

## 盐酸小檗碱对毒蕈碱型受体的作用

王文雅\*, 陈克敏<sup>1</sup>, 关永源<sup>1</sup>

(中国人民解放军广州医学高等专科学校药理教研室, 广州 510315; <sup>1</sup> 中山医科大学药理教研室, 广州 510089)

**摘要** 目的:研究盐酸小檗碱对乙酰胆碱系统的影响。方法:采用离体血管环、离体支气管螺旋体及放射配基-受体结合实验等方法。结果:较低浓度的盐酸小檗碱(Ber)对乙酰胆碱的舒张反应有浓度依赖性的增强作用;而较高浓度的 Ber 可浓度依赖性地直接舒张带内皮的动脉环,此作用在去内皮或阻断 M 受体后被完全抑制。在豚鼠离体气管条上,Ber 可引起浓度依赖性的收缩反应,而阿托品可阻断这种作用。放射配基-受体结合实验显示盐酸小檗碱可特异性与大鼠脑组织的毒蕈碱受体结合,Ki 值为  $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:盐酸小檗碱可激动毒蕈碱受体,从而引起血管的内皮依赖性的舒张反应及支气管的收缩。

**关键词** 盐酸小檗碱;毒蕈碱受体;乙酰胆碱

多年前 Furchgott 等人已证明乙酰胆碱(ACh)作用于血管内皮细胞膜上的 M 胆碱受体,引起内皮松弛因子(EDRF)的释放,进而作用于血管平滑肌,使后者产生松弛反应。一旦血管失去了内皮,ACh 也就失去了松弛血管的作用。有资料<sup>[1]</sup>指出:小剂量的小檗碱有增强 ACh 的作用,且能抑制大鼠心房的胆碱酯酶,但阿托品不能对抗其降压作用。离体大鼠肠系膜动脉条实验发现<sup>[2]</sup>:小檗碱(Ber)可抑制苯肾上腺素触发的血管收缩, $0.01 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ber 可产生剂量依赖性的血管松弛作用,而且这种作用在去内皮细胞后被减弱。姚伟星等发现<sup>[3]</sup> Ber 可使 ACh 在大鼠肛尾肌上的量效曲线右移,最大反应降低,表现出非竞争性拮抗作用。但上述实验中均未排除 Ber 的  $\alpha$  受体阻断作用可能引起的效应,且 Ber 对血管内皮 M 受体的作用未见报道。本文用基本的离体动脉环实验研究 Ber 对血管内皮 M 受体的作用,以求从器官的功能性变化着手,研究 Ber 对 ACh 系统的影响。

### 材料与方 法

**实验动物** 健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(200 ~ 250 g),Hartly 豚鼠(250 ~ 300 g),为中山医科大学动物中心提供,♂♀ 兼用。

**实验药物** 盐酸小檗碱(Ber),由中国药品生物制品检定所提供,溶于双蒸水中,调至 pH 7.4;氯化乙酰胆碱(ACh)购于 Sigma 公司,溶于 5%磷酸二氢钠溶液中,避光储存;实验中所用药物均为分析纯。

**离体血管环制备** 大鼠击昏后放血,取胸主动脉,置于通以 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 混合气体的 Krebs 液中,小心去除周围结缔组织后将血管剪成约 2.5 mm 宽的血管环,避免过度牵拉,以防损伤内皮。如需要,可用小镊轻轻磨擦血管环内表面以去除内皮细胞。将血管环放入含 Krebs 4 ml 液的浴槽内,静息张力 1.5 g,持续通混合气体。在 37℃ 下平衡 2 h,每 20 min 换液一次。正式实验前给予 KCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> 激发血管环收缩,以连续两次得到的最大收缩反应之差小于 10% 为可利用血管。以 KCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> 收缩血管环的峰值为标准值(100%),各种药物对血管环的收缩强度以占标准值的百分比来表示。

