

- 603
- 10 赵松吉.  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  直肠-门静脉显像对慢性肝病门静脉分流评价的探讨. 中华医学会第三届全国核医学学术会议论文交流目录, 1989; 8
  - 11 利波纪久. 核医学イメージングハンドブック 第一版, 大阪: 企画/ありい出版株式会社, 1986; 92-93
  - 12 Tonami N et al. J Nucl Med, 1982; 23: 965-972
  - 13 Urbain D et al. Eur J Nucl Med, 1986; 12: 267-270
  - 14 Urbain D et al. Nucl Med Commun, 1986; 7: 25-32
  - 15 Kashiwagi T et al. Radiology, 1988; 169 (1): 137-140
  - 16 Yen CK et al. J Nucl Med, 1989; 30: 1702-1707
  - 17 柏木 激·他. 日本消化器病雑誌, 1990, 87: 816-821
  - 18 Yen CK et al. J Nucl Med, 1986; 27: 1321-1326
  - 19 陈绍亮 等. 上海医科大学学报, 1992; 19(5): 321
  - 20 陈绍亮 等. 核技术, 1992; 15: 641

## 毒蕈碱受体亚型定量分布研究进展

上海第二医科大学 陆 敏综述 夏宗勤审

**摘 要:** 随着毒蕈碱(M)受体异质性的确定及分子生物学基础的阐明, 亚型的定量分布研究取得了一系列的进展。本文介绍这方面的研究现状, 放射配基结合分析、分子生物学技术、免疫沉淀分析等方法的特点, 应用及今后的发展方向。

毒蕈碱(M)受体是一类位于细胞膜上的糖蛋白, 分子量约为50kD, 结构同所有与G蛋白偶联的受体结构相似, 其氨基酸序列形成7个跨膜区及连接这些跨膜区的3个胞浆环(i1~i3)和3个细胞外环(o2~o4)氨基端位于细胞外, 羧基端位于细胞内<sup>[1]</sup>。80年代初, 发现了M受体拮抗剂哌仑西平(PZ), 提出了至少有两个亚型即M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, 而近来分子克隆研究证明至少有五种不同的M受体亚型, 即m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub>, m<sub>4</sub>, m<sub>5</sub><sup>[2]</sup>。各亚型在不同的组织有不同分布和含量, 并与其各自的生理功能有关。测定各组织M受体各亚型的含量和分布, 对阐明M受体的结构、功能、代谢调节、亚型分类和疾病状态及各年龄期M受体含量变化有重要的意义<sup>[3]</sup>。有多种方法可用于M受体亚型的定量分布研究, 本文就目前常用的几种方法的特点及研究现状作一概述。

### 一、放射配基结合分析

#### 受体的放射配基结合分析

用放射性核素标记M受体的配基与相应的M受体进行特异性的结合反应, 从而对M受体进行定性和定量研究。在此之前, 对受体的研究主要靠观察受体激动剂和拮抗剂的生理或药理效应, 对受体与配基相互作用的观察基本停留在宏观水平, 不能对受体在组织细胞的分布进行定位, 更无法从分子水平上认识受体及其与配基相互作用的本质和意义。从60年代开始, 对M受体的放射配基结合反应进行了大量的研究, 理论上和方法上都取得了重大突破。

