

挥发性麻醉药与烷烃相加作用的研究

何绍明 王国军 刘进

【摘要】 目的 研究挥发性麻醉药(VAs)与正烷烃的相互作用以推测全麻作用靶位的性质。**方法** 将3种VAs氟烷、安氟烷、异氟烷和3个正烷烃戊烷、己烷、庚烷相互配对组合。用果蝇模型单瓶连续法测定ED₅₀,用气相色谱仪检测麻醉气体浓度。每次配对实验分为6组,1组和6组分别测定A药和B药的ED₅₀;2、3、4、5组分别在维持A或B药0.2或0.4 ED₅₀条件下,通过增加另一药的浓度来测定A或B药的ED₅₀(定义为合用ED₅₀);将这4组内各自恒定药的浓度均数分别除以1组及6组测得的各自单药的ED₅₀值,得各自A药或B药的ED₅₀分数,将各组A药和B药的ED₅₀分数相加得该组ED₅₀分数之和。每对重复实验4次,用各组A药ED₅₀分数为横坐标值、B药ED₅₀分数为纵坐标值制成相互作用图。**结果** 除2对因浓度不能在同一气相色谱条件下检测被剔除外,共进行了13个配对组合实验,所有结果均为相加作用,在208个相互作用点中,只有1个位于相加范围线之左下,8个位于相加作用点之右上。**结论** 实验结果提示麻醉作用机制的分子靶位相同,根据它们的理化性质和其他蛋白质模型的研究结果推测作用靶位既非疏水区也非亲水区,而是亲疏水两性分子的特定区域。

【关键词】 麻醉药; 烷烃类; 药物协同作用; 药理作用分子作用机制

The additive effects of volatile anesthetics and n-alkanes imply an identical molecular mechanism HE Shaoming, WANG Guo-jun, LIU Jin. Department of Anesthesiology, The 454th Hospital of PLA, Nanjing 210002, China
Corresponding author: HE Shaoming, Email: Heshao ming454@ yahoo. com. cn

【Abstract】 Objective To study the interaction between volatile anesthetics and n-alkanes in order to imply the action mechanism. **Methods** The potencies of combination of the three volatile anesthetics (halothane, enflurane, and isoflurane) and the three n-alkanes (pentane, hexane, and heptane) were determined by using an assay of the geotactic behavior of the fruitfly. Every pair of anesthetic agents were called drug A and B according to the time of observing peak in gas chromatography. Each pair of experiment was divided into six groups with six flasks, the ED₅₀ of drug A and B were determined respectively in flask 1 and flask 6. The concentrations of drug B in flask 2 and 3 maintaining constantly at about 0.2 and 0.4 ED₅₀, the ED₅₀ of drug A was determined by increasing gradually its concentration. The concentrations of drug A in flask 4 and 5 maintaining constantly at about 0.4 and 0.2 ED₅₀, the ED₅₀ of drug B was determined by increasing gradually its concentration. The ED₅₀ of flask 1 was ED_{50A} and the ED₅₀ of flask 6 was ED_{50B}. The concentrations of constant drug and ED₅₀ measured in 2, 3, 4, and 5 flasks were divided by ED_{50A} or ED_{50B}; the fractional ED_{50A} added fractional ED_{50B} was the sum of ED₅₀. Each pair repeated four times. With fractional ED_{50A} on the abscissa and fractional ED_{50B} on the ordinate, a line connecting the 1.0 creates a line of additivity. **Results** Additive behavior was got in all the binary combinations of the thirteen binary combinations which can be made from the six agents in the gas chromatographic determination of two concentrations at the same time. Only 1/208 point fell in the supra-additive, and 9/208 points in the sub-additive ranges. **Conclusions** These data imply an identical molecular mechanism of anesthetic action in the central nervous system. Neither nonpolar hydrophobic region nor polar hydrophilic region, but the amphiphilic pockets with solvent and aliphatic character might represent the nature of the sites according to their physicochemical character and other studies of model proteins.

