

190-192

(27)

# 山莨菪碱对乙酰胆碱受体通道的阻断作用<sup>1</sup>

R 972

赵春林, Stoop RON<sup>2</sup>, 刘传绩<sup>3</sup>, 何湘平<sup>3</sup>, 谢佐平 (清华大学生物科学与技术系, 北京 100084, 中国)

## Blocking effect of anisodamine on acetylcholine receptor channels<sup>1</sup>

ZHAO Chun-Lin, Stoop RON<sup>2</sup>, LIU Chuan-Gui<sup>3</sup>, HE Xiang-Ping<sup>3</sup>, XIE Zuo-Ping (Department of Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**ABSTRACT** Anisodamine, an analog of atropine, was isolated first in China. Patch-clamp technique was used to study the inhibitory effect of anisodamine (Ani) on acetylcholine receptor on the membrane of muscle innervated by neuron. Neural tube in embryo of *Xenopus laevis* were cultured. By whole-cell clamp and outside-out patch, we found that the inhibitory effect of Ani was obvious on both miniature end-plate currents (MEPC) and single channel. This effect was reversible and the minimal concentration for complete inhibition was  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , vs 1 and  $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  for atropine and scopolamine, respectively. Our results indicate that Ani blocks both M-ACh and N-ACh receptors.

**KEY WORDS** atropine; atropine derivatives; scopolamine; *Xenopus laevis*; microelectrodes; electrophysiology; cholinergic receptors

**摘要** 在非洲爪蟾胚胎神经和肌肉培养细胞上, 用膜片钳技术研究了盐酸山莨菪碱(Ani)对乙酰胆碱(ACh)受体通道的作用, 发现它在微终板电流和单通道水平上都有明显的可逆性阻断作用, 完全阻断神经肌肉接点传递的剂量为  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而阿托品和东莨菪碱所需剂量分别为 1 和  $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 表明 Ani 有较强的抗 N 型 ACh 的作用。

Received 1991-02-26

Accepted 1992-08-19

<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China. No 38970302.

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Columbia University, New York NY 10027, U.S.A.

<sup>3</sup> Department of Neuropharmacology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China.

**关键词** 阿托品; 阿托品衍生物; 东莨菪碱; 非洲爪蟾; 微电极; 电生理学; 胆碱受体

山莨菪碱(anisodamine, Ani)系我国首先从茄科

植物唐古特莨菪(*Amisodus tanguticus*)分离的生物碱。常用抢救有机磷中毒, 感染中毒性休克, 眩晕病及血管疾患, 有调节微循环, 扩张小血管, 缓解平滑肌痉挛及镇痛作用, 功能与阿托品相似而较弱, 仅为阿托品和东莨菪碱效力的 5-10%<sup>[1,2]</sup>。由于 Ani 对消化道的腹部神经节主要是毒蕈碱型乙酰胆碱(M-ACh)受体的作用非常明显, 大多数人认为 Ani 的作用是抑制 M-ACh 受体, 常常将其与阿托品、东莨菪碱同列为 M-ACh 受体阻断剂。

近期发明的斑片钳技术能直接观察“可兴奋细胞”生物电活动相关的基本单元—离子单通道动力学特征及其影响因素, 本文利用这种技术研究 Ani 对于神经肌肉接点中的 ACh 受体通道作用。

## MATERIALS AND METHODS

盐酸 Ani 系苏州长征制药厂产品。

### 细胞培养技术

**1 采卵** 将分别注射过绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropins)的<sup>+</sup>非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)各一只放在暗处, 使其排卵受精。取卵的程序如下: d 1 晚, sc<sup>+</sup> - 蟾, 每次 500 IU (1 mg), d 2 晨分别 sc<sup>+</sup> - 蟾, 分别放置, d 2 晚, sc<sup>-</sup> - 蟾, 将<sup>+</sup> - 放在一起, 避光盖好, d 3 晨, 选择发育良好的胚胎保存。

**2 细胞培养** 待受精卵发育到 17-22 期(受精约 17-25 h 神经胚), 无菌条件下培养, 先用 75% EtOH 消毒, 在 10% 任(Ringer)氏液中剥去卵膜, 并在 10% 任氏液中清洗 4 遍, 在无  $\text{Cu}^{2+}$  及  $\text{Mg}^{2+}$  的任氏液中剪下背部中段的神经管和少量的中胚层细胞, 放置消化约 20-30 min, 细胞自然散开, 用新拉制的毛细管吸

取细胞划线接种在塑料培养皿内固定好的干净的盖玻片上。放入 20–30°C 的培养箱中培养。细胞接种 20–30 h 后进行电生理学实验。一般每只培养皿中培养一只胚胎的细胞。培养基成分如下: Leibovitz medium (L15) 30%, 胎牛血清 2%, 任氏液 68%: NaCl 115, CaCl<sub>2</sub>, KCl 2.5, Hepes 10 (mmol·L<sup>-1</sup>), pH 7.4.