80年代以后, 随着M受体亚型特异性配基的发现, 利用氘标记的配基测定各组织中的M受体亚型含量成为可能。到目前为止已有数十种配基发现, 较有用的配基有PZ, 化

合物AF-DX-116, McN-A-343, 二苯乙酸-4-哌啶酯碘甲烷季胺盐(4-DAMP), 六氢二苯哌丁醇(HHS), 甲基东莨菪碱(NM-S), 二苯羟乙酸奎宁酯(QNB), N-甲基QNB等。现已知道PZ, AF-DX-116及HHS分别对M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>有最高的亲和力<sup>[4]</sup>。利用这些配基, 目前研究M受体亚型的方法主要有二种, 一种是采用放射性标记亚型选择性配基, 若这种配基仅对一种亚型结合, 就可直接用来定性和定量分析该种受体亚型。但是配基的选择性往往是相对的, 也即它们对不同的亚型都有一定的结合能力, 但亲和力不同, 这时Scatchard作图呈现向上凹的曲线, 采用一定的数学方法可求出高亲和态和低亲和态的结合位点数; 另一种是采用亚型选择性配基竞争性抑制非选择性标记配基与受体的结合, 所得数据用Hofstee模型处理, 得到一条向上凹的曲线, 同样可以求出组织中不同亚型受体的相对比例。此外, 也可选一种高度特异性的非标记配基抑制其中一种受体亚型与标记配基的结合, 对另一种受体亚型进行饱和分析, 测定该种亚型的含量。利用上述两种方法测定M受体三个亚型在各组织中的含量分布发现, M<sub>1</sub>受体主要分布在皮质和海马, 嗅球中的含量也很高, 而在外周组织则主要分布在交感神经节、下颌下腺及输精管等器官; M<sub>2</sub>受体主要分布在心脏, 至少构成M受体总密度的92%以上, 此外在后脑、脑干、中脑和丘脑以及外周组织的回肠、子宫等器官也有一定的分布; M<sub>3</sub>受体亚型则主要分布在腺体及平滑肌, 而其它组织较少<sup>[5]</sup>。近来研究表明, 在大鼠纹状体和兔外周肺存在M<sub>4</sub>受体亚型<sup>[6]</sup>。

放射配基结合分析方法是直接观察受体含量分布和受体性质的重要手段, 方法成熟、可靠。它不仅能定量地测定M受体, 而且在M受体的结构、功能、结合特性、异质性等研究中, 更是不可缺少的基本方法。然而, 由于目前还没有一种配基对M受体某种亚型

的选择性超过其它亚型的十倍以上, 也没有一种配基对M<sub>4</sub>或M<sub>5</sub>有选择性, 因而此法在同时有多种亚型存在的组织中, 要精确地测定某一亚型的含量尚有困难<sup>[7]</sup>。此外, 某些配基尚受化学稳定性的影响。寻找对M受体各亚型的高亲和力, 高特异性配基是今后研究的方向之一。

### 放射自显影

利用卤化银乳胶记录、检查和测量放射性, 得到放射自显影像。在放射配基结合的基础上利用自显影术, 已对M受体亚型的定量分布进行了广泛的研究。用<sup>[3H]</sup>-PZ进行光镜自显影发现, 特异性结合的PZ在海马的CA区、大脑回分子层、纹状体、皮质顶部的板层丰富。而在胼胝体、低位脊髓(除背角外)则无分布<sup>[8]</sup>。用<sup>[3H]</sup>-QNB加PZ作竞争性抑制进行自显影研究, 也证实了上述结果。体外放射自显影观察到对PZ低亲和力的M<sub>2</sub>受体亚型存在于心脏、小肠、脑桥、脊髓。利用定量放射自显影, Cortes等<sup>[9]</sup>进一步确定了大鼠脑M受体的含量(用<sup>[3H]</sup>-NMS测检结合被PZ抑制的情况), 对PZ低亲和力位点主要在脑干和丘脑部分。

放射自显影技术能在形态学的基础上观察机能及含量变化, 灵敏度高, 能给出直观的受体分布图像, 操作简便。此外还可用于定量和双标记示踪实验, 在原位杂交及Northern blot分析中也广泛应用, 但是也受其配基对M受体亚型选择性的影响。

## 二、分子生物学技术

### 原位杂交技术

由于M受体五个亚型的基因已被克隆, 其氨基酸序列已阐明, 利用与M受体各亚型的mRNA互补的寡核苷酸探针进行原位杂交, 测定M受体各亚型的mRNA含量分布取得了很大成就。Buckley等<sup>[10]</sup>以<sup>32</sup>P标记DNA探针用组织切片进行原位杂交, 再用放射自显影对杂交分子进行检测, 显示有组织

