

# 研究 $\gamma$ -氨基丁酸、乙酰胆碱和谷氨酸效应的蚯蚓背肌模型

周廷冲 周建群 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100800)

**提要** 在蚯蚓背肌、水蛭背肌、蟾蜍腹直肌、小白鼠腹直肌及豚鼠回肠中, 仅蚯蚓背肌对 GABA 有肌松弛反应。用毒扁豆碱修正任氏液冲灌时, 这些标本中仅蚯蚓背肌有 GABA 拮抗 ACh 效应。蚯蚓肌块 ChE 活性比水蛭肌块弱约 5 倍, soman 处理都使其失活, 并不能由 PAM-C1 重活化。经 soman 处理后 ChE 已失活的蚯蚓背肌标本可用来研究离子型反应的神经递质, 如 GABA、ACh、谷氨酸。

**关键词** 蚯蚓背肌; 水蛭背肌;  $\gamma$ -氨基丁酸; 谷氨酸; 乙酰胆碱; 胆碱酯酶; 索曼

$\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 是各种动物中枢和周围神经系统内的抑制性神经递质, 很多研究均借助于电生理学技术, 对筛选强效的 GABA 受体激动剂或对抗剂很不方便。

Korenaga 等报道的关于双环磷酸酯对蚯蚓 (*Pheretima communissima*) 神经—肌肉接头区电位变化的影响<sup>(1)</sup>一文引起了我们的注意, 因为蚯蚓是和水蛭一样容易得到的实验材料。水蛭的背肌主要由兴奋性神经支配, 但蚯蚓背肌主要由抑制性神经支配。本文采用记录肌肉收缩和松弛反应的简单方法比较这两种肌肉标本对 GABA 等神经递质和其它生物活性物质的反应。

## 材 料 和 方 法

**一、实验动物** 蚯蚓 (*Eisenia foetida*), 天津饲料研究所赠; 水蛭 (*Hirudo nipponia*), 购自北京实验动物供应站。

**二、记录仪器** SCF-5 型三用误差分选仪 (南京长江无线电厂); XWX-204 型携带式电子自动电位差计 (江苏海安自动化仪表厂); WSQ-A 型微量输液器 (江苏沙洲实验仪器厂); 电磁感应线圈 (自制); 杠杆系统 (自制); 0.15 ml 浴池 (自制)。

**三、试验化合物** 氯化乙酰胆碱 (ACh ·

Cl), 上海新华制药厂; 谷氨酸 (Glu), 生物化学产品上海制药厂; (GABA), 购自上海化学工厂, 由本室任蕴芳同志纯化; 甘氨酸 (Gly), 北京化学工业公司; 牛磺酸 (Tau), 由夏寿萱同志赠; Muscimol (Mus), 美国 Sigma 化学公司; 水杨酸毒扁豆碱, 英国产品; 特己基甲基氟磷酸酯 (索曼, soman), 由军事医学科学院药理毒理研究所提供。

以上试药溶于修正任氏液 (蚯蚓) 或任氏液 (水蛭)。

**四、蚯蚓背肌标本的制备** 沿腹中线从其生殖带下沿向后剪开约 20 mm。展平肌肉, 用镊子除净腹内容物, 暴露背肌, 尽可能除去背肌表面的神经。在背中线上 (中间保留一条约 0.5 mm 的肌肉) 各剪取一条长约 5—10 个环节, 宽约 1 mm, 湿重约为 5 mg 的背肌 (图 1)。将标本两端分别用线结扎后的引线一端固定在浴池的底部, 另一端固定在杠杆的一个臂上, 使标本悬挂在浴池内。然后用输液器冲

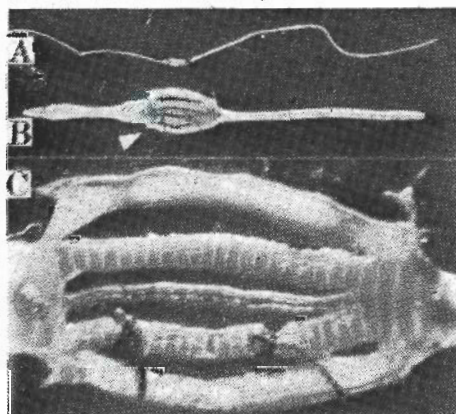


图 1. A) Earthworm dorsal muscle preparation; B) The arrow points at the muscle to be taken; C) About 10 rings in the preparation.

