

## 羟乙酸酯类 8 个化合物和小鼠脑内 M-胆碱能受体的结合

徐珩 金文桥 夏兴林 池志强

(中国科学院上海药物研究所, 上海)

**提要** 本文报道了 [ $^3\text{H}$ ]QNB 与小鼠脑匀浆  $\text{P}_2$  部分 M-受体的结合。 [ $^3\text{H}$ ]QNB 与小鼠脑内 M-受体的结合具有特异性, 其特异/非特异的比值一般可达 3-6。其它 M-胆碱能药物可以取代这种结合, 而非胆碱能药物几乎不能取代这种结合。试验了我所合成的一系列具有中枢抗胆碱能作用的羟乙酸酯类化合物对 M-受体的亲和力, 观察到它们对 M-受体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  $r = 0.98$ 。

**关键词** M-胆碱能受体; [ $^3\text{H}$ ] 二苯羟乙酸奎宁酯, 羟乙酸酯类;  $\text{P}_2$  部分; 抗震颤。

由于分子药理学研究的进展, 高亲和力抗胆碱能药物及其高放射比活性同位素标记物的合成, 已开展对 M-或 N-胆碱能受体与其激动剂或拮抗剂相互作用的研究。有人曾利用 [ $^3\text{H}$ ]阿托品对豚鼠回肠和大鼠脑亚细胞各部分<sup>(1)</sup>的结合, 来研究 M-胆碱能受体。但因其可逆性大, 与受体结合不牢, 使分离效果不够满意。二苯羟乙酸奎宁酯, 简称 QNB, 是一个极强的中枢 M-样抗胆碱药<sup>(2,3)</sup>, 作用时间长, 与 M-胆碱能受体结合牢固, 是研究 M-胆碱能受体的一个有效的工具药。Yamamura 等<sup>(4,5)</sup>曾采用 [ $^3\text{H}$ ]QNB 进行受体结合试验, 发现 [ $^3\text{H}$ ]QNB 能与大鼠脑和豚鼠回肠纵肌 M-受体结合, 并具有高度特异性, 由此得到的与 [ $^3\text{H}$ ]QNB 结合的受体可被 M-胆碱能激动剂或拮抗剂所竞争, 其竞争强度与它们的药理强弱有一

定的相关性。

本文报道了 [ $^3\text{H}$ ]QNB 与小鼠脑内 M-胆碱能受体的结合试验, [ $^3\text{H}$ ]QNB 特异性结合在亚细胞各部分的分布, 胆碱能和非胆碱能药物的竞争强度, 以及一些替代的羟乙酸酯类化合物的受体亲和力与它们的中枢抗胆碱能强度之间的关系。所用替代的羟乙酸酯类化合物是目前抗胆碱能药物中最强的一类<sup>(6)</sup>。为了研究该类化合物的作用机理, 近几年来我所合成了一系列化合物, 其中大部分是自行设计的新的结构。有关这类化合物构效关系的研究将另行报道。本文报道该类化合物与中枢 M-受体的相互作用。

### 材 料 和 方 法

[ $^3\text{H}$ ]QNB 由军事医学科学院药理毒理研究所合成, 放射比活性为  $8.76 \text{ Ci/mM}$ , 母液用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释成  $1.75 \times 10^{-6} \text{ Ci/ml}$ , 低温贮存备用。QNB 和一些羟乙酸酯类化合物(结构式见表 3)由本所合成, 其中 B-7601 由中国人民解放军药物化学研究所合成。

**受体( $\text{P}_2$ )的制备** 雄性小鼠, 体重 18-20 g, 断头后迅速取脑, 剥离硬脑膜和除去小脑后, 置于冰冷的 0.32 M 蔗糖溶液中去表面血迹,

1980年4月5日收稿 1980年6月5日修回

以1:10(w/v)冰冷的0.32 M蔗糖溶液进行匀浆, 1000 × g 离心 10 min, 上层液用 20,000 × g 离心 20 min, 沉淀悬浮于 50 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中, 1500 × g 离心 10 min, 最后得到的沉淀物悬浮于冰冷的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中, 匀浆, 分装后低温贮存备用。用双缩脲法测定蛋白含量(以牛白蛋白为标准), 用磷酸盐缓冲液将受体蛋白稀释成 10 mg/ml 左右。