### 单通道技术

**1 微电极的拉制** 利用微电极控制仪(Nauishige Japan, PP-83), 拉制出尖端开口约 1 μm 的玻璃毛细管微电极。在微电极尖端涂上树脂(Sylgard)并烤干, 然后用微电极抛光仪(Nauishige, MF-83)抛光, 使尖端光滑并且开口在 0.65 ± 0.15 μm 之间。拉制过程中避免微电极的污染。

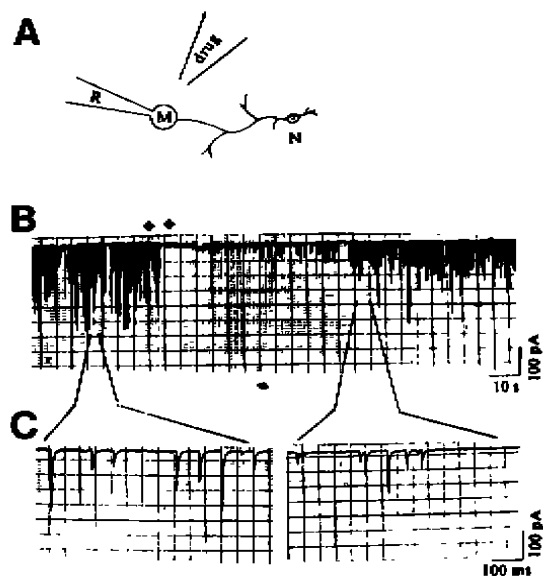
**2 离子单通道仪器及斑片钳技术** 由单通道放大器(List EPC-7)记录到信号, 显示于记忆示波器(TeXtronic 5113), 并同步输入到磁带记录仪中存储(TEAC-XR-30C), 实验结果用双道记录仪(Gould 2200)绘出。记录工作在上述培养基中进行。电极内液为: KCl 82, KOH 35, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 11, Hepes 5 (mmol·L<sup>-1</sup>), pH 7.2.

细胞培养和电生理记录都在室温 20–25°C 下进行。

## RESULTS

**Ani 对自发微终板电流(MEPC)的作用** 在蟾蜍神经胚的细胞培养皿中可以看到各种形态的神经元及许多肌肉细胞。以前我们观察到, 当神经元的轴突末梢一俟生长到接触肌肉细胞, 就可引发神经元轴突末梢自发释放乙酰胆碱。在肌肉细胞上可记录到微终板电位(MEPP)<sup>5</sup>。我们利用这一现象作为基础进行实验, 观察了 Ani 对神经肌肉接点的作用。微电极电阻在 5–10 MΩ 左右, 实验中选择边缘清楚有神经元支配的肌肉细胞。将微电极落到细胞表面, 轻吸一下与微电极连通的细管, 给一微小负压, 形成 10–100 GΩ 高阻封接。至 GΩ 封接后, 进行电压钳制至 -80 mV, 再在管内用力吸一下使微电极尖端下细胞膜破裂, 成为全细胞钳制。此时调整放大倍数, 就能观察到 MEPC。记录 10 min 后, 落下加药电极, 移近钳位细胞, 约 200 μm 外, 轻吹一下加药, 作用 5 min

后, 提起加药电极离开液面, 观察 MEPC 有否恢复 (Fig 1).



**Fig 1. Inhibitory effect of anisodamine (Ani) on spontaneous synaptic activities of neurite-muscle junction in a 1-d-old embryo of *Xenopus* culture.** (A) Set-up M= muscle cell; R= recording electrode; N= neuron; and the pipette for perfusion of drug. (B) Continuous tracing shows membrane currents through muscle cell under whole-cell voltage-clamp ( $E_m = -80$  mV, inward current downward). The pulsatile currents were abolished after local perfusion with Ani 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and then recovered after removing the drug. Arrows indicate the perfusion time of Ani. (C) Samples of currents at higher time-resolution.

