

## 猪脑血管上的苯环利定受体

陆亦凤、孙凤艳、张玲妹、张安中 (上海医科大学神经生物学教研室, 上海 200032, 中国)

## Phencyclidine receptors in porcine cerebral arteries

LU Yi-Feng, SUN Feng-Yan, ZHANG Ling-Mei, ZHANG An-Zhong  
(Department of Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

**ABSTRACT** A specific, saturable, reversible, and selective binding site with  $K_d = 87 \pm 33$  nmol/L,  $B_{max} = 0.78 \pm 0.11$  pmol/mg protein was detected in the binding of [ $^3$ H] phencyclidine (PCP) to porcine cerebral blood vessels. Only ligands of PCP/sigma series were able to bind to the PCP receptors. [ $^3$ H]PCP bound to its receptors was not displaced by etorphine or norepinephrine 0.1 mmol/L. A specific [ $^3$ H]PCP binding site was found in porcine brain with  $K_d = 75 \pm 34$  nmol/L,  $B_{max} = 0.61 \pm 0.23$  pmol/mg protein. Bioassay *in vitro* showed PCP enhanced the perfusion pressure of porcine cerebral blood vessels in a dose-dependent manner. This study provides direct evidence for PCP receptors on cerebral blood vessels, and suggests that PCP may produce cerebral vasospasm via PCP receptor interaction.

**KEY WORDS** phencyclidine; drug receptors; cerebral arteries; radioligand assay; perfusion

**摘要** 应用放射配体结合分析发现猪脑血管上有 [ $^3$ H] 苯环利定 ([ $^3$ H]PCP) 特异性结合部位, 其解离常数为  $87 \pm 33$  nmol/L, 最大结合为  $0.78 \pm 0.11$  pmol/mg protein. PCP/sigma 型配体能抑制 [ $^3$ H]PCP 的特异性结合。猪脑内也发现有 [ $^3$ H]PCP 的特异性结合部位。离体血管生物鉴定显示了 PCP 能明显增加血管灌注压, 并呈剂量依赖关系。

**关键词** 苯环利定; 药物受体; 脑动脉; 放射配体测定; 灌注

Received 1988 Sep 23 Accepted 1989 Mar 28

自从在大鼠和人脑中 发现 PCP/sigma 受体<sup>(1,2)</sup>以来, 有人报道 PCP 与脑血管疾病和脑血管意外有关<sup>(3,4)</sup>。但脑血管上是否有 PCP/sigma 受体, 未见文献报道。为了了解脑血管上是否有 PCP/sigma 受体以及是否参与脑血管的舒缩活动, 本文采用放射结合分析法和血管灌注技术进行了研究。

## MATERIALS

猪脑血管(含基底动脉, 基底动脉环和主要分枝)取自上海龙华肉类联合加工厂。

PCP, etorphine 和 [ $^3$ H]PCP (0.91 TBq/mmol) 由本校药学院合成和标记。d-,l-SK&F-10047 由 Dr Richard L. Hawks (NIDA, USA) 赠。Dextrorphan, levorphanol 由 Dr Avram Goldstein (Addiction Research Foundation) 赠。d-,l-Pentazocine 由 Dr S William Tam (Du Pont Company) 赠。d-,l-Butaclamol 购自 Research Biochemicals Inc. Haloperidol 购自上海第十三制药厂。去甲肾上腺素购自上海天丰药厂。

## METHODS

**脑血管突触膜匀浆蛋白制备** 新鲜猪脑血管用预冷的 5 nmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.8) 洗去血液, 剪碎。按每克湿重加 30 ml 缓冲液置于玻璃匀浆管内, 匀浆 30-40 次。匀浆液在  $500 \times g, 4^\circ C$  离心 10 min。上清液在  $30\ 000 \times g$ ,

4℃离心 20 min. 沉淀用缓冲液重新悬浮。在 30 000 × g, 4℃再离心 20 min. 沉淀存于 -20℃. 实验前用酚试剂法测量突触膜匀浆蛋白含量。

**放射配体结合分析法** 反应管置于冰浴中, 分别加入匀浆蛋白 0.25 mg, [<sup>3</sup>H]PCP 4-259 nmol/L 和不同量的 PCP 或 PCP/sigma 受体的配体。非特异结合管加 PCP 40 μmol/L (文中均指最终浓度)。反应管内最终容量为 0.5 ml. 反应管在 4℃孵育 1 h. 用 GF/C 玻璃纤维滤纸过滤反应液。过滤时, 每反应管用冰冷缓冲液快速冲洗 3 次, 每次 5 ml. GF/C 滤纸使用前先浸入含 0.01% polyethylenimine 的缓冲液内 2 h, 以减少滤膜自身的非特异性吸附。滤过的滤膜烘干后作液体闪烁计数。

