

·实验核医学·

受体结合实验及其在放射性显像剂研究中的应用进展

周雪 乔晋萍 孔爱英 朱霖

【摘要】受体结合实验是一种重要的药物筛选方法,它通过体外实验来考察配体与受体的结合能力。目前,很多放射性显像剂是利用放射性配体与体内受体结合的高度选择性来进行受体显像的。因此,受体结合实验是放射性显像剂研究中广泛使用的一种体外评价方法,在放射性显像剂设计与筛选中发挥了重要作用。

【关键词】放射性药物;药物设计;受体结合实验;放射配体测定

Progress on the application of ligand receptor binding assays in radiopharmaceuticals

ZHOU Xue*, QIAO Jin-ping, KONG Ai-ying, ZHU Lin.

(*Key Laboratory of Radiopharmaceuticals, Ministry of Education, College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

【Abstract】 Receptor binding assay is an important drug screening method, which can quickly and inexpensively study the interactions between the targeted receptor and the potential ligands in vitro and provide the information of the relative binding affinity of ligand-receptor. The imaging of many radiopharmaceuticals is based on highly selective radioligand-receptor binding. The technique plays an important role in the design and screening of receptor-targeting radiopharmaceuticals.

【Key words】 Radiopharmaceuticals; Drug design; Ligand receptor binding assay; Radioligand assay

受体是一种能够识别和选择性结合某种配体(信号分子)的大分子物质,多为糖蛋白,一般至少包括两个功能区域:一是与配体结合的区域;二是产生效应的区域。当受体与配体结合后,因构象改变而产生活性,进而启动一系列信号转导过程,最终表现为生物学效应。受体与配体间的相互作用具有3个主要特征:①特异性;②饱和性;③高度的亲和力。

配体与受体的结合是一种分子识别过程,主要靠氢键、离子键与范德华力发挥作用。随着两种分子空间结构互补程度的增加,相互作用基团之间的距离就会缩短,作用力就会大大增加,因此,分子空间结构的互补性是受体和配体特异结合的主要因素^[1]。许多药物在体内都是通过和特异性受体相互作用,改变细胞的生理生化功能而产生效应的。

受体结合实验是一种在体外直接观察受体的实验手段,该方法考察的是配体与受体的结合能力,而非受体功能,且与受体的信号通路无关。体外受体结合实验已被广泛用于阐明药物的作用机制,探讨疾病的病因、发病机理,提高临床合理用药和诊断水平,探寻新的受体、受体亚型和内源性配体,以及新药设计和药物筛选等领域^[2]。该方法研究效率高、简便,样品用量少,毫克量的化合物即可用于研究,大大促进了受体新药的研发。

放射性显像剂是专门用于核医学领域的一类特殊药物,其结构中含有放射性核素,根据核素发出的射线而达到诊断和治疗疾病的目的。很多放射性显像剂是利用放射性配体与体内受体结合的高度选择性而进行显像的,受体结合实验是目前放射性显像剂研究中广泛使用的一种体外评价方法,在放射性显像剂设计与筛选中发挥了重要作用^[2]。

1 受体结合实验的基本原理

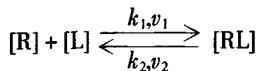
根据 Clark 的占领理论,受体与配体之间的相互作用是可逆的,受体与配体的结合反应遵循质量作用定律^[1]:

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2010.06.001

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973计划)(2011CB504105)项目;国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02A408)项目

作者单位:100875,北京师范大学化学学院放射性药物教育部重点实验室(周雪,乔晋萍,朱霖);100071北京,总后卫生部药品仪器检验所(孔爱英)

通信作者:乔晋萍 (E-mail: qiaojp920@gmail.com)



