

猪冠状动脉上的苯环利定受体<sup>1</sup>

R 965.2

石刚刚、许绍芬 (上海医科大学神经生物学教研室, 上海 200032, 中国)

Phencyclidine receptors in porcine coronary artery<sup>1</sup>

SHI Gang-Gang, XU Shao-Fen (Department of Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

**ABSTRACT** By using radioligand assay, there was a phencyclidine (Phe) binding site in porcine coronary artery. This binding was specific, reversible, saturable, and stereoselective. The Scatchard analysis showed that the binding site was a single class, with dissociation constant ( $K_d$ ) and maximum binding ( $B_{max}$ ) of  $27.7 \pm 6.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $0.82 \pm 0.15 \text{ pmol/mg protein}$ , respectively. The displacement experiments revealed that the [<sup>3</sup>H]Phe binding was displaced by nonradioactive Phe, TCP (Phe receptor agonists), and dextrophan (its antagonist). d-INN, a ligand of sigma receptor, had a weaker activity of displacement. These showed a dose-dependent manner. Both etorphine, an agonist of opioid receptor, and *N*-methyl-*D*-aspartic acid (NMDA), an excitatory amino acid, failed to displace the binding. These results suggest that the Phe receptors exist in the porcine coronary artery.

**KEY WORDS** phencyclidine; drug receptors; coronary vessels; radioligand assay

**摘要** 本文采用放射受体结合法研究猪冠状动脉上的苯环利定(Phe)受体, 发现猪冠状动脉上存在 Phe 特异结合部位, Scatchard 分析表明, 结合呈单位点,  $K_d$  为  $27.7 \pm 6.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $B_{max}$  为  $0.82 \pm 0.15 \text{ pmol/mg protein}$ . 取代实验表明 Phe 及 TCP, dextrophan 和 sigma 受体配基 d-INN 均有取代作用, 两类药物取代作用呈量-效关系, 本实验结果提示猪冠状动脉上存在的特异结合位点是 Phe 受体.

Received 1991-01-08

Accepted 1992-07-21

<sup>1</sup> Project supported by the Fund of the Ministry of Health of China (No 0758112) and the Science Fund for Doctor program from State Education Commission of China (No 90-41).

**关键词** 苯环利定; 药物受体; 冠状血管; 放射配位体测定

动物的心房<sup>(1)</sup>、心室<sup>(2)</sup>、兔耳血管<sup>(3)</sup>及肠系膜血管上<sup>(4)</sup>有 Phe 受体, 并参与心血管功能的调节. Phe 促进脑内单胺类递质的释放<sup>(5)</sup>并抑制其重摄取<sup>(6)</sup>, 与脑缺血等疾病有关<sup>(7)</sup>. 冠状动脉上是否也存在 Phe 受体, Phe 对冠脉功能有无调节作用, 至今未见文献报道. 本文研究猪冠状动脉上的 Phe 受体, 为其功能找到受体基础.

## MATERIALS AND METHODS

[<sup>3</sup>H]Phencyclidine ( $0.91 \text{ TBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ), 放射纯度 >95%, 上海医科大学放射药理学教研室提供; Phe, etorphine 由上海医科大学药学院合成; *N*-(1-2-thienyl cyclohexyl)-3,4-piperidine (TCP), 军事医学科学院赠; *N*-allylnormetazocine (INN)由美国 NIDA 的 Dr Richard L HANKS 赠; dextrophan, 美国 Prof Avram GOLDSTEIN 赠; *N*-methyl-*D*-aspartic acid (NMDA), 美国 Du Pont 公司惠赠.

新鲜的猪冠状动脉取自上海龙华肉联加工厂. XHF-1 高速分散器由上海兴华电子仪器厂生产.

**猪冠状动脉匀浆蛋白的制备** Tris  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  缓冲液 (pH 7.4, 4℃) 中分离猪冠状动脉左降支 6.5 cm, 右支第一分支处开始分离 8 cm, 去掉血管周围结缔组织及脂肪, 洗去血液, 剪碎, 在玻璃匀浆管内匀浆 5 min, 然后在高速分散器上捣碎 10 000 rpm 1 min, 匀浆液离心  $30\,000 \times g$  反复 3 次, 测定沉淀层蛋白含量.