**猪脑基底动脉环灌注法** 参照大鼠肠系膜血管床灌注方法<sup>(5)</sup>, 取猪基底动脉环作血管灌注实验。灌注液为 Krebs 液, 标本置于浴槽内持续通 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 混合气, 37 ± 0.5℃, 平衡 2 h 后, 即可给予各种药物, 观察其对灌注压的变化情况。

## RESULTS

### 放射结合分析

**1 Scatchard 分析** 反应管中固定突触膜匀浆蛋白的量, 改变 [<sup>3</sup>H]PCP 的浓度。实验结果显示猪脑血管上具有一个 [<sup>3</sup>H]PCP 特异性结合的部位。在一定浓度范围内, 随着 [<sup>3</sup>H]PCP 浓度的增加, 特异性结合也随之增加。但到一定浓度后结合呈饱和趋势。其解离常数 ( $K_d$ ) 和最大结合量 ( $B_{max}$ ) 分别为 87 ± 33 nmol/L 和 0.78 ± 0.11 pmol/mg protein ( $n = 5$ )。猪脑皮质匀浆的 [<sup>3</sup>H]PCP 结合分析显示猪脑内也有呈饱和性、特异性结合的部位, 其解离常数 ( $K_d$ ) 和最大结合量 ( $B_{max}$ ) 分别为 75 ± 34 nmol/L 和 0.61 ± 0.23 pmol/mg protein ( $n = 3$ , Fig 1)。

**2 竞争性抑制能力分析** 投料时固定 [<sup>3</sup>H]PCP 的投料量为 24.6 nmol/L 和突触膜匀浆蛋白的量为 0.25 mg, 改变 PCP 和 PCP/sigma 受

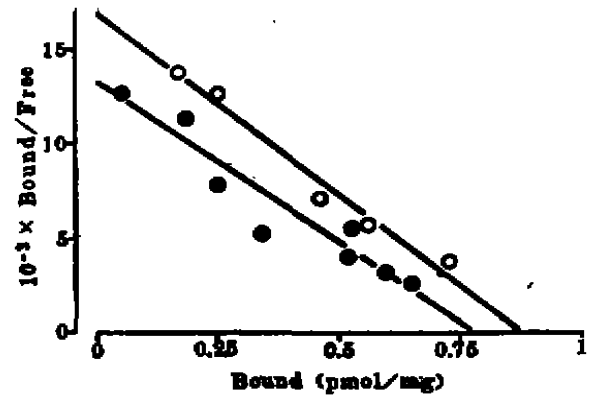


Fig 1. Specific binding of [<sup>3</sup>H]PCP to porcine cerebral blood vessels (●) and to porcine brain (○) as a Scatchard analysis.

体各种配体的浓度。将各配体抑制 [<sup>3</sup>H]PCP 与脑血管匀浆蛋白特异性结合达 50% 时的浓度 ( $IC_{50}$ ) 作为抑制能力的指标。实验显示非标记 PCP 对 [<sup>3</sup>H]PCP 的特异性结合有竞争性抑制作用。当非标记 PCP 的浓度分别为 0.005, 0.01, 0.05, 0.5, 1, 5, 10 μmol/L 时它们的抑制% 分别为 3, 21, 43, 49, 65, 90 和

Tab 1. Potencies of drugs to inhibit [<sup>3</sup>H]phencyclidine binding  $IC_{50}$ , concentration displacing 50% of specific bound of [<sup>3</sup>H]phencyclidine.  $\bar{x} \pm SD$ .  $n_H$  was the pseudo-Hill coefficient from displacement curves which give best fit with experimental points. Relative potency expressed potency to PCP (relative potency = 1).

Drug	n	$IC_{50}$ (μmol/L)	$n_H$	Relative potency
Phencyclidine	7	0.19 ± 0.20	0.9	1.00
Levorphanol	4	0.59 ± 0.68	0.8	0.32
Dextrorphan	4	0.86 ± 0.78	0.9	0.22
Haloperidol	7	1.1 ± 1.9	1.0	0.17
d-Butaclamol	4	1.4 ± 1.4	0.7	0.14
l-Butaclamol	3	2.1 ± 1.5	0.8	0.09
d-SKF 10 047	3	2.3 ± 1.0	0.9	0.08
d-Pentazocine	4	3.5 ± 4.7	1.0	0.05
l-Pentazocine	3	4.8 ± 3.8	0.9	0.04
l-SKF 10 047	3	7.1 ± 8.6	0.9	0.03
Etorphine	4	>100	—	—
Norepinephrine	4	>100	—	—

