

羟乙酸酯类化合物与小鼠脑 M-胆碱能受体结合的放射自显影研究

叶淑贞 李桂芬 池志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用强效 M-胆碱能拮抗剂 [³H]QNB 作放射自显影定位试验, 观察 M-受体在小鼠脑内的分布。结果表明尾-壳核, 海马树突区, 外侧膈核, 伏膈核和大脑梨区等均有较高密度的 M-受体, 受体最密区为尾-壳核。羟乙酸酯类化合物可以使纹状体的银颗粒数减少, 减少的程度与它们的中枢抗胆碱作用强度有关。说明羟乙酸酯类化合物的抗胆碱能作用与 M-受体亲和力有关。

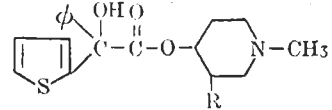
关键词 M-胆碱能受体; [³H] 二苯羟乙酸奎宁酯; 羟乙酸酯类; 放射自显影术

二苯羟乙酸奎宁酯(简称 QNB)是一种强效中枢 M-胆碱能拮抗剂。用 [³H]QNB 研究 M-胆碱能受体在大鼠脑的放射自显影定位, 表明在海马树突区、纹状体和大脑皮层均有受体分布, 预先 im M-胆碱能拮抗剂阿托品后, 这些部位的银颗粒数明显减少^(1,2)。说明 [³H]QNB 在这些区域的结合是特异性的。替代的羟乙酸酯类化合物是目前抗胆碱能药物中最强的类型之一。我所近年来也合成了一系列替代的羟乙酸酯类化合物, 这些化合物对 M-受体的亲和力与它们的中枢抗胆碱强度之间具有良好的相关性⁽³⁾。为进一步研究 [³H]QNB 和羟乙酸酯类化合物与小鼠脑 M-胆碱能受体结合的相互作用, 我们采用放射自显影术, 用 [³H]QNB 研究 M-胆碱能受体在小鼠脑内的定位, 并观察我所合成的二个羟乙酸酯类化合物在这些受体部位的竞争性取代。

材 料 和 方 法

1. **动物** 为本院动物饲养场繁殖的 ♂ 小鼠, 体重 22 g。

2. **药物** [³H]QNB 由北京军事医学科学院药理毒理研究所合成, 放射比活性为 8.76 Ci/mM。羟乙酸酯类化合物 7811 和 7810 由本所合成。结构式如下



7810 R = CH₂CH = CH₂

7811 R = CH₃

3. 实验方法

给小鼠 iv [³H]QNB 水溶液 66 μCi/0.11 ml, 1 h 后将小鼠断头处死(用药物组于 iv [³H]QNB 前 30 min ip), 迅速剥取脑组织, 切取尾-壳核, 海马和小脑三个部位厚 3-5 mm 的冠状切面, 分别放在自制的紫铜夹盘上, 迅速浸入液 N₂, 放在盛有干冰的保暖瓶内, 于切片前安放到已经冷却的标本台上, 在暗室内(室温 < 16°C), 用装有半导体致冷器(上海冶炼厂生产)的国产切片机切成 10 μm 厚的切片, 融-贴(thaw-mounted)在预先制备的涂有核-4 乳胶(中国科学院原子能研究所生产, 以浸膜法涂敷乳胶层)的载玻片上, 立即放入盛有 P₂O₅ 的干燥器内, 切片干后放入暗盒, 在 4°C 下曝光 30 d, 经显影和定影处理, Carnoy 液固定, H-E 染色, 乳胶层上的银颗粒分布可反映受体的定位。

在显微镜高倍视野下选定观察的部位, 用网格目镜测微器数每个格子中的银颗粒数, 在一个视野中连续数 10 个格子, 算出平均每 500 μm² 中的银颗粒数($\bar{x} \pm SD$)。观察的部位选择相当于 Stumpf 和 Sar⁽⁴⁾ 图中 3cm 和 12cm 冠状切面。每组 2 只小鼠, 每只小鼠的每个脑区观察 2-3 张切片。