**匀浆蛋白的饱和分析及 Scatchard<sup>(8)</sup>分析** 用 [<sup>3</sup>H]Phe 和冠状动脉匀浆蛋白进行反应, 反应分总结合管(TB)和非特异结合管(NSB), TB 管加入 [<sup>3</sup>H]Phe, 匀浆蛋白, NSB 管还须加入  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的非标记

Phe. 反应容量为 0.5 ml, 投料在冰浴中进行. 反应管在 4°C 放 1 h. 用 GF/C 玻璃纤维滤膜过滤反应液, 用冰冷缓冲液快速冲洗滤膜 3 次, 每次 5 ml. GF/C 滤膜使用前先浸入含 0.01% polyethylenimine 缓冲液内 2 h, 以减少滤膜自身吸附. 滤膜用红外线烘干, 在液体闪烁计数器(LKB 公司生产)上计数. 根据实验要求, 匀浆蛋白和  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  投料如下:

采用匀浆蛋白 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45, 0.6 mg 与  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  20 nmol · L<sup>-1</sup> 进行反应.

采用 0.25 mg 的匀浆蛋白与  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  3, 6, 19, 38, 51, 76, 126, 152 nmol · L<sup>-1</sup> 进行反应.

**$[^3\text{H}]\text{Phe}$  结合竞争性抑制反应** 采用 0.25 mg 匀浆蛋白和  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  20 nmol · L<sup>-1</sup> 作结合反应, 用 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100 μmol · L<sup>-1</sup> 的 Phe, TCP, dextrophan, *d*-, *l*-INN etorphine 和 NMDA 取代这种结合, 计算各药物的抑制%, 求出抑制特异结合达 50% 时所需浓度(IC<sub>50</sub>).

**RESULTS**

**匀浆蛋白饱和分析** 用  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  20 nmol · L<sup>-1</sup> 与猪冠状动脉匀浆蛋白作特异结合, 在 0.1-0.4 mg 范围内, 结合随蛋白浓度增加而增加, 达 0.5 mg 时呈饱和状态. 在 0.25 mg 蛋白处有较大的 SB/NSB 比值 (2.2 : 1), 故在本文 Scatchard 分析及取代反应中均采用 0.25 mg 匀浆蛋白.

**Scatchard 分析** 特异结合随  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  浓度增大而增加, 到达 150 nmol · L<sup>-1</sup> 时, 呈饱和趋势(*n*=3) (Fig 1), 说明  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  结合反应具有饱和性. 根据 Scatchard 分析,  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  和匀浆蛋白的特异结合是单一位点, 计算机处理数据, 求得解离常数(*K<sub>d</sub>*)和最大结合量(*B<sub>max</sub>*)分别为 27.7 ± 6.9 nmol · L<sup>-1</sup> (*n*=3) 0.82 ± 0.15 pmol / mg protein (*n*=3).

**$[^3\text{H}]\text{Phe}$  与受体结合的竞争性抑制** 几种配基均可取代  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  的特异结合, 从取代强度看, 以 Phe 配基 Phe, TCP, dextrophan

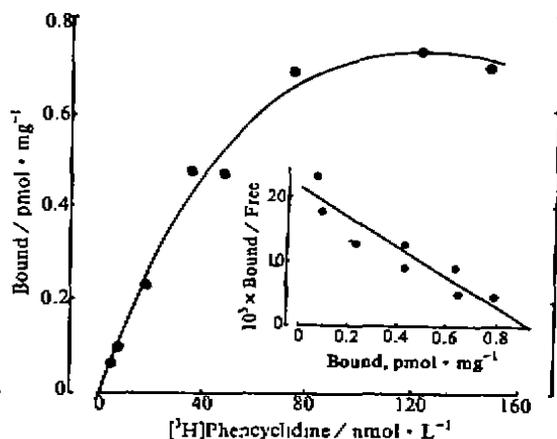


Fig 1. Saturation of the specific binding of  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  to porcine coronary artery. (Inset) Scatchard analysis.

较强, 而 sigma 受体配基 INN 较弱, 其中右旋体的取代作用强于左旋体, 左旋体取代作用极弱. NMDA 和 etorphine 几无取代作用 (Tab 1).

Tab 1. Potencies of unlabeled ligands in inhibition of  $[^3\text{H}]\text{Phencyclidine}$  binding.

