

家兔脑内苯二氮草受体的特性、 分布及 GABA 的调制作用

颜光美 胡本荣

(药理学教研室)

哺乳类动物脑内发现特异的、高亲和力的 BZ 受体是近年来神经科学领域中的一项重要进展^[1,2]。迄今的大量研究提示, BZ 受体存在种属差异^[3], 研究不同种属中 BZ 受体的特性, 有助于阐明其生物学功能。本文应用放射配基受体结合分析法研究家兔脑内 BZ 受体的特性、分布及与 GABA 受体的关系。

材料与方 法

一、材料与试剂 [³H]-FNP (氟硝基安定) 购自 New England Nuclear Corp. (Boston, Mass), 比放射活性为 73Ci/mmol。Muscimol, bicuculline 为 Sigma 产品, Picrotoxin 为 BDH 产品; 安定、硝基安定由湖北制药厂提供, 氯硝基安定由上海医学院合成; GABA (γ-氨基丁酸) 系上海生化试剂厂出品; 微孔玻璃纤维滤纸 49 型由上海红光造纸厂生产, GF/A, GF/B 型系 Whatman 产品; PPO, POPOP 为进口分装产品。

二、组织制备 健康中国大耳白兔, ♂, 5 月龄。颈动脉放血处死, 立即取脑组织置于 0-4℃ Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 中洗去血污。按 Craigie 法(1951)^[4]解剖出前叶皮质、海马、尾核、小脑、中脑、脑桥、延髓及脊髓。继后的操作均在冰浴中进行。按 1:10(w/v) 加入冰冷的 0.32M 蔗糖溶液。用玻璃匀浆器先手动匀浆上、下三次, 再电动匀浆(约 5000rpm) 2 分钟。匀浆液以 1000g × 10 分钟离心, 沉淀部分加入适量 Tris-HCl 缓冲液制成悬液, 此系代表 P₂ 组分; 上清部分再以 30000g × 20 分钟离心二次, 收集沉淀加入原容积 Tris-HCl 缓冲液, 手动匀浆 1 分钟, 是为突触体膜制备 (P₃ 膜)。

将 30000g 离心的上清液以 100000g × 45 分钟超速离心 (MSE-75), 沉淀加入适量缓冲液混悬后代表微粒体膜制备 (P₃ 膜)。未经离心的匀浆液为全匀浆 (whole homogenates)。各组分悬液按 Lowry 法(1951)^[5]测定蛋白质含量后, 分装贮于 -25℃ 冰箱备用。

三、洗涤膜制备 取 P₂ 膜于室温下融解, 以 30000g × 20 分钟离心, 收集沉淀加入原容积缓冲液, 手动匀浆 1 分钟。上述过程重复四次。最后沉淀仍用原容积缓冲液混悬。

四、放射配基结合实验 取 100μl P₂ 膜, 加入 [³H]-FNP 50μl 使终浓度为 1.37nM。Tris-HCl 缓冲液调管终容积为 500μl。反应管在 25℃ 孵育 15 分钟后, 移至 0℃ 再孵育 30 分钟。加入 5ml 冰冷的缓冲液终止反应, 立即滴加至微孔玻璃纤维滤纸上负压抽滤, 并用 5ml 冰冷缓冲液洗涤二次以除去未结合的 [³H]FNP。滤纸在 70℃ 下烘烤 20 分钟, 转移至 20ml 液闪瓶内, 加入含 PPO POPOP 二甲苯的液闪剂 5ml。暗适应至少 8 小时以减少化学发光。LKB 双道自动液闪仪测定计数率, 效率约 50%。加入 10μM 安定后的结合为非特异性结合。

特异性结合 = 总结合 - 非特异性结合。

结 果

一、家兔前叶皮质 BZ 受体的特性

上述方法制备的 P₂ 膜, 其含量与 [³H]FNP-受体复合物生成量呈良好的线性关系 (图 1)。检测 [³H]FNP-受体复合物与所用的微孔玻璃纤维滤纸有关, GF/B 型明显优于 49 型及 GF/A 型 (图 2)。

