

吗啡类药物对大鼠脑内毒蕈碱样胆碱受体亲和力的影响

陆利* 汤健 韩济生 (北京医学院生理教研室, 北京 100083)

提要 应用放射受体分析法研究了啡类药物对中枢毒蕈碱样受体亲和力的影响。结果表明, 芬太尼、吗啡、麦佩里丁、镇痛新等啡类药物能降低中枢毒蕈碱样胆碱受体对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 的亲和力, 但不改变受体的总碱数。阿片拮抗剂纳洛酮和部分拮抗剂烯丙吗啡、buprenorphine 等则无明显影响。

关键词 毒蕈碱样胆碱受体; $[^3\text{H}]$ 二苯羟乙酸奎宁酯; 吗啡; 芬太尼; 麦佩里丁; 镇痛新; 纳洛酮; 烯丙吗啡

某些神经原能合成、贮存和释放影响突触传递的活性物质, 一种是经典的神经递质, 另一则为“辅递质”, 后者能调制与其共存的主递质的功能。例如, 用肾上腺髓质嗜铬细胞研究证明^(1,2), 阿片肽与乙酰胆碱(ACh)共存于内脏大神经末梢内, 阿片肽作为辅递质调节突触后膜上N-胆碱受体的数量, 从而调制ACh所携带的原始信息的传递。

阿片肽与ACh广布于中枢神经系统内, 阿片肽是否也可作为辅递质调节中枢M-胆碱受体的数量和亲和力, 从而调制中枢ACh的功能, 这一问题迄今未见报道。我们参照文献方法⁽³⁾, 应用 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 体外放射受体分析法, 观察了某些阿片类物质对中枢M-胆碱受体亲和力与受体数目的影响。

方 法

大鼠体重 $200 \pm (\text{SD}) 10 \text{ g}$ 迅速断头取脑, 剔除小脑, 称重后加入 0.32 M 蔗糖液(1:10 w/v), 于冰浴中用玻璃匀浆器制备匀浆, -4°C 离心($1000 \times g$, 15 min), 取上清液再离心($48000 \times g$, 45 min), 沉淀加入pH 7.4, 0.05 M tris-HCl 缓冲液(1:5 v/v), 在冰浴中搅拌2 min, 再离心($20000 \times g$, 30 min), 取沉淀加入适量 tris-HCl 缓冲液以制备受体蛋白悬液, 用Lowry法测定蛋白质含量, 用上述缓冲液调至 15 mg/ml , 贮于 -20°C 备用。

1981年11月5日收稿 1982年12月8日修回

* 新疆医学院生理教研室

Tab 1. Sequence and amounts (μl) of solutions added.

	$[^3\text{H}]\text{QNB}$	Atropine 0.6 mM	Morphine	Tris-HCl buffer pH 7.4, 0.05 M	Receptor protein
Blank	20	/	/	80	200
Carrier	20	50	/	30	200
Sample	20	/	50	30	200

加样后于 25°C 温育 1 h, 加入 1 ml 冰冷 tris-HCl 缓冲液立即离心 ($4000 \times g$, 4 min), 沉淀再加入冰冷 tris-HCl 缓冲液, 经磁力搅拌后再离心, 倾去上清液以清除未被结合的 $[^3\text{H}]\text{QNB}$, 沉淀中加入 0.1 ml 浓甲酸消化受体蛋白, 最后取 200 μl 消化液放入 5 ml 闪烁液计数。计数效率为 16%。

空白管相当于总结合量, 载体管为非特异结合量, 二管计数之差即为特异结合量。特异结合与非特异结合之比一般为 5:1。

$$\text{受体蛋白特异结合抑制率} = \frac{\text{空白管} - \text{样品管}}{\text{空白管} - \text{载体管}} \times 100\%$$

实验数据按 Scatchard 方程作图, 计算 K_D 值和最大结合量。

$[^3\text{H}]\text{QNB}$ 系英国 Amersham 放化中心产品, 放射比度为 12 Ci/mmol。

结 果

吗啡对 M-胆碱受体亲和力和最大结合量的影响 用 tris-HCl 缓冲液将 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 稀释

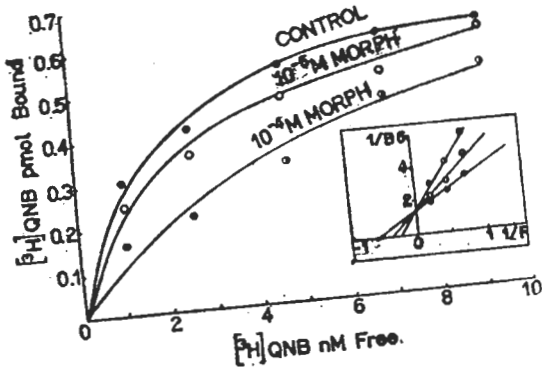


Fig 1. Binding of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ with M-cholinergic receptors. Inset is the double reciprocal plot of the same data.