**受体结合竞争试验** 每管加 200 μl (约 2 mg) 匀浆, 内含小鼠粗突触膜受体 (P<sub>2</sub>), 加 20 μl [<sup>3</sup>H]QNB (约 77,000 cpm) 使最终浓度为 1.0 × 10<sup>-8</sup> M。载体管加 20 μl 不标记的 QNB, 使最终浓度为 1.0 × 10<sup>-5</sup> M; 样品管加待测药物溶液 20 μl; 对照管不加药物。各管用磷酸盐缓冲液加至总体积 0.4 ml, 混合后于 35°C 孵育 20 min, 取出后立即置冰浴中冷却, 1500 × g 离心 10 min, 弃去上层液。沉淀物加 0.4 ml 冰冷的磷酸盐缓冲液充分搅拌洗涤, 1500 × g 离心 10 min, 弃去上层液。沉淀物加 0.1 ml 甲酸(85—88%) 在沸水浴中消化 10 min, 冷却, 用 5 ml 亲水性闪烁液将消化液转移到计数杯中, 用国产 FJ-353 型液体闪烁计数器测定。

对照管代表总结合值, 载体管代表非特异性结合值, 两者之差即为特异性结合值。被试药物抑制特异性结合的%(即竞争率)为:

$$\frac{\text{对照管计数} - \text{样品管计数}}{\text{对照管计数} - \text{载体管计数}} \times 100\%$$

每个药物选用 4 组不同的浓度, 每组浓度为 4 复管, 取其平均值, 误差不超过 10%。闪烁液配方为 PPO 3.5 g, POPOP 0.3 g, 萘 37.5 g, 乙二醇甲醚 150 ml, 二甲苯加至 500 ml。

## 结 果

**一、[<sup>3</sup>H]QNB 浓度和匀浆蛋白量对结合值的影响** 在匀浆蛋白含量、孵育体积和其它实验条件恒定的情况下, 我们分析了 [<sup>3</sup>H]QNB 浓度对特异性和非特异性结合值的影响, 结果见图 1。

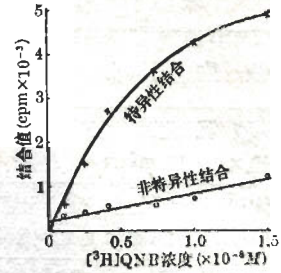


图 1 [<sup>3</sup>H]QNB 浓度对结合值的影响

特异性结合随着 [<sup>3</sup>H]QNB 浓度增加而渐至饱和, 表明受体与 [<sup>3</sup>H]QNB 的特异性结合是可饱和的。但非特异性结合却与此截然不同, 它随着 [<sup>3</sup>H]QNB 浓度增加而直线上升, 呈不饱和性。[<sup>3</sup>H]QNB 剂量以 0.7—1.0 × 10<sup>-8</sup> M 为适, 过低或过高均会降低特异/非特异的比值, 我们使用 1.0 × 10<sup>-8</sup> M 的 [<sup>3</sup>H]QNB 对分离得到的各批小鼠突触膜受体蛋白进行结合试验, 其特异/非特异的比值一般为 3—6。

在 [<sup>3</sup>H]QNB 浓度和其它实验条件恒定的情况下我们分析了匀浆蛋白含量对特异性和非特异性结合值的影响, 结果见图 2。

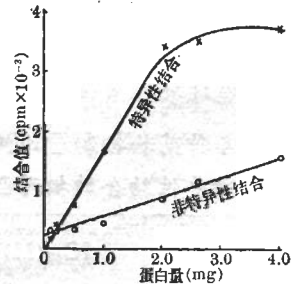


图 2 受体蛋白量对结合值的影响

可以看出, 受体蛋白量以 1.0—2.0 mg 为适, 我们选用 2 mg 的蛋白含量进行结合试验, 此时特异/非特异的比值较高。

**二、小鼠脑匀浆中 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合在亚细胞各部分的分布** 为了观察 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合的亚细胞分布, 将全脑匀浆经不同的离心分别制得细胞核沉淀 (P<sub>1</sub>), 粗制突触体—线粒体沉淀 (P<sub>2</sub>) 和粗制微粒体沉淀 (P<sub>3</sub>) 三部分 (表 1), 并分别测定它们与 [<sup>3</sup>H]QNB 的特异性结合值。

