

## 13种胆碱能拮抗剂对大鼠心脏 M-胆碱能受体的作用

沈淑英\* 许建 金国章 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 13种胆碱能拮抗剂竞争抑制 [ $^3\text{H}$ ]QNB 与大鼠心脏 M-胆碱能受体结合的动力学参数: 1) 亲和力 ( $K_i$ ) 次序为 QNB > 7923, 东莨菪碱 > 阿托品 > B-7601 > M-8225 > 苯海索 > S-18, M-8218 > 7810 > S-27 > 山莨菪碱 > 樟柳碱。2) 斜率 (b) 约为 1, 表明它们作用于相同的 M-胆碱能受体。3) 大多数拮抗剂的 Hill 系数 ( $n_H$ ) 近于 1, 表示无协作关系的双分子结合。

**关键词** 大鼠心脏; M-胆碱能受体; 二苯羟乙酸奎宁酯; 东莨菪碱; 抗副交感神经药; Scatchard 式; Hill 系数

1983年9月8日收稿 1984年4月13日修回

\* 上海第一医学院药理教研组进修教师

作者对中枢 M-胆碱能药物曾提出划分亚型的设想<sup>(1)</sup>, 用多种类型的 M-胆碱能拮抗剂进行比较。当用大脑皮层、纹状体、迴肠、腮腺的 M-胆碱能受体膜蛋白与 [ $^3\text{H}$ ]QNB 作受体结合试验时<sup>(2,3)</sup> 发现它们对腮腺 M-胆碱能受体的亲和力次序有显著的倒转现象。已报道心脏有不同的 M-胆碱亚型受体<sup>(4)</sup>。本文应用这些 M-胆碱能拮抗剂研究它们对心脏的 M-胆碱能受体的亲和力强度和次序, 并与其对大脑皮层的亲和力<sup>(2)</sup> 相比, 看是否有特殊差异, 为研究亚

型受体提供线索。

## 材料和方 法

**材料** 二苯羟乙酸奎宁酯(QNB)和B-7601由解放军药物化学研究所提供; M-8225, M-8218, 7923, 7810, S-18和S-27由本所提供(图1); 苯海索系上海第十一制药厂生产; 盐酸山莨菪碱针剂系北京制药厂产品; 樟柳碱针剂系沪第十制药厂产品; 溴化东莨菪碱为E. Merck公司产品。玻璃纤维滤纸(GF/C)为Whatman公司产品;  $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (16.78Ci/mmol)系Radiochemical Centre Amersham产品。

**大鼠心脏M-胆碱能受体膜蛋白的制备** 参照文献<sup>(6-7)</sup>, 将♂大鼠220±SD 21g击毙, 取出心脏。按10:1, v/w加入冰冷的提取缓冲液

(0.25 M 蔗糖, 5 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 在冰浴中制成匀浆, 通过4层纱布过滤。其滤液离心(480×g, 4°C, 10 min), 取上清液再离心(30,000×g, 4°C, 20 min), 沉淀部分用孵育缓冲液洗涤1次(50 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 重复离心, 取沉淀物(受体蛋白)悬浮于原重量3倍的孵育缓冲液中, 按Lowry氏法测蛋白含量, 然后分装贮存于冰箱备用2周。每次用50只心脏制备, 共制备二批。

**受体结合试验** 贮存的膜蛋白解冻后, 将2 mg膜蛋白(5 mg/ml)与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (0.3-4.8 nM)及孵育缓冲液混合。非专一结合管另加非标记的QNB(0.3 μM), 总反应容量为2 ml。37°C保温40 min, 加入3 ml冰冷孵育缓冲液终止反应。立即经玻璃纤维滤纸减压抽滤, 用孵育缓冲液洗滤纸4次, 滤纸经80°C, 20 min烘干, 放入含有PPO和POPOP的二甲苯闪烁液中计数。

$[^3\text{H}]\text{QNB}$ 与心脏M-胆碱能受体结合的平衡离解常数( $K_D$ )和最大结合量( $B_{\text{max}}$ )按Scatchard式计算, 再求Hill系数( $n_H$ )<sup>(8)</sup>。

**M-胆碱能拮抗剂与大鼠心脏M-胆碱能受体的竞争结合试验** 在2 mg受体蛋白的孵育缓冲液中, 以胆碱能拮抗剂(10 nM-100 mM)与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (2.4 nM)孵育。每次均为复管试验, 其它过程同上。按量-效式(D/R)<sup>(9)</sup>计算拮抗剂抑制 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合50%时所需浓度( $\text{IC}_{50}$ )和斜率(b), 再求Hill系数( $n_H$ ), 通过 $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + L/K_D)$ 式计算 $K_i$ 值<sup>(2)</sup>。从而比较各拮抗剂与心脏M-胆碱能受体结合的亲和力。式中L为放射配基浓度,  $K_D$ 为Scatchard式计算的值。