成不同浓度, 使之与同一浓度 (1 mg/0.2 ml) 受体蛋白进行反应, 以此作为对照。实验管中加吗啡, 使其终浓度为 100 μM 或 10 μM , 观察结合反应有无变化。结果见图 1。

从图 1 可见, $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 与 M-胆碱受体的特异结合随 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 浓度的增加而增长, 当 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 浓度为 7 nM 时, 结合反应接近饱和。加入终浓度为 100 μM 吗啡后, 特异结合量减少。当 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 的浓度为 2.36, 4.67 nM 时, 其特异结合量与对照组相比明显降低 ($P < 0.01$)。终浓度为 10 μM 的吗啡使结合曲线下移, 但各点与对照组相比差异不显著。

将 7 次实验 272 批数据经 Scatchard 分析结果见图 2。

从图 2 可见, 3 条回归线的斜率不同, 但其延长线均交聚于 X 轴的一点上。这说明加入吗啡后 M-胆碱受体的亲和力降低, 而受体的数量 $[R_0]$ 却没有变化。其 K_D 值对照组为 1.92 nM, 加入终浓度为 10 μM 和 100 μM 吗啡后, 增至 2.78 和 4.17 nM。

几种吗啡类药物对 M-胆碱受体亲和力的影响 为了检验上述效应是否为吗啡类药物所

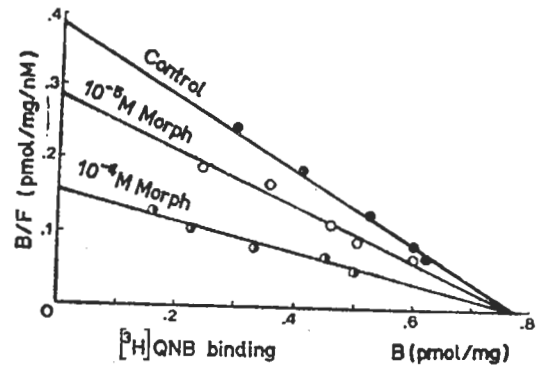


Fig 2. Scatchard analysis of the data in Fig 1.

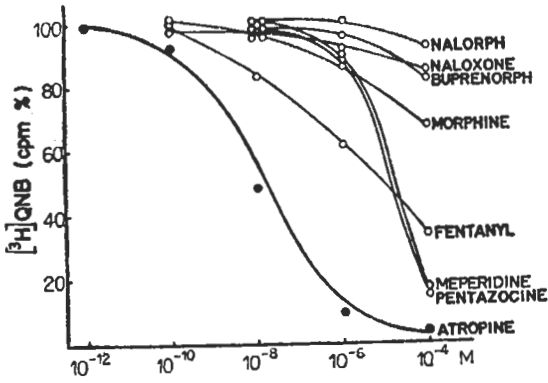


Fig 3. Effect of morphine analogues on $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding

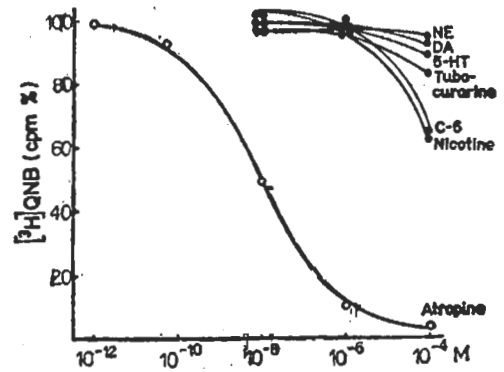


Fig 4. Effects of N-cholinoceptor agonists and antagonists and monoamines on $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding

共有, 选用芬太尼 (fentanyl)、麦佩里丁 (meperidine)、镇痛新 (pentazocine)、buprenorphine、纳洛酮 (naloxone)、烯丙吗啡 (nalorphine), 观察其对 M-胆碱受体亲和力的影响, 并与阿托品的效应相比较。结果见图 3。

从图 3 可见, 阿片受体激动剂均可抑制 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 与 M-胆碱受体的结合, 使受体亲和力降低。其中以芬太尼抑制作用最强, 在 10 nM 时即有抑制作用; 吗啡在 1 μM 时有一定的抑制作用, 镇痛新与麦佩里丁到 100 μM 时抑制作用明显。阿片受体阻断剂纳洛酮和部分阻断剂纳洛芬、buprenorphine 均无明显的抑制效应。

非吗啡类药物对 M-胆碱受体亲和力的影响 用 N-胆碱受体激动剂尼古丁 (nicotine) 和颉抗剂六烃季铵 (hexamethonium, C6), 筒箭毒碱 (tubocurarine) 以及单胺类物质去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT), 观察其对 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 与 M-胆碱受体结合反应的影响, 结果见图 4。

从图 4 可见, N-胆碱受体激动剂尼古丁和神经节型 N-胆碱受体阻断剂六烃季铵到 100 μM 时对 M-胆碱受体与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 的结合有轻度的抑制作用, 而神经-肌接点型 N-受体阻断剂筒箭毒碱以及单胺类物质 NE, DA, 5-HT 等均未见有明显的抑制作用。