灌修正任氏液（将任氏液用 0.01 M NaHCO<sub>3</sub> 溶液稀释至 65%，pH 7.4, 15°C），速度为 0.05-0.25 ml/min，肌肉标本的载重为 0.04—0.1 g。在杠杆的另一个臂离支点一定距离处用线与一小金属棒相连，垂下的小金属棒可在电磁感应线圈中随由于肌肉运动而牵动的杠杆上下移动，这样所产生的电流变化经误差分选仪放大后，在描笔式自动电位差计上描记下来。这实际是改良的 Szerb 法<sup>(2)</sup>。实验时取 0.05 ml 试药由微量注射器经进药孔注入浴池内，有时也可将试药配在冲灌液内冲灌标本，并观察在这些情况下肌肉标本对其它神经递质和强效药物的反应。水蛭标本的制备及实验除用任氏液冲灌外，其它同蚯蚓标本。

结果和讨论

一、正常蚯蚓背肌标本和水蛭背肌标本对 5 种神经递质的反应 蚯蚓背肌标本对 ACh 和 Glu 产生肌收缩反应，对 GABA 则产生肌松弛反应（在其它实验中也证明 GABA 受体激动剂 Mus 与 GABA 效应相同）。而水蛭背

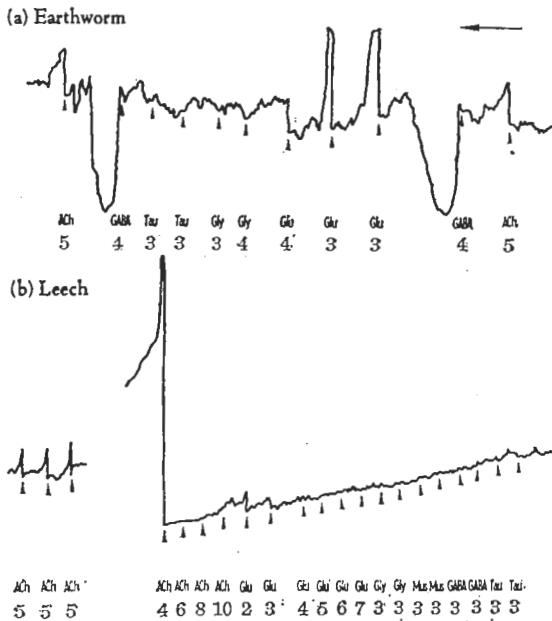


图 2. Responses of muscle preparations to 5 neurotransmitters and muscimol which are expressed in -log M.

肌标本只对 ACh 和 Glu 产生肌收缩反应，对 Glu 的反应似乎要比蚯蚓标本弱些，对 GABA 或 GABA 受体激动剂 Mus 则无反应。这 2 种标本对 Gly 和 Tau 均未见反应（图 2）。实验说明蚯蚓背肌对 GABA 的反应是特有的，同时又具有对 ACh 和 Glu 的反应。因此，有可能作为研究神经递质相互作用的理想模型。

二、胆碱酯酶 (ChE) 失活的蚯蚓背肌标本对 5 种神经递质的反应 正常蚯蚓背肌标本的自发活动往往影响实验，同时由于肌肉表面 ChE 活性的影响，标本对 ACh 反应的灵敏度就不易提高。为此我们利用 soman 作为工具试剂制备了 ChE 失活的蚯蚓背肌标本。同时，还用同样的方法处理水蛭背肌标本，并相互作了比较。将 2 种背肌标本分别用含 soman 10 μg/ml 的生理溶液（修正任氏液或正常任氏液）在 30°C 孵温 30 min，洗去游离 soman 后，用比色法<sup>(3)</sup>测其 ChE 活性，同时各自和其正常肌肉标本的 ChE 活性作比较。蚯蚓肌肉块每管用 100 mg（即湿重 20 mg 一块，共 5 块），水蛭肌肉块每管用 20 mg（即湿重 20 mg 一块），其 ChE 活力基本相当，表明蚯蚓肌肉 ChE 活力比水蛭弱约 5 倍（图 3）。

