

苯二氮䓬衍生物的抗惊厥活性与前叶皮质受体亲和力的关系

颜光美、胡本荣 (中山医科大学药理教研室, 广州 510037)

提要 可逆性受体结合及光亲和标记法证明15种国产苯二氮䓬衍生物的抗戊四唑惊厥活性与对兔前叶皮质受体的亲和力存在良好的平行关系。衍生物的受体亲和力及其抗惊厥活性强度取决于A环第7位吸电子基取代、B环内酰胺结构及C环C_{2'}位的吸电子基取代。光亲和标记法标记的位点为具有药理学功能的苯二氮䓬受体。

关键词 苯并二氮䓬类; 苯并二氮䓬受体; 光亲和标记; 戊四唑; 结构-活性关系

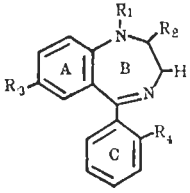
药物与受体相互作用的构效关系的研究是改造、创制新药的指南, 并且有助于阐明受体的分子结构。现已证明, 哺乳类动物脑内存在特异性、高亲和力的苯二氮䓬受体(BZ-R), 介导该类药物的中枢作用⁽¹⁾。本文应用可逆性配基-受体结合法及光亲和标记法(Photoaffinity-labeling), 以氚标记氟硝安定 [³H]FNP 与家兔脑前叶皮质 BZ-R 的结合为实验模型, 研究非同位素标记的15种国产苯二氮䓬衍生物对上述结合反应的竞争性抑制作用, 并与整体给药时抗戊四唑(PTZ)惊厥的药理活性进行比较, 试图了解苯二氮䓬衍生物与BZ-R结合的构效关系, 以及光亲和标记位点的药理学性质。

材料和方法

材料 [³H]FNP系New England Nuclear Corp产品, 比放射强度2701 GBq/mmol。安定、硝基安定、三唑安定系湖北制药厂产品, 氟硝安定由上海医工院合成, 利眠宁由广州市药检所提供, 氟安定系上海第二制药厂产品。其余9种苯二氮䓬衍生物由北京医科大学药学院管作武教授合成惠赠。结构式经元素分析、IR, uv, NMR确定。PTZ注射剂系上海新亚制药厂产品。GF/B型微孔玻璃纤维滤纸为Whatman公司产品。

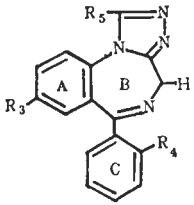
前叶皮质 P₂ 膜制备 中国大耳兔, ♂, 5月龄。颈动脉放血处死, 立即解剖出前叶皮质, 置于1-4℃的Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)中洗去血污。称重后按1:10(wt/vol)加入冰冷的0.32 mol/L蔗糖溶液。先用玻璃匀浆器上、下三次手动匀浆, 再用电动匀浆(约5000 rpm)2 min。匀浆液以1000×g离心20 min, 弃去沉淀。上清液再以30 000×g离心二次。收集沉淀加入原容积的Tris-HCl缓冲液, 手动匀浆1 min制成悬液。按Lowry法⁽²⁾测定蛋白质含量后, 分装贮存于-20℃备用3周。

Tab 1. Structures of benzodiazepines investigated



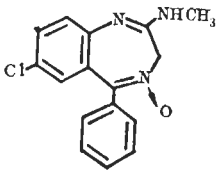
[1,4]Benzodiazepines

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Diazepam	CH ₃	O	Cl	H
Clonazepam	H	O	NO ₂	Cl
Nitrazepam	H	O	NO ₂	H
Flurazepam	CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	O	Cl	F
G-411	CH ₃	S	Cl	H
CBC 1219	CH ₃	O	H	H



Triazolo(1,4)benzodiazepines

	R ₃	R ₄	R ₅
Alprazolam	Cl	H	CH ₃
Estazolam	Cl	H	H
G-401	NO ₂	H	CH ₃
G-402	NO ₂	H	C ₂ H ₅
G-403	Br	H	CH ₃
G-404	Br	H	C ₂ H ₅
G-405	NO ₂	H	C ₁₂ H ₂₅
G-406	Cl	H	C ₂ H ₅



Chlordiazepoxide

BZ-R 竞争结合实验 反应系统中加入 P₂ 膜 100 μl, 不同浓度的苯二氮䓬衍生物 100 μl, [³H]FNP 50 μl, Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 250 μl. 反应管在 25°C 下孵育 15 min 后, 加入冰冷缓冲液 5 ml, 立即滴加到 GF/B 玻璃纤维滤