特异性的M受体亚型mRNA存在： $m_2$ -mRNA在心脏含量丰富，而在脑除了斜状带和中央中隔等少数部位含量较高外，其它部位含量低； $m_1, m_3, m_4$ -mRNA在脑内广泛分布而在心脏则无。虽然脑内 $m_1, m_3, m_4$ -mRNA的分布有高度的重叠，但在海马、纹状体和脑回有相对高的含量区。大鼠大脑原位杂交组织化学分析显示在皮质和纹状体 $m_1$ -mRNA呈弥散分布，然而在海马和嗅球有特别集中的分布，在丘脑和后脑则无分布。此外在泪腺、腮腺有 $m_1$ -mRNA的存在，在小肠、气管、膀胱等组织有 $m_2$ -mRNA的存在，而在 $M_3$ 受体丰富的唾液腺则发现有 $m_3$ -mRNA的存在，在海马、纹状体等部位有 $m_4$ -mRNA存在<sup>[11]</sup>。由于 $m_5$ -mRNA含量相当低，直到最近才清楚 $m_5$ -mRNA也在脑中表达，虽然这些结果可能因灵敏度问题而有偏差<sup>[12]</sup>。

用DNA探针作原位杂交，分析相应mRNA的数量和定位，这种实验常用组织切片进行。探针以含25~50个碱基的DNA片段为宜，这种长度的DNA片段容易进入细胞，同时仍有足够的特异性以识别mRNA，DNA探针可用<sup>32</sup>P，<sup>35</sup>S和<sup>3</sup>H标记，其中以<sup>32</sup>P和<sup>35</sup>S更为常用，因为它们可以通过放射自显影方法检测出来。也有人用<sup>125</sup>I标记可提高比活度，但其标记产物在结构和功能上，与原来的核酸不完全相同是其缺点。

Northern blot分析——mRNA的固定和分析

Northern blot法的整个操作过程包括RNA的提取、RNA变性电泳、RNA转移（固定）、标记DNA与RNA分子杂交及放射自显影等步骤。利用与M受体各亚型mRNA互补的DNA（cDNA）进行Northern blot分析，分别在人及多种动物的大脑皮质，纹状体和心脏，脑桥髓质的样本中测到 $m_1$ 和 $m_2$ -mRNA，同样，在这些部位含有丰富的 $m_1$ 和 $m_2$ 受体。Orr等<sup>[13]</sup>最近证实 $m_1, m_2, m_3, m_4$ -mRNA在大鼠脑和许多组织中表达，其

中 $m_1, m_3$ -mRNA已在外分泌腺观察到（唾液腺，腮腺，下颌下腺），而 $m_2, m_3$ -mRNA在平滑肌组织中发现（小肠，大肠，气管，尿道）。

Western blot分析——蛋白质的固定和分析

本法能精确地测定受体蛋白的含量，然而由于受蛋白质分离，提纯和结合配基特异性的影响，尚未能成功应用于M受体亚型的定量分布研究，但仍不失为一个有前途的方法。

分子生物学技术是通过测定M受体各亚型mRNA的含量分布，间接地观察受体亚型的含量变化和分布，它能使M受体亚型得到本质上的证实，能明确地区分M受体的各种亚型。但是，应当注意的是分子生物学技术测定M受体亚型含量分布时受下列因素的限制：①mRNA测定方法本身的特异性、灵敏度等；②因每个mRNA具有不同的翻译效率，组织中的mRNA含量不能绝对地反映特征性受体蛋白的丰度；③M受体及其mRNA在神经元中有不同的亚细胞分布（mRNA仅存在于细胞体），应该认识到某些受外来神经支配的组织仅存在受体而没有相应的mRNA<sup>[14]</sup>。

### 三、免疫沉淀分析

M受体亚型抗血清

80年代末，Luthin<sup>[15]</sup>等在放射配基结合分析的基础上，为了解决其特异性不高的问题，利用人工合成的M受体各亚型特征性寡肽，联接血蓝蛋白或牛血清白蛋白，作为抗原免疫兔产生针对特定亚型的多克隆抗血清。随后Levey等<sup>[16]</sup>利用M受体各亚型的基因片段（i3 loop）融合于葡萄球菌A蛋白的基因，产生融合蛋白，作为抗原，也能产生特异性地针对某一亚型的抗血清。用<sup>3</sup>H-QNB，<sup>3</sup>H-NMS等非选择性高亲和力的M受体配基标记M受体，然后加入亚型

