映组织中存在的受体数(因一个分子配体仅与一个受体相结合, 故可求得受体数目), 通常以克分子/毫克组织(或细胞)表示。并根据标记配体的结合/游离比值及与标记配体最大结合量绘成斯科称德(Scatchard) 曲线, 曲线的斜率代表  $1/K_m$ , 曲线与 X 坐标的相交点代表受体浓度(容量)(见图 1、2)

图 1、2 是大鼠副睾脂肪垫胞液, 加入不同



1  
饱和曲线

○ 总结合 × 非特异结合 ● 特异结合



2  
斯科称德曲线

表 1 三种测定方法的性能比较

项 目	放射免疫测定的特异性抗体	竞争蛋白结合分析的特异性结合蛋白质	放射受体测定的特异性受体蛋白
制备条件	需数月, 较简单	数分钟, 简单	数小时, 较简单
稳定性	+++	+++	++
重现性	可变异	好	好
亲和常数 (灵敏度 <sup>-1</sup> )	$10^{13}$	$10^9$	$10^{10}-10^{12}$
结构上的特异性	最高	高	高
生物学上的特异性	可变异	高	非常高
反应速度	几小时—几天	几分钟	几分钟
测量条件	$^3\text{H}$ , $^{125}\text{I}$	$^3\text{H}$	常用 $^3\text{H}$

浓度的<sup>3</sup>H地塞米松及再加入1000倍量的未标记地塞米松,在0℃条件下保温三小时,经放射性测量得<sup>3</sup>H地塞米松结合量,绘成饱和曲线A和斯科称德曲线B。

放射受体测定具有比放射免疫和竞争蛋白结合测定操作简单、重复性强、受体制备方便、用量少、个体差异小、较稳定等特点(见表1)。

## 二、放射受体测定的应用

放射受体测定除了直接用于测量血浆、细胞液或细胞核等受体浓度、激素、神经递质、药物、毒素浓度外,可以与电泳、放射自显影等方法配合使用,成为有广泛用途的测量方法。

(一) 作受体的定位和结构分析。将标记的配体注射入动物体内,使之与受体结合,再取出各种器官组织,测定其中放射性的特异性结合量,或制成薄片作放射自显影,确定其受体的组织定位。如盐皮质激素受体分布于肾、十二指肠粘膜、结肠、唾液腺和汗腺;雌激素受体位于子宫、阴道、卵巢、输卵管、乳腺、垂体前叶、脑(杏仁、视前-隔区、下丘脑);糖皮质激素受体则广泛分布于各器官组织。受体可存在于靶细胞的胞膜、胞质、胞核内,如肽类激素受体、儿茶酚胺受体主要在细胞膜上;甾体激素受体位于细胞溶质(cytosol)和细胞核;甲状腺素T<sub>3</sub>受体位于线粒体内膜上,在心肌胞浆中存在糖皮质类固醇和盐皮质类固醇受体。现已有人用放射受体分析发现动物组织有三种多巴胺受体(D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>)的存在。β-肾上腺受体亚单位是低聚体结构。

(二) 作为研究组织细胞功能的手段 存在于细胞膜上的受体蛋白参与细胞表面的调节装置及细胞的功能活动。受体蛋白与微丝、微管相联,当受体与相应配体结合时,对其相联的微丝、微管也起作用。而微丝、微管的结构变化(如聚合或解聚)也影响受体在细胞表面的活动。因此,细胞内的微丝、微管与细胞表面膜受体共同组成细胞表面调节装置,对细胞分裂的控制,机体内诸细胞间的接触抑制,使体内细胞间协调共处等起着重要作用。一种器官功能可有多

种受体参与调节,如卵巢的周期性变化中有雌激素、β-肾上腺能等多种受体的调节控制。

对生物膜选择透过机理的研究发现,狗肾远侧肾小管对糖的再吸收与受体有关。在此区存在四种糖受体,即葡萄糖受体、甘露糖受体、肌醇受体位于刷状缘,d-葡萄糖受体位于基底面,不同受体要求糖的不同位置上有合适的羟基,组成选择性势垒,糖通过两层势垒再吸收入血中。

自苏列林德(Sutherland)提出激素作用的第二信使学说后,一般认为激素通过cAMP发挥作用。但近年来,对第二信使提出了不少其他物质和途径,最突出的是关于胰岛素的第二信使学说。哥德芬(Goldfine)等证明胰岛素能进入细胞与胞核专一性结合,胰岛素与细胞表面受体相互作用的结果,改变细胞的通透性,促进DNA、RNA和蛋白质合成。

最近发现,细胞通讯中需要受体参加。各种蛋白质移位时在蛋白质中有“信号”顺序,在特异的细胞膜上有不同识别“信号”顺序的特异受体,通过受体的作用后,发生一系列的生化变化。

(三) 利用受体寻找新药及研究药理作用 药物与受体的关系被比拟为“锁、钥”结构关系。凡与受体有很强亲和力,亦有内在活性的药物,其作用表现为兴奋受体,称为激动剂(agonist),凡与受体亲和力强,但无内在活性者,它排斥介质与相应受体的结合,表现为受体阻断现象,称为拮抗剂(antagonist)。如吗啡受体激动剂的作用要比吗啡的镇痛作用强千倍,而其特异性很强的受体拮抗剂环丙羟丙吗啡、纳洛酮具有拮抗吗啡的作用。