纸上负压抽滤, 并用 5 ml 冰冷缓冲液洗涤二次. 滤纸在 70°C 下烘烤 20 min, 转移至 20 ml 液闪瓶内, 加入含有 ppo, popop 和二甲苯的液闪剂 5 ml. 暗适应至少 8 h 以减少化学发光. LKB 双道自动液闪仪测定计数率 (cpm). 苯二氮䓬衍生物抑制 [³H]FNP 与受体结合的百分数 (I %) 由下式求得

$$I \% = \frac{\text{总结合管 cpm} - \text{含衍生物管 cpm}}{\text{总结合管 cpm} - \text{非特异结合 cpm}}$$

再按竞争抑制的量-效关系式 (D/R) 求出各苯二氮䓬衍生物抑制 50% 时浓度 (IC₅₀)⁽³⁾, 以此代表该衍生物与受体的亲和力.

$$D/R \text{ 式: } A/E_A = IC_{50}/E_{A_{max}} + 1/E_{A_{max}} \cdot A$$

式中 A 为苯二氮䓬衍生物浓度, E_A 为衍生物浓度为 A 时抑制结合的 % (I%), E_{A_{max}} 为衍生物的最大抑制 %.

光亲和标记实验 反应体系同上. 反应管先在暗室中 0°C 下孵育 120 min, 再给予紫外光 (2537 Å) 照射 20 min, 光源强度为 (1.4 J/m²)/s. 然后各管均加入 10 μl 安定, 移至 30°C 下孵育 30 min 使可逆性结合的 [³H]FNP 完全解离. 抽滤及计算方法同上.

抗 PTZ 惊厥实验 小鼠, 体重 20 ± SD 2 g, ♀♂ 各半, 随机分组, PTZ 剂量为 (90 mg/10ml)/kg 体重, ip. 强直性或阵挛性惊厥持续 3 s 以上为阳性. 上述剂量惊厥率为 100% (n = 50), 与文献 (4) 结果相同. 苯二氮䓬衍生物以少许无水乙醇溶解, 0.9% NaCl 加至容积刻度. 乙醇最高浓度为 2%. 文献报道及本文预实验均证明该浓度的乙醇对 90 mg/kg PTZ 惊厥无保护作用. 苯二氮䓬衍生物在 PTZ 前 30 min 给予 ip, 连续观察 1 h. 按 Weil 氏法计算 ED₅₀⁽⁵⁾.

结 果

[³H]FNP 与家兔前叶皮质 P₂ 膜的饱和结合分析 以不同浓度的 [³H]FNP 与含 0.4 mg 蛋白质的 P₂ 膜进行结合反应, 得到总结合曲

线.另一组中加入 10 μ l 安定获得非特异性结合曲线.特异性结合 = 总结合 - 非特异性结合(图 1).

从图 1 可见, [3 H]FNP 结合呈可饱和性.同一资料经电子计算机拟合的 Scatchard 曲线为双曲线型;其二组参数分别为 $K_{D1} = 0.276$ nmol/L, $B_{max1} = 0.33$ pmol/mg 蛋白质; $K_{D2} = 5.960$ nmol/L, $B_{max2} = 3.70$ pmol/mg 蛋白质(图 2), 提示 BZ-R 存在负协作效应或两种亚型.

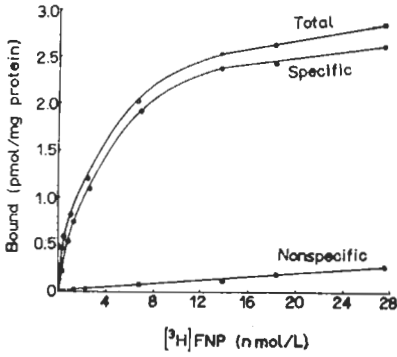


Fig 1. Saturation bindings of [3 H]flunitrazepam to rabbit frontal synaptosomal membranes.

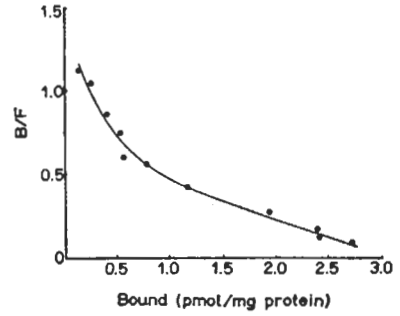


Fig 2. Scatchard plot of [3 H]flunitrazepam binding by DCE-10 computer. $K_{D1} = 0.276$ nmol/L; $B_{max1} = 0.33$ pmol/mg protein; $K_{D2} = 5.960$ nmol/L; $B_{max2} = 3.70$ pmol/mg protein; RMS Error < 0.04.