BZ 受体结合能力与孵育温度的关系如图 3

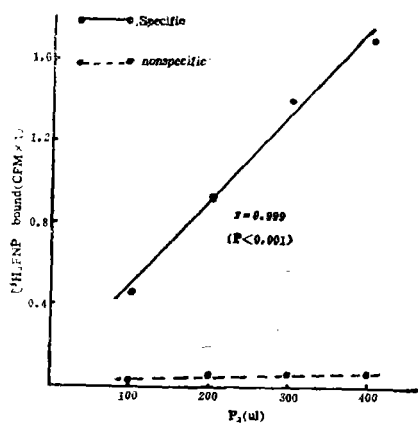
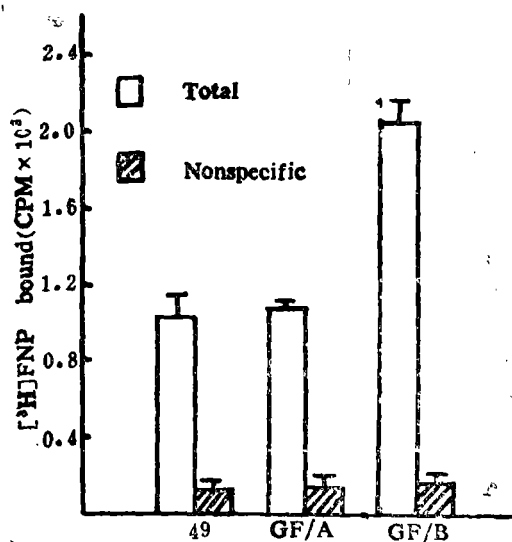
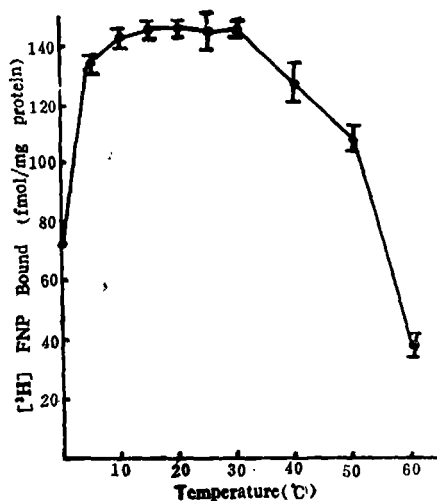
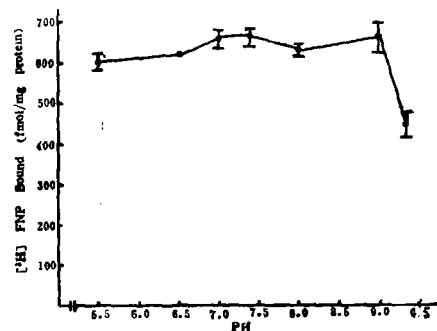
图1 $[^3\text{H}]$ FNP 结合量与膜含量的关系

图2 不同微孔滤纸计数效率的比较

所示, 50℃加热处理结合活性仍可保持74%左右, 提示BZ受体具有耐热性。BZ受体与配基的结合和 pH 有关, 硷性条件下结合显著减少,

图3 不同温度对 $[^3\text{H}]$ FNP 结合量的影响图4 pH 变化与 $[^3\text{H}]$ FNP 结合量的关系

酸性环境对结合无明显影响(图4)。

二、家兔 BZ 受体的脑区分布与亚细胞分布

结果如表1, BZ受体密度最高为海马及前叶皮质, 中脑次之, 丘脑、脑桥、小脑、尾核较少, 延髓、脊髓含量最低。

表1 家兔 BZ 受体的脑区分布

脑 区	结 合 量 fmol/mg 蛋白质	脑 区	结 合 量 fmol/mg 蛋白质
前叶皮质	632.47 ± 10.17	脑 桥	39.94 ± 10.87
小 脑	132.32 ± 2.89	中 脑	376.62 ± 1.08
尾 核	129.22 ± 10.50	延 髓	67.41 ± 7.62
海 马	762.65 ± 0.64	脊 髓	60.75 ± 0.22
丘 脑	153.82 ± 5.12		

BZ受体主要为膜受体,突触体、微粒体膜上分布丰富,结果见表2。

表2 家兔前叶皮质 BZ 受体的
亚细胞分布

细胞组分	结 合 量 fmol/mg 蛋白质
全匀浆	238.17 ± 18.16
P ₁ 膜	16.56 ± 3.12
P ₂ 膜	632.47 ± 10.17
P ₃ 膜	139.91 ± 77.69

三、家兔前叶皮质 BZ 受体的特异性

采用15种神经介质或作用于中枢神经系统的药物,它们分别是各类受体的激动剂或拮抗剂,与 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 进行竞争性抑制结合反应。上述药物在 10^{-4}M 高浓度时对 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 结合均无明显置换作用。三种苯二氮草衍生物在 10^{-5}M 或 10^{-6}M 时能抑制 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 结合的90~98%(表3)。