结 果

1. [³H]QNB 在小鼠脑内的分布 由表 1

1981年5月26日收稿 1981年9月24日修回
1980年9月在全国第一届神经药理学专业学术会议宣读

Table 1. Autoradiographic grain density (grains/500 μm^2 , $\bar{x} \pm \text{SD}$) of [^3H]QNB in various regions of mouse brain. Background 1.1 ± 1.4

Nucleus caudatus-putamen	43 \pm 13
Corpus callosum	3.6 \pm 2.5
Nucleus septi lateralis	19 \pm 6
Anterior commissure	3.1 \pm 2.2
Nucleus accumbens	15 \pm 6
Pyriiform cortex	15 \pm 6
Cerebellum	3.0 \pm 2.5
Hippocampus	
Stratum oriens	16 \pm 4
Stratum pyramidal	10 \pm 3
Stratum radiatum	16 \pm 6
Stratum lacunosum-moleculare	9 \pm 4
Alvelus	3.1 \pm 2.1
Fimbria	4 \pm 3
Dentate gyrus	
Stratum granulare	9 \pm 4
Stratum polymorphicum	10 \pm 7
Stratum moleculare	16 \pm 6

可见, 尾-壳核银颗粒数最多, 说明有高密度的 M-胆碱受体分布, 但尾-壳核背侧部和内侧部银颗粒最密集, 为 43 ± 13 粒/500 μm^2 ,

Table 2. Autoradiographic grain density (grains/500 μm^2 , $\bar{x} \pm \text{SD}$) of [^3H]QNB (7.54×10^{-9} M) in mouse brain after ip anticholinergic drugs

	Control	7811 0.14 \times 10 ⁻⁶ M	7811 0.83 \times 10 ⁻⁶ M	7811 2.26 \times 10 ⁻⁶ M	Scopolamine 2.26 \times 10 ⁻⁶ M	Atropine 2.26 \times 10 ⁻⁶ M	7810 2.26 \times 10 ⁻⁶ M
Nucleus caudatus putamen	43 \pm 13	11 \pm 5	7 \pm 4	4 \pm 3	3.2 \pm 2.4	8 \pm 3	16 \pm 9
Nucleus septi lateralis	19 \pm 6	8 \pm 3	6 \pm 4	3.6 \pm 2.6	3.5 \pm 2.6	10 \pm 4	8 \pm 4
Pyriiform cortex	15 \pm 6	9 \pm 5	4 \pm 3	4 \pm 3	2.9 \pm 2.3	6.7 \pm 2.9	9 \pm 4
Nucleus accumbens	15 \pm 6	12 \pm 4	7 \pm 4	4.0 \pm 2.3	2.3 \pm 1.8	5.9 \pm 2.8	11 \pm 5
Hippocampus							
Stratum oriens	16 \pm 4	9 \pm 3	6 \pm 3	4.8 \pm 2.9	2.8 \pm 2.3	8 \pm 4	11 \pm 4
Stratum radiatum	16 \pm 6	7.4 \pm 2.8	7.2 \pm 2.7	4.5 \pm 2.7	2.5 \pm 1.8	7 \pm 3	12 \pm 5
Stratum moleculare	16 \pm 6	10 \pm 3	7 \pm 3	3.6 \pm 2.3	2.9 \pm 2.3	6 \pm 3	10 \pm 4

尾-壳核的中部银颗粒呈斑块状分布, 颗粒密度稍有减少. 尾壳核的邻近区胼胝体银颗粒数明显减少, 为 3.6 ± 2.5 粒/500 μm^2 (图 1 A).

外侧膈核也有较多的银颗粒, 但是比尾-壳核少(图 1 C). 内侧膈核的银颗粒数比外侧膈核少.

伏膈核有密集的胆碱能神经分布, 这个区域也有较多的银颗粒. 伏膈核邻近的白质区前连合银颗粒数很少.