**离体气管螺旋条制备** 豚鼠击头致毙,立即分离出气管,每 2 ~ 3 个软骨剪一个螺旋环,取半作一标本。将气管条放入盛有营养液的浴槽中,其下端用线固定于浴槽底部的通气管上,上端用线连于张力传感器。恒温 37℃,持续通混合气体,负荷 3 g。稳定 1 h(每 15 min 换液一次)后开始做实验。每次用药间隔 15 min,每加一药接触 5 min,观察药物反应,然后换液,待基线恢复后再给另一药。

**脑组织受体的制备** 大白鼠断头后迅速取脑,去小脑和白质,加入冰冷的 Tris 缓冲液,制成匀浆。于 4℃,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后,弃沉淀,取上

收稿日期:1998-06-18

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(970278)

\* Tel:(020) 84219935-50514, E-mail:YL@www.gzmc.PLA.edu.cn

清液于 4℃, 18 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取沉淀再以反应 Tris 液制成匀浆。用 Lowry 法测其蛋白质含量后置液氮中储存备用。

**Scatchard 图的制作** 每个反应管中加入固定浓度的膜蛋白, 不同浓度的标记配体([<sup>3</sup>H] QNB, 比活度 1.55 × 10<sup>12</sup> Bq·mmol<sup>-1</sup>), 在非特异性结合管中另加入终浓度约为 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的阿托品, 补充 Tris 缓冲液至总体积为 400 μl。上述反应管在 30℃ 水浴温孵 45 min 后, 用冰冷的缓冲液 5 ml 终止反应, 立即倒入铺有玻璃纤维滤片的滤器中, 减压抽滤。再冲洗 3 次, 以洗去游离配体。滤片在 80℃ 烘干后置二甲苯闪烁液 4 ml 中, 用液体闪烁计数器测定滤片上的放射量。特异性结合: TB-NSB。以标记配体的浓度为横坐标, 相应的特异结合浓度为纵坐标, 绘制受体结合的饱和曲线。

## 结 果

### 1 乙酰胆碱 (ACh) 引起的血管舒张反应与内皮的关系

用 40 mmol·L<sup>-1</sup> KCl 引起血管环收缩, 待收缩达峰稳定后, 累积加入 ACh (终浓度为 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 μmol·L<sup>-1</sup>), 使血管环产生浓度依赖性舒张反应。取下血管环, 用小镊小心磨擦内表面以去除内皮细胞, 固定后稳定 30 min, 重复上述步骤, ACh 不再引起血管环的舒张。

### 2 盐酸小檗碱 (Ber) 对 40 mmol·L<sup>-1</sup> KCl 预收缩的动脉环的作用

在酚妥拉明预处理的血管环上, 用 40 mmol·L<sup>-1</sup> KCl 引起血管环收缩, 待收缩达峰稳定后加入 ACh (终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup>) 引起血管舒张; 冲洗后稳定 30 min, 以不同浓度 Ber 代替 ACh, 重复上述步骤, 发现低浓度 Ber 不能直接松弛血管环, 但当浓度 ≥ 20 μmol·L<sup>-1</sup> 时, Ber 可直接引起血管环浓度依赖性的舒张反应 (表 1)。当用 10 μmol·L<sup>-1</sup> 阿托品阻断 M<sub>1</sub> 受体及去除内皮细胞后, Ber 和 ACh 的直接舒张血管环作用均消失。

### 3 盐酸小檗碱对 KCl 预收缩后 ACh 舒张血管环反应的影响

在酚妥拉明预处理的血管环上, 用 40 mmol·L<sup>-1</sup> KCl 引起血管收缩, 待收缩达峰稳定后加入上述浓度的 ACh 引起血管舒张; 冲洗后仍用酚妥拉明预处理, 在 KCl 收缩达峰后加入不同浓度的 Ber, 10 min 后再加入 ACh, 发现 Ber 对 ACh 引起的血管环