由图 3 可见，soman 中毒后的肌肉块 ChE 活性基本丧失，也不易被肟类药 PAM-Cl 重活化。中毒蚯蚓肌肉块的 ChE 活性似乎

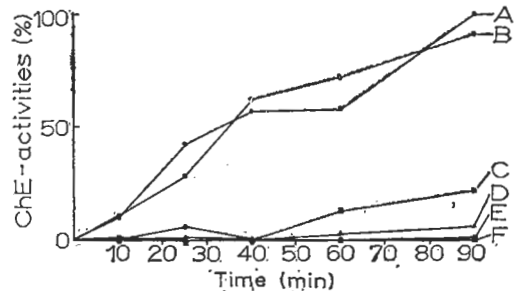


图 3. ChE-activities of A) normal earthworm muscle; B) normal leech muscle; C) soman-poisoned earthworm muscle treated by PAM; D) soman-poisoned earthworm muscle; E) soman-poisoned leech muscle; F) soman-poisoned leech muscle treated by PAM.

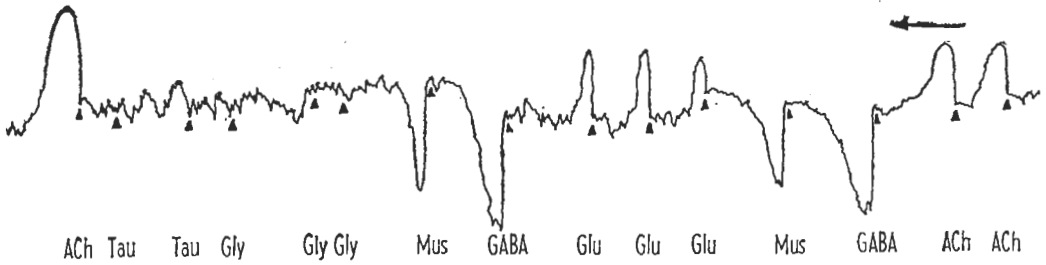


图 4. Responses of ChE-deactivated earthworm muscle to 5 neuro-transmitters and muscimol. ACh  $10^{-4}$  M; GABA  $10^{-4}$  M; Glu  $10^{-3}$  M; Gly  $10^{-3}$  M; Mus  $10^{-4}$  M; Tau  $10^{-3}$  M.

要比中毒水蛭肌肉块略高些，但其活性仍是微不足道的。ChE 失活的蚯蚓背肌标本自发活动较少，就更适宜于测试 GABA 及其它神经递质。用这种标本重复了图 2(a) 的实验(图 4)，ChE 失活的蚯蚓背肌标本对以上 5 种神经递质的反应完全同 ChE 未失活的正常蚯蚓背肌标本。我们认为这种标本对筛选强效的 GABA 受体激动剂和对剂，以及研究 GABA、ACh 和 Glu 这 3 种神经递质的相互作用是很有用的。我们还观察了蚯蚓背肌标本对 GABA 的剂量—效应关系(图 5)。

### 三、只有蚯蚓背肌标本能反映 GABA 效

应 在生理溶液中加入毒扁豆碱 ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 冲灌标本，以 GABA 对 ACh 反应的拮抗为指标，比较了 5 种动物的标本。图 6 和图 7 分别显示在蚯蚓背肌标本和蟾蜍腹直肌标本上 GABA 对 ACh 的拮抗效应。在蚯蚓背肌标本上 GABA 能对抗 ACh 反应，而在蟾蜍腹直肌标本上 GABA 则不能对抗 ACh 反应。水蛭背肌、小白鼠腹直肌和豚鼠回肠的反应都与蟾蜍腹直肌标本相同。其他实验也证明，单独给 GABA 时，除蚯蚓背肌标本有肌松弛反应外，其它标本均无反应。这更加说明蚯蚓背肌标本上的 GABA 效应是非常特异的。