Drugs	<i>n</i>	IC <sub>50</sub> / μmol · L <sup>-1</sup>	Relative potency
Phencyclidine	3	0.34 ± 0.20	1.00
TCP	3	0.56 ± 0.43	0.61
Dextrophan	3	4.03 ± 1.05	0.08
<i>d</i> -INN	3	5.78 ± 2.71	0.06
<i>l</i> -INH	3	15.99 ± 5.54	0.02
Etorphine	3	> 100	-
NMDA	3	> 100	-

**DISCUSSION**

本实验中  $[^3\text{H}]\text{Phe}$  与冠状动脉匀浆蛋白的结合具有饱和性, 一系列受体配基竞争取代实验表明这一结合是特异的, 可逆的. INN 的取代作用说明了该结合的立体专一性, 由此证明该结合具有受体结合的特点, 即特异性.

饱和性、可逆性和立体专一性,提示猪冠状动脉上存在的 Phe 结合位点为 Phe 受体。

目前认为 Phe 和 sigma 受体不是同一受体,各自有自己的特异激动剂<sup>(11)</sup>,取代实验中发现 Phe 受体特异配基和 sigma 受体配基均可以取代 Phe 的结合,提示 Phe 和 sigma 受体可能有部分重叠,这与其它部位血管报道<sup>(7)</sup>一致 INN 右旋体亲和力大于左旋体,这一特点为 Phe 类工具药及高效,高选择性拮抗剂提供了信息。

有报道认为 NMDA 受体与 Phe 受体密切相关,在 NMDA 受体复合物的离子通道上有 Phe 及同类物结合位点, Phe 是 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂<sup>(12)</sup>。这种与 NMDA 受体复合物偶联的为 Phe<sub>1</sub> 受体,无偶联关系的为 Phe<sub>2</sub> 受体<sup>(13)</sup>。本实验中 NMDA 不能取代 Phe 的结合,提示在猪冠状动脉上的 Phe 受体可能不是 Phe<sub>1</sub> 受体。

Phe 使单胺类递质释放增加,又使细胞外 Ca<sup>2+</sup>内流增加,提示 Phe 可能对冠脉舒缩有调控作用。本文为其作用找到了受体基础。

#### REFERENCES

- Huang LY, Xu SF. Existence of phencyclidine receptor in guinea pig atria. *Acta Physiol Sin* 1990; 42: 53-60.
- Temma K, Akera T, Ng YC. Cardiac actions of phencyclidine in isolated guinea pig and rat heart: Possible involvement of slow channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7: 297-306.
- Zhu H, Zhang AZ, Zhang LM, Xu XR, Le WL. Phencyclidine receptor in blood vessels. *Chin J Physiol Sci* 1986; 2: 47-54.
- Sun FY, Li KY, Zhang LM, Lu YQ, Zhang AZ. Autoradiographic study on etorphine and phencyclidine specific binding sites in rabbit mesenteric artery. *Acta Pharmacol Sin* 1980; 10: 298-301.
- Hitzemann RJ, Lon HH, Lomino EF. Effect of phencyclidine on the accumulation of <sup>14</sup>C-Catecholamines from <sup>14</sup>C-Tyrosine. *Arch Int Pharmacodyn* 1973; 202: 252-8.
- Smit RC, Meltzer HY, Arora RC, Davis JM. Effects of phencyclidine on [<sup>3</sup>H]catecholamine and [<sup>3</sup>H]serotonin uptake in synaptosomal preparations from rat brain. *Biochem Pharmacol* 1977; 26: 1435-37.
- Lu YF, Sun FY, Zhang LM, Zhang AZ. Phencyclidine receptors in porcine cerebral arteries. *Acta Pharmacol Sin* 1980; 10: 508-11.
- Klotz IM, Hunston DL. Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites. *Biochemistry* 1971; 10: 3065-9.
- Massamiri T, Duckles SP. Multiple vascular effects of sigma and Phe ligands: inhibition of amine uptake and contractile responses. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 124-9.
- Loo PA, Braunwalder AF, Williams M, Sills MA. The novel anticonvulsant MK-801 interacts with central phencyclidine recognition sites in rat brain. *Eur J Pharmacol* 1987; 135: 261-3.
- Quirion R, Chicheportiche R, Contrevas PC, Johnson KM, Lodge D, Tam SW, et al. Classification and nomenclature of phencyclidine and sigma receptor sites. *Trends Neurosci* 1987; 10: 444-6.

## 2nd International Symposium on Ionic Channels and Calcium Antagonists

1993 Nov 9-12

Guangzhou, China

Please contact Dr CHEN Yi-Yue, Department of Pharmacology,  
Guangdong Medical and Pharmaceutical College,  
Guangzhou 510224, China  
Telephone: 86-20-442-9040, Ext 274