在研究心脏节律时发现心脏有α和β两种肾上腺素能受体。交感影响心脏产生心律失常仅通过β受体,故可设想通过兴奋α肾上腺素能受体的特异性药物,达到抗心律失常的一个途径。但不同种属动物对强心甙正性肌力作用的敏感性不同,可能是对细胞强心甙受体亲和力及抑制Na<sup>+</sup>·K<sup>+</sup>-ATP酶的能力有关,在大鼠心脏有对药物亲和力不同的结合部位,其离

解常数分别为  $K_m = 10^{-7} M$  和  $K'_m = 3 \times 10^{-5} M$ 。在豚鼠心脏只有一种强心甙受体,  $K_m = 1.3 \times 10^{-7} M$ 。

(四) 用于研究疾病发生机制。霍乱肠毒素、破伤风毒素的毒性极高,在很短时间内能与细胞膜上作为受体的神经节苷酯结合成无活性的毒素——受体复合物,经变构效应后才具有生物活性而存在于膜的内侧发挥毒性作用。白喉毒素通过与膜糖蛋白结合或破坏膜受体而进入细胞发挥毒性。

在甲状旁腺组织细胞上有  $Ia 25(OH)_2D$  的受体,由于受体功能变化引起  $Ia 25(OH)_2D$  生产不足,导致血清 Ca 和 P 水平下降,出现继发性甲状旁腺功能亢进,骨骼内矿物质沉淀减少和神经肌肉的功能紊乱。

抗体的克隆选择学说的创始者波尼特 (Burnet) 认为,每个淋巴细胞表面带有一个特异的抗体受体,当抗原进入机体,它需要找到带相应受体的淋巴细胞,并刺激之,细胞按已知方式产生大量的特异性抗体。抗原抗体结合时,抗体的 FC 段被激活,能与 K 细胞的 FC 段受体结合,使 K 细胞活化,通过细胞外非吞噬性的杀伤作用,破坏靶细胞,造成组织损伤,如慢性淋巴细胞性甲状腺炎。一些免疫性疾病,如伴有形成甲状腺抗体的自身免疫性疾病格来威 (grave) 氏病是被自身的甲状腺刺激素 (TSH) 受体分子所致。

(五) 作受体疾病的诊断根据。由于受体功能的变化,受体的部分或全部缺乏,受体亲和力缺陷及产生受体的抗体等都会引起受体病。可根据测得的受体变化作出诊断。这方面已有大量报道。

(六) 作某些恶性肿瘤的治疗指导和预后判断。一些动物和人的恶性肿瘤细胞有特异性激素受体。用  $^{125}I$  标记的外源凝集素伴刀豆球蛋白 A (ConA)、戊麦菌凝集素 (WGA) 标记糖蛋白区测定正常细胞和肿瘤细胞 100 K 区中总的结合量百分比,表明 100 K 蛋白质是糖基化时产生的异常成分,这种异常成分存在于各种恶性细胞,包括癌、肉瘤、淋巴瘤和黑色素瘤

细胞中,但不存在正常和杂交瘤细胞中。这种 100 K 蛋白质可能是胰岛素受体。人类肿瘤中,乳腺癌有雌激素和黄体酮受体,子宫内膜癌有雌激素受体,急性淋巴细胞性白血病的淋巴(母)细胞有糖皮质激素受体。对有激素受体的肿瘤,用激素治疗效果较好,而受体阴性者用化疗效果较好,但复发率高。

综上所述,放射受体测定法对生物学和医学的基础理论及临床研究已显示出它的价值。随着可以从细胞提纯受体蛋白,并在体外检定其结合力,此技术的应用已日益广泛和完善。现已有人根据受体的作用功能,把放射受体测定法改进为受体调节测定法 (receptor modulation assay)。

## 参 考 文 献

- Burman K. et al; 1981. Estrogen receptors in the neuro-endocrien tissues of the Ewe in relation to breed, season, and tage of the estrous cycle. *Biology of reproduction* 24(2): 323—329.
- Feldman D. et al.; 1977. Glucocorticoid receptors in adiposs tissue. *Endocrinology*. 100(2): 398—405.
- Frederick C. Lung. 1980. Reletionship between radioreceptor assay and radioimmunoassay estimates of prolactin in rat pituitary tissue, inculation medium, and serum; effects of dialysis on measurements of the hormone. *Endocrinology*, 106(1): 61—67.
- Hannelore Braunsberg et al.; 1980. practical and theoretical aspects in the analysis of steroid receptors. *J. steroid biochem.* 13(10): 1133—1145.
- Korenmam S. G. et al.; 1970. Steroid assay by protion bining, Stockholm. 291, New York.
- Lefkewilz, R. et al.; 1970. Radioreceptor assay of adreno-corticopic hormones; new approach to assay of polypeptide hormones in plasma: *Science* 170: 633—635.
- Leverly G. S. 1976. Hormone-receptor interaction: molecular aspects. 4, 174, marcel dekker inc. New York and Basel.
- Macaron, C. et al.; 1978. Recepto dysbunction and hormone resistiance in human diseases—a review. *AM. J. Med. Sci.* 275(2): 149—158.
- Poplawski S. T. et al.; 1977. Irreversible binding of 3-14C-3-14C-antipyryne to hepatic protien in vivo and in metabolizing liver microsomes. *Naungn-Schmiedeborg's arch pharmacology.* 297: 105—110.
- Shields, R. 1978. Growth factors for tumours. *Nature*, 272(5655): 670—671.
- Sokoloff P. et al.; 1980. Three classes of dopamine receptor (D2 D3 D4) identified by binding studies with  $^3H$  apomorphine and  $^3H$ -Domperidone. *Nanyn-Schmiedeborg's Arch pharmacology* 315: 89—102.