在海马, 含有锥体细胞的底树突和顶树突的区域多形细胞层和辐射层银颗粒数多, 腔隙分子层银颗粒数少, 室床和伞部银颗粒数更少.

在齿状回, 含有颗粒细胞树突的分子层银颗粒多, 颗粒层和含有颗粒细胞轴突的多形细胞层银颗粒数较少.

在大脑皮层, 我们仅观察了大脑梨区, 银颗粒较多(图 1 B). 小脑银颗粒很少, 与白质胼胝体和前连合相当.

2. 4个抗 M-胆碱药物对 [^3H]QNB 在小鼠脑内受体结合竞争能力的比较 由表 2 可见, 4个抗 M-胆碱药物在同等剂量 ($2.26 \times 10^{-6}\text{M}$)时, 小鼠预先 im 具有较强中枢抗胆碱作用的羟乙酸酯类化合物 7811, 尾-壳核等受体密集的脑区银颗粒数明显减少 (图 1 D),

Table 1. Autoradiographic grain density (grains/500 μm^2 , $\bar{x} \pm \text{SD}$) of [^3H]QNB in various regions of mouse brain. Background 1.1 ± 1.4

Nucleus caudatus-putamen	43 \pm 13
Corpus callosum	3.6 \pm 2.5
Nucleus septi lateralis	19 \pm 6
Anterior commissure	3.1 \pm 2.2
Nucleus accumbens	15 \pm 6
Pyriform cortex	15 \pm 6
Cerebellum	3.0 \pm 2.5
Hippocampus	
Stratum oriens	16 \pm 4
Stratum pyramidal	10 \pm 3
Stratum radiatum	16 \pm 6
Stratum lacunosum-moleculare	9 \pm 4
Alvelus	3.1 \pm 2.1
Fimbria	4 \pm 3
Dentate gyrus	
Stratum granulare	9 \pm 4
Stratum polymorphicum	10 \pm 7
Stratum moleculare	16 \pm 6

可见, 尾-壳核银颗粒数最多, 说明有高密度的 M-胆碱受体分布, 但尾-壳核背侧部和内侧部银颗粒最密集, 为 43 ± 13 粒/500 μm^2 ,

Table 2. Autoradiographic grain density (grains/500 μm^2 , $\bar{x} \pm \text{SD}$) of [^3H]QNB (7.54×10^{-9} M) in mouse brain after ip anticholinergic drugs

	Control	7811 0.14 \times 10 ⁻⁶ M	7811 0.83 \times 10 ⁻⁶ M	7811 2.26 \times 10 ⁻⁶ M	Scopolamine 2.26 \times 10 ⁻⁶ M	Atropine 2.26 \times 10 ⁻⁶ M	7810 2.26 \times 10 ⁻⁶ M
Nucleus caudatus putamen	43 \pm 13	11 \pm 5	7 \pm 4	4 \pm 3	3.2 \pm 2.4	8 \pm 3	16 \pm 9
Nucleus septi lateralis	19 \pm 6	8 \pm 3	6 \pm 4	3.6 \pm 2.6	3.5 \pm 2.6	10 \pm 4	8 \pm 4
Pyriform cortex	15 \pm 6	9 \pm 5	4 \pm 3	4 \pm 3	2.9 \pm 2.3	6.7 \pm 2.9	9 \pm 4
Nucleus accumbens	15 \pm 6	12 \pm 4	7 \pm 4	4.0 \pm 2.3	2.3 \pm 1.8	5.9 \pm 2.8	11 \pm 5
Hippocampus							
Stratum oriens	16 \pm 4	9 \pm 3	6 \pm 3	4.8 \pm 2.9	2.8 \pm 2.3	8 \pm 4	11 \pm 4
Stratum radiatum	16 \pm 6	7.4 \pm 2.8	7.2 \pm 2.7	4.5 \pm 2.7	2.5 \pm 1.8	7 \pm 3	12 \pm 5
Stratum moleculare	16 \pm 6	10 \pm 3	7 \pm 3	3.6 \pm 2.3	2.9 \pm 2.3	6 \pm 3	10 \pm 4

尾-壳核的中部银颗粒呈斑块状分布, 颗粒密度稍有减少. 尾壳核的邻近区胼胝体银颗粒数明显减少, 为 3.6 ± 2.5 粒/500 μm^2 (图 1 A).

