中国药理学报　　1987 年 3 月；8 (2)：100-105

豚鼠肺组织中 M-胆碱受体的检定[1]

吕宝璋、王小兵[2]、单京瑞　　（军事医学科学院基础医学研究所，北京 100800）

提要　采用放射配基结合分析法，检定了正常豚鼠肺组织中的 M-胆碱受体，证实存在着高亲和力、低结合容量和低亲和力、高结合容量两种组分。由于作用不同的蛋白质修饰剂，对这两种组分与标记配基结合的影响不同，故认为它们是两种亲和力不同的结合部位。

1985 年 6 月 24 日收稿　　1986 年 6 月 30 日修回
[1] 中国科学院科学基金资助课题 №83；[2] 研究生

关键词　毒蕈碱受体；　放射配位体测定；　乙基马来酰亚胺；　二硫苏糖醇；　肺

受体分型是药理学研究的重要课题之一。由于分离、纯化和检定技术的发展，特别是放射性配基结合分析法的引入和具有高选择性化合物的应用，对某些受体亚型的研究和认识，已有长足进展，例如肾上腺素受体；而另一些受体的分型问题，则尚未解决，M-胆碱受体即为一例。有的资料表明[1,2]，无论是中枢神经系统或受副交感神经支配的外周组织中的M-胆碱受体，都只有单一亲和力的结合部位；而另一些资料则表明[3]，不同组织中M-胆碱受体，都存在着亚型。本文报道采用放射性配基结合分析法，配合应用蛋白质修饰剂，对豚鼠肺组织中M-胆碱受体检定的结果。

材料与方法

试剂与材料 [^{3}H]二苯羟乙酸奎宁酯([^{3}H]3-quinuclidinyl benzilate,[^{3}H]QNB,3.89 GBq/mg)系Amersham产品；QNB由军事医学科学院药理毒理学研究所提供；*N*-乙基马来酰亚胺(*N*-ethylmaleimide, NEM)、氯化乙酰胆碱和氨甲酰胆碱均购自美国Sigma公司；二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)系E. Merck公司产品；阿托品购自Aldrich公司；其他试剂均为AR。玻璃纤维滤膜用上海虹光造纸厂生产之海光49型滤纸自制。

豚鼠肺组织细胞膜制剂的制备 将3月龄♂豚鼠389±SD 35 g断头处死，取肺置于冰冷的生理盐水中洗去血污，移至冰冷的50 mmol/L磷酸盐含10 mmol/L EDTA的缓冲液(pH 7.4)中，剪碎后，以20 000 rpm的速度匀浆2 min；组织匀浆以400×*g*在4℃离心4 min；弃沉淀，上清再以30 000×*g*在4℃离心20 min。所得沉淀混悬于适量缓冲液中，使蛋白质含量约为2 mg/ml，立即供实验用。

结合实验 膜制剂200 μl，加入最终浓度为1-20 nmol/L的[^{3}H]QNB溶液，并加缓冲液使总容量为500 μl，在30℃水浴中孵育40 min后，通过玻璃纤维滤膜行负压抽滤；滤膜在80℃烤干后，置于含有0.5% PPO的甲苯中，用LKB-1215型液闪计数仪测量放射性。非特异结合系向反应体系中加入最终浓度为10 μmol/L的阿托品溶液而得。

动力学研究 膜制剂200 μl，与最终浓度为12 nmol/L的[^{3}H]QNB在30℃水浴中孵育不同时间，按前法抽滤、烤干和测量，以了解缔合情况。当反应达到平衡后，在反应体系中加入最终浓度为20 μmol/L的阿托品溶液，再继续保温不同时间，以研究其解离情况。

结合抑制实验 向含有200 μl膜制剂和12 nmol/L[^{3}H]QNB的反应体系中，加入不同浓度的各种非标记配基，在30℃水浴中孵育40 min后，按上述步骤操作并测量放射性。

