

小鼠脑内乙酰胆碱、胆碱乙酰化酶、乙酰胆碱酯酶和 M 胆碱受体的昼夜变化

潘思源 (北京中医学院药理教研室, 北京 100029, 中国)

Circadian changes of acetylcholine, choline acetyltransferase, acetylcholinesterase and muscarinic receptors in mouse brain

PAN Si-Yuan (*Department of Pharmacology, Beijing College of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China*)

ABSTRACT By means of radioisotope, the daily changes of cholinergic nervous markers, acetylcholine (ACh), choline acetyltransferase (ChAT), acetylcholinesterase (AChE) and muscarinic receptors in the mouse brain were measured in September and October. The mice were housed 5 animals to a cage under natural light-dark cycle (12:12) for 7 d in the laboratory room at 18-22°C. The determinations of ACh were taken, every 2 h, to assess the brain ACh of 5 mice for 24 consecutive hours. M-cholinergic receptors, ^3H ChAT and AChE activity were examined at 10:00, 16:00 and 22:00. The results demonstrated that the ACh contents, ChAT activity and muscarinic receptor B_{max} value were high at 10:00, low at 16:00 and 22:00. However, AChE maximum activity was found at 16:00, minimum activity at 22:00. But the affinity of muscarinic receptors to [^3H]QNB did not show any significant daily changes. These data strongly suggested that in mouse brain the cholinergic nervous markers showed a clear daily rhythm.

KEY WORDS acetylcholine; choline acetyltransferase; acetylcholinesterase; muscarinic receptors; mice; brain; circadian rhythm

摘要 本文用放射性核素实验技术研究发现, 在正常生理条件下, 10:00 小鼠脑内 ACh 含量, ChAT 活性及 M 受体的 B_{max} 值最高, 16:00 和 22:00 较低。AChE 活性 16:00 最高, 22:00 最低。但是 M 受体的 K_D 值昼夜之间变化不大。本结果提示, 小鼠脑内 ACh 含量, ChAT 和 AChE 活性及 M 受体数, 呈现明显的昼夜节律。

关键词 乙酰胆碱; 胆碱乙酰化酶; 乙酰胆碱酯酶; 毒蕈碱受体; 昼夜节律; 小鼠; 脑

胆碱能神经是脑内主要的神经之一。对其研究主要是在药物, 或其它具有生物活性物质, 或在某些条件刺激的作用下, 观察脑内乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)含量, 胆碱乙酰化酶(choline acetyltransferase, ChAT)和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性, 以及胆碱能神经受体的变化⁽¹⁻⁷⁾。但是在正常生理条件下, 一天不同时间内小鼠脑中胆碱能神经递质, 酶和受体的变化如何? 作者未见文献报道。本文用放射性核素实验技术, 对白天和夜晚小鼠脑内 ACh 浓度, ChAT 和 AChE 活力及 M 受体 B_{max} 和 K_D 值进行了研究, 以观察小鼠脑内胆碱能神经的昼夜变化。

MATERIALS AND METHODS

昆明种小鼠, ♂, 体重 25.3 ± 2.5 g, 购于中医研究院动物房。小鼠至少在实验室内饲养 1 wk 后才进行放射性核素实验, 以使其适应环境。室温 18-22°C, 自然光照。实验在 9 和 10 月间进行。

ACh, ChAT, AChE 放射性核素测定试剂盒由军事医学科学院供给, 测 M 受体的放射性配体, 二苯羟乙酸奎宁酯([^3H]QNB, $251.4 \text{ TBq} \cdot \text{mol}^{-1}$)由中日友好医院临床研究所以生理室提供。

ACh 放射免疫测定⁽⁸⁾ 小鼠断头取脑(不包括小脑和脑干, 下同)后, 用 9.3 倍量的 HClO_4 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 冰浴匀浆, $8500 \times g$ 离心 3 min, 取上清液 $10 \mu\text{l}$ 进行 ACh 放免测定。标准管内分别加入氯化 ACh 160, 40, 10, 2.5 pmol。ACH 抗血清用磷酸缓冲液 50

Received 1990 Apr 9

Accepted 1991 Jan 17

mmol · L⁻¹, pH 7.4 1:500 稀释. 每个测定管用 500 μl, 最后加入 [³H]ACh 10 μl, 混匀后置于 -4℃ 15-20 h. 用直径 0.4 μm 的混合纤维素酯薄膜(上海新亚净化器件厂生产)抽滤, 80℃ 烘干, 置于 0.5% 甲苯-PPO 闪烁液中; 用 Beckman Ls 8501 液体闪烁计数器测放射性强度.