外侧膈核也有较多的银颗粒, 但是比尾-壳核少(图 1 C). 内侧膈核的银颗粒数比外侧膈核少.

伏膈核有密集的胆碱能神经分布, 这个区域也有较多的银颗粒. 伏膈核邻近的白质区前连合银颗粒数很少.

在海马, 含有锥体细胞的底树突和顶树突的区域多形细胞层和辐射层银颗粒数多, 腔隙分子层银颗粒数少, 室床和伞部银颗粒数更少.

在齿状回, 含有颗粒细胞树突的分子层银颗粒多, 颗粒层和含有颗粒细胞轴突的多形细胞层银颗粒数较少.

在大脑皮层, 我们仅观察了大脑梨区, 银颗粒较多(图 1 B). 小脑银颗粒很少, 与白质胼胝体和前连合相当.

2. 4个抗 M-胆碱药物对 [^3H]QNB 在小鼠脑内受体结合竞争能力的比较 由表 2 可见, 4个抗 M-胆碱药物在同等剂量 ($2.26 \times 10^{-6}\text{M}$) 时, 小鼠预先 im 具有较强中枢抗胆碱作用的羟乙酸酯类化合物 7811, 尾-壳核等受体密集的脑区银颗粒数明显减少 (图 1 D),

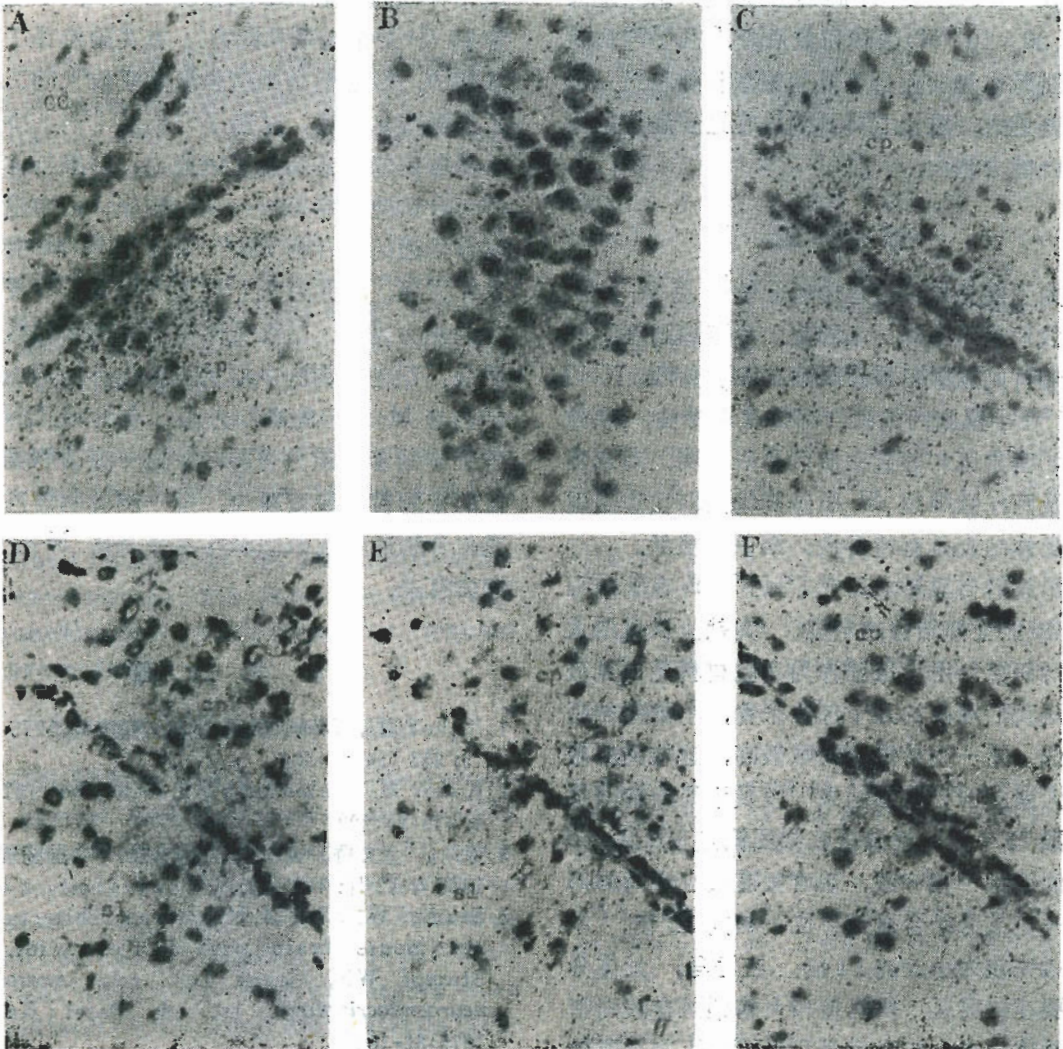
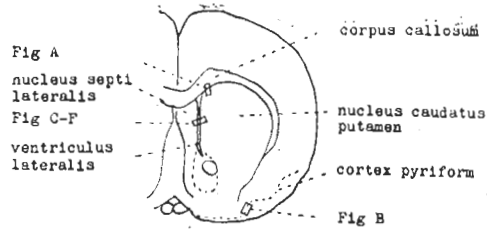