上述反应式中, R 和 L 分别为受体和配体, [R]和[L]分别为游离受体和游离配体的浓度, [RL]为受体配体复合物浓度, v_1 和 v_2 分别为结合速率和解离速率, k_1 和 k_2 分别为结合速率常数和解离速率常数。其中, $v_1 = k_1[R][L]$, $v_2 = k_2[RL]$ 。当反应达到平衡时, $v_1 = v_2$, 即 $k_1[R][L] = k_2[RL]$ 。

k_2 与 k_1 的比值为平衡解离常数, 即 k_D 值, 表示受体与配体亲和力的大小, k_D 值越小, 亲和力越大, 临床所用剂量越小。对一定数量和一定亲和力的受体来说, [RL]与[L]之间为非线性关系, [L]从零开始上升时, [RL]先是上升很快, 以后逐渐变慢, 最后绝大多数受体都变为复合物, 受体达到饱和。这就是饱和曲线, 曲线的高度反映了受体数量的多少, 曲线上升的快慢则反映受体和配体的亲和力大小, 即亲和力越大, 曲线上升越快。

受体结合实验常用的方法有两种: 饱和法和竞争取代反应法。其中, 饱和法又分为单点饱和法和多点饱和法。单点饱和法操作简单、样本用量少, 一般用来计算受体结合容量, 不能得到 k_D 值, 误差也比较大; 多点饱和法是在一定量的受体制剂中, 逐步增加配体的量, 使受体结合趋于饱和。可通过曲线拟合法或直线拟合法计算受体结合容量和配体与受体结合的亲和力(用 k_D 表示), 结果可靠性高。但受体标本、配体用量大, 工作量大。竞争取代反应是在反应系统中加入定量的配体和受体制剂, 并逐渐增加竞争性抑制剂, 该法可用来测定抑制 50%受体结合的抑制剂浓度及抑制剂与受体结合的亲和力(用抑制常数 k_i 表示)^[1-3]。在受体研究领域, 竞争取代反应法是研究受体与配体结构功能关系的重要方法。在药物研究领域, 该法则可用来研究药物的作用机理及进行药物筛选和发现新药等。

2 受体样本的来源

用于受体结合实验的理想受体组织应含有高密度的靶受体和低密度的与配体非特异结合的受体。在受体结合实验中, 所用的受体材料可以是组织切片、完整的单层培养细胞或游离的活细胞、粗制的或纯化的细胞膜受体和可溶性的受体蛋白等^[1-3]。

2.1 组织来源

受体的组织来源主要是实验动物或人血供停止

30 min 内的新鲜组织, 4℃保存 24 h 内的组织也可用于受体结合实验。其中, 胎盘组织是受体来源丰富的材料, 胎盘组织内含上皮生长因子、血小板衍生因子、胰岛素、肾上腺素能受体、胰岛素样生长因子等多种受体。Kung 等^[4]在进行 ¹²⁵I-尼索西汀与去甲肾上腺素转运体的结合实验时, 不仅使用了过度表达去甲肾上腺素转运体的 LLC-PK1 细胞(一种肾小管上皮细胞), 还使用了大鼠前脑皮层的组织样本。

2.2 细胞来源

完整的活细胞来源于组织分离出的游离细胞、血细胞或是体外培养的细胞。完整细胞的受体处于原有的正常环境中, 由于细胞膜未受破坏, 膜内 pH 值、离子梯度保持正常。受体与其相连的效应系统(如 G 蛋白)也保存完好。因此, 可以在受体功能较为完全的情况下研究受体, 便于同时观察配基与受体的结合情况和细胞的生物效应, 所得结果更能反映受体的生理特点。但完整细胞的受体分析条件较难控制, 操作过程可能导致细胞表面生理活性的改变, 因此结果有时不够稳定。Choi 等^[5]在研发叶酸受体肿瘤显像剂时, 采用受体结合实验筛选化合物, 用人口腔表皮样癌细胞系 KB 细胞制备受体样本, 并用人肺癌细胞系 A549 细胞作为缺乏叶酸受体的阴性对照。

2.3 细胞膜来源

膜制剂是优良的受体来源, 使用膜制剂可以减少非特异性结合率, 而且在制备过程中, 通过洗膜的方法, 可以将内源性配基洗去, 并除去部分蛋白溶解酶。膜制剂保存了受体结合所需要的膜双层脂质结构和受体的药理学特征, 且便于保存, -70℃可保存数月。