[³H]ACh 放射比活度为 73.63 TBq · mol⁻¹ 溶于 HCl 0.01 mol · L⁻¹, 使 10 μl 溶液的 dpm 数为 6600-8200.

脑组织中 ACh 含量的计算 根据液闪所获得的 dpm 数按下式计算:

$$B / B_0 = (B - NSB) \cdot (B_0 - NSB)^{-1}$$

$$X = \ln\left(\frac{B / B_0}{1 - B / B_0}\right); Y = \lg B_0(\text{ACh})$$

其中 B 为标准管或样品管, NSB 为非特异管(管内无 ACh 抗血清). B₀ 为零标准管, (ACh) 为标准管或样品管 ACh pmol. 标准管经直线回归处理, 求出 X 值和 Y 值. 将样品管 dpm 数计算成 X 值, 代入 Y = a + bX 式, 即得每 mg 脑组织湿重中所含的 ACh pmol 数.

ChAT 活性测定⁽⁹⁾ 小鼠断头取脑. 用 20 倍量的 Triton X-100 1% 冰浴匀浆. 20-50 min 后再用双倍量的磷酸缓冲液 0.2 mol · L⁻¹, pH 7.4 匀浆一次. 8500 × g 离心 3 min, 上清液用于 ChAT 活性测定. ChAT 活性测定的反应液为 30 μl(内含乙酰辅酶 A 0.27 mmol · L⁻¹, 胆碱 0.4 mmol · L⁻¹, 新斯的明 0.13 mmol · L⁻¹, EDTA 0.67 mmol · L⁻¹, 少量牛血清蛋白, 及上述脑组织提取液 10 μl), 于 37℃ 温育 10 min 后取出, 放入冰浴中立即加入 HClO₄ 0.2 mol · L⁻¹ 30 μl 使酶失活. 然后用上述放免测定法测定 ACh 的生成量. ChAT 活力以生成 ACh pmol · min⁻¹ · (mg 脑组织)⁻¹ 表示.

AChE 活性测定⁽¹⁰⁾ 脑组织称重后用样品提取液(内含 Triton X-100 1%, NaCl 0.45

mol · L⁻¹, MgCl₂ 0.01 mol · L⁻¹, 磷酸缓冲液 50 mmol · L⁻¹, pH 7.4) 冰浴匀浆, 离心, 上清液再用样品提取液 1:1000 稀释, 取稀释液 20 μl 加入 [³H]ACh 17.7 nmol, 37℃ 水浴 20 min, 取出后加入酶终止反应液(内有氯乙酸 1 mol · L⁻¹, NaOH 0.05 mol · L⁻¹, NaCl 2 mol · L⁻¹). 然后用 5 mm × 25 mm 的四九滤纸条吸干反应液, 投入 0.5% 甲苯-PPO 闪烁液中, 在室温下放置 15 h 后进行闪烁计数. 无酶管不加入脑组织提取液, 完全水解管是在反应液中加入 NaOH 2 mol · L⁻¹ 使底物彻底水解.

AChE 活力计算 把上述完全水解管和样品管所测的 dpm 数扣除无酶管的 dpm 数, 并按下式求出 AChE 活性, 以 nmol · min⁻¹ · (mg 脑)⁻¹ 表示.

$$\text{AChE} = (17.7 \text{ nmol} \times \text{样品 dpm}) / (\text{脑重 mg} \times \text{min} \times \text{完全水解 dpm})$$

M 胆碱受体的制备 小鼠取脑后用于冷的蔗糖 0.32 mol · L⁻¹, 1:20 匀浆, 4℃, 2000 × g 离心 10 min. 取上清液 45000 × g 离心 10 min, 沉淀用 Tris 缓冲液 50 mmol · L⁻¹ 洗涤离心一次, 速度和时间同前. 最后沉淀按 5 ml / g 脑组织加 Tris 缓冲液制成膜蛋白. -20℃ 备用. 膜制备中的蛋白质含量用比色法⁽¹¹⁾测定.

M 受体饱和实验 总反应管非特异管中均加入不同浓度(0.03-2 nmol) 的 [³H]QNB, 及上述制备的膜蛋白 100-150 μg. 非特异管中另加入阿托品 0.5 μmol · L⁻¹. 反应液为 200 μl 的磷酸(Na₂HPO₄, KH₂PO₄)缓冲液 50 mmol · L⁻¹, pH 7.4, 37℃ 温育 15 min, 用冷缓冲液终止反应. 反应液用上海虹光造纸厂生产的 49 型滤纸真空抽滤, 80℃ 烘干, 置甲苯-PPO 闪烁液中测放射性. 用总反应管中的 dpm 数减去非特异管中的 dpm 数, 并通过 Scatchard 作图求出 [³H]QNB 对 M 受体特异性结合的 B_{max} 数及其平衡解离常数 K_D 值.

