DOI:10.16016/j.1000-5404.1983.01.002

替代的羟乙酸酯类5个化合物与大鼠脑内M-胆碱能受点的结合研究

药理学教研室 宋裕南

羟乙酸酯类（Glycallic）化合物是目前抗胆碱能药物中最强的一类[1][2][3]。自1958年Ostfeld等人[4]提出正常人口服这类药物后，出现妄想、幻觉与环境脱离等的精神症状，引起人们极大的注意。据推测，美军正在研制的第二代中枢抗胆碱能类失能剂，属于替代的羟乙酸酯类，因此这类化合物（毒剂）在未来化学战争中使用的可能性及重要性是很大的。

为了探讨该类化合物的作用机理，筛选寻找强效的中枢抗M胆碱能药物，本文选用羟乙酸-3-奎宁酯和羟乙酸-4-哌啶酯的5个强效衍生物，从整体和受点二个水平进行实验分析研究。整体试验应用震颤素（Oxotremorine）的对抗试验，测定欲测药物对抗震颤素诱发小白鼠震颤ED_{50}值，以评定药物的中枢抗胆碱能强度；M-胆碱能受点结合试验，是以大鼠脑匀浆P_2作为受点制备，[^{3}H]-三苯羟乙酸奎宁酯（[^{3}H]QNB）作为配基，把欲测药物与[^{3}H]QNB竞争M-受点，欲测药物对M-受点的竞争能力即亲和力以IC_{50}为指标，以比较药物对M-受点的亲和力强弱。本文报道了[^{3}H]QNB与大鼠脑匀浆P_2部份M-受点的结合试验。[^{3}H]QNB与大鼠脑内M-受点的结合具有特异性，其特异/非特异的比值可达10—15。观察到5药抑制（竞争）[^{3}H]QNB特异性结合的能力与药物的浓度有良好的线性关系，并且都与QNB的抑制（竞争）曲线接近平行。发现5药对M-受点的亲和力与它们的中枢抗胆碱能强度之间有良好的相关性。其相关系数r=0.98。

材料和方法

一、材料和试剂

1. [^{3}H]QNB由解放军军事医学科学院药理毒理所供给，放射比活性为2.4Ci/mM，母液用pH7.4 Tris-HCl缓冲液稀释成1.44μCi/ml，低温贮存备用。

2. QNB和其它替代的羟乙酸酯类化合物由解放军药物化学所合成。

3. 十二烷基硫酸钠（SDS）配成乙二醇甲醚二甲苯溶液（每克纯化SDS加乙二醇甲醚10ml，二甲苯5 ml）。

4. Tris-HCl缓冲液（50mM，pH7.4）

5. 闪烁液组成为PPO6克，POPOP0.3克，萘75克，乙二醇单甲醚300ml，二甲苯加至1000ml。

二、方法

（一）受点（大鼠脑匀浆P_2）的制备[5]。

注：受点（receptor）国内曾译称受体。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大鼠（150—200克）10只，断头后速取前段脑，置于冰冷的0.32M蔗糖溶液中去除硬脑膜和表面血迹，称重，以9倍体积（w/v）冰冷的0.32M蔗糖溶液制成匀浆。4℃、1000×g离心10min后，倒掉上清液，小心将乳黄色中层沉淀吸入另一离心管内，下层紧贴管底的棕红色沉淀用0.32M蔗糖液洗涤，洗涤液与中层乳黄色沉淀合并，以0.32M蔗糖液恢复至原体积、搅匀。然后4℃、20000×g离心20min，如上述将乳黄色沉淀混悬于Tris-HCl液至原体积1/5，于30℃温育30min，再4℃、20000×g离心20min。最后得到的沉淀物（P_2）加适量Tris-HCl液，搅匀。用Folin-酚法测定匀浆蛋白含量（以牛白蛋白为标准），将匀浆蛋白用Tris-HCl液稀释成13.4mg/ml，我们用150μl（相当于2mg蛋白）作为标准放射受点分析。分装后贮存在-20℃备用。