苯二氮革衍生物与前叶皮质 BZ-R 结合的亲和力比较 当 [3 H]FNP 为 1.37 nmol/L 时, 非特异性结合 < 3%. 15 种苯二氮革衍生物竞争抑制 [3 H]FNP 与受体结合的 IC_{50} 值列于表 2. IC_{50} 是一个与 K_i 有关的参数, 故可作为衍生物与受体亲和力的度量. 表 2 显示, 氯硝安定最强; 甲基三唑安定、G-403 G-404 及安定均较强; G-411 较弱, CBC 1219 及 G-405 最弱.

Tab 2. Affinity to benzodiazepine receptors in rabbit frontal cortex and anti-convulsant potency of benzodiazepine derivatives.

Number	Compounds	IC_{50} (nmol/L)	ED_{50} (μ mol/L)	Photoaffinity IC_{50} (nmol/L)
1	Diazepam	10	1.159	26
2	Clonazepam	3	0.226	0.11
3	Nitrazepam	25	1.779	63
4	Flurazepam	39	1.239	19
5	G-411	190	21.245	138
6	CBC 1219	50 118	174.205	50 100
7	Chlordiazepoxide	2 818	52.995	2 884
8	Alprazolam	14	0.223	4
9	Estazolam	19	1.347	12
10	G-401	55	0.784	63
11	G-402	125	1.501	208
12	G-403	12	0.357	23
13	G-404	10	1.717	31
14	G-405	8912	61.615	10 000
15	G-406	25	1.023	59

抗 PTZ 惊厥作用比较 如表 2 所示, 15 种苯二氮䓬衍生物中, 抗 PTZ 惊厥作用以氯硝安定最强, 甲基三唑安定次之, CBC 1219 最弱。将各衍生物的抗 PTZ 惊厥的 ED_{50} 与其对前叶皮质受体亲和力 (IC_{50}) 进行相关分析, 可逆性结合的相关系数为 0.958, 光亲和标记法的相关系数为 0.960 (p 均 < 0.01), 提示两种方法所检测的受体具有相同的药理学性质 (图 3)。

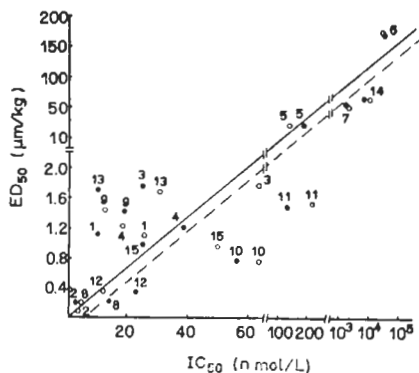


Fig 3. Correlation of inhibition by benzodiazepine derivatives of $[^3H]$ flunitrazepam binding in rabbit frontal cortex receptor (IC_{50}) with anti-convulsant potencies in mice (ED_{50}).

(●) Reversible binding ($r = 0.958$, $p < 0.01$)

(○) photoaffinity labeling ($r = 0.960$, $p < 0.01$)

讨 论

用配基-受体结合实验筛选各种化合物是一种多快好省的方法⁽⁶⁾。如果将试管内的结合实验与整体实验结合起来进行, 除了探讨受体的药理学特性外, 还可以在受体大分子与药物小分子的相互作用上阐明药物的构效关系规律, 为新药的定向设计提供科学可靠的依据。

如表 1 及表 2 所示, 本研究所选用的苯二氮䓬衍生物包括苯二氮䓬类各个不同发展时期的代表药物, 其中 8 种 (G-401-406, CBC 1219, G-411 系国内最新创制。15 种衍生物的受体亲和力与抗 PTZ 惊厥的药理学活性之间具有非常显著的相关关系, 证明 $[^3H]$ FNP 标记的位点具有药理学功能。衍生物与受体的亲和力大 (IC_{50} 小), 其药理学活性亦强 (ED_{50} 小), 反之

亦然。应用光亲和标记法对上述 15 种苯二氮䓬衍生物进行研究也得出相同的结论。但存在个别例外, 如氟安定和三唑安定与安定比较时可见亲和力与药理活性分离。由于药理活性的表现, 不仅取决于药物与受体相互作用的药效动力学过程, 而且在此之前要受某些药代动力学过程的影响。药理学方面的差异, 可能造成到达受体部位的有效药物浓度不同。