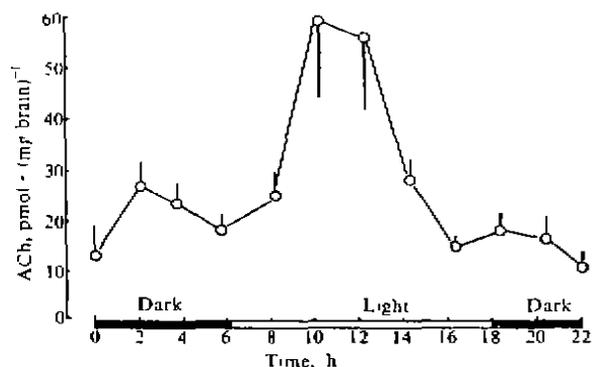


Fig 1. Daily changes of acetylcholine content in mouse brain. $n=5$, $\bar{x} \pm SD$.

RESULTS

ACh 含量 实验于 10:00 开始, 用放免方法每 2 h 测定 5 只小鼠脑内 ACh 含量, 连续 24 h. 结果(Fig 1)发现, 上午小鼠脑中 ACh 含量较高, 其中 10:00 为最高. 下午及夜间 ACh 浓度较低, 最低的时间是 22:00, 高低之间差异非常显著($P < 0.01$).

ChAT 活性 取小鼠脑内 ACh 含量变化较大的 10:00, 16:00 和 22:00 测其脑内 ChAT 活性的昼夜变化, 每个时间用 10 只小鼠. 结果(Tab 1)表明, 这 3 个时间内小鼠脑中 ChAT 活性与同时间的 ACh 含量多少相一致, 活性最高的是 10:00, 最低的是 22:00, 16:00 介于中间. 10:00 与 22:00 相比 ChAT 活性差异非常显著($P < 0.01$), 但与 16:00 相比 $P > 0.05$.

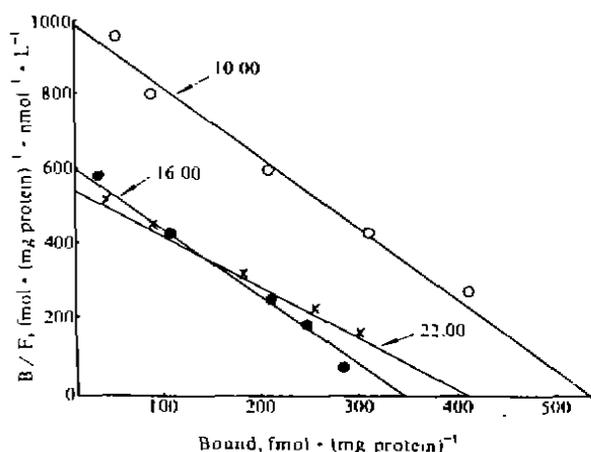


Fig 2. Scatchard plot of $[^3H]QNB$ specific binding of muscarinic receptors in mouse brain.

AChE 活性 小鼠脑内 AChE 活性测定的时间同 ChAT. 结果(Tab 1)显示, AChE 活性以 16:00 为最高, 其次是 10:00, 22:00 活性最低. 16:00 的 AChE 活性与 22:00 相比 $P < 0.01$, 但与 10:00 相比 $P > 0.05$.

M 胆碱受体 选择时间与测 ChAT 和 AChE 活性的时间完全相同, 结果(Tab 1, Fig 2)表明, 小鼠脑内 M 胆碱受体的最大密度是 10:00, 其次是 16:00 和 22:00. 高低之间差异非常显著($P < 0.01$). 但这 3 个时间内 M 受体的解离常数 K_D 值则差异不大 ($P > 0.05$).