制备的大鼠脑匀浆P_2部份经电镜观察含有较丰富的突触结构。

（二）受点结合竞争试验

每管加[^{3}H]QNB溶液50μl，使最终浓度为1.0×10^{-8}M；载体管（用来检验非特异性结合值）加未标记的QNB溶液50μl，使最终浓度为1.0×10^{-5}M；样品管一律加待测药物溶液50μl；空白管（用来表示总结合值）不加药物，而加Tris-HCl液50μl；摇匀后每管加鼠脑匀浆150μl（相当于2mg蛋白），使总体积为250μl。上述各管每7—9管合为一扎，于30℃温育（不时振摇）20min，取出后立即置冰浴冷却，并同时加入1.5ml冰冷Tris-HCl液终止反应。然后4℃、2000×g离心10min，离心结束后倒掉上清液，将整扎离心管口朝下倒立于数层软纸上，尽量使管壁挂液流尽。再如上法，沉淀物加冷Tris-HCl液1.5ml经电磁搅伴洗涤，4℃、2000×g离心10min，弃去上清液，用软纸吸干每只试管壁的液滴。最后，每管沉淀加纯化SDS液0.5ml，经电磁搅拌后，将消化溶液移入计数杯内，并以10ml闪烁液反复洗涤离心管，并入计数杯内摇匀成匀相后，以贝克曼（Beckman）LS8000液体闪烁计数仪测定放射性。

（三）计算

特异性结合值（B）＝总结合值（TB）－非特异性结合值（NB）

游离标记物浓度（F）＝所加标记物浓度（T）－特异性结合值（B）

被试药物抑制特异性结合的%（即竞争率）为：

$$\frac{\text{空白管计数}-\text{样品管计数}}{\text{空白管计数}-\text{载体管计数}}\times100\%$$

被试药物抑制特异性结合50%的值（即IC_{50}）是根据其浓度—抑制率曲线（即竞争结合曲线）经对数机率转换，由直线回归分析测算所得的。

标记物[^{3}H]QNB的平衡解离常数（kd）及结合受点总浓度（R_0）由Scatchard作图法[6][7]经直线回归分析测算所得的。Scatchard作图法公式如下：

$$\frac{B}{F}=-\frac{1}{kd}\cdot[B]+\frac{R_0}{kd}$$

每个药物选用4—8个不同浓度，每一实验值为三复管测定值的平均值，其误差不超过10%。

实验结果

一、[^{3}H]QNB浓度对结合值的关系

在匀浆蛋白含量、温育体积和其它实验条件恒定的情况下为求得最佳标记物剂量，测定了不同浓度的[^{3}H]QNB与受点的结合（饱和曲线），分析了特异性和非特异性结合与[^{3}H]

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

QNB浓度之间的关系。

表1 〔^{3}H〕QNB浓度对结合值的影响

计数及浓度		结合值 (cpm)			特异/非特异
cpm/0.25ml×10^{-3}	nM*	总结合	非特异性结合	特异性结合	
1.680	2.50	800	112	688	6.1:1
3.427	5.10	1844	159	1685	10.0:1
6.807	10.1	3470	245	3225	13.2:1
10.42	15.5	4947	320	4627	14.5:1
16.91	25.2	6716	457	6259	13.7:1
23.42	34.9	7900	599	7301	12.2:1
30.26	45.0	8662	778	7884	10.1:1
40.32	60.0	9125	1016	8109	8.0:1

* $\frac{〔^{3}H〕QNB计数(cpm)}{50\%} \times \frac{1nCi}{2.22\times10^{3}dpm} \times \frac{1pmol〔^{3}H〕QNB}{2.4nCi} \times \frac{1}{0.25}$