【Key words】 Anesthetics; Alkanes; Drug synergism; Molecular mechanisms of pharmacological action

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.09.015

基金项目: 国家自然科学基金(39770713)

作者单位: 210002 南京,解放军第454医院麻醉科(何绍明、王国军);四川大学华西医院麻醉科(刘进)

通讯作者: 何绍明, Email: Heshao ming454@ yahoo. com. cn

全麻药作用机制的一元论与多元论又有新的博弈,尽管目前以分子和系统机制的多元论(multi-site and multi-mechanisms concept)为主流^[1],但不能从总体上解释麻醉现象。吸入麻醉药效价强度通常与脂溶性相关(Meyer-Overton rule),但梅-欧法则的一元论脂质

学说已被否定,尤其是弱的亲水性不能剔除,大多数药物总体上处在非特异性脂质相互作用与弱的特异性极性相互作用之间的近似平衡。因此,亲疏水两性分子的“袋状结构”可能是共同的关键靶位^[2]。但缺乏中枢神经系统(central nervous system, CNS)内高分辨力的实验资料证明。近期 Yuki 等^[3]在外周淋巴细胞证明了挥发性麻醉药(volatile anesthetics, VAs)对蛋白质功能的变构调节机制,这一机制可能与全麻药在 CNS 的作用机制相同,可谓是在分子水平具有原子景象的新一元论,仍需更多的实验证据支持。正烷烃类物质具有一定的麻醉作用,由于脂溶性过强及水溶性过弱而偏离梅-欧法则,但其最低有效肺泡气浓度(MAC)与油/气分配系数(O/G)和水/气分配系数(S/G)相关($MAC \times O/G \times S/G = 0.077 \pm 0.018$)^[4],可以用来推测 CNS 麻醉作用部位的性质。假如麻醉作用取决于相同的亲疏水两性分子的“袋状结构”,其与 VAs 之间就会是相加作用;倘若取决于不同的疏水性或极性区域,它们之间则应该是协同作用。本研究旨在验证这种假设。

材料与方 法

1. 材料:在 22 °C 恒温箱内的玉米-琼脂培养基中培养原生黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*),将同一代新羽化的果蝇转移到新鲜培养基中培养,第 7 天进行实验,在第 6 天将果蝇换入新鲜培养基中培养 1 d。以果蝇失去负性趋地性和趋光性为麻醉标准,用单瓶连续法^[5]测定果蝇吸入麻醉药物半数有效浓度(ED_{50})。麻醉装置见图 1,主室(A)为一 5000 ml 的锥形瓶,用于容纳和麻醉果蝇,经磨口与特制附室紧密相连。附室(B)有两个取样口(B1 和 B2)通过软管与金属三通连接,由一个有中心孔的活塞(C1)与收集柱(C)相隔或相通,C 下方有一个同样的活塞(C2)与集蝇瓶(D)相隔或相通。

2. 相加实验方法:将 3 种 VAs 中的氟烷(halothane)、安氟烷(enflurane)、异氟烷(isoflurane)和 3 个正烷烃中的戊烷(pentane)、己烷(hexane)、庚烷(heptane)相互两两组合成 15 个对子。每对 1 次相加实验分为 6 组,实验前用低负压吸引器将果蝇吸入一个 600 ml 的锥形瓶中混合,然后随机分配到 6 组的主室 A 瓶内,每瓶 150~200 只。将主室和附室连接固定后并列垂直倒挂在支架上,上方安置灯光吸引果蝇。实验开始经 B2 将 A、B 室吸成 0.92~0.98 atm(1 atm = 101 325 Pa)的负压,从 B1 注入预定容量的高浓度麻醉药气体,注药完毕让空气自动进入达到压力平衡后立即关闭三通,麻醉过程中打开 C1 让被麻醉下坠的果蝇