94%。其平均  $IC_{50}$  为 190 nmol/L, 95% 可信限为 128-277 nmol/L。此竞争性抑制呈线性。

PCP/ $\sigma$  类配体也能抑制 [ $^3H$ ]PCP 的特异性结合。Tab 1 列出了此类药物对 [ $^3H$ ]PCP 特异性结合竞争性抑制的能力大小。

**猪基底动脉环灌注实验结果分析** 我们看到 PCP 能引起灌注压升高。当 PCP 给予量分别为 3.5, 35, 和 350 nmol/L 时, 其灌注压增值分别为  $0.17 \pm 0.31$  kPa ( $1.3 \pm 2.3$  mm Hg),  $1.51 \pm 0.27$  kPa ( $11.3 \pm 2.0$  mm Hg) 和  $2.97 \pm 0.47$  kPa ( $22.3 \pm 3.5$  mm Hg) ( $n=3$ )。剂量反应呈线性 (Fig 2)。

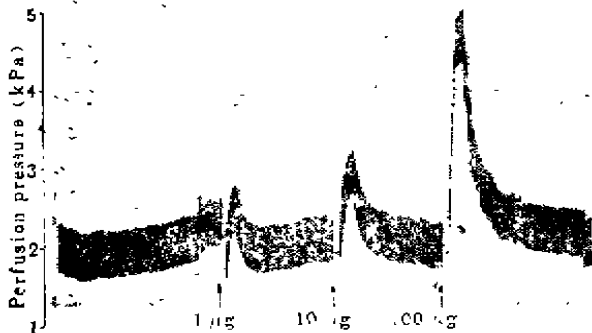


Fig 2. Effects of phencyclidine (PCP) on porcine cerebral blood vessels.

实验结果还显示 PCP 受体拮抗剂 dextrorphan 能部分抑制 PCP 引起的灌注压升高作用。给予 dextrorphan 0.1  $\mu$ mol 时对基础压无明显作用, 而在给予 dextrorphan 0.1  $\mu$ mol 后 15 min 再给予 PCP 0.01  $\mu$ mol, 此时 PCP 升高灌注压的作用被部分拮抗。其抑制率为  $26 \pm 12\%$  ( $n=3$ )。

## DISCUSSION

本实验采用放射配体结合分析直接证明脑血管上具有 [ $^3H$ ]PCP 特异性结合的部位。该结合反应具有饱和性, 可逆性和选择性。提示此结合部位是 PCP 受体。本文还比较了猪脑血管和猪脑皮质中的 PCP 受体的结合情况。其解离常数和最大结合量十分相近。脑血管上的实验结果与外周血管上实验结果<sup>(8)</sup>比较也是相

似的, 但脑血管上 PCP 受体密度比外周血管上低 6-7 倍。

PCP 或 PCP/ $\sigma$  类配体能竞争性抑制 [ $^3H$ ]PCP 的特异性结合。而阿片受体广谱激动剂 etorphine 和肾上腺素能受体激动剂 norepinephrine 在浓度高达 0.1 mmol/L 也不抑制 [ $^3H$ ]PCP 的特异性结合。说明脑血管上的 PCP 受体有高的选择性。

脑血管上 [ $^3H$ ]PCP 的特异性结合可被 SKF 10 047, haloperidol 和 butaclamol 等药物竞争性抑制, 但它们的抑制能力不及 PCP 自身对 [ $^3H$ ]PCP 在脑血管上特异性结合的抑制能力。这与文献(7,8)报道结果相符。在大鼠脑匀浆突触膜结合分析中 PCP 能抑制 [ $^3H$ ]SKF 10 047 的特异性结合, 但抑制能力不及 SKF 10 047, haloperidol 和 butaclamol 等药物; 反之, SKF 10 047, haloperidol 和 butaclamol 等药物也能抑制 [ $^3H$ ]PCP 的特异性结合, 其抑制能力也不及 PCP。PCP 受体和  $\sigma$  受体有交叉。因此, 脑血管上 [ $^3H$ ]PCP 的特异性结合部位是以 PCP 为主, 还是以  $\sigma$  为主, 尚待研究。

猪脑基底动脉环灌注实验初步的实验结果显示 PCP 能提高脑血管灌注压, 此作用呈剂量依赖关系。提示 PCP 可引起猪脑血管收缩。我们实验的结果与狗大脑基底动脉和中动脉张力试验所得结果<sup>(9)</sup>相似。PCP 引起的血管灌注压增加效应可被 PCP 受体拮抗剂 dextrorphan<sup>(10)</sup>部分拮抗。提示 PCP 引起的脑血管收缩作用是通过脑血管上的 PCP 受体而实现的。其作用机理的研究正在进行中。