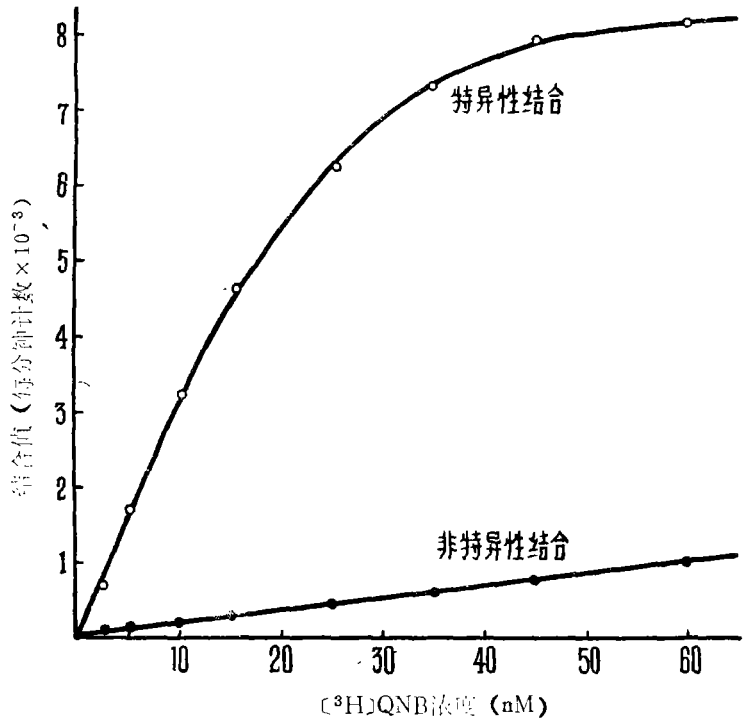


图1 〔^{3}H〕QNB浓度对结合值的影响—受点结合饱和曲线

结果(见表1和图1)表明：特异性结合随着〔^{3}H〕QNB浓度增加而渐至饱和，表明M-受点与〔^{3}H〕QNB的特异性结合是可饱和的。但非特殊性结合却与此截然不同，它随着〔^{3}H〕QNB浓度增加而直线上升呈不饱和特性。〔^{3}H〕QNB浓度以1—2×10^{-8}M为适，此时特异/非特异的比值高达13—15，过低或过高浓度均会降低特异/非特异的比值。

二、〔^{3}H〕QNB对大鼠脑匀浆（P_2）M-受点的平衡解离常数（kd）及结合受点总浓度（R_0）：

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在结合试验中所测得的〔^{3}H〕QNB特异性结合值（B）和游离〔^{3}H〕QNB浓度（F）进行Scatchard作图（见图3），按Scatchard作图公式测算〔^{3}H〕QNB对大鼠脑匀浆M-受点的kd值和R_0值。并作配基受点结合饱和曲线Ⅱ（见图2）。

结果由Scatchard作图测算得kd值为10.6± 0.9nM（$\bar{X}$± SE，n=9），R_0值为1.94±0.07pmol/mg prot.（$\bar{X}$±SE，n=9）。在图2的$\frac{1}{2}$ Bmax处的横坐标位置的〔F〕值即代表kd，而其kd值与Scatchard作图分析测算的kd值极为接近。