表 1 小鼠脑匀浆中 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合的亚细胞分布

亚细胞部分	特异性结合值 (cpm±SE)	非特异性结合值 (cpm±SE)	特异/非特异 ±SE
细胞核沉淀 (P <sub>1</sub> ) (1000×g, 10 min)	1519±55	737±55	2.1±0.1
粗制突触体-线粒体沉淀 (P <sub>2</sub> ) (20,000×g, 20 min)	2893±90	937±115	3.0±0.4
粗制微粒体沉淀 (P <sub>3</sub> ) (100,000×g, 60 min)	3623±182	1112±34	3.3±0.2

由表 1 可见, 特异性结合值在细胞核部分最少, 而在粗制突触体-线粒体沉淀和粗制微粒体沉淀部分呈现了较高的特异性结合值, 其特异性结合值分别为细胞核部分的 1.9 和 2.4 倍。由于在含有突触体的 P<sub>2</sub> 部分具有丰富的 M-胆碱能受体<sup>(5)</sup>, 加之 P<sub>2</sub> 部分制备方便, 因此我们选用 P<sub>2</sub> 沉淀进行结合试验, 此时特异/非特异的比值也较高。

**三、胆碱能和非胆碱能药物对 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合值的影响** 为了阐明 [<sup>3</sup>H]QNB 与小鼠脑突触膜 M-受体的结合具有特异性, 我们观察了胆碱能和非胆碱能药物对 M-受体的亲和力, 比较了它们抑制 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合的相对强度(表 2), 抑制强度以 IC<sub>50</sub> (药物抑制 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合 50% 的浓度) 为指标。

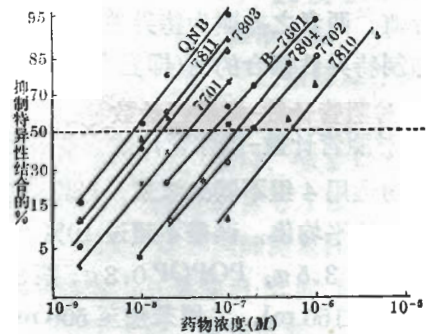
表 2 各种药物抑制 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合的相对强度

药 物	IC <sub>50</sub> (M)
QNB	7.5×10 <sup>-9</sup>
东莨菪碱	7.9×10 <sup>-9</sup>
阿托品	11.9×10 <sup>-9</sup>
B-7601	64.9×10 <sup>-9</sup>
震颤素	5.0×10 <sup>-5</sup> (抑制 34.8%)
氨甲酰胆碱	5.0×10 <sup>-5</sup> (抑制 23.5%)
吗啡	5.0×10 <sup>-5</sup> 无作用
GABA	5.0×10 <sup>-5</sup> 无作用
5-HT	5.0×10 <sup>-5</sup> 无作用
DA	5.0×10 <sup>-5</sup> (<10%)

由表 2 可见, M-胆碱能拮抗剂, 如 QNB、东莨菪碱、阿托品、B-7601 等均能比较强地抑

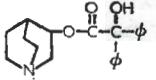
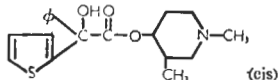
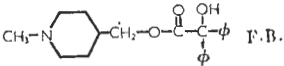
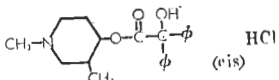
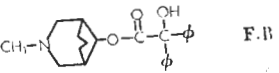
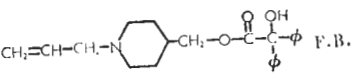
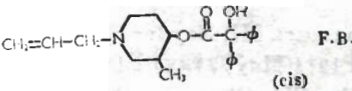
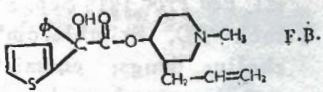
制 [<sup>3</sup>H]QNB 的特异性结合, 其 IC<sub>50</sub> 为 7.5—64.9 nM。而 M-胆碱能激动剂对受体的亲和力相应地要小得多, 如震颤素和氨甲酰胆碱, 在 5.0×10<sup>-5</sup>M 浓度下仅分别抑制 34.8% 和 23.5%。各种非胆碱能药物, 如吗啡、GABA、5-HT、DA 等, 浓度增加到 5.0×10<sup>-5</sup>M, 几乎不影响 [<sup>3</sup>H]QNB 的特异性结合值, 说明 [<sup>3</sup>H]QNB 与小鼠粗突触膜 M-受体的结合具有特异性。