的舒张反应有浓度依赖性的增强作用 (表 2)。用阿托品阻断 M<sub>1</sub> 受体或去除内皮后, Ber 的增强作用消失。

**Tab 1 Inhibitory action of berberine (Ber) on KCl-induced contraction of the endothelium intact thoracic aortic rings in rats (n = 8)**

Ber/μmol·L <sup>-1</sup>	% Relaxation induced by Ber
10	0
20	10.38 ± 8.83**
40	15.73 ± 6.27**
60	19.03 ± 5.03**
80	23.29 ± 5.64**
100	25.03 ± 4.38**

$\bar{x} \pm s$ , \*\*  $P < 0.01$  vs the actin of 10 μmol·L<sup>-1</sup> Ber.

**Tab 2 Influence of berberine on ACh-induced relaxation of the endothelium intact thoracic aortic rings in rats (n = 8)**

Ber/μmol·L <sup>-1</sup>	% Relaxation induced by ACh
Control	29.36 ± 8.09
0.001	34.79 ± 10.84**
0.010	41.66 ± 8.47**
0.100	46.17 ± 7.81**

$\bar{x} \pm s$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control.

### 4 离体气管螺旋条实验

磷酸组织胺 10 μg·μl<sup>-1</sup> (终浓度) 引起气管螺旋条收缩, 证明气管功能状态良好。ACh 10 μg·μl<sup>-1</sup> (终浓度) 引起气管条的收缩, 在反应达峰后加入 Ber 20 μmol·L<sup>-1</sup>, 气管条进一步收缩。冲洗稳定后加入 Ber 20 μmol·L<sup>-1</sup>, 引起气管条收缩; 再累积加入不同浓度的 Ber, 使气管条产生浓度依赖性的收缩反应。用阿托品 10 μmol·L<sup>-1</sup> 阻断 M<sub>1</sub> 受体后, ACh 和 Ber 均不再有收缩气管的作用。以累积法制备 Ber 收缩气管条的量效曲线, 冲洗后在浴槽内分别加入阿托品 1, 10 nmol·L<sup>-1</sup>, 平衡 15 min 后重复上述步骤, 得到另两条量效曲线。比较这 3 条曲线, 发现阿托品使 Ber 收缩气管条的量效曲线平行右移而最大反应不变 (图 1)。按徐氏方法计算出 pA<sub>2</sub> = 9.79, 95% 可信限为 8.98 ~ 10.62 (n = 6)。

### 5 放射配体-受体结合实验

[<sup>3</sup>H] QNB 为毒蕈碱受体特异性的配体, 它与脑组织中毒蕈碱受体结合的 K<sub>d</sub> 值为 0.07 nmol·L<sup>-1</sup>。而 Ber 可抑制 [<sup>3</sup>H] QNB 与毒蕈碱受体的结合, 使其 K<sub>d</sub> 值增大为 0.7 nmol·L<sup>-1</sup>, 但 B<sub>max</sub> 值不

变(图2)。Ber 竞争性地与大鼠脑组织毒蕈碱受体结合的 IC<sub>50</sub> 值为 17.82 μmol·L<sup>-1</sup>, Ki 值为 1.64

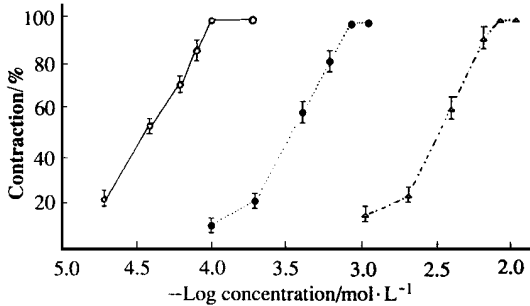


Fig 1 Effect of atropine on the cumulative dose-response curve of berberine (Ber)-induced contraction on rat trachea strips. ○—○ No atropine; ●---● With 1 nmol·L<sup>-1</sup> atropine; △---△ With 10 nmol·L<sup>-1</sup> atropine.

