

静注索曼对 [^3H]二苯羟乙酸奎宁酯与大鼠脑匀浆特异性结合的影响

赵德禄 裴淑秋 刘传绩 (军事医学科学院药理毒理研究所, 北京 100800)

提要 用体内给药, 体外鉴定的方法研究了索曼对 [^3H]QNB 与大鼠全脑匀浆结合的影响。一定剂量范围的索曼与其对 [^3H]QNB 在中枢结合的抑制有较好的量效关系。 [^3H]QNB 为 4.0 nM 时, 索曼 ID_{50} 为 66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。双倒数作图分析表明, 索曼对 [^3H]QNB 结合的抑制是竞争性的。索曼完全抑制 AChE 之前, 它已对 [^3H]QNB 结合有影响。

关键词 索曼; [^3H]二苯羟乙酸奎宁酯; 毒蕈碱受体; 脑

有机磷胆碱酯酶抑制剂能否直接作用于中枢毒蕈碱样受体(M-AChR)是大家所关心的⁽¹⁾。文献曾报道反复少量给予胆碱酯酶抑制剂后, 体内长期积聚的乙酰胆碱(ACh)可使 M-AChR 数目减少, 但并非是化合物对 M-AChR 的直接作用^(2,3)。我们曾初步报道了索曼等胆碱酯酶抑制剂对中枢 M-AChR 有直接作用的体外依据⁽⁴⁾。本文给大鼠 iv 不同剂量的索曼, 观察它是否影响 [^3H]QNB 与其脑匀浆 M-AChR

结合。以期进一步判定在体内，索曼对中枢的 M-AChR 有否直接作用。

材料和方法

本院繁殖的 Wistar ♂ 大鼠，体重 $189 \pm SD$ 15 g。乌拉坦 1.0 g/kg ip 麻醉，切开气管接人工呼吸器。甲基阿托品 0.5 mg/kg im，以防止索曼引起的循环衰竭和呼吸道大量分泌。10 min 后，由股静脉缓慢 iv 各种被试药物或生理盐水(对照组)。再 15 min 后断头，取全脑(除小脑)称重，用 0.32 M 蔗糖制成 1:10(w/v) 匀浆。匀浆中加猪脑固相胆碱酯酶(2.0 mg/ml 匀浆)，在 37°C 振摇 10 min。此时用放射免疫法测定匀浆中 ACh 浓度为 $0.09 \mu M$ ，远低于明显抑制 $[^3H]QNB$ 结合的浓度⁽⁶⁾。将匀浆以 $2700 \times g$ 离心 10 min，取上层液与不同浓度 $[^3H]QNB$ 孵育。用国产 49-型玻璃纤维滤纸滤去游离 $[^3H]QNB$ ，闪烁计数^(4,5)。在样品管中有 $40 \mu M$ 非标记 QNB (载体管) 情况下，测得非特异性结合部分。被试药物抑制 $[^3H]QNB$ 结合%为： $(\text{对照管计数} - \text{样品管计数}) / (\text{对照管计数} - \text{载体管计数}) \times \%$ 。 $[^3H]QNB$ 为本所标记，比活性 311 GBq/mmol。1215 型液体闪烁计数仪(LKB)，计数效率 36%。固相乙酰胆碱酯酶是由本室从猪脑提取。羟胺法测定 AChE 活力。

实验结果

$[^3H]QNB$ 与全脑匀浆(除小脑)受体的结合 以固定的匀浆量与不同浓度的 $[^3H]QNB$ 进行结合实验(图 1)。特异性结合呈饱和曲线，而非特异性结合则呈直线。 $[^3H]QNB$ 4.0 和 8.0 nM 为适宜浓度，其特异性结合与非特异性结合比值为 11-13。 $[^3H]QNB$ 浓度过高或过低，其比值均有所降低。Scatchard 作图分析，平衡解离常数 $K_D = 12.5 \text{ nM}$ ，最大结合 $B_{max} = 33.0 \text{ pmol/g 湿重}$ 。双倒数作图分析 $K_D = 13.2 \text{ nM}$ ， $B_{max} = 33.3 \text{ pmol/g 湿重}$ 。Hill 作图分析 $K_D = 11.2 \text{ nM}$ ， $n = 0.92$ ，“H 接近“1”，表明

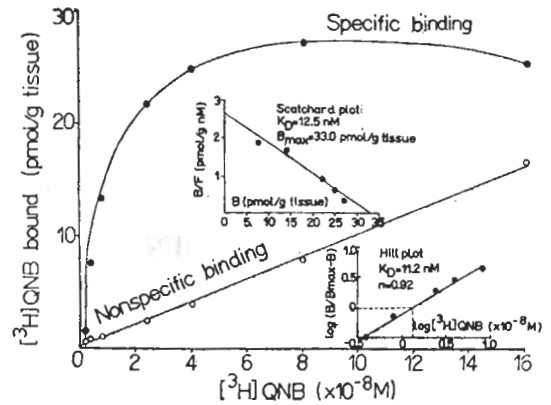


Fig 1. Binding of $[^3H]QNB$ to rat brain homogenate.