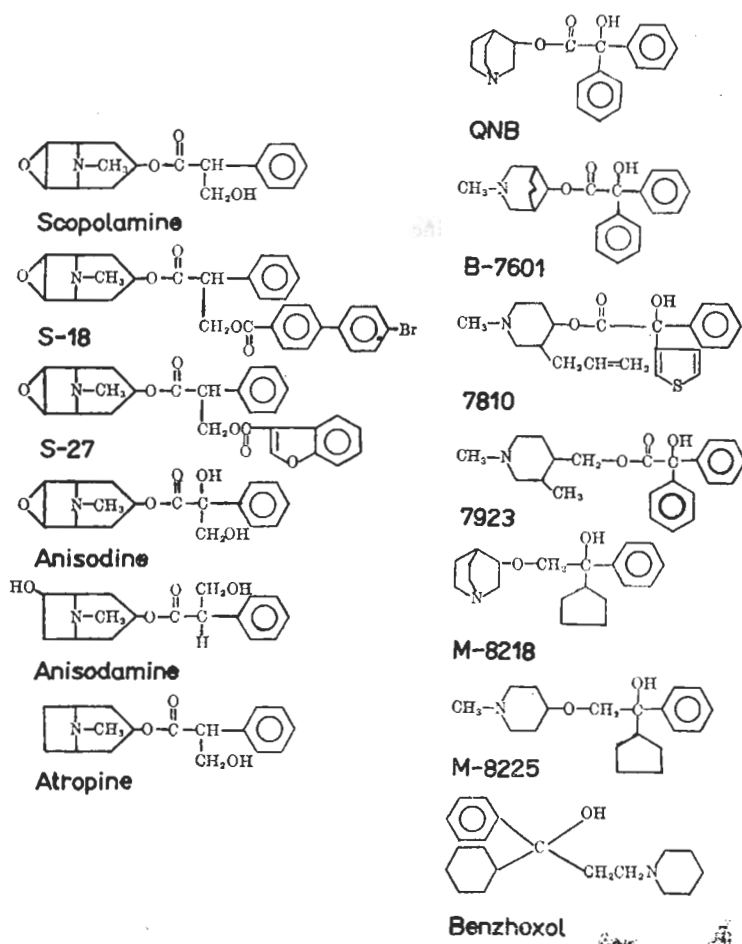


Fig 1. Structures of 13 cholinergic antagonists.

## 结果和讨论

大鼠心脏 M-胆碱能受体与不同浓度 [<sup>3</sup>H]QNB 的专一结合的量-效饱和曲线见图 2。在测定范围内非专一结合为总结合的 10-20%。

经 Scatchard 式求得的  $K_D = 0.36$  nM,  $B_{max} = 29.8$  fmol/mg protein, 作图。按 Hill 式求得的  $K_D = 0.41$  nM,  $n_H = 0.92$ , 作图 2。因  $n_H$  近于 1, 表明 [<sup>3</sup>H]QNB 与心脏 M-胆碱能受体作用是双分子结合的。

13 种胆碱能拮抗剂竞争抑制 [<sup>3</sup>H]QNB 与心脏 M-胆碱能受体结合的动力学参数 ( $K_i$ ,  $b$ ,  $n_H$ ) 见表 1, 其亲和力的强弱次序为 QNB >

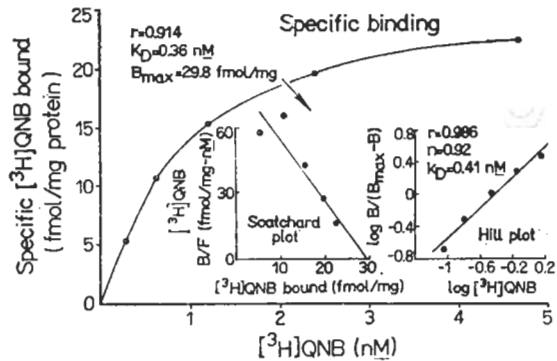


Fig 2. Specific binding of [<sup>3</sup>H]QNB to M-cholinergic receptors from rat heart membrane.

7923, 东莨菪碱 > 阿托品 > B-7601 > M-8225 > 苯海索 > S-18, M-8218 > 7810 > S-27 > 山莨菪碱 > 樟柳碱。这与前文<sup>(2)</sup>对中枢大脑皮层 M-胆碱能受体亲和力的强弱次序大体相仿 (表 1), 并没有明显的倒转现象。在本试验条件下, 未发现外周心脏与中枢大脑皮层的 M-受体存在不同亚型受体的依据。但从具体的亲和力强度来看, 这些拮抗剂对大脑皮层 M-受体的亲和力相应的都比心脏的要强 (1-18 倍), 这可能由于皮层内 M-胆碱能受体密度较大, 也可能由于此受体的结合点更适合于它们。

经 D/R 式处理求得的斜率 ( $b$ ) 约为 1, 表明他们的作用曲线的斜率很相似, 这种平行关系提示各拮抗剂均作用在相同的心脏 M-胆碱

能受体上竞争相同的受点; 绝大多数拮抗剂的  $n_H$  为 0.8-1.0, 看来它们似乎与受体结合是以双分子方式进行的无协作关系。

药物是通过和某些特异性受体相结合而发生作用的, 这种结合能力以亲和力表示, 药物对受体的亲和力与药物的生物效应之间存在着密切的关系。从实验数据 (表 1) 分析, 苯海索