**致谢** 本文统计工作得到徐端正教授的指导和帮助。

## REFERENCES

- 1 Vincent JP, Kartalovski B, Geneste P, Kamenka JM, Lazdunski M. Interaction of phencyclidine ("angel dust") with a specific receptor in rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76 : 4678
- 2 Sircar R, Zukin SR. Characterization of

- specific sigma opiate/phencyclidine (PCP)-binding sites in the human brain. *Life Sci* 1983; 33(Suppl) : S 259
- 3 Hollister LE. Pharmacology and toxicology of psychotomimetics. In: Hoffmeister F, Stille G, eds. *Psychotropic agents*; Part III. Berlin: Springer, 1982: 31-44. (Born GVR, Farah A, Herken H, Welch AD, eds. *Handbook of experimental pharmacology*; vol 55)
  - 4 Winger G. PCP-NMDA connection provides hope in cerebral ischemia but new direction for antipsychotics. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8 : 323
  - 5 McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J Physiol (Lond)* 1965; 177 : 21
  - 6 Zhu H, Zhang AZ, Zhang LM, Xu XR, Ye WL. Phencyclidine receptor in blood vessels. *Chin J Physiol Sci* 1986; 2 : 47
  - 7 Tam SW, Cook L.  $\sigma$  opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[<sup>3</sup>H]SKF 10,047 and [<sup>3</sup>H]haloperidol binding in guinea pig brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81 : 5618
  - 8 Sonders MS, Keana JFW, Weber E. Phencyclidine and psychotomimetic sigma opiates: recent insights into their biochemical and physiological sites of action. *Trends Neurosci* 1988; 11 : 37
  - 9 Altura BT, Quirion R, Pert CB, Altura BM. Phencyclidine ("angel dust") analogs and  $\sigma$  opiate benzomorphans cause cerebral arterial spasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80 : 865
  - 10 Sun FY, Zhu H, Zhang LM, Xu XR, Zhang AZ. Dextrorphan: an antagonist for phencyclidine receptors. *Life Sci* 1987; 40 : 2303

\* \* \* \* \*

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Nov; 10(6) : 511-515

### Effects of endothelin on porcine coronary arterial strips

GONG Qin-Yan, YANG Zao-Chen (Department of Pharmacology, Faculty of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

CAI Hui, LIN Shan-Yan (Department of Nephrology, Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200040, China)

CHANG Ding, CHANG Jao-Kang (Peninsula Laboratories Inc, Belmont CA 94002, USA)

**ABSTRACT** Endothelin, a novel endothelium derived 21-residue vasoconstrictor peptide synthesized by Peninsula Laboratories, provoked a concentration-dependent contraction of porcine coronary arterial strips.  $EC_{50}$  value for endothelin was  $14 \pm SD 4$  nmol/L ( $n=6$ ), and significantly lower than the values for 5-hydroxytryptamine (5-HT,  $0.28 \pm 0.07$   $\mu$ mol/L,  $n=6$ ) and 15-methyl-prostaglandin  $F_{2a}$  (15-methyl-PGF<sub>2a</sub>,  $4 \pm 3$   $\mu$ mol/L,  $n=7$ ). The maximal increase in tension caused by endothelin was  $5.4 \pm 1.1$  g, being much greater than that induced by 5-HT ( $3.7 \pm 0.8$  g,  $P < 0.05$ ) and 15-methyl-PGF<sub>2a</sub> ( $3.7 \pm 0.6$  g,  $P < 0.01$ ). The changes in tension provoked by endothelin (2-20 nmol/L) were attenuated significantly after pretreated with tetrodotoxin (TTX, 30  $\mu$ mol/L,  $P < 0.05$  or 0.01). The results suggest that en-

dothelin is one of the most potent vasoconstrictive agents, and its action is partially related to voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channel in the cell membrane.

**KEY WORDS** drug dose-response relationship; swine; coronary vessels; vasoconstriction; vascular endothelium; serotonin; prostaglandins F; tetrodotoxin; verapamil; endothelin

Since the discovery of endothelium-dependent vasodilatation by Furchgott and Zawadzki in 1980<sup>(1)</sup>, it has been recognized that the vascular endothelial cells play an important role in the regulation of vascular smooth muscle tension. In recent years it has been confirmed that in addition to endothelium derived relaxing factor, vascular endothelial cells produce a substance

Received 1989 Feb 29 Accepted 1989 May 17