讨 论

实验结果表明, 鼠脑 M-胆碱受体与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 的特异性结合可被阿片受体激动剂不同程度地抑制, 这种抑制是通过降低 M-胆碱受体的亲和力而实现的, 因此属于竞争性抑制; 与此同时, M-胆碱受体与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 的最大结合量并无明显变化, 说明受体的总数没有显著改变。在同样的浓度下, 纳洛酮等阿片受体阻断剂对于 M-受体结合力并无显著影响。非吗啡类药物, 包括作用于 N-受体的激动剂和颉顽剂以及 NE、DA、5-HT 等单胺类物质对 M-胆碱受体与 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 的结合均无明显的干扰作用。这表明吗啡类药物降低 M-胆碱受体亲和力的效应具有一定的特异性。

吗啡 1-100 μM 使肾上腺髓质嗜铬细胞上烟碱样胆碱受体的数目减少而亲和力不变, 说明是通过“非竞争性结合”机制起作用⁽¹⁾。故吗啡对于 M-和 N-两种胆碱受体分别产生不同的影响。

除吗啡类药物外, 已知三环药物 imitriptyline 也是中枢 M-胆碱受体有效的阻断剂。 $[^3\text{H}]\text{imitriptyline}$ 能与中枢 M-胆碱受体产生特异结合, 也能竞争性抑制中枢 M-受体阻断剂与受体的结合⁽⁴⁻⁶⁾。此外 P 物质也有阻断胆碱受体的作用^(7,8)。这些现象的陆续发现为阐明 ACh 受体的作用机理提供了线索。

上述实验是在体外进行的,所用的均为外源性的吗啡类药物,应用的浓度也较高。在体内,内源性阿片样物质(内啡素)是否能在生理浓度下发生类似的作用?值得加以研究。免疫组化研究证明脑啡肽广泛分布于大鼠的自主神经系统内⁽⁸⁾,在植物性神经节前纤维的末梢中有ACh与内啡素共存⁽⁹⁾。豚鼠Corti氏器中的胆碱能神经末梢可同时释放ACh与脑啡肽⁽¹⁰⁾。这些资料为内啡素和ACh在功能上的相互作用提供了形态学依据。

吗啡或内啡素与ACh受体相互作用的原理可能是多种多样的。上述两项初步研究结果即减少N-受体数目⁽¹⁾和降低M-受体亲和力(本文),也许可作为今后进一步研究的两条线索。

Acta Pharmacologica Sinica 1983 Sep; 4 (3) : 149-152

EFFECTS OF MORPHINE AND ITS ANALOGUES ON M-CHOLINOCEPTOR BINDING AFFINITY IN RAT BRAIN

LU Li, TANG Jian, HAN Ji-sheng

(Department of Physiology, Beijing Medical College, Beijing 100083)

ABSTRACT The effects of morphine and its analogues (fentanyl, pentazocine, meperidine, buprenorphine, naloxone and nalorphine) on [³H]QNB binding to muscarinic cholinceptors of the rat brain was studied *in vitro*.

Scatchard analysis revealed that the affinity of the binding was dose-dependently inhibited by morphine 10-100 μM without significant effect on the total number of the binding sites. Fentanyl was more potent than morphine in blocking [³H]QNB binding while naloxone, nalorphine and buprenorphine were

- ### 参 考 文 献
- 1 Kumakura K, Karoum F, Guidotti A, Costa E. *Nature* 1980 Jan 31; 283 (5746):489
 - 2 Costa E. *Prog Physiol Sci* 1981 Jul; 12 (3): 284
 - 3 Yamamura HI, Snyder SH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 May; 71(5): 1725
 - 4 Rehavi M, Ramot O, Yavetz B, Sokolovsky M. *Brain Res* 1978 Aug 4; 194(2):443
 - 5 Raisman R, Briley M, Langer SZ. *Nature* 1979 Sep 13; 281(5727): 148
 - 6 Golds PR, Przyslo FR, Strange PG. *Br J Pharmacol* 1980 Mar; 68(3): 541
 - 7 Mizobe F, Kozousek V, Dean DM, Livett BG. *Brain Res* 1979 Dec 14; 178(2-3): 555
 - 8 Hokfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M. *Nature* 1980 Apr 10; 284 (5756): 515
 - 9 Glazer EJ, Basbaum AI. *Science* 1980 Jun 27; 208 (4451): 1479
 - 10 Fex J, Altschuler RA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 Feb; 78(2): 1255

ineffective. Neither nicotinic cholinceptor agonist and antagonists nor the putative monoamine neurotransmitters exhibited any significant effects.

The functional relevance of the effect of morphine and possibly endogenous opioids on the activities of cholinceptors *in vivo* was discussed.

KEY WORDS M-cholinceptor; [³H]QNB; morphine; fentanyl; meperidine; pentazocine; naloxone; nalorphine