Tab 1. Concentrations of acetylcholine, activity of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase, muscarinic receptors in mouse brain at various times. $n=10$, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$ vs 10:00. * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$ vs 22:00.

| Times | ACh $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ brain | ChAT $\text{pmol ACh} \cdot \text{min}^{-1} \cdot$ $(\text{mg brain})^{-1}$ | AChE $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot$ $(\text{mg brain})^{-1}$ | Muscarinic receptors | |
|-------|--|---|---|---|---|
| | | | | B_{max} ($\text{fmol} \cdot (\text{mg protein})^{-1}$) | K_D ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) |
| 10:00 | 55 ± 18 | 155 ± 35 | 10 ± 8 | 539 ± 39 | 0.63 ± 0.25 |
| 16:00 | $14.9 \pm 1.7^{***}$ | $112 \pm 27^{**}$ | $17 \pm 6^{***}$ | $356 \pm 26^{***}$ | $0.6 \pm 0.5^{**}$ |
| 22:00 | $10.5 \pm 2.2^{***}$ | $94 \pm 17^{**}$ | $6 \pm 5^*$ | $403 \pm 61^{***}$ | $0.75 \pm 0.19^*$ |

DISCUSSION

实验时所测小鼠脑内 ACh 含量的多少, 受其合成、释放和水解速度的影响。ACh 合成速度取决于底物胆碱和乙酰辅酶 A 的浓度及 ChAT 活性。ACh 水解速度主要决定于 AChE 活性的大小。在正常生理条件下, ACh 的释放主要与行为活动及脑机能状态有关。文献⁽¹²⁾报道, 猫在清醒和快波睡眠时, 皮层处的 ACh 释放比慢波睡眠时增加。本文发现, 小鼠夜间脑中 ACh 浓度较低, 这可能与夜间活动较多, ACh 释放增加有关。下午小鼠脑中低 ACh 水平可能与其 AChE 活性高有关。

当受体被激动剂作用后, 可以从细胞膜的外表面内移入细胞内, 然后水解。结果膜表面的受体密度下降, 有研究⁽¹³⁾发现, 当大鼠脑皮层细胞与 M 受体激动剂一道培育时, 30 min 后^[3H]标记的 N-甲基东莨菪碱的结合部位减少。本结果显示小鼠脑内 M 受体的 B_{max} 值与其 ACh 含量多少相一致, 这可能与 ACh 释放减少时, 脑中含量增加, 受体通过向上调节作用使其数目增多。相反, 当 ACh 释放增加时, 脑中含量减少, 受体通过向下调节作用, 使其膜表面的密度下降。

由于条件所限, 本实验未能严格的控制小鼠光照时间, 光照强度, 及室内温度和湿度的恒定。因此不能排除昼夜温度差对结果的影响。但这与实际情况比较相接近, 因为人或动物不可能生活在一个外界温度绝对恒定的环境中。

REFERENCE

1 Dolezal V, Tucek S. Effects of choline and glucose on atropine-induced alterations of acetylcholine synthesis and content in the caudate

nuclei of rats. *Brain Res* 1982; 240: 285

2 Wecker L, Schmidt DE. Neuropharmacological consequences of choline administration. *Brain Res* 1980; 184: 234

3 Bianchi C, Siniscalchi A, Beani L. Serotonergic modulation of cortical acetylcholine in the guinea-pig. *Neurosci Lett* 1988; (Suppl 33): S 22

4 Westlind A, Grynfarb M, Hedlund B, Bartfai T, Fuxe K. Muscarinic supersensitivity induced by septal lesion or chronic atropine treatment. *Brain Res* 1981; 225: 131

5 Smith CJ, Court JA, Keith AB, Perry EK. Increases in muscarinic stimulated hydrolysis of inositol phospholipids in rat hippocampus following cholinergic deafferentation are not paralleled by alterations in cholinergic receptor density. *Brain Res* 1989; 485: 317

6 Kiss J, McGovern J, Patel AJ. Immunohistochemical localization of cells containing nerve growth factor receptors in the different regions of the adult rat forebrain. *Neuroscience* 1988; 27: 731

7 Richter D, Crossland J. Variation in acetylcholine content of the brain with physiological state. *Am J Physiol* 1949; 159: 247

8 Bao ZQ, Ling SG, Liu FM, Wang GY, Li L. Radioimmunoassay for acetylcholine. *Acta Pharmacol Sin* 1982; 3: 166

9 Ling SG, Bao ZQ, Li L, Wang GY. Radioimmunoassay for choline acetyltransferase. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5: 73

10 Ling SG, Wang GY, Li L, Bao ZQ. Radiochemical determination for cholinesterase. *Bull Acad Milit Med Sci* 1984; 2: 22

11 Lowry OH, Roseborough NJ, Faar Al, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265

12 Jasper HH, Tessier J. Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. *Science* 1971; 172: 601

13 Eva C, Gamalero SR, Genazzani E, Costa E. Regulation of brain muscarinic receptors in primary cultures of cortical cells. *Neurosci Lett* 1988; (Suppl 33): S 80