烷化剂NEM和还原剂DTT的作用 膜制剂200 μl与最终浓度为0.1 mmol/L的NEM或DTT在30℃水浴中孵育10 min后，再按与上述结合实验相同的操作，加入不同浓度的标记配基，孵育、抽滤和烤干，最后作放射性测量。

蛋白质定量用比色法[4]。

实验结果

膜制剂与[^{3}H]QNB的结合 标记的M-胆碱受体拮抗剂——[^{3}H]QNB，已被广泛用于M-胆碱受体的检定。在本实验所用的[^{3}H]QNB浓度范围内(1-20 nmol/L)与豚鼠肺组织细胞膜制剂的结合，呈明显的双相性(图1)：在3-4 nmol/L达饱和；当加大浓度时，

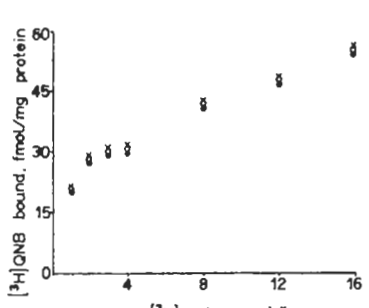

Fig 1. Specific binding of [^{3}H]quinuclidinyl benzilate ([^{3}H]QNB) to membranes of lung tissue from guinea pigs.

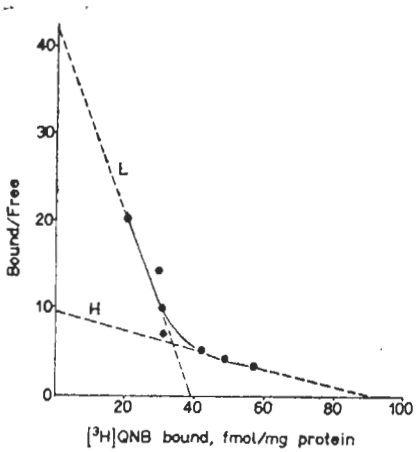

Fig 2. Scatchard plot of the binding of [^{3}H]QNB to membranes of lung tissue from guinea pigs. H: low affinity/high binding capacity; L: high affinty/low binding capacity.

又表现为第二个结合峰。将所得特异结合数据，按 Scatchard 公式计算并作图，则得到如图 2 所示的下凹曲线。根据其结合特征分解该曲线，可得到两条斜率不同的直线(图 2 中虚线)，它们在横坐标的截距为各自的最大结合容量(B_{max})。计算结果表明：高亲和力、低结合容量($B_{max}L$)组分的 $B_{max}=39.8$ fmol/mg 蛋白，$K_D=0.95$ nmol/L；低亲和力、高结合容量($B_{max}H$)组分的 $B_{max}=86.6$ fmol/mg 蛋白，$K_D=9.3$ nmol/L；可见 $B_{max}L$ 组分的结合亲和力较 $B_{max}H$ 者高近 10 倍，而其结合容量却不及后者的一半。当然，仅根据结合实验的结果，尚难以肯定它们究竟是两种不同亲和力的结合部位，还是由于负协同的结果。

动力学研究 欲确定结合实验中与标记配基结合的确属受体的结合部位，动力学研究是必不可缺的。图 3 的结果表明，膜制剂与[^{3}H]QNB 共同孵育，达半数最大结合量的时间为 36 s，在 10 min 时达到平衡；在加入终浓度为 20 μmol/L 阿托品后，离解半量受体-配基复合物所需时间为 47 s；说明缔合和离解是以高速率进行的，是可逆的。根据公式，在结合反应中 $\ln[(RL_{eq})/(RL_{eq}-RL)]=(K_1+K_2)L$，以 $n(RL_{eq})/(RL_{eq}-RL)$对时间作图，得到假一级速率图；以直线回归法求得其斜率，即为表观速率常数 K_{ob}，而 $K_{ob}=K_1+K_2=K_1(L)+K_2$。在离解反应中，$\ln(RL)/(RL_{eq})=-K_2t$，以 $\ln(RL)/(RL_{eq})$ 对时间作图，并以直线回归法求得其斜率，即为离解速率常数 K_2。将 K_2 代入 $K_{ob}=K_1(L)+K_2$ 式中，即可求得 K_1。据此求得本研究中肺组织细胞膜制剂与[^{3}H]QNB 反应的 $K_1=0.010\ min^{-1}\cdot(nmol/L)^{-1}$，在阿托品参与下，$K_2=0.109\ min^{-1}$；得 $K_D=K_2/K_1=10.90$ nmol/L，与前述结合实验所得之数据相近。