表3 多种受体激动剂、拮抗剂
对 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 结合的影响

药 物	浓度(μM)	CPM	抑制%
对 照		2742 ± 200	
L-Arginine	100	2135 ± 200	22.1
Glycine	100	2021 ± 23	26.3
5-HT	100	1737 ± 71	36.6
Histamine	100	2217 ± 65	19.1
ATP	100	2681 ± 28	2.2
Acetylcholine	100	2484 ± 18	9.3
Noradrenaline	100	2902 ± 80	5.8
Adrenaline	100	2679 ± 3	2.3
Glumitate	100	2737 ± 79	0
Morphine	100	2282 ± 36	16.7
Tolazoline	100	2472 ± 67	9.8
Atropine	100	2399 ± 81	12.5
Luminal	100	1553 ± 55	44.1
Propranolol	100	2529 ± 84	7.8
Diazepam	10	92 ± 15	96
Nitrazepam	10	290 ± 16	90
Clonazepam	1	54	98
GABA	100	3163 ± 13	+14

四、GABA 受体激动剂、拮抗剂对 BZ 受体的调制作用

取前叶皮质及小脑洗涤膜 $100\mu\text{l}$ 分别与GABA受体激动剂 muscimol, GABA及拮抗剂 bicuculline, Picrotoxin 在含有 200mM NaCl 的Tris-枸橼酸缓冲液中预孵育5分钟后,加入 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 。观察 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ -受体复合物生成量的变化。结果如表4所示。GABA, muscimol 能使前叶皮质及小脑中 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 结合量增加,这种促进作用可被 bicuculline 所取消。bicuculline 及 Picrotoxin 可降低 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 的基础结合。用小脑洗涤膜观察 GABA 提高 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 结合的量效关系,最高可增加35%(图5)。

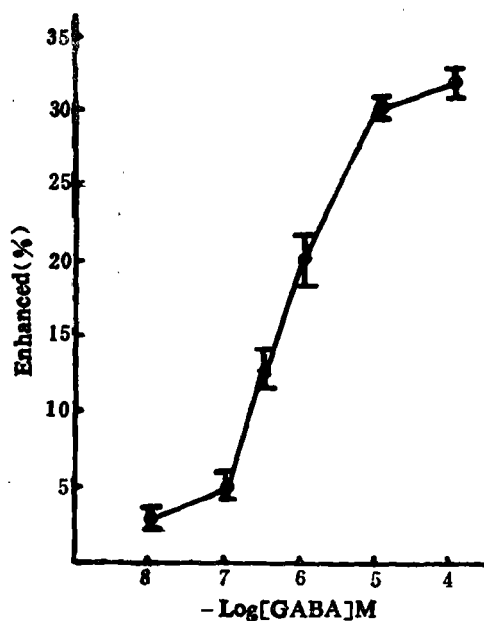


图5 GABA 对家兔小脑皮质 P₂ 膜 $[^3\text{H}]\text{FNP}$ 结合的影响。

讨 论

BZ受体主要分布于中枢神经系统,外周组织亦有分布,但似乎与苯二氮草类药物的作用无关(wang, et al 1984)^[6]。多年来研究 BZ 受体多采用大白鼠、小鼠、豚鼠及小牛等脑组织,利用家兔脑组织的研究未见详细报道。本文以家兔脑组织为材料,有利于阐明不同动物

表4 GABA 受体激动剂、拮抗剂对 [^3H]FNP 结合的影响

药 物	对 照	结 合 量(CPM)	
		前 叶 皮 质	小 脑
		10314 $\pm$ 158	1613 $\pm$ 40
GABA (100 μM)		11736 $\pm$ 39*	1862 $\pm$ 48*
Muscimol (20 μM)		11530 $\pm$ 12*	1729 $\pm$ 46*
Bicuculline (50 μM)		8664 $\pm$ 81*	1302 $\pm$ 29*
GABA(50 μM) + Bicuculline(50 μM)		9967 $\pm$ 96*	1692 $\pm$ 60
Picrotoxin (100 μM)		9570 $\pm$ 694	1569 $\pm$ 172

* $P < 0.05$ ($n = 6$)

种属间 BZ 受体的特性。

BZ 受体膜的制备采用 P_2 膜制备法,方法简便。它是完整的突触体膜,用于研究突触体的受体更为接近生理条件。经离子型或非离子型去垢剂溶脱提取的受体与天然膜中的受体是有差异的,其功能未必能够充分说明离子通透性的调节机制 (Karlin, 1979) [7]。从本文实验用 P_2 膜制备的结果看,膜蛋白含量与 [^3H]FNP—受体复合物生成量具有良好的线性关系,非特异结合在 3% 以下(图 1),说明 P_2 膜制备用来进行 BZ 受体的研究是可取的。BZ 受体的结合活性对酸性环境的耐受比硷性环境好,并且对加热稳定,提示 BZ 受体可能是神经细胞膜上的一种耐热的酸性蛋白(图 3、图 4、表 2)。

家兔脑内 BZ 受体具有很高的特异性。多种神经介质及某些已知的特异性受体激动剂或拮抗剂,尽管其浓度高达 10^{-4}M ,但对 1.37×10^{-8} [^3H]—FNP 结合仍无明显置换作用。重要的是,甘氨酸、GABA 在高浓度时对 [^3H]—FNP 结合亦无明显置换作用,说明 BZ 受体与甘氨酸受体和 GABA 受体是不同的。