2.4 蛋白来源

1%的聚乙二醇-辛基苯基醚可以有效地将大多数跨膜受体蛋白从双脂层中溶解出来, 得到可溶性蛋白, 用于受体结合实验的研究。高振霆等^[6]用过氧化物酶体增殖剂活化受体 γ 亚型(peroxisome proliferator-activated receptors gamma, PPAR γ) 配体结合域的蛋白制剂研究了 PPAR γ 与配体的结合亲和性, 并计算出了 PPAR γ -LY171883 (PPAR γ 的一种配体)的 k_D 和 k_i 值。

3 受体结合实验的分析方法

通过受体结合实验可以测定反应达到平衡时结

合配体的量, 求解受体的最大数量与平衡解离常数。反应达到平衡后, 先将结合型配体与游离型配体分离, 常用的分离方法有: 离心法、过滤法、吸附法、透析法和电泳法等; 然后选择合适的分析方法检测结合型或游离型配体的量。目前已报道的分析方法包括受体放射配基结合分析法(radioligand binding assays of receptors, RBA)、放射自显影法、荧光光谱法、等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)、高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)、液相层析-质谱测定法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)等^[7-10]。

3.1 RBA

RBA 简称为受体放射分析, 是一个分析受体的经典方法, 应用放射性核素标记的配体与特异的受体相结合, 研究受体的亲和力大小和受体数量, 也可用于研究受体亚型等。

RBA 的主要优点包括: ①高灵敏度。由于高比活度的配体和高亲和力的受体结合, 保证了测定的灵敏度很高, RBA 的灵敏度可以达到 10^{-15} mol/L 水平; ②特异性强, 专一性好。放射性核素标记一般不改变配体结合的活性, 具有严格构型和构象的标记配体才能与特异的受体结合, 因此, 配体分子结构的特异性保证了结合反应的特异性和专一性; ③受体试剂的多用性。同一组织或细胞上可能存在多种受体, 某种组织试剂可与多种配体进行受体结合分析。另外, 人和动物的受体存在相容性, 用动物的受体研究得到的结果可以用于人类, 这就给受体研究带来了便利^[11]。

然而, RBA 也有一些不足之处, 主要包括缺乏受体的标准品; 受体标本在制备和贮存过程中结构容易发生改变; RBA 质量控制比较困难, 造成实验结果稳定性差。另外, 放射性标记配体在使用和存放时放射性核素发生脱落和衰变, 造成配体结构改变和放射性比活度改变。因此, 在使用该方法时要仔细考虑每一个细节, 合理设计实验流程, 克服各种影响因素, 采用正确的方法处理数据。

3.2 放射自显影法

放射自显影法是将具有放射性的特异性配体与受体结合, 显影后检测放射性配体结合位点的密度, 从而观测受体的活性、数目等特征, 具有定位、定量准确, 灵敏度高的特点。用放射自显影法

研究受体结合, 可以得到受体的数量和分布特征, 以及病理、生理和药理学信息。但该方法无法测定 k_D 和 k_I 值, 并且需要有合适的放射性配体。有报道用放射自显影法研究了 ^{35}S -ACPPB (一种甘氨酸转运体) 在大鼠和恒河猴脑切片中的特异性结合, 结果发现, ACPPB 在脑干、小脑、丘脑、皮层的白质以及脊髓灰质中有较高的亲和性^[12]。

3.3 荧光光谱法

荧光光谱法作为一种重要的现代仪器分析方法, 具有灵敏度高、选择性强、用量少、方法简便、信息多样等优点, 且避免了使用放射性配体, 因而成为受体结合实验中广泛应用的分析方法之一。高振霆等^[6]在研究 PPAR γ 与配体的结合亲和性时, 采用了顺十八碳四烯酸荧光探针进行荧光光谱分析。Kecskes 等^[13]采用该方法研究了 MRS5346 (一种腺苷受体拮抗剂) 与受体的结合反应, 得到了相应的 k_D 和 k_I 值。

3.4 ITC

ITC 是近年来发展起来的一种研究生物热力学与生物动力学的重要方法, 它通过高灵敏度、高自动化的微量量热仪连续、准确地监测和记录一个变化过程的量热曲线, 原位、在线、无损伤地同时提供热力学和动力学信息。ITC 具有许多独特之处, 包括对研究体系的溶剂性质、光谱性质和电学性质等没有任何限制条件, 即具有非特异性的独特优势; 样品用量小, 方法灵敏度和精确性高; 实验时间较短, 操作简单; 样品在测量时不需要制成透明清澈的溶液, 而且量热实验完毕后的样品未遭破坏, 还可用于后续生化分析。运用 ITC 可获得生物分子相互作用的完整热力学参数, 包括结合常数、结合位点数、摩尔结合焓、摩尔结合熵、摩尔恒压热容和动力学参数等^[8]。