Tab 1. Comparison of kinetic parameters of 13 cholinergic antagonists on M-cholinergic receptors in rat heart and cerebral cortex

Antagonist	Cortex*		Heart	
	$K_i$ (nM)	$K_i$ (nM)	$b$	$n_H$
QNB	0.13	0.2	1.02	0.973
7923		2.7	1.00	0.841
Scopolamine	1.1	2.8	1.03	0.787
Atropine	1.9	3.8	0.999	0.955
B-7601	2.3	7.8	0.970	0.919
M-8225	4.8	8.2	1.01	0.805
Benzhexol	2.3	10.0	0.957	1.02
S-18	1.0	18.0	0.972	1.03
M-8218	2.3	19.0	1.04	1.01
7810	22.0	40.0	1.00	0.929
S-27	18.0	73.0	1.01	0.742
Anisodamine	130.0	150.0	0.988	0.950
Anisodine	33.0	270.0	1.01	0.958

\* Ref 2

抗 M-胆碱作用的亲和力在中枢要比外周心脏的强约 4.3 倍, 这结果与文献<sup>(10)</sup>将苯海索称为选择性中枢作用的抗胆碱药的材料相符。S-18 的中枢抗胆碱作用要比心脏的强 18 倍, 它是否能成为一个中枢作用更为突出的药物, 有待探讨。对心脏 M-胆碱能受体结合的亲和力山莨菪碱大于樟柳碱约 1.8 倍, 而对皮层 M-胆碱能受体的亲和力则樟柳碱大于山莨菪碱约 4 倍, 这也支持樟柳碱的中枢作用较山莨菪碱强<sup>(11)</sup>; 反之, 说明山莨菪碱的外周抗胆碱作用较强, 具有选择较高的优点。

## 参 考 文 献

- 1 金国章, 药学通报 1980; 15: 181
- 2 许建、金国章、俞蕾平、李建华、俞璐瑶, 中国药理学报 1983; 4: 156
- 3 俞璐瑶、金国章、许建、俞蕾平、李建华, 生

- 理学报 1985; 37 : 282
- 4 Barlow RB, Burston KN, Vis A. *Br J Pharmacol* 1980; 68 : 141
  - 5 Tse J, Powell JR, Baste CA, Priest RE, Kuo JF. *Endocrinology* 1979; 105 : 246
  - 6 Story DD, Briley MS, Langer SZ. *Eur J Pharmacol* 1978; 57 : 423
  - 7 Rimele TJ, Gagarella TS. *Biochem Pharmacol* 1982; 31 : 515
  - 8 Bennett JP. Methods in binding studies. In: Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ, eds. *Neurotransmitter receptor binding*. 1st ed. NY: Raven Press, 1978 : 57-90
  - 9 金正均. 中国药理学报 1980; 1 : 3
  - 10 Bowman WC, Rand MJ. Parkinson's disease and drugs used in its treatment. In: Bowman WC, Rand MJ, eds. *Textbook of pharmacology*. 2nd ed. Oxford: Blackwell, 1980; 18 : 19
  - 11 中国医学科学院药物研究所药理室神经组. 中华医学杂志 1975; 55 : 795

*Acta Pharmacologica Sinica* 1985 Sep, 6 (3) : 158-161

## EFFECT OF 13 CHOLINERGIC ANTAGONISTS ON M-CHOLINERGIC RECEPTORS IN RAT HEARTS

SHEN Shu-ying, XU Jian, JIN Guo-zhang

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

**ABSTRACT** By means of radioligand receptor binding assay of M-cholinergic receptors from rat heart membranes, the results showed that [<sup>3</sup>H]QNB bound in a saturable manner to M-cholinergic receptors with an equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) = 0.36 nM and the maximum number of binding sites ( $B_{max}$ ) = 29.8 fmol/mg protein.

The affinities and modes of action of 13 cholinergic antagonists on M-cholinergic receptors in rat heart were measured from inhibition of [<sup>3</sup>H]QNB binding to M-cholinergic receptors. By the dose-response equation and Hill equation, the calculated kinetics parameters were as follows:

1. The order of affinity constants ( $K_i$ )

was QNB > 7923, scopolamine > atropine > B-7601 > M-8225 > benzhexol > S-18, M-8218 > 7810 > S-27 > anisodamine > anisodine.

2. Their slopes (b) were all close to 1. It suggested that the antagonists acted on the same M-cholinergic receptor sites.

3. The Hill numbers ( $n_H$ ) of most antagonists approximated to 1, which indicated receptor binding of antagonists likely to be bimolecular reaction without cooperative interactions.

**KEY WORDS** rat heart, M-cholinergic receptors, QNB, scopolamine, parasympatholytics, Scatchard plot, Hill coefficient