根据可逆性受体结合与光亲和标记实验和整体药理学研究, 苯二氮䓬衍生物具有明显的构效关系规律: (1) A 环 C_7 吸电子基取代后与受体亲和力及药理活性大为增强, 如安定与 CBC 1219 受体亲和力与药理活性均相差约 200 倍。对于药理活性的强弱, C_7 取代基的关系是 $NO_2 > Br > CF_3 > Cl$ ⁽⁷⁾。(2) B 环内酰胺结构, 如内酰胺的羰基氧被硫取代 (G-411) 或变为甲胺基 (利眠宁), 它们与受体的亲和力及药理活性仅为安定的 1/280 和 1/110。B 环 N_1 甲基取代亲和力及药理活性均明显增强, 但如取代基太大, 两者反而下降 (氟安定, G-405), 可能是空间位阻效应妨碍了药物与受体的结合。(3) C 环的 C_2' 卤素取代, 受体亲和力及药理活性均增强。最近文献报道, B 环 C_3 位的长链或带电基团取代, 可导致与受体亲和力降低⁽⁸⁾。

三唑苯二氮䓬类 (triazolo[1,4]benzodiazepines) 是一类新型的苯二氮䓬衍生物。其结构特点是 B 环的 N_1-C_2 再环化成三唑环。三唑环上甲基取代时可增加受体亲和力及药理活性, 但长链基团取代则使两者均下降, 如 G-405。本研究中采用的甲基三唑安定、三唑安定及 G-403 与 BZ-R 均有较高的亲和力, 抗 PTZ 惊厥作用亦强。

借助于详细的构效关系研究, 不仅能更有效地改造苯二氮䓬类药物, 而且可能勾勒出 BZ-R 的分子形状。本研究只能以有限的材料提供一些线索, BZ-R 似乎至少存在三个带正电性的部位。但真正的 BZ-R 的分子结构有待于受体蛋白的纯化及其结构分析才能阐明。

参 考 文 献

- 1 Squires RF, Braestrup C. Benzodiazepine receptor in rat brain, *Nature* 1977; 266 : 732
- 2 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 3 Levitzki A. Quantitative aspects of ligand binding to receptor. In : Schulster D, Levitzki A. eds. *Cellular receptor for hormones and neurotransmitters*. 1st ed. NY : Wiley, 1980: 10-28
- 4 Grecksch G, Carralho LP, Venault P, Chapouthier G, Russier J. Convulsions induced by submaximal dose of pentylenetetrazol in mice are antagonized by benzodiazepine antagonist Ro 15-1788. *Life Sci* 1983; 32 : 2579
- 5 Weil CS. Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD_{50} or ED_{50}) and instruction in their use. *Biometrics* 1952; 8 : 249
- 6 周廷冲. 受体药理学的进展和展望. 生理科学进展 1984; 15 : 105
- 7 管作武. 苯骈二氮杂葸类药物. 医药工业 1983; 7 : 20
- 8 Shibuya T, Field R, Watanabe Y, Sato K, Salafsky B. Structure affinity relationships between several new benzodiazepine derivatives and 3H -diazepam receptor sites. *Jpn J Pharmacol* 1984; 34 : 435

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Sep; 7 (5) : 389-393

Benzodiazepine derivatives: relationship between anti-convulsant activity and affinity to rabbit frontal cortical receptors

YAN Guang-mei, HU Ben-rong

(Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510037)

ABSTRACT The correlation between benzodiazepine receptor affinity of 15 benzodiazepine derivatives and their anti-convulsant activity was studied by reversible radioactive ligand binding and photoaffinity labeling methods. The binding characteristics of benzodiazepine receptor exhibited apparent heterogeneity with two dissociation constants (K_D), ie, 0.276 and 5.960 nmol/L, respectively. They showed a good parallel between binding to receptor and anti-convulsant potency of benzodiazepine derivatives ($r=0.958$ for reversible binding and $r=0.960$ for photoaffinity labeling).

The analysis of structure-activity

relationship suggested that the affinity to BZ receptor of benzodiazepine derivatives and their pharmacological effects seemed to be dependent on the replacement of H atom by electrophilic groups at C_7 in ring A, C_2 in ring C and lactam structure of ring B. The BZ receptor seemed to have three positive electronic sites at least for binding to benzodiazepines.

KEY WORDS benzodiazepines; benzodiazepine receptors; photoaffinity labeling; pentylenetetrazol; structure-activity relationship