特异性抗血清进行免疫沉淀反应。因抗血清的特异性,只有相应的M受体亚型被沉淀,沉淀物通过微型离心机收集或用Sephadex G25柱凝胶过滤收集,测其放射性活度,即可知相应M受体亚型的含量。以阿托品测定非特异性结合,用以校正。

最近, Dorje F等<sup>[17]</sup>以免疫沉淀方法对M受体各亚型进行了较精确的定量分布研究,结果显示:  $m_1$ 在中枢神经系统各部位的含量分别是(以占M受体总量的百分比表示): 皮质34%, 海马47%, 纹状体29%, 丘脑16%, 脑桥髓质5%, 小脑<2%;  $m_2$ 的含量分别是: 皮质20%, 海马19%, 纹状体12%, 嗅球20%, 丘脑43%, 脑桥髓质70%, 小脑75%。在外周组织分析了交感神经节、血管、下颌腺、心房、外周肺、子宫、回肠等组织,发现 $m_1$ 受体在交感神经节、下颌腺、血管中含量丰富,而 $m_2$ 在各组织有不同比例的分布,以交感神经节、回肠、子宫含量较丰,此外它还是心房测得的唯一M受体亚型。 $m_3$ 主要在下颌腺, $m_4$ 是外周肺的主要亚型,但也能在子宫和回肠组织中测得, $m_5$ 在任何组织均未测到。

本法有二个基本要求: ①非选择性高亲和力地针对某一受体族的配基存在; ②受体蛋白拥有一个特异性的区域能被用作抗原。因此, M受体特别适用于利用免疫沉淀分析进行研究,因为所用的非特异性结合配基 $[^3H]$ -QNB、 $[^3H]$ -NMS等解离率很低,在受体-抗体完成定量的免疫沉淀反应及受体-抗体复合物分离的时间内很少解离,游离放射配基的本底水平很低,提高了检测的灵敏度。此外, M受体各亚型存在各自特异性的区域可被用作抗原。

在抗原的选择方面,利用亚型特异性的寡肽联接蛋白作为抗原,此法技术上简单,实验条件要求不高,而且能产生较高滴度的特异性抗血清。利用融合蛋白作为抗原,来源丰富,容易被纯化,不需要通过化学方法

偶联到载体就可用作抗原,而且葡萄球菌A蛋白的三级结构能增强免疫反应,但是融合蛋白的产生需要通过基因工程技术。

应当注意的是,本法测定的M受体各亚型的含量值是偏低的,因为即使在含100% $m_2$ 受体的中国仓鼠卵巢细胞( $m_2$ CHO-Cell)也不是全部的 $m_2$ 受体能被沉淀。对于精确的定量分析,如<10fmol/每管溶液的情况下,灵敏度不如免疫细胞化学方法或Western Blot分析。

#### M受体亚型单克隆抗体

抗体技术在研究受体亚型的含量分布具有重要的用途,但传统的抗血清为多克隆抗体,有较多的交叉免疫反应,来源有限,所产生的抗体由于动物的个体差异而滴度不同,不易标准化,所以在应用上受到限制。单克隆抗体则是针对单一抗原决定簇的抗体,特异性极强,交叉反应少,杂交瘤株建立后,原则上可以源源不断地提供大量抗体,滴度也一致,易于标准化,具有很大的优越性。