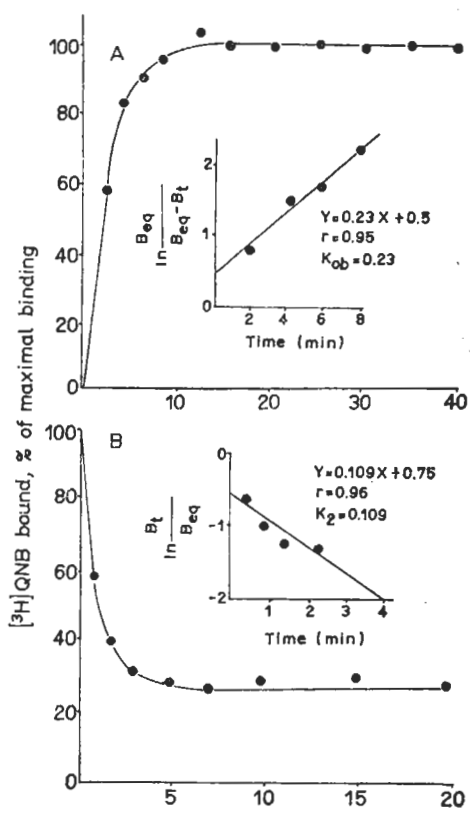

Fig 3. Kinetics of the binding of [^{3}H]QNB to cellular membranes of lung tissue from guinea pigs. Inset: A, pseudofirst-order plot of association; B, first-order plot of dissociation.

结合抑制实验 受体结合部位的特征之一，是它们与配基的结合可被不同化学和药理性质的激动剂或拮抗剂所取代。本研究采用不同浓度的 QNB、阿托品、氨甲酰胆碱和溴化

乙酰胆碱进行结合抑制实验；结果以非标记配基浓度的常用对数 log[I]为自变量，即 x 轴，以 logit(p)为因变量，即 y 轴，进行直线回归并作图如图 4。其中 logit(p) = ln [结合率/(100-结合率)]。在直线回归方程式中，当 y = 0 时的 x 值，就是 IC_{50} 的常用对数。如此求得上述各药的 IC_{50} 分别为 14.2 nmol/L，163.9 nmol/L，13.8 μmol/L 和 1.4 mmol/L。与文献报道[5]基本相符。

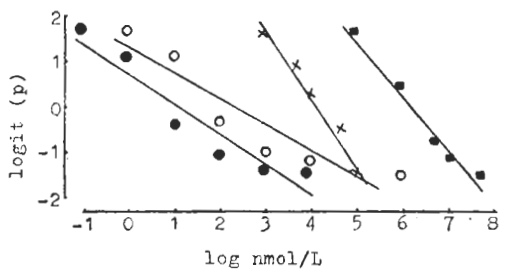

Fig 4. Inhibition of ligands of M receptor on the binding of [^{3}H]QNB to membrances prepared from lung tissue of guinea pigs.