盐酸 Ani 的阻断作用很快, 当其浓度在 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  几乎在加药的同时就有明显的阻断作用, 在 1 min 内, MEPC 变小变疏直至完全阻断。但钳位近 10 min 也没有记录到 MEPC 的恢复。在 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时就可完全阻断 MEPC 的产生。移出加药电极后, 可记录到基本完全的恢复。MEPC 的大小、频率和宽度变化不大 (Fig 1)。浓度 < 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 只能记录到不完全的阻断, MEPC 变小、变疏但仍然出现。实验中以任氏液替代 Ani 溶液灌入加药电极的对照实验, MEPC 没有变化。

为了比较 Ani、阿托品和东莨菪三者对 N-ACh

受体的作用, 我们在本实验系统中研究了阿托品和东莨菪碱完全阻断神经肌肉接点传递的最小剂量分别是 1 和 0.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。比较 Ani 等三药对 M-ACh 受体阻断的作用为阿托品 = 东莨菪碱 > Ani; 对 N-ACh 的作用则为阿托品 = 东莨菪碱 < Ani。

**Ani 对单通道电流的影响** “外膜面向外”膜片钳 (outside-out patch) 实验中, 选择培养干净而且孤立的肌细胞钳位, 按上面的方法形成全细胞钳位后, 稳定 10 min, 向上向后慢慢运用微操纵器提起微电极, 此时“外膜向外”膜片钳形成。在培养皿中加入 ACh 约  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 调放大器的放大倍数, 使示波器的分辨率为 pA / 格数量级, 置钳位电压 -100 mV, 就可看到 ACh 受体单通道电流 (Fig 2), 记录 10 min 后, 落下灌注 Ani  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的加药电极, 并移至钳位的膜片附近轻轻吹一下随即再离开液面, 就立即

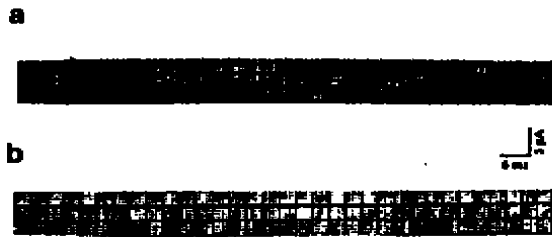


Fig 2. Inhibitory effect of anisodamine (Ani) on single cholinergic receptor channels of muscle cell in a 1-d-old embryo of *Xenopus* culture. a. Control; outside-out patch recording of ACh-R channels in ACh  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . b. After perfusion of Ani  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

看到单通道被阻断, 开放数目变少 (Fig 2)。移开微电极至未加药处, 可看到单通道电流很快恢复, 数目、形态、大小基本与阻断前相同。

## DISCUSSION

对 Ani 的药理学作用机制曾有过很多提法<sup>[4]</sup>, 人们一直以为 Ani 是一种单纯抗 M-ACh 受体的药物。从本文结果可以分析出, Ani 还具有较强的抗 N-ACh 的作用, 其作用特点为可逆性, 并有明显剂量依赖性。因此, 我们认为 Ani 是一个兼具抗 M 型和抗 N-ACh 受体的拮抗剂。这对于 Ani 所具有的药理作用, 可能提供更完善的解释。

## REFERENCES

- 1 Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Pharmacologic effects of anisodamine. *Chin Med J* 1973; 5 : 269-73.
- 2 Department of Pediatrics, Peking Friendship Hospital. Anisodamine therapy of diseases of acute micro-circulatory disturbances. *Chin Med J* 1973; 5 : 259-63.
- 3 Xie ZP, Wang T, Zhu YJ. Whole-cell clamp study of *Xenopus* embryonic cholinergic neurons. *Sci Sin [B]* 1989; 32 : 148-54.
- 4 Li J, Jiang YY, Yue TL. Inhibition of release of prostaglandins and leukotrienes from calcimycin-induced mouse peritoneal macrophages and bovine aorta endothelial cells by anisodamine. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 274-8.

## Corrigendum

This *Acta* 1992 Nov; 13 (6) : 541. The authors apologize to correct in MATERIALS AND METHODS in the right column. 46-147°C should be 146-147°C.