3.5 HPLC

HPLC 是一种高灵敏度、高选择性的高效快速的分离分析方法, 广泛用于微量组份的分析测定, 也可以作为受体结合实验研究的一种分析方法。蒋心惠等^[14]采用 HPLC 配荧光检测器研究了硫酸特布他林与红细胞表面 β_2 -肾上腺素受体的结合量, 该方法安全、简便、灵敏, 结果发现硫酸特布他林与红细胞膜受体的非特异性结合量高于特异性结合量。他们用同样的方法研究了沙丁胺醇与红细胞表面 β_2 -肾上腺素受体的结合量, 结果发现沙丁胺醇

的非特异性结合量和特异性结合量均随沙丁胺醇加入量的增加而增大^[15]。

3.6 LC-MS

LC-MS 是将 HPLC 的高分离效能和质谱的高灵敏度、高专属性、通用性及较强的结构解析能力相结合的一种重要分析手段。该方法可用于受体结合实验的定量检测,对结合型或游离型的配体都可以检测,实验方法灵活,应用更加广泛,具有独特的优势:①待测配体与标准配体都是化合物原形,不需要进行标记及化学修饰;②适用的化合物较广,涵盖了绝大多数有机物;③开发的方法具有较高的通量,且可实现半自动化分析^[7]。但是,该方法也存在一些问题,比如由于孵育体系中含有大量缓冲盐溶液,进行 LC-MS 分析时,会产生基质效应和离子抑制。

Hofner 等^[16]采用 LC-MS 对已知的多巴胺 D₁ 亚型和 D₂ 亚型受体拮抗剂进行竞争结合实验的测定,定量分析离心后上清液中游离的标准配体,得到了相应的 k_i 值,但测定结果与 RBA 所得结果有较大偏差,推测是由于非特异性结合较高所致。他们还测定了多种单甘油酯酰基转移酶拮抗剂的亲和性。通过 96 孔板过滤分离,并将游离型与结合型标准配体解离出来,定量测定其浓度,得到的 k_i 值与 RBA 测定结果的一致性有所改善^[17]。Hofner 等^[18]还尝试使用基质辅助激光解吸质谱法及选用较短的色谱柱等方法提高分析速度,并进行了分析方法的验证,证明了 LC-MS 用于受体结合实验的可行性。

另外,毛细管电泳、核磁共振、紫外光谱以及电化学等分析方法都广泛运用于药物与蛋白质相互作用的研究中。由于受体本身是一种蛋白质,因此,这些方法应该也可用于受体-配体结合实验的研究。

4 受体结合实验在放射性显像剂研究中的应用

随着越来越多的受体分子结构被阐明,在已知配体结合位点结构的基础上开发亲和力高、特异性强、体内稳定性好的受体显像剂,是放射性显像剂研究的一个热点,为观察由受体所介导的细胞内特定的生化过程提供了窗口。目前,常见的受体显像剂有:肿瘤受体显像剂、脑受体显像剂和肝受体显像剂等,在这些受体显像剂的研究过程中,结合实验作为一种重要的筛选手段,发挥了巨大的作用。

4.1 肿瘤受体显像剂

由于基因扩增或基因突变等原因,肿瘤细胞膜上常有一些受体过度表达,利用放射性配体与肿瘤细胞膜上的特异性受体结合而使肿瘤显像,是一种敏感性和特异性较高的显像手段。目前研究较多的是些调节性肽类受体,如生长抑制素受体、叶酸受体、血管活性肠肽受体、P 物质受体,类固醇类激素受体等^[19]。 σ 受体在许多肿瘤中过度表达,Hou 等^[20]用小鼠乳腺癌细胞的细胞膜制剂进行了受体结合实验,筛选合成的苯甲酰胺类衍生物,结果发现其中的 5-碘-2,3-二甲氧基-N-[2-(6,7-二甲氧基四氢异喹啉基)-丁基] 苯甲酰胺对 σ -2 受体具有高亲和性。