Fig 1. Anterior brain section corresponds to 3em after Stumpf and Sar. A—C) [³H]QNB; D) 7811 + [³H]QNB; E) 7810 + [³H]QNB; F) Atropine + [³H]QNB,

与东莨菪碱作用相当。预先 im 中枢抗胆碱作用较弱的羟乙酸酯类化合物 7810, 尾一壳核等脑区的银颗粒数减少程度较差(图 1 E), 说明这 2 个羟乙酸酯类化合物对 [^3H]QNB 在小鼠脑内受体结合均有竞争能力, 但是 7811 比 7810 竞争能力强。东莨菪碱和阿托品二组相比, 东莨菪碱组的银颗粒数减少明显, 说明东莨菪碱阻止 [^3H]QNB 在小鼠脑内受体结合的能力比阿托品强。在小鼠脑内竞争 [^3H]QNB 受体结合的能力, 4 药的次序为 7811 = 东莨菪碱 > 阿托品 > 7810(图 1 F)。

在 7811 的三个不同剂量组中, 给药量最大($2.26 \times 10^{-6}\text{M}$)银颗粒数最少, 几乎与白质例如胼胝体和前连合等处的银颗粒数相当。说明给药量大, 阻止 [^3H]QNB 在这些脑区的受体结合能力也大。

讨 论

为了避免制片过程中标记物的丢失和扩散, 我们采用新鲜、未固定、冷冻的脑组织作冰冻切片的放射自显影观察, 结果表明: [^3H]QNB 在小鼠脑内的结合部位有选择性, 颗粒分布的密集区和邻近白质区界限分明, 对东莨菪碱及阿托品等抗 M-胆碱药物的取代作用说明其受体结合是有特异性, 结果能重复。

用放射自显影术研究 [^3H]QNB 在脑内与 M-胆碱能受体结合的定位, 文献上仅见用大鼠进行研究, 用小鼠脑作为实验材料还未见报道。从我们观察的几个部位来看, 小脑颗粒密度最低, 尾一壳核银颗粒数最高, 这与文献报道的大鼠放射自显影结果⁽¹⁾以及用显微解剖法取大鼠 75 个专一性脑区和核团测定 [^3H]QNB 结合的结果⁽⁶⁾相一致, 后者报道结合最高的部位尾一壳核为结合最低部位小脑的 12 倍, 本结果尾壳核为小脑的 14 倍。在海马, 受体分布主要在树突区。伏膈核和大脑梨区有较高密度的受体分布。初步表明 [^3H]QNB 在小鼠脑内与 M-胆碱能受体结合部位基本上与大鼠相类似。