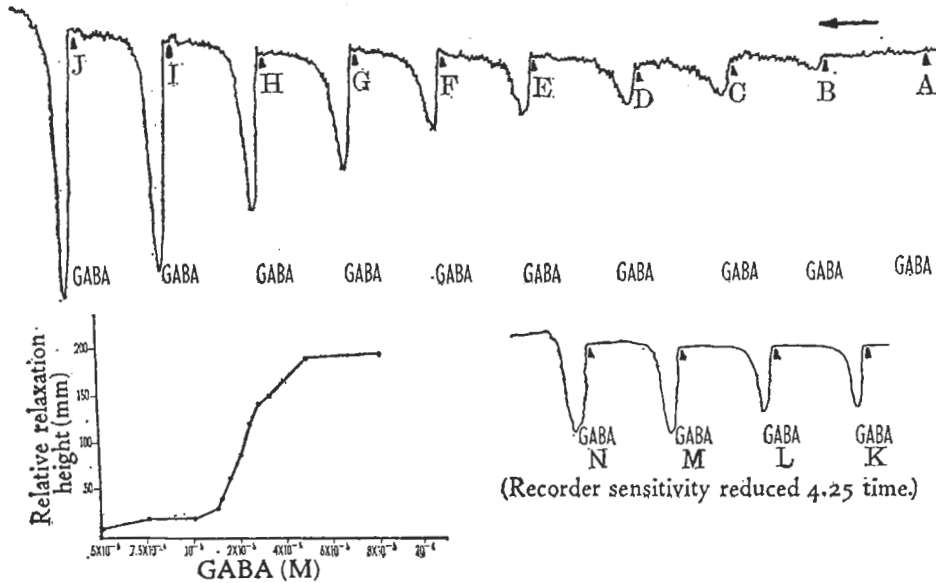


图 5. Dose-response patterns of GABA on ChE-deactivated earthworm muscle.

- A)  $10^{-6}$  M B)  $5 \times 10^{-6}$  M C)  $7.5 \times 10^{-6}$  M D)  $10^{-5}$  M E)  $1.25 \times 10^{-5}$  M  
 F)  $1.5 \times 10^{-5}$  M G)  $2 \times 10^{-5}$  M H)  $2.5 \times 10^{-5}$  M I)  $3 \times 10^{-5}$  M J)  $3.5 \times 10^{-5}$  M  
 K)  $3.5 \times 10^{-5}$  M L)  $4 \times 10^{-5}$  M M)  $6 \times 10^{-5}$  M N)  $10^{-4}$  M

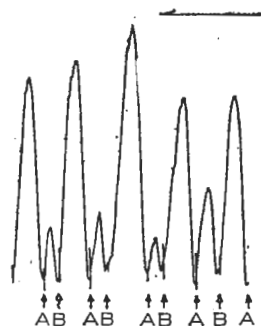


图 6. Effects of GABA and ACh on earthworm dorsal muscle during physostigmine-containing superfusion. A)  $10^{-6}$  M ACh; B)  $10^{-6}$  M ACh +  $10^{-4}$  M GABA.

综上所述, 蚯蚓背肌标本是一种用来研究 ACh、Glu 和 GABA 效应的较满意模型。

致谢 解放军总医院绘图室白杰同志协助绘图

*Acta Pharmacologica Sinica* 1981 Sep; 2 (3) : 145—148

## EARTHWORM DORSAL MUSCLE PREPARATION FOR STUDYING GAMMAAMINOBUTYRIC ACID, ACETYLCHOLINE AND GLUTAMIC ACID

ZHOU Ting-chong (T C Chou), ZHOU Jian-qun

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)

**ABSTRACT** A new model of earthworm (*Eisenia foetida*) dorsal muscle preparation was discovered. The response of muscle was recorded through mechanical functional changes instead of potential variations. It is more direct, simpler and specific for measuring GABA activity and screening GABA receptor agonist or

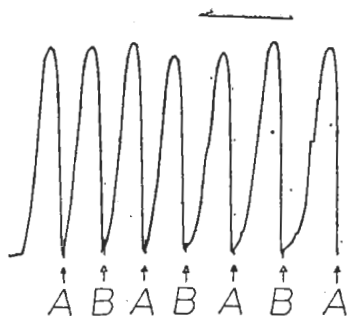


图 7. Effects of GABA and ACh on toad abdominal muscle during physostigmine-containing superfusion. A)  $10^{-5}$  M ACh; B)  $10^{-5}$  M ACh +  $10^{-3}$  M GABA.

### 参 考 文 献

- 1 Korenaga S, Ito Y, Ozoe Y, Eto M. *Comp Biochem Physiol* [C] 1977 Feb; 57(2):95
- 2 Szerb JC. *J Physiol* (Lond) 1961 Oct; 158(3):8P
- 3 Hestrin S. *J Biol Chem* 1949 Aug; 180(1):249

antagonist. This model could also be used to test other neurotransmitters such as acetylcholine and glutamic acid.

**KEY WORDS** earthworm; dorsal muscle; leech; GABA; glutamic acid; ACh; ChE; soman