掉入 C 中,而未麻醉果蝇仍停留在上方的瓶底部,每一药物浓度维持 30 min,从 B2 取样用 GOW-MAC 气相色谱仪检测瓶中麻醉气体浓度后,关闭 C1 打开 C2, C 中被麻醉的果蝇自然坠入 D 中用于计数。关闭 C2 打开 C1 后再经 B1 注入预定容量的高浓度麻醉药气体,采用与 B2 注射器来回缓慢抽动的方法达到混匀与压力平衡,然后重复上述过程,直至所有果蝇都被麻醉为止。计算每一药物浓度的累计效应频数(每一药物浓度及其所有更低浓度被麻醉果蝇数之和/该组总数 $\times 100\%$),用各个麻醉气体浓度与其累计效应频数绘制浓度-效应关系曲线,用经验 Logistic 回归法^[6]计算 ED_{50} 。根据每对药物气体在气相色谱中出峰的先后称为 A 药和 B 药,实验中将 1、2、3 号瓶(组)内恒定药(B 药)浓度分别维持在 0、0.2 和 0.4 ED_{50} ,通过增加 A 药(递增药)浓度来测定 A 药的 ED_{50} (定义为合用 ED_{50});将 4、5、6 号瓶内 A 药浓度分别维持在 0.4、0.2 和 0 ED_{50} ,通过增加 B 药浓度来测定 B 药的合用 ED_{50} 。由于 1 号和 6 号瓶实际上只使用了一种药物,其测定的递增药合用 ED_{50} 就分别是 A 药和 B 药的 ED_{50} 。在 2、3 号瓶分别用 B 药浓度的均数除以 6 号瓶测得的 B 药 ED_{50} 值,得 2、3 号瓶 B 药 ED_{50} 分数;用 2、3 号瓶测得的 A 药合用 ED_{50} 值分别除以 1 号瓶测得的 A 药 ED_{50} 值,得各自 A 药 ED_{50} 分数。在 4、5 号瓶用同样的方法分别算得各自 A 药和 B 药 ED_{50} 分数,将各瓶 A 药和 B 药的 ED_{50} 分数相加得该瓶 ED_{50} 分数之和。每对重复实验 4 次,用各瓶 A 药 ED_{50} 分数为横坐标值、B 药 ED_{50} 分数为纵坐标值制成相互作用图。以 A 药和 B 药的样本变异率($1.96 \times$ 标准差/均数 $\times 100\%$)为相加范围,位于相加范围以内的点为相加作用,位于相加范围之外且在左下的点为协同作用,位于相加范围之外且在右上的点为拮抗作用。

结 果

除 2 对因浓度不能在同一气相色谱条件下检测被剔除外,共进行了 13 个配对相加实验,所有配对实验结果均为相加作用(图 2~14),在 208 个相互作用点中,只有 1 个位于相加范围线之左下,8 个位于相加作用点之右上。提示 VAs 与正烷烃麻醉作用的分子靶位相同。

这 6 种药物的 $ED_{50} \times O/G = 129.484 \pm 119.377$ (脂区公式)、 $ED_{50} \times O/G \times S/G = 11.392 \pm 12.128$ (极性区公式),变异系数分别为 92.2% 和 106.5%;6 对药物的 $ED_{50A} \times O/G_A + ED_{50B} \times O/G_B = 129.233 \pm 79.308$,变异系数为 61.4%。这些数据均不恒定,说明麻醉效价强度与理化性质并非线性关系,提示麻醉作