**四、一些羧乙酸酯类化合物的受体亲和力与中枢抗胆碱能活性之间的关系** 图 3 表明了一些羧乙酸酯类化合物抑制 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合的浓度-抑制率曲线, 这些化合物抑制 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合的能力与药物浓度有良好的线性关系, 并且都与 QNB 的反应曲线接近平行。

图 3 药物抑制 [<sup>3</sup>H]QNB 特异性结合的浓度-抑制率曲线

我们进一步比较了该类化合物的受体亲和力与中枢抗胆碱能强度之间的关系, 中枢抗胆碱能强度以对抗震颤素 (ip 50 mg/kg) 对小鼠震颤作用的 ED<sub>50</sub> 为指标, 发现它们的 IC<sub>50</sub> 值与中枢抗胆碱能强度 ED<sub>50</sub> 值之间有良好的相

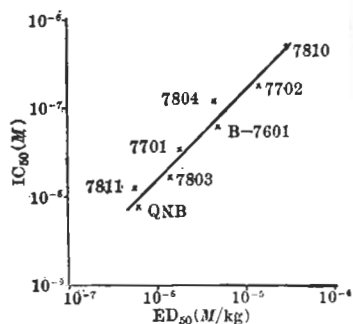
表 3 8个替代的羟乙酸酯类化合物的  $IC_{50}$  及抗震颠  $ED_{50}$  值

编号	结 构 式	$IC_{50}(M)$	$ED_{50}(M/kg)$
QNB	 F.B.	$7.50 \times 10^{-9}$	$6.15 \times 10^{-7}$
7811	 F.B.	$1.29 \times 10^{-8}$	$5.51 \times 10^{-7}$
7803	 F.B.	$1.68 \times 10^{-8}$	$1.42 \times 10^{-6}$
7701	 HCl	$3.35 \times 10^{-8}$	$1.76 \times 10^{-6}$
B-7601	 F.B.	$6.49 \times 10^{-8}$	$4.74 \times 10^{-6}$
7804	 F.B.	$1.22 \times 10^{-7}$	$4.38 \times 10^{-6}$
7702	 F.B.	$1.83 \times 10^{-7}$	$1.45 \times 10^{-5}$
7810*	 F.B.	$5.0 \times 10^{-7}$	$2.77 \times 10^{-5}$

\* 构型未定

关性(表3)。一般来说,中枢抗胆碱能作用强的化合物,与受体的亲和力也强,反之,中枢抗胆

碱能作用弱的化合物,与受体的亲和力也弱。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  $r=0.98$ (图4)。

图4 羟乙酸酯类8个化合物的抗震颠  $ED_{50}$ - $IC_{50}$  曲线

## 讨 论

$[^3H]QNB$  是研究M-胆碱能受体的一个有效工具药。我们利用它研究了小鼠脑中的M-胆碱能受体,方法简便,灵敏度高,专一性强。在分离结合的 $[^3H]QNB$ 与游离的 $[^3H]QNB$ 的过程中,快速有效的洗涤是提高特异性结合值,降低非特异性结合值的关键之一,目前国外大多采用玻璃纤维滤纸 Whatman

GF/B, GF/C 进行快速过滤洗涤。在不具备过滤法的条件下,我们采用离心法,并且用一次离心洗涤来减少非特异性结合值,效果也较好,其特异/非特异的比值可提高到6。另外,我们使用高浓度的非标记 QNB 进行结合试验,也可以提高特异/非特异的比值。