QNB 与 M-AChR 不存在正负合作关系。三种作图与 YEE-8100 微型计算机处理值非常接近。 K_D 值较国外偏高。

大鼠 iv 索曼等药后对脑匀浆与 $[^3H]QNB$ 结合的影响 固定 $[^3H]QNB$ 在 4.0 nM，当索曼剂量为 25-70 $\mu g/kg$ iv 时，随着索曼剂量逐渐增加， $[^3H]QNB$ 结合逐渐减少，有着较好的量效关系(图 2)。索曼抑制 $[^3H]QNB$ 结合最

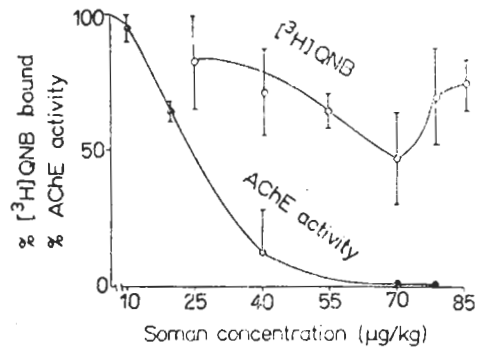


Fig 2. Effects of soman iv on specific binding of $[^3H]QNB$ (4.0 nM) and AChE activity in rat whole brain homogenates $n = 4-6$. $\bar{x} \pm SD$

大可达 72%，平均 $53 \pm 16\%$ 。其抑制 $[^3H]QNB$ 结合 50% 的剂量 (ID_{50}) 为 66 $\mu g/kg$ 。但是索曼剂量超过 70 $\mu g/kg$ 时，对结合的影响反而有所降低。索曼为 70 $\mu g/kg$ 和 55 $\mu g/kg$ 时，AChE 活力基本全部被抑制。与对照组相比， $[^3H]QNB$ 结合均显著减少 ($p < 0.01$)。看来，AChE 活力还未被索曼完全抑制之前，索曼已

开始使 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合减少。

图3表明, 当iv M-AChR拮抗剂QNB (0.8 mg/kg)时, 也可以明显抑制 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合。其抑制程度与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 浓度呈高度相关 ($r = -0.97$)。索曼 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iv 对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合的抑制也与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 浓度呈高度相关 ($r = -0.98$), 即它们对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合的抑制, 均可被逐渐增加剂量的 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 所减弱。然而, 当iv N-胆碱能受体拮抗剂美加明时, 剂量虽高达 10 mg/kg, 仍不能明显抑制 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合。

双倒数作图表明(图4)索曼 70 与 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 55 与 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 结合曲线之间的斜率有显

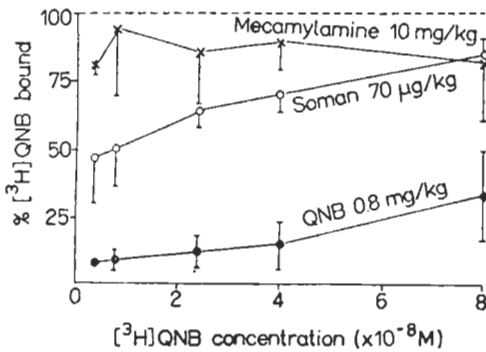


Fig 3. Effects of drugs iv on specific binding of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ in rat whole brain homogenates. $n = 5-6$. $\bar{x} \pm \text{SD}$.

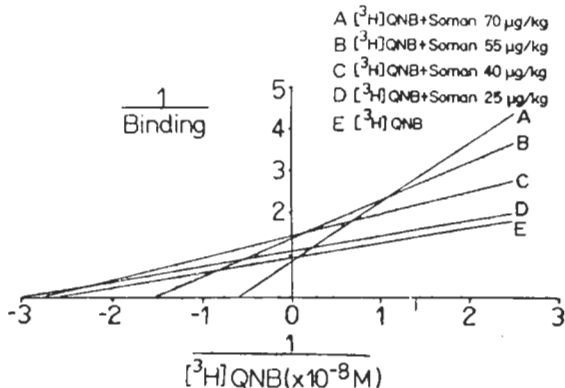


Fig 4. Double-reciprocal representation of product formation in the absence or presence of soman. All intercepts are in 95% confidence limit. Slope: A~B ($p < 0.01$), B~C ($p < 0.05$), C~D~E ($p > 0.05$). Binding: pmol/50 mg wet weight of tissue.