烷化剂 NEM 和还原剂 DTT 的作用 在受体与配基结合时，结合部位中的巯基和二硫桥键起着重要作用。修饰这些基团，将改变受体的结合作用[6,7]。在本研究中，当将膜制剂与[^{3}H]QNB 在 30℃共同孵育 10 min 后，再加终浓度为 0.1 mmol/L 的 NEM，并继续在 30℃反应 30 min，按上述步骤抽滤和烤干，测量放射性，并与未加 NEM 者相比较，未见两者的 B_{max} 和 K_D 值有明显差异。反之，当将膜制剂先与 0.1 mmol/L 的 NEM 孵育 10 min，再加入不同浓度的[^{3}H]QNB 继续孵育 30 min，则见各个浓度点上结合的标记配基量，均少于未加 NEM 者。计算结果表明，B_{max}L 和 B_{max}H 值均因事先用 NEM 处理而降低了近 30%，而两者的 K_D 值则无明显改变(图 5)。

还原剂 DTT 对膜制剂与[^{3}H]QNB 结合的影响与 NEM 者不同：它只使 B_{max}H 值降低，而对 B_{max}L 却无明显影响(图 5)。

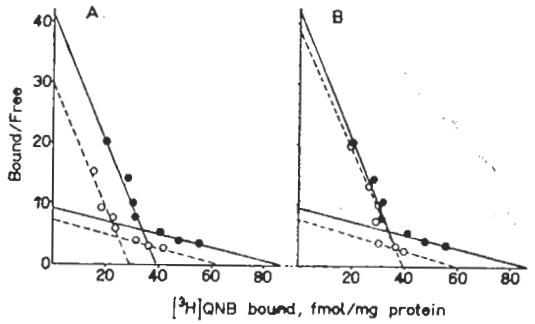

Fig 5. Effect of *N*-ethylmaleimide (NEM) (A) and dithiothreitol (DTT) (B) on the binding of [^{3}H]QNB to cellular membranes of lung tissue from guinea pigs. Solid lines (both in A and B): without NEM and DTT, B_{max}L = 39.79 fmol/mg protein, K_D = 0.95 nmol/L; B_{max}H = 86.62 fmol/mg protein, K_D = 9.26 nmol/L. Dotted lines in A: membranes were preincubated with 0.1 mmol/L of NEM, B_{max}L = 28.76 fmol/mg protein, K_D = 0.97 nmol/L; B_{max}H = 63.60 fmol/mg protein, K_D = 8.89 nmol/L. Dotted lines in B: membranes were preincubated with 0.1 mmol/L of DTT, B_{max}L = 39.65 fmol/mg protein, K_D = 1.02 nmol/L; B_{max}H = 59.00 fmol/mg protein, K_D = 7.86 nmol/L. Each point is the $\bar{x}$ of 3 experiments.

讨　　论

M-胆碱受体分型是一个比较复杂的问题。有人认为[8]，在心肌中 M-胆碱受体可能有两种不同的结合部位，而在延脑中则有三种；根据对配基亲和力、组织分布和所偶联的效应器不同，建议将 M-胆碱受体分为至少三个亚型。但是，迄今对几种动物肺组织或气道平滑肌中 M-胆碱受体检定的结果，却表明它们都只有单一亲和力的结合部位[9-12]。Mita 等[9]以 0.5-1.5 nmol/L 的[^{3}H]QNB 为标记配基，测得豚鼠肺组织膜制剂中 M-胆碱受体的 B_{max} 为 54±1.8 fmol/mg 蛋白，与我们用 1-4 nmol/L [^{3}H]QNB 测得之 B_{max} 值(39.79 fmol/mg 蛋白)相近。但是如图 1 所示，继续增加[^{3}H]QNB 的浓度，又出现了一个明显不同的结合时相。经以 Scatchard 公式处理并作图，即表现为高亲和力、低结合容量和低亲和力、高结合容量两种成分。动力学研究和结