在胆碱能和非胆碱能药物抑制 [ $^3\text{H}$ ] QNB 特异性结合的竞争试验中,各种M-胆碱能拮抗剂均能比较强地抑制 [ $^3\text{H}$ ] QNB 的特异性结合,而M-胆碱能激动剂对受体的亲和能力相应地要小得多。我们的结果与文献报道的结果<sup>(4,5)</sup>一致。Snyder 等<sup>(6)</sup>曾报道各种M-胆碱能拮抗剂和混合型激动-对抗剂对大鼠脑和豚鼠回肠M-受体的亲和力与它们的外周药理活性(豚鼠回肠收缩)之间有很好的平行关系。但对于激动剂却出现了矛盾,其受体亲和力比它们收缩肠肌的相对强度要小得多。他们认为<sup>(6)</sup>M-受体可能也与阿片受体一样,具有互变的两种构象状态,即利于激动剂结合(A)和利于拮抗剂结合(B)的两种受体构象,拮抗剂与(B)构象的受体具有较高的亲和力,而激动剂对于(B)构象的受体比对于(A)构象的受体亲和力要低,因此激动剂抑制 [ $^3\text{H}$ ] QNB 特异性结合的程度相应地要小得多。但由于它们具有较高的内在活性,因此其外周药理活性比较强,从而解释了激动剂在受体亲和力与药理活性之间的矛盾。

一些学者<sup>(4,5,7)</sup>也研究过各种M-胆碱能拮抗剂与M-受体的相互作用,他们大多以大鼠脑或豚鼠回肠作为受体制备,认为受体亲和力与外周药理活性之间有较好的相关性,但有关

受体亲和力与中枢药理活性关系的报道却很少。Baumgold 等<sup>(8)</sup>曾报道一组具有拟精神活性的羟乙酸酯类化合物,发现它们对大鼠脑M-受体的亲和力与它们的行为失调之间有很好的相关性。我们使用小鼠脑匀浆P<sub>2</sub>部分作为受体制备,并在同一类型化合物中选择结构式基本相仿但中枢抗胆碱能强度相差较大的化合物进行试验,所得受体亲和力与中枢抗胆碱能强度之间有良好的相关性,显然可以理解此类化合物的中枢抗胆碱能强度主要取决于它们与中枢M-受体的亲和能力。

**致谢** 黄忠明、陈洁、陈新建、张鸿萍同志参加部分工作。

## 参 考 文 献

- 1 Farrow JT, O'Brien RD. *Mol Pharmacol* 1973 Jan; 9 (1) : 33
- 2 Albanus L. *Acta Pharmacol Toxicol* 1970 Jul; 28 (4) : 305
- 3 Meyerhöffer A. *J Med Chem* 1972 Sep; 15 (9) : 994
- 4 Yamamura HI, Snyder SH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 May; 71 (5) : 1725
- 5 Snyder SH, Chang KJ, Kuhar MJ, Yamamura HI. *Fed Proc* 1975 Sep; 34 (10) : 1915
- 6 Inch TD, Brimblecombe RW. *Antiacetylcholine drugs; chemistry, stereochemistry and pharmacology*. In: Pfelffer CC, Smythies JR, eds. *International review of neurobiology*, vol 16. New York: Academic Press, 1974 : 67-144
- 7 Aronstam RS, Triggle DJ, Eldefrawi ME. *Mol Pharmacol* 1979 Mar; 15 (2) : 227
- 8 Baumgold J, Aboud LG, Aronstam R. *Brain Res* 1977 Mar; 124 (2) : 331

*Acta Pharmacologica Sinica* 1980 Dec; 1 (2) : 76—81

## BINDING OF 8 GLYCOLATE ESTERS WITH MUSCARINIC CHOLINERGIC RECEPTOR IN MOUSE BRAIN

XU Heng, JIN Wen-qiao, XIA Xing-lin, CHI Zhi-qiang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

**ABSTRACT** Muscarinic cholinergic receptor binding in mouse brain was studied. Binding sites with high affinity and specificity for [<sup>3</sup>H]QNB were present in P<sub>2</sub> fraction of mouse brain homogenate. The ratio of specific/nonspecific binding was 3—6. Muscarinic antagonists and agonists displaced specific [<sup>3</sup>H]QNB binding, while non-cholinergic drugs had

negligible affinity. Displacement potencies of [<sup>3</sup>H]QNB binding to P<sub>2</sub> fraction of mouse brain by a group of glycolate esters, synthesized in our Institute, correlated significantly with their central anticholinergic potencies.

**KEY WORDS** muscarinic cholinergic receptor; [<sup>3</sup>H]QNB; glycolate esters; P<sub>2</sub> fraction; antitremor

\* \* \*

\* \* \*