4.2 脑受体显像剂

脑受体显像可在人体正常生理和病理状态下,显示脑受体的数目、活性和密度,并对受体的空间分布进行定位和定量分析,从而有助于揭示脑的多种活动机制和一些与受体有关的神经精神疾病的发病机理,并对相应的疾病做出诊断。大脑内受体的种类很多,神经元之间的联系也很复杂,要实现对脑受体显像,关键是要有合适的放射性配体。目前研究比较多的包括多巴胺受体、乙酰胆碱受体、5-羟色胺受体、阿片受体和可卡因受体等的放射性配体,为脑受体显像剂的研究奠定了一定的基础,并在实际应用中取得了不少成绩^[20-29]。朱霖等^[29]设计合成了一系列作用于囊泡转运体的化合物,¹⁸F 标记后,用于帕金森病等神经退行性疾病的诊断,通过 RBA 进行了受体结合实验的研究,并对这些化合物进行了筛选,从中找出具有开发前景的显像剂。

4.3 肝受体显像剂

当肝炎、肝硬化或肝癌等肝损伤性疾病发生时,肝受体的数量和活性会发生改变,通过肝受体显像可以反映肝脏生理及病理状况,对于疾病的诊断具有重要意义。肝细胞膜上存在去唾液酸糖蛋白受体、法尼酯衍生物 X 受体等。⁹⁹Tc^m-半乳糖新白蛋白 (⁹⁹Tc^m-galactosyl-neoglycoalbumin, ⁹⁹Tc^m-NGA) 是一种能够鉴别诊断肝良恶性疾病的肝受体显像剂,研究发现,⁹⁹Tc^m-NGA 与受体之间具有很高的亲和力^[27]。肝癌病变组织由于缺乏 NGA 受体,在 ⁹⁹Tc^m-NGA 影像上显示为冷区;良性肝脏疾病由于含有正常功能的肝细胞,病变处可显示为 ⁹⁹Tc^m-NGA 摄取正常或增高。