80年代,随着M受体的提纯,开始制备M受体的单克隆抗体。但由于机体还没有一种组织只含有某一M受体亚型,蛋白质的分离提纯技术尚不能区分不同的亚型,无法制备亚型特异性的单克隆抗体。1984年,有人报道了几种M受体单克隆抗体,有几种对肾上腺素受体有交叉反应,因而这种由未纯化的免疫原所产生的抗体特异性不高。以后Luetje等<sup>[18]</sup>分离了心脏 $M_2$ 亚型的单克隆抗体。随着M受体亚型基因的克隆,利用CHO-cell表达各亚型M受体,生产了针对各亚型的特异性单克隆抗体。1990年, Silva等<sup>[19]</sup>利用 $m_1$ ,  $m_2$ 单克隆抗体对牛脑组织 $m_1$ ,  $m_2$ 受体含量进行了免疫沉淀分析。Levey等<sup>[20]</sup>用单克隆抗体进行免疫沉淀分析,发现脑内以 $m_1$ ,  $m_2$ 和 $m_4$ 为主;用免疫细胞化学方法,显示各亚型有不同的区域和细胞分布, $m_1$ 分布在皮质、纹状体的细胞和轴突; $m_2$ 主

要分布在前脑底部、中脑被盖及颅脑神经核； $m_4$ 则在新纹状体、嗅球和海马回含量丰富。不同的分布情况提示各亚型有不同的生理功能。目前单克隆抗体技术在M受体亚型的定量分布研究中应用尚不多，是今后努力的方向。

应该提出的是，亚型特异性的单克隆抗体技术最终将给出M受体各亚型的精确含量分布图。同时，这一手段原则上可用于许多cDNA已被克隆的其他受体亚型的定量分布研究。在受体的结构和功能关系的研究中，它也是不可缺少的方法。

### 参 考 文 献

- 1 Hulme EC et al. Symp Soc Exp Biol, 1990; 44:39-46
- 2 Hulme EC et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990; 30:633-673
- 3 Palacios JW. Acta Psychiatr Scand Suppl, 1991; 83:27-35
- 4 Melchiorre C et al. Med Res Rev, 1990; 10:327-332
- 5 Vanderheyden P et al. J Neurol Sci, 1990; 97:67-80
- 6 Fryer AD et al. Life Sci, 1990; 47:611-618

- 7 Dörje F et al. J Pharmacol Exp Ther, 1991; 256:727-733
- 8 Mcleskey sw et al. Neuropharmacology, 1990; 29:861-868
- 9 Cortes R et al. Brain Res, 1986; 362:227-238
- 10 Buckley NJ et al. J Neurosci, 1988; 8: 4646-4652
- 11 Weiner DM et al. Proc Natl Acad sci USA, 1990; 87:7050-7054
- 12 Vilaro MT et al. Neuroscience, 1991; 40 :159-167
- 13 Orr GL et al. Arch Insect Biochem Physiol, 1991; 16:107-115
- 14 Bonner TI. Trends Pharmacol Sci, 1989; 10(suppl):11-15
- 15 Luthin GR et al. Mol Pharmacol, 1988; 34:327-333
- 16 Levey AI, et al. FEBS Lett, 1990; 275 :65-69
- 17 Dörje F et al. Mol pharmacol, 1991; 40 :459-462
- 18 Luetje CW et al. Biochemistry, 1987; 26 :6892-6896
- 19 Silva WI et al. Neurosci Lett, 1990; 113 :89-94
- 20 Levey AI et al. J Neurosci, 1991; 11: 3218-3226

## 核医学听诊器在心脏病学中的应用

Lahiri A, Crawley J

核医学听诊器被用来测量心血管循环功能已有五十多年的历史，直至十年前，由于 $^{99m}\text{Tc}$ 的放射性核素心血管造影术的出现和扫描设备的发展，人们才把目光转向非成像的核医学听诊器。Wanger等人首先利用具有碘化钠光电倍增管探头的临床用仪器和血池造影术来分析心脏功能，于是核医学听诊器成为现今发展的探针技术的基础。虽然大多数核医学方法是要利用 $\gamma$ 相机的，然而有

些情况下，它的高空间分辨率仍然不够，尤其在动态或长时间研究中，很难在病人和探头之间保持不变的空间关系。核医学听诊器则具有高时间分辨率，能被固定在心脏上方记录心脏放射性活度（体积）的变化，还能利用血池心室造影术进行每心跳和门电路的心功能研究。

Taki等人应用过一种具备小型碘化镭探头的核医学听诊器，他们将听诊器方法和