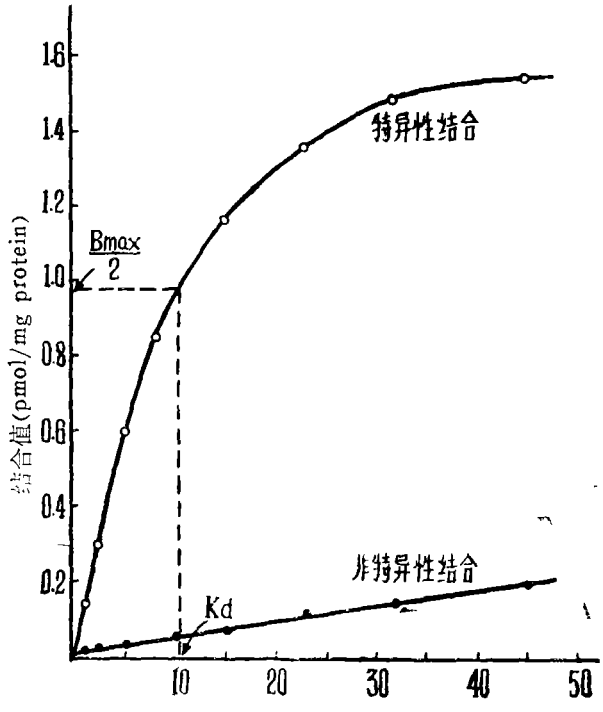


图2 游离〔^{3}H〕QNB浓度对结合值的影响——受点结合饱和曲线Ⅰ

注：Bmax值是由Scatchard作图测得为19.4pmol/mg prot

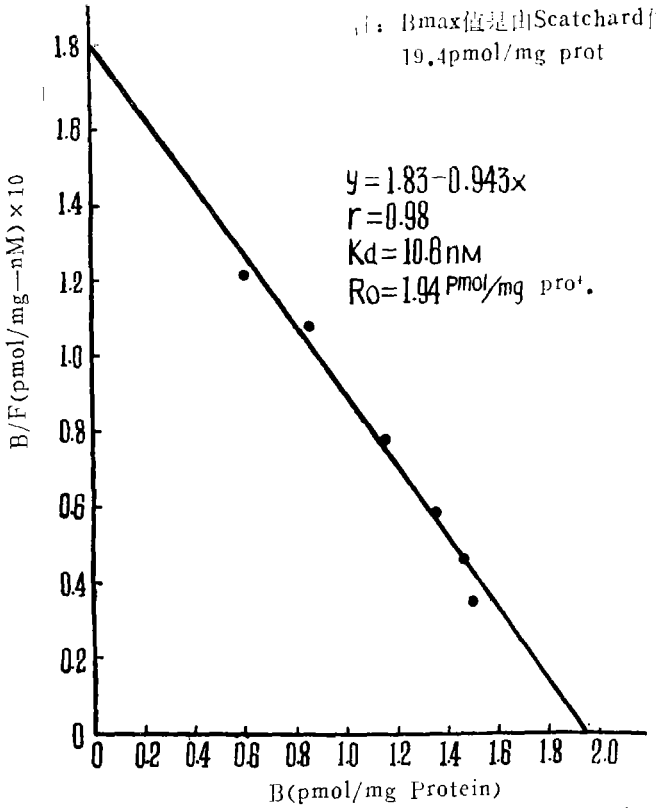


图3 〔^{3}H〕QNB对大鼠脑匀浆（P_2）M-胆碱能受点的直线Scatchard图

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表2　Scatchard 作图分析数据

B(pmol/mg prot)*	F (nM)**	B/F(pmol/mg—nM)×10
0.600	4.97	1.21
0.861	7.99	1.08
1.16	15.0	0.775
1.36	23.2	0.585
1.47	32.1	0.457
1.51	44.9	0.336

* $\frac{[^3H]QNB特异性结合cpm}{50\%} \times \frac{1nCi}{2.22\times10^3dpm} \times \frac{1pmol[^3H]QNB}{2.4nCi} \times \frac{1}{2mg\ prot.}$

**　F = T—TB

三、替代的羟乙酸酯类5个化合物与M-胆碱能受点的亲和力（IC_{50}值）

根据受点竞争结合试验的数据，绘制药物抑制（竞争）[³H]QNB特异性结合的浓度—抑制（竞争）率曲线（竞争曲线），从竞争曲线可以直接得出特异性结合50%受抑制所需的药物浓度(IC_{50})。IC_{50}值为药物与受点结合的强度指标即亲和力。表3即是替代的羟乙酸酯类5药的IC_{50}值比较。图4表明替代的羟乙酸酯类5药的竞争（抑制）曲线，其竞争（抑制）能力与药物浓度有良好的线性关系，并且都与QNB的竞争（抑制）曲线接近平行。