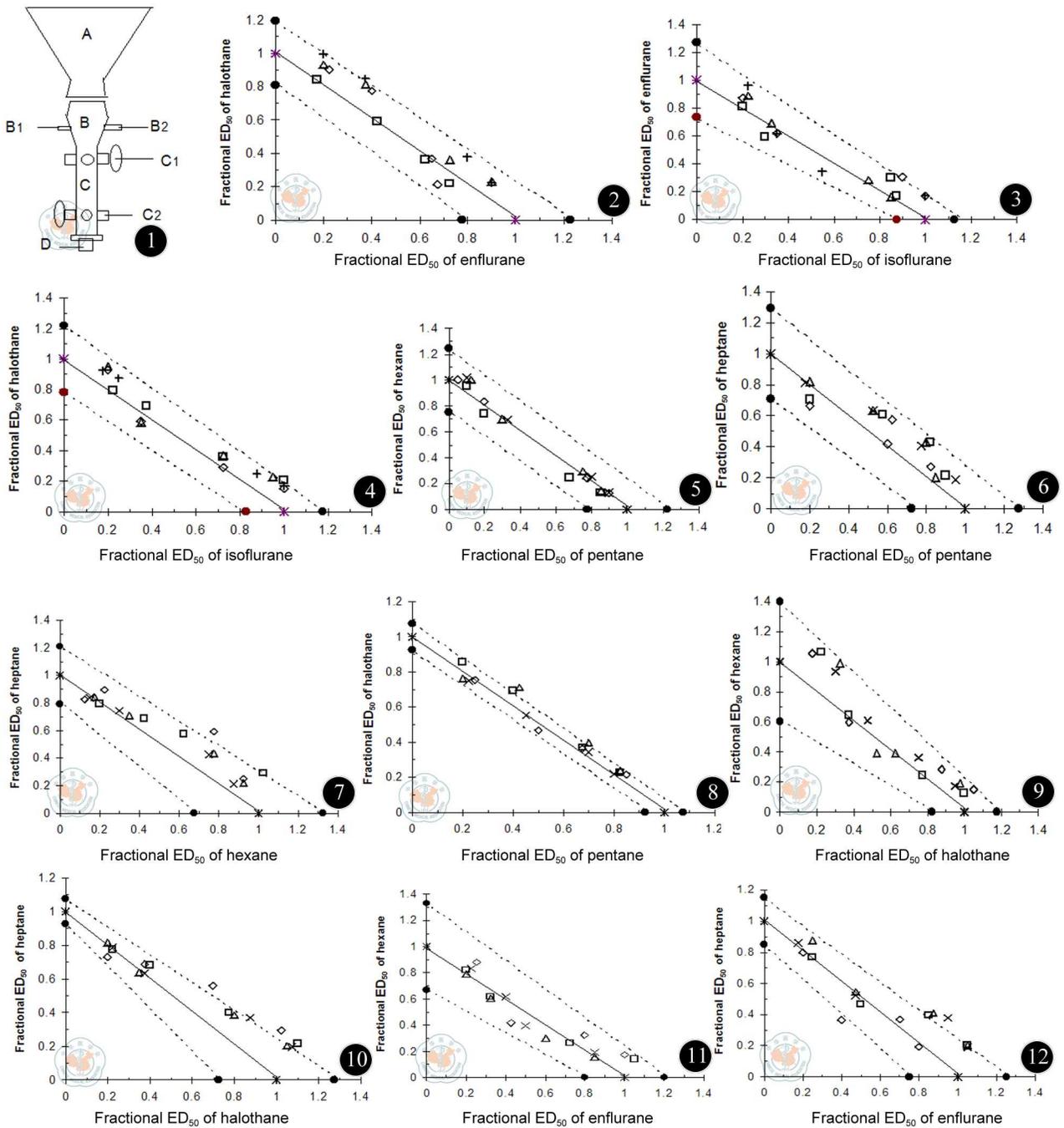


图1 果蝇麻醉装置 图2 安氟烷与氟烷的相互作用均在相加线之内 图3 异氟烷与安氟烷的相互作用均在相加线之内 图4 异氟烷与氟烷的相互作用均在相加线之内 图5 戊烷与己烷的相互作用均在相加线之内 图6 戊烷与庚烷的相互作用均在相加线之内 图7 己烷与庚烷的相互作用一点在相加线之右上 图8 戊烷与氟烷的相互作用一点在相加线之右上 图9 氟烷与己烷的相互作用均在相加线之内 图10 氟烷与庚烷的相互作用三点在相加线之右上 图11 安氟烷与己烷的相互作用均在相加线之内 图12 安氟烷与庚烷的相互作用一点在相加线之左下，二点在相加线之右上

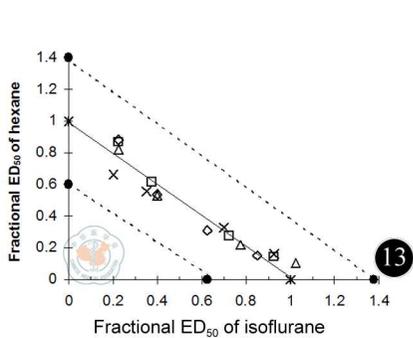


图13 异氟烷与己烷的相互作用均在相加线之内

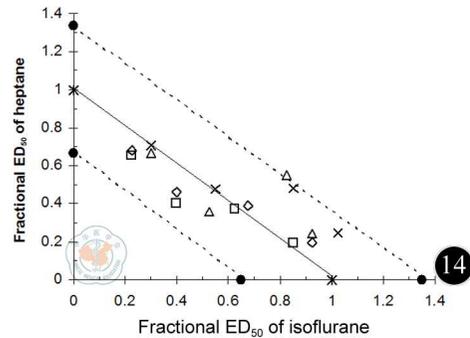


图14 异氟烷与庚烷的相