5 结语

综上所述,受体结合实验通过体外实验来考察配体与受体的结合能力,是放射性显像剂研究中广泛使用的一种体外评价方法,在放射性显像剂设计与筛选中发挥着重要作用。

参 考 文 献

- [1] 刘长征,王浩丹,胡雅儿.实验核医学与核药学.北京:人民卫生出版社.1999:218-249.
- [2] Bigott-Hennkens HM, Dannoon S, Lewis MR, et al. In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2008, 52(3): 245-253.
- [3] Pinyot A, Nikolovski Z, Bosch J, et al. On the use of cells or membranes for receptor binding: growth hormone secretagogues. Anal Biochem, 2010, 399(2): 174-181.
- [4] Kung MP, Choi SR, Hou C, et al. Selective binding of 2-[125I]iodo-nisoxetine to norepinephrine transporters in the brain. Nucl Med Biol, 2004, 31(5): 533-541.
- [5] Choi H, Choi SR, Zhou R, et al. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery. Acad Radiol, 2004, 11(9): 996-1004.
- [6] 高振鑫,罗海彬,陈莉莉,等.顺十八碳四烯酸荧光探针法研究 PPAR γ 与配体的结合亲和力.中国科学 B 辑, 2004, 34(6): 441-448.
- [7] Need AB, McKinzie JH, Mitch CH, et al. In vivo rat brain opioid receptor binding of LY255582 assessed with a novel method using LC/MS/MS and the administration of three tracers simultaneously. Life Sci, 2007, 81(17-18): 1389-1396.
- [8] Poon GM. Explicit formulation of titration models for isothermal titration calorimetry. Anal Biochem, 2010, 400(2): 229-236.
- [9] Cornelius P, Lee E, Lin W, et al. Design, synthesis, and pharmacology of fluorescently labeled analogs of serotonin: application to screening of the 5-HT_{2C} receptor. J Biomol Screen, 2009, 14(4): 360-370.
- [10] Goswami R, Ponde DE, Kung MP, et al. Fluoroalkyl derivatives of dihydrotetrabenazine as positron emission tomography imaging agents targeting vesicular monoamine transporters. Nucl Med Biol, 2006, 33(6): 685-694.
- [11] Atack JR, Eng WS, Gibson RE, et al. The plasma-occupancy relationship of the novel GABAA receptor benzodiazepine site ligand, α 51A, is similar in rats and primates. Br J Pharmacol, 2009, 157(5): 796-803.
- [12] Zeng Z, O'Brien JA, Lemaire W, et al. A novel radioligand for glycine transporter 1: characterization and use in autoradiographic and in vivo brain occupancy studies. Nucl Med Biol, 2008, 35(3): 315-325.
- [13] Kecskés M, Kumar TS, Yoo L, et al. Novel Alexa Fluor-488 labeled antagonist of the A(2A) adenosine receptor: Application to a fluorescence polarization-based receptor binding assay. Biochem Pharmacol, 2010, 80(4): 506-511.
- [14] 蒋心惠,周岐新.高效液相色谱法测定硫酸特布他林与红细胞膜表面 β_2 肾上腺素受体结合量.分析化学, 2010, 38 (3): 377-380.
- [15] 蒋心惠,杨俊卿,周岐新.沙丁胺醇与红细胞膜表面 β_2 -肾上腺素受体结合量的高效液相色谱法测定.分析测试学报, 2010, 29(8): 837-840, 845.
- [16] Höfner G, Wanner KT. Competitive binding assays made easy with a native marker and mass spectrometric quantification. Angew Chem Int Ed Engl, 2003, 42(42): 5235-5237.
- [17] Zepperitz C, Höfner G, Wanner KT. MS-binding assays: Kinetic, saturation, and competitive experiments based on quantitation of bound marker as exemplified by the GABA transporter mGAT1. ChemMed-Chem, 2006, 1(2): 208-217.
- [18] Höfner G, Merkel D, Wanner KT. MS binding assays-with MALDI toward high throughput. ChemMedChem, 2009, 4(9): 1523-1528.
- [19] Emonds KM, Swinnen JV, Mortelmans L, et al. Molecular imaging of prostate cancer. Methods, 2009, 48(2): 193-199.
- [20] Hou C, Tu Z, Mach R, et al. Characterization of a novel iodinated sigma-2 receptor ligand as a cell proliferation marker. Nucl Med Biol, 2006, 33(2): 203-209.
- [21] Oya S, Choi SR, Kung MP, et al. 5-Chloro-2-(2-((dimethylamino)methyl)-4-iodophenylthio) benzenamine: a new serotonin transporter ligand. Nucl Med Biol, 2007, 34(2): 129-139.
- [22] Lakshmi B, Kung MP, Lieberman B, et al. (R)-N-Methyl-3-(3-(125I)-pyridin-2-ylxy)-3- phenylpropan-1-amine: a novel probe for norepinephrine transporters. Nucl Med Biol, 2008, 35(1): 43-52.
- [23] Bourdier T, Poisnel G, Dhilly M, et al. Synthesis and biological evaluation of N-substituted quinolinimides, as potential ligands for in vivo imaging studies of delta-opioid receptors. Bioconjug Chem, 2007, 18(2): 538-548.
- [24] Li J, Fish RL, Cook SM, et al. Comparison of in vivo and ex vivo [³H]flumazenil binding assays to determine occupancy at the benzodiazepine binding site of rat brain GABAA receptors. Neuropharmacology, 2006, 51(1): 168-172.
- [25] Barth VN, Chernet E, Martin LJ, Need AB, et al. Comparison of rat dopamine D2 receptor occupancy for a series of antipsychotic drugs measured using radiolabeled or nonlabeled raclopride tracer. Life Sci, 2006, 78(26): 3007-3012.
- [26] Zhu L, Liu J, Kung HF. Synthesis and evaluation of 2-amino-dihydrotetrabenazine derivatives as probes for imaging vesicular monoamine transporter-2. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19 (17): 5026-5028.
- [27] Stadalnik RC, Vera DR. The evolution of (^{99m}Tc)-NGA as a clinically useful receptor-binding radiopharmaceutical. Nucl Med Biol, 2001, 28(5): 499-503.

(收稿日期: 2010-09-15)