### 讨 论

在研究 Ber 对 ACh 系统的作用时,为了避免 Ber 作用于血管平滑肌的 α 受体引起血管舒张,因此在实验中用酚妥拉明 10 μmol·L<sup>-1</sup> 对动脉环进行预处理。结果发现:不同浓度 ACh 的舒张动脉环的反应仅在内皮完整的情况下发生,表明其舒张反应是内皮细胞直接作用的结果,即由于内皮细胞释放 EDRF 引起的<sup>[4,5]</sup>。而 Ber 在较低浓度 (0.001, 0.010, 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>) 时对 ACh 的舒张大鼠胸主动脉环反应有浓度依赖性增强作用;当浓度超过 20 μmol·L<sup>-1</sup> 时, Ber 则对 KCl 预收缩的动脉环有浓度依赖性的直接松弛作用。Ber 的上述作用在去除内皮或用阿托品阻断 M<sub>2</sub> 受体后不再出现。提示 Ber 对血管环的直接舒张作用与 ACh 相似,也是通过激动内皮上的 M<sub>2</sub> 受体,释放 EDRF 而引起的,所以也是内皮依赖性的。至于低浓度的 Ber 对 ACh 作用的影响推测可能是通过促进 EDRF 的释放而产生的。

过去一直认为 M<sub>2</sub> 激动剂和拮抗剂与受体是呈单一的、均匀的结合。近十年来,由于配基-受体结合技术的应用与一系列新的选择性高的激动剂与拮抗剂的合成,在大量研究结果的基础上改变了对受体认识的概念,即药物与受体的结合不是单一的,而是存在复杂性及多样性。近年克隆研究证明至少有 5 种不同的 M<sub>2</sub> 受体亚型<sup>[6]</sup>。其中在血管内皮细胞上介导 EDRF 释放的是 M<sub>2B</sub> 受体亚型<sup>[7]</sup>。此外, M<sub>2</sub> 受体亚型还分布于气道平滑肌上,介导气管收缩;分

布在上皮细胞、粘膜下腺体,促进腺体的分泌<sup>[8]</sup>。

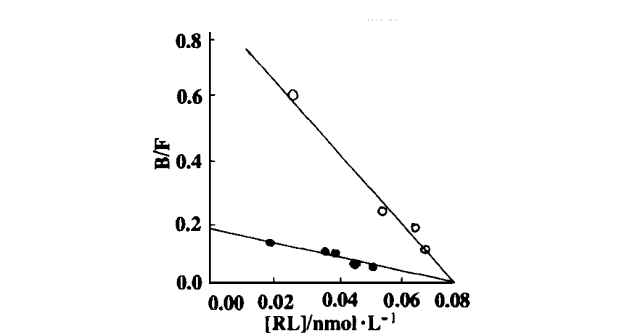


Fig 2 Scatchard plots of [³H] QNB binding to muscarinic receptors in rat brain homogenate. ○—○ No berberine; ●---● With berberine 10 μmol·L<sup>-1</sup>.

布在上皮细胞、粘膜下腺体,促进腺体的分泌<sup>[8]</sup>。

既然 Ber 可激动 M<sub>2</sub> 受体而引起血管平滑肌的松弛,则可推想它可能对其它器官的 M<sub>2</sub> 受体也有激动作用。如果有,就多了一个支持 Ber 是 M<sub>2</sub> 受体激动剂的证据。为此我们选用以 M<sub>3</sub> 亚型为主的豚鼠离体气管螺旋条标本观察 Ber 对气管 M<sub>2</sub> 受体的作用。结果显示 Ber 使气管螺旋条产生浓度依赖性的收缩,阿托品可阻断这种作用;且阿托品使 Ber 收缩气管条的量效曲线平行右移而最大反应不变,表现出竞争性抑制作用。由此证实 Ber 是 M<sub>2</sub> 受体激动剂,而阿托品是其竞争性拮抗剂。