合抑制实验表明，它们与[^{3}H]QNB 的结合，具有受体结合部位应有的特征。为了探究这两种不同亲和力和结合容量的组分的性质，我们在反应体系中加入了对蛋白质巯基起烷化作用的 NEM，及可裂断其二硫键的 DTT，分别观察它们对 M-胆碱受体与[^{3}H]QNB 结合作用的影响，意在通过比较它们所产生影响的异同，确定由结合实验数据所得两种组分是分属于不同的结合部位呢，还是由于负协同作用的结果。由于事先与 NEM 反应，使两种组分与[^{3}H]QNB 的结合都有所减少，而后加 NEM 却无此作用，说明这两种组分在与配基结合时，都需有-SH 基存在；配基的结合对这些基团有修饰或保护作用，从而免遭烷化。由于 DTT 只降低 $B_{max}H$ 与[^{3}H]QNB 的结合，而对 $B_{max}L$ 者无影响，除说明前者与配基结合需有二硫键存在外，还提示这两种组分至少在构象上是不同的。换言之，豚鼠肺组织中的 M-胆碱受体有两种不同亲和力和结合容量的结合部位。

参 考 文 献

1 Hulme EC, Birdsall NJM, Burgen ASV, Mehta P. The binding of antagonists to brain muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 1978; **14** : 737

2 Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJM, Burgen ASV, Hulme EC. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 1980; **283** : 90

3 Birdsall NJM, Hulme EC. Muscarinic receptor subclasses. *Trends Pharmacol Sci* 1983; **4** : 459

4 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193** : 265

5 Schulster D, Levitzki A. *Cellular receptors for hormones and neurotransmitters.* 1st ed. NY: John Wiley, 1980 : 353-68

6 Vauquelin G, Andre C, De Backer J-P, Laduron P, Strosberg AD. Agonist-mediated conformational changes of muscarinic receptors in rat brain. *Eur J Biochem* 1982; **125** : 117

7 Bottari S, Vauquelin G, Durieu O, Klutchka C, Strosberg AD. The β-adrenergic receptor of turkey erythrocyte membranes: Conformational modification by β-adrenergic agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; **86** : 1311

8 Birdsall NJM, Hulme EC. Muscarinic receptor heterogeneity. *Trends Pharmacol Sci* 1984; **5** : 4

9 Mita H, Yui Y, Suzuki M, Yayueda H, Shida T. Effect of *Bordetella pertussis* on α_1 and β_1-adrenergic and cholinergic muscarinic receptors in guinea pig lung membranes. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1982; **69** : 169

10 Cheng JB, Townley RG. Comparison of muscarinic and beta adrenergic receptors between bovine peripheral lung and tracheal smooth muscles: A striking difference in the receptor concentration. *Life Sci* 1982; **30** : 2079

11 Murlas C, Nadel JA, Roberts JM. The muscarinic receptors of airway smooth muscle: their characterization *in vitro*. *J Appl Physiol* 1982; **52** : 1084

12 Barnes PJ, Nadel JA, Roberts JM, Basbaum CB. Muscarinic receptors in lung and trachea: Autoradiographic localization using [^{3}H]quinuclidinyl benzilate. *Eur J Pharmacol* 1982; **86** : 103

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Mar; **8** (2) : 100-105

Identification of muscarinic receptors in lung of guinea pig

LÜ Bao-Zhang, WANG Xiao-Bin, SHAN Jin-Rui

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

ABSTRACT Using radioligand binding assay, muscarinic receptors in the lung tissue of guinea pigs were identified. Two components with higher affinity/low binding capacity and lower affinity/high binding capacity have been revealed. The binding of [^{3}H]QNB to the 2 components was decreased when the membranes were pre-

incubated with *N*-ethylmaleimide (NEM). However, a decreased binding can only be screened in the component with higher binding capacity ($B_{max}H$) when the membranes were preincubated with dithiothreitol (DTT). The results suggest that the difference in affinity between the 2 components may be a reflection of the existence of 2 different kinds of binding sites.

KEY WORDS muscarinic receptors; radioligand assay; ethylmaleimide; dithiothreitol; lung

Projects supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences. № 83

* * * * * *