著差别(p 值分别为 <0.01 和 <0.05)。而 40 和 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 单药组斜率则无明显差别($p > 0.05$)。各个剂量组的截距均在一个 95%置信限内。随着索曼剂量的改变, 结合曲线斜率变化较大, 而截距变化不大, 说明iv 索曼影响 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 与 M-AChR 的 K_D 值, 对 R_0 影响不大, 提示索曼与 QNB 对中枢 MACHR 是竞争性结合。

讨 论

大鼠 iv 不同剂量索曼后, 再分别用其全脑匀浆在体外与不同浓度的 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 进行放射配基-受体结合鉴定(RRA)。结果表明, 索曼 55-70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 除抑制 AChE 外, 还可以明显减少 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合, 并且这个减少可被剂量逐渐增加的 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 所翻转。有报道较高剂量的 $[^3\text{H}]\text{QNB}$, 减少阿托品对它的抑制, 提示阿托品对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合影响是竞争性的⁽⁶⁾。支持我们用双倒数作图法测算所得结论, 即索曼对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合影响是竞争性的, 但是还不能完全排除索曼通过其它机制去影响 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合的可能性。

体内外实验最大区别在于, 体内实验存在着药物代谢和神经递质系统之间错综复杂的关联。因而影响体内实验的因素较多, 加之个体差异, 使结果波动较大。体外实验影响因素相对较少。体内给药, 体外进行 RRA 可部分地避免体内复杂情况的干扰。但是, 由于在体实验只能用给药后活杀、取脑、制备匀浆方法进行 RRA, 而在制备匀浆和离心等过程中, 与受体本来已结合的药物又有可能由于结合不牢而解离下来被洗掉⁽⁷⁾。从而显示了对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合无影响的假象。我们曾用中枢 M-AChR 激动剂氧化震颤素 1.5 mg/kg iv 大鼠 (3 倍严重震颤量), 本应明显抑制 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合, 但是没有看到。可能是氧化震颤素在体内与 M-AChR 结合后, 在制备匀浆过程中又解离下来了。当再进行 RRA 实验时, 对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合显示没有明显抑制, 但是索曼在此条件下,

确仍能对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 结合有明显干扰。间接地说明,索曼对M-AChR的结合可能是较牢的。

索曼55-70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iv刚刚能将大鼠脑AChE活力基本上完全抑制,但是已明显地干扰 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 与中枢M-AChR结合。提示索曼尚未完全抑制AChE活力时,已对中枢M-AChR有结合了。这点与文献报道的索曼需较大剂量($3 \times 10^{-4}\text{M}$)才对外周N-胆碱能受体有结合不同⁽⁸⁾。

总之,本实验指出了大鼠iv索曼后,对中枢M-AChR有竞争性结合。超过一定剂量,结合反而减少,其机理尚不明。低于完全抑制AChE活力的索曼剂量,已开始对中枢M-AChR有结合。以上结果与先前体外实验结果相同⁽⁴⁾。

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Dec; 6 (4) : 227-230

EFFECTS OF INTRAVENOUS INJECTION OF SOMAN ON SPECIFIC BINDING WITH $[^3\text{H}]\text{QNB}$ IN RAT BRAIN HOMOGENATES

ZHAO De-lu, PEI Shu-qiu, LIU Chuan-gui

(Inst Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)

ABSTRACT Rats were injected iv soman 25-70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and, after 15 min, the specific binding of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ to their whole brains (except cerebellum) homogenates was studied by radioligandreceptor assay. Soman inhibited the $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding in a dosedependent manner and the ID_{50} was 66 $\mu\text{g}/\text{kg}$. But the inhibition was diminished when the iv dose of soman was over 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Double-reciprocal plot of data

致谢 张宝贞协助统计,凌世淦协助测定ACh。

参 考 文 献

- 1 Van Meter WG, Karczmar AG, Fiscus RR. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1978; 231 : 249
- 2 Costa LG, Schwab BW, Murphy SD. *Toxicology* 1982; 25 : 79
- 3 Sivam SP, Norris JC, Lim DK, Hoskins B, Ho IK. *J Neurochem* 1983; 40 : 1414
- 4 赵德禄、王忠孝、裴淑秋、刘传缙. 中国药理学报 1983; 4 : 225
- 5 Yamamura HI, Snyder SH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71 : 1725
- 6 Yamamura HI, Kuhar MJ, Snyder SH. *Brain Res* 1974; 80 : 170
- 7 Boggan WO, Evans MG, Wallis CJ. *Life Sci* 1982; 30 : 1191
- 8 Bullock JO, Farquharson DA, Hoskin FCG. *Biochem Pharmacol* 1977; 26 : 337

revealed that the inhibition of soman on $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding was competitive. This inhibition took place before complete inhibition of cholinesterases (ChE) by soman. The dual actions of soman on ChE and M-AChR *in vivo* confirmed our previous results *in vitro*.

KEY WORDS soman; $[^3\text{H}]\text{QNB}$; muscarinic receptors; brain