通过上述有关血管环与气管条的功能性实验,我们首次从宏观水平上证实 Ber 是 M<sub>2</sub> 受体激动剂,为了获得直接证据,选用放射配体-受体结合实验以观察 Ber 与毒蕈碱受体的结合情况。结果发现 Ber 可抑制毒蕈碱受体的特异性配体 [³H] QNB 与大鼠脑组织中毒蕈碱受体结合的程度,在 Scatchard 图中 Ber 使 [³H] QNB 结合受体的 K<sub>d</sub> 值增大而 B<sub>max</sub> 值不变,其 K<sub>i</sub> 值为 1.6 μmol·L<sup>-1</sup>,可知这种抑制是特异性的竞争性抑制。由此可认为: Ber 是一个毒蕈碱受体的特异性激动剂,它对血管平滑肌的内皮依赖性的松弛作用是其激动血管内皮上的 M<sub>2</sub> 胆碱受体的结果,这是 Ber 舒张血管的作用机理之一。

### 参 考 文 献

- 1 Zhou ZD. A study on the hypotensive action and mechanism of berberine hydrochloride. *Acta Pharm Sin*, 1980, 15: 248
- 2 Chiou WF, Yen MH, Chen CF. Mechanism of vasodilatory

- effect of berberine in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol*, 1991, **204**: 35
- 3 Yao WX, Fang DC, Xia GJ, *et al.* Blocking action of berberine on various receptors in the rat aortic smooth muscle. *Acta Pharmacol Sin*, 1989, **10**: 385
  - 4 Vanhauhte PM, Miller VM. Heterogeneity of endothelium dependent responses in mammalian blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1985, **7**: s12
  - 5 郑秀凤, 潘红卫, 卞如濂. 粉防己碱对依 Ca<sup>2+</sup> 性内皮源松弛因子释放的影响. *中国药理学报*, 1987, **8**: 525
  - 6 Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990, **30**: 633
  - 7 Hawley J, Rubin PC, Hill SJ. Distribution of receptors mediating phosphoinositide hydrolysis in cultured human artery smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, 1995, **49**: 1005
  - 8 Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*, 1993, **52**: 521
  - 9 Bevan P. [<sup>3</sup>H] Oxotremorine- M binding to membranes prepared from rat brain and heart: evidence for subtypes of muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol*, 1984, **101**: 101

## EFFECT OF BERBERINE HYDROCHLORIDE ON MUSCARINIC RECEPTORS

Wang Wenya( Wang WY) , Chen Kemin( Chen GM)<sup>1</sup> and Guan Yongyuan( Guan YY)<sup>1</sup>

( Department of Pharmacology, Guangzhou Medical College of PLA, Guangzhou 510315 ;

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510089)

**ABSTRACT AIM:** To study the effect of berberine hydrochloride (Ber) on muscarinic receptors. **METHODS:** Use isolated aortic rings, isolated helical trachea strips and radioligand-receptor binding experiment. **RESULTS:** The inhibitory action of acetylcholine (ACh) on the contractile response of KCl in the endothelium-intact thoracic aortic rings of rats was potentiated by Ber concentration-dependently. At concentrations above 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Ber relaxed the endothelium-intact rings directly. The EC<sub>50</sub> value was 31.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . But such inhibitory action of Ber was totally abolished by removing the endothelium or by pretreatment with atropine 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Ber dose-dependently induced contraction on isolated helical strips of guinea pig trachea. This action was completely blocked by atropine 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . In the radioligand-receptor binding experiments, Ber was shown to bind to muscarinic receptors with definite affinity in rat brain. The K<sub>i</sub> value was 1.6  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . **CONCLUSION:** Ber is an agonist of muscarinic receptor. It may release EDRF from vascular endothelia cells by exciting muscarinic receptors to relax aortic rings.

**KEY WORDS** berberine hydrochloride; muscarinic receptors; acetylcholine