东莨菪碱的中枢抗胆碱作用比阿托品强, 在放射自显影实验中也证实了东莨菪碱阻止 [^3H]QNB 与 M-胆碱能受体结合的能力比阿托品的作用强。文献⁽¹⁾报道用 [^3H]QNB 海马分子层的银颗粒数为 11.4 粒/ $100 \mu\text{m}^2$, 预先 im 阿托品减少为 2.85 粒/ $100 \mu\text{m}^2$, 减少 75%。本实验用阿托品后, 海马分子层的银颗粒数减少 74%, 用东莨菪碱后减少 85%。

徐珩等⁽³⁾在羟乙酸酯类化合物和小鼠脑 M-受体亲和力试验中观察到受体亲和力与中枢抗胆碱强度之间有良好的相关性, 并认为这类化合物的中枢抗胆碱强度主要取决于它们与中枢 M-受体的亲和能力。本实验选择了结构式相仿, 但中枢抗胆碱强度相差较大的二个羟乙酸酯类化合物, 试验了它们对 [^3H]QNB 在小鼠脑内的受体结合竞争能力, 结果与体外受体结合试验的结果相一致。预先 ip 中枢抗胆碱作用强的化合物 7811, 由于它与 M-受体的亲和力强, 因而阻止 [^3H]QNB 与 M-受体结合的能力也强, 结果受体部位的银颗粒数减少明显。预先给弱的中枢抗胆碱化合物 7810, 由于它与 M-受体的亲和力弱, 与 [^3H]QNB 竞争受体结合的能力也弱, 故尾一壳核等受体部位的银颗粒数轻度减少。进一步说明羟乙酸酯类化合物的中枢抗胆碱作用强度与 M-受体亲和力有关。

参 考 文 献

- 1 Kuhar MJ, Yamamura HI. *Nature* 1975 Feb 13; 253 (5492):560
- 2 Kuhar MJ, Yamamura HI. *Brain Res* 1976 Jul 9; 110(2):229
- 3 徐珩、金文桥、夏兴林、池志强. 中国药理学报 1980 年 12 月; 1(2):76
- 4 Stumpf WE, Sar M. Hormone-architecture of the mouse brain with [^3H]estradiol. In: Stumpf WE, Grant LD, eds. *Anatomical neuroendocrinology*. 1st ed. Basel: Karger, 1975:82-103
- 5 Kobayashi RM, Palkovits M, Hruska RE, Rothschild R, Yamamura HI. *Brain Res* 1978 Oct 6; 154(1):13

AUTORADIOGRAPHIC STUDIES ON BINDING OF GLYCOLATE ESTERS WITH MUSCARINIC CHOLINERGIC RECEPTORS IN MOUSE BRAIN

YE Shu-zhen, LI Gui-fen, CHI Zhi-qiang

(*Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

ABSTRACT Muscarinic cholinergic receptors determined by the autoradiographic localization of a potent, muscarinic cholinergic antagonist [^3H]QNB was studied in mouse brain. Higher densities of silver grains were seen over nucleus caudatus putamen, dendritic regions in the hippocampus, nucleus septi lateralis, nucleus accumbens and pyriform cortex. The greatest density of receptors was observed in nucleus caudatus putamen. If mice were ip injected with glycolate esters, the

density of grains in striatum regions was reduced. Displacement potencies of [^3H]QNB binding to mouse brain by glycolate esters, correlated with their central anticholinergic potencies. The anticholinergic effect of these glycolate esters closely correlated with muscarinic receptor affinity.

KEY WORDS muscarinic cholinergic receptor; [^3H]QNB; glycolate esters; autoradiography