BZ 受体在家兔脑内呈不均匀分布(表 1)。这种不均匀分布因动物种属不同而有某些差异 [7,8]。但前叶皮质及海马中的分布都是最为密集的。某些皮层下结构,如中脑、丘脑、尾核等亦有中等密度的分布,延髓及脊髓中密度最低,家兔小脑皮质中观察到的 BZ 受体密度较低而大鼠小脑中 BZ 受体含量几与大脑皮质

相等 [7]。这种差异的生物学意义仍需进一步研究。前叶皮质及边缘系统中的 BZ 受体可能介导苯二氮草类药物的抗焦虑作用,小脑中 BZ 受体与苯二氮草类所致运动失调有关。有较多的证据说明海马、杏仁核的 BZ 受体参与抗惊作用。下丘脑的 BZ 受体兴奋可刺激食欲,苯二氮草类药物的肌松作用可能是作用于网状结构内 BZ 受体的结果 [9,10]。

哺乳类动物脑内微电泳给予苯二氮草类药物能增强 GABA 的电生理反应 (Tallman, et al 1980) [11]。BZ 受体与 GABA 受体在功能上的直接联系,应用放射受体分析法可以在分子水平上得到证明。本研究使用高浓度的 GABA 未能明显抑制 [^3H]FNP 的特异结合(表 3),说明 GABA 受体与 BZ 受体分子实体不同。GABA 及 muscimol 均是强力的 GABA 受体激动剂,它们对家兔前叶皮质及小脑 BZ 受体的结合具有促进作用,并存在明显的量效关系,最高可增加 32% (表 4、图 5)。GABA 受体专一的拮抗剂 bicuculline 或 Picrotoxin 可取消上述增强作用,进一步说明 GABA 受体与 BZ 受体在功能上是密切联系的。有不少构思认为, BZ 受体、GABA 受体与氯离子通道在细胞膜上组成三联体式复合物 [12,13]。但复合物相互作用的机制尚有待于三联体式复合物的分离与纯化。

(本文承生化教研室提供离心制备条件,同位素室大力协助液闪测量,在此谨致谢忱。)

参 考 文

- [1] Braestrup C, et al. High densities of benzodiazepine receptor in human cortical areas, *Nature*(London)1977; 269:702.
- [2] Moehler H, et al. Benzodiazepine receptors: demonstration in the central nerve System. *Science* 1977; 198:349.
- [3] Kish SJ, et al. Benzodiazepine receptor binding in cerebellar cortex: observation in olivopontocerebellar atrophy. *J Neurochem* 1984; 42:466.
- [4] Craigie EH. A laboratory guide to the anatomy of the rabbit. Uni. Toronto Press, 1951.
- [5] Lowery OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265.
- [6] Wang JKT, et al. Structural requirements for the binding of benzodiazepines to their peripheral-type sites. *Mol. Pharmacol* 1984; 25:349.
- [7] Karlin A, et al. Advances in cytopharmacology. 133, Raven Press, 1979.
- [8] Moehler H, et al. The benzodiazepine receptor in normal and pathological human brain, *Br. J psychiatry* 1978; 133: 261.
- [9] Young WS, et al. Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 212: 337.
- [10] Cooper SJ. Benzodiazepine-opiate antagonist interactions in relation to feeding and drinking behavior. *Life Sci*.1983; 32: 1043.
- [11] Tallman JF, et al. Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines. *Science* 1980; 207: 274.
- [12] Braestrup C, et al. Benzodiazepine receptors. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 1980; 30: 852.
- [13] Bowery NG, et al. (—)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*(London) 1980; 283: 92.

Characteristics and Distributions of Benzodiazepine Receptor in Rabbit Brain and Its Regulatory Relation with GABA

Yan Guangmei Hu Benrong
(Department of Pharmacology, Sun Yat-sen
University of Medical Sciences)

Abstract

The characteristics and the regional and Subcellular distributions of benzodiazepine receptors in rabbit central nervous System(CNS) have been studied with [^3H]-Flunitrazepam ([^3H]-FNP) binding. The results indicate that the distribution of benzodiazepine receptors in rabbit CNS is not uniform, i.e. the frontal cortex and hippocampus are the highest density areas and the Spinal cord the lowest. Benzodiazepine receptors are mainly located in the cell membrane and likely an acidic proteins which are heat-stable. The receptors have a high specificity because 15 kinds of neurotransmitters or other agonists and antagonists have no inhibitive effect on [^3H]-FNP binding. But GABA, muscimol stimulate the binding and bicuculline, picrotoxin abolish this stimulation. The pharmacological significance of benzodiazepine receptors has been discussed.