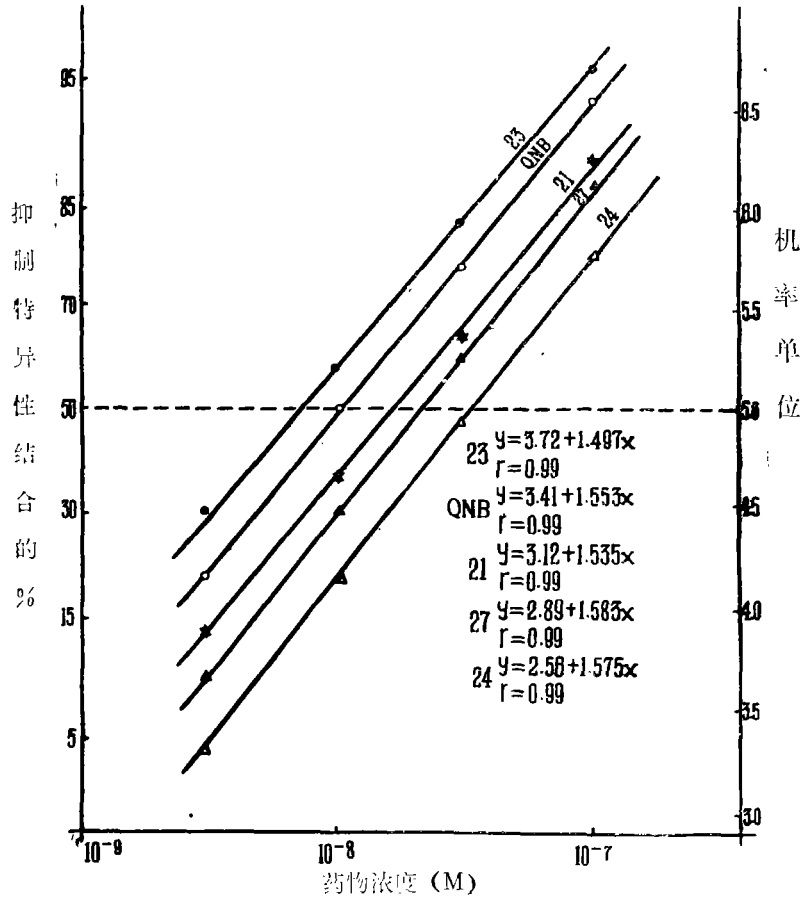


图4　药物抑制[³H]QNB特异性结合的浓度—抑制率曲线

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表3　替代的羟乙酸酯类5个化合物的IC_{50}值比较

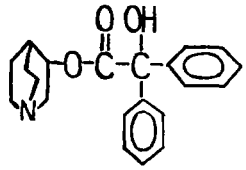
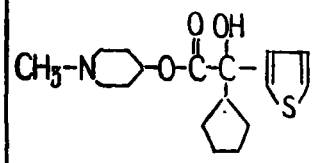
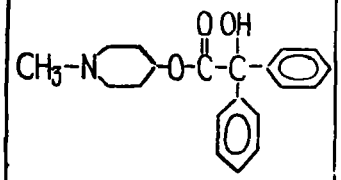
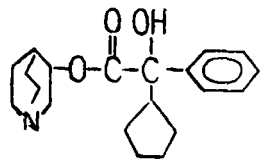
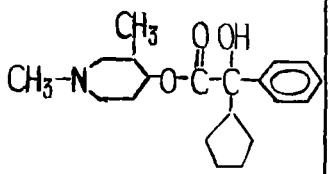
编　号	n	IC_{50}(nM)	*抑制强度（亲和力）
QNB	6	10.5 ±1.0	1
213—23	5	7.16±0.76	1.48
213—21	5	16.7 ±1.9	0.63
213—27	5	21.5 ±2.1	0.49
213—24	4	35.4 ±4.5	0.30

* 以QNB的IC50之倒数为I

四、替代的羟乙酸酯类5个化合物的受点亲和力与中枢抗胆碱能活性之间的关系

该类化合物的中枢抗胆碱能强度以对抗氧化震颤素(Oxotremorine，ip 50mg/kg)诱发小鼠震颤作用的ED_{50}为指标，发现该类化合物的IC_{50}值与中枢抗胆碱能强度ED_{50}值之间有良好的相关性（表4）。一般来说，中枢抗胆碱能作用强的化合物，与受点的亲和力也强；反之，中枢抗胆碱能作用弱的化合物，与受点的亲和力也弱。如果将这些化合物的ED_{50}对其IC_{50}作图，可得到较好的线性关系，相关系数r = 0.98（P <0.001）（图5）。

表4　羟乙酸酯类5个化合物的IC_{50}及抗震颤ED_{50}值

编号	结构式	IC50(nM)	ED50(mg/kg)
QNB		10.6	0.04
213—23		1.16	0.02
213—21		16.7	0.07
213—27		21.5	0.09
213—24		35.4	0.12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

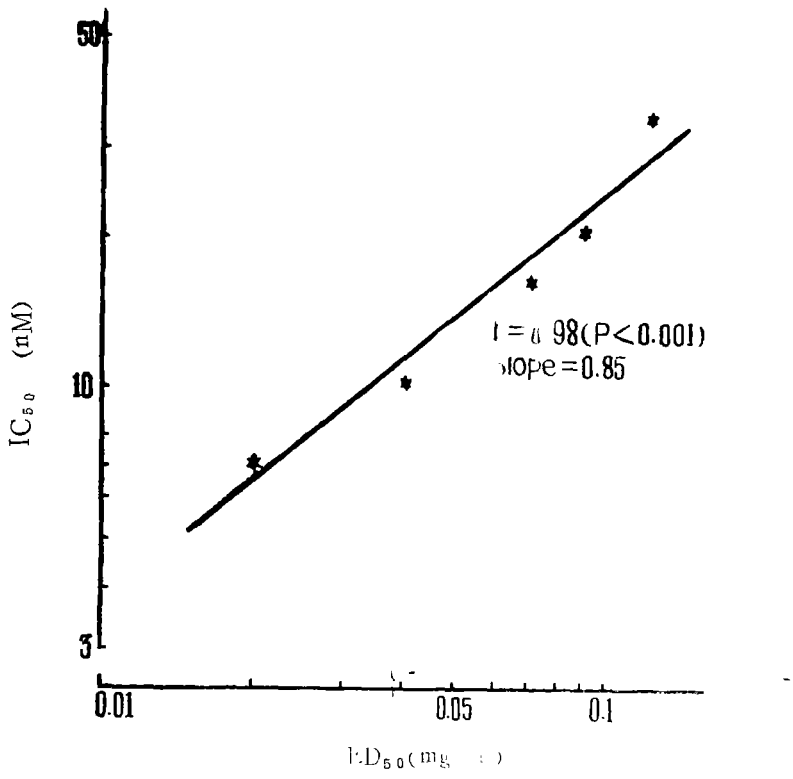


图5 苯乙酸酯类5个化合物的抗震颤ED50—IC50曲线

讨　　论

[^{3}H]QNB对M-胆碱能受点结合的高度专一性是抗胆碱能类化合物放射配基受点结合分析法的基础。结合反应平衡后，在分离结合的与游离的标记配基中，过滤法和离心法是最常用的两种分离手段。目前国外多数实验室采用玻璃纤维滤纸(Watma GF/B或C型)快速过滤洗涤法。有些实验室采用Beckman圆锥形聚乙烯离心管，离心洗去游离标记配基后，切下管尖沉淀部份测定放射性的方法。我们采用普通玻璃试管，经两次低温常速离心，两次冷冻洗涤来减少非特异性结合，其特异/非特异的比值可高达到10—15，而特异性结合 (cpm) 且占总计数(cpm)30—50%。经用Scatchard作图分析测算[^{3}H]QNB对M-胆碱能受点的kd值为；10.6±0.9nM（$\bar{X}$±SE），R_0值为1.94±0.07pmol/mg prot．（$\bar{X}$±SE）。所测得kd值较文献[8][9]为高，其原因可能是[^{3}H]QNB的放射比活性较低，[^{3}H]QNB的终浓度偏高，再则在离心及沉淀洗涤期间配基，受点发生解离。但本文的方法简便，重复性好，灵敏度较高。

Yamamura等[8][10][11]曾采用大鼠脑突触膜制备，观察M-胆碱能拮抗剂与M-受点的相互作用，认为对受点的亲和力与外周药理活性之间有较好的相关性。Baumgola等[12]曾报道一组羟乙酸酯类化合物对大鼠脑M-受点的亲和力与它们的行为失调之间有很好的相关性。本文采用大鼠脑匀浆P_2制备，在M-受点竞争结合试验中，发现213—23和QNB两药竞争（抑制）强度非常接近，但213—23似略强一些，其它三药竞争（抑制）强度都较QNB弱。观察到5药竞争（抑制）[^{3}H]QNB特异性结合的能力与药物的浓度有良好的线性关系，并且都与

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

QNB的竞争（抑制）曲线接近平行。进一步观察到5药的受点亲和力与它们中枢抗胆碱能强度之间有良好的相关性，说明该类化合物的中枢抗胆碱能活性主要决定于它们与中枢M-受点的亲和力。

（本文承金荫昌教授及李灵源研究员指导，刘彦信、叶荣英、郑值全同志大力协助，特此致谢）

参 考 文 献

（1）Albanus L: Acta Pharmocol et Toxicol 28(4):305,1970

（2）Meyerhöffer A: J Med Chem 15(9):994,1972

（3）李灵源等：二苯羟乙酸-3-奎宁醇酯的药理作用研究。第一届神经药理学专业学术会议论文摘要，1980

（4）Ostfeld AM et al: Arch Neuro Psychiat 79:317 1958

（5）李灵源等：纳洛肼及羟基吗啡肼与吗啡受点结合的可逆性问题。第一届神经药理学专业学术会议论文摘要，1980

（6）Yamamura HI et al: Neurotrasmitter Receptor Binding .P 57—99, Raven Press, New York, 1978

（7）金荫昌：国外医学分子生物学分册 3(1):6—10, 1981

（8）Yamamura HI & Snyder SH: Proc Nat Acad Sci USA, 71(5):1725, 1974

（9）Gllberf MR et al: Br J Pharmacol 65(10):451, 1979

(10) Snyder SH et al : Fed Proc, 34(10):1915, 1975

(11) Aronstam RS et al: Mol Pharmacol 15(2):227, 1979

(12) Bangold J et al: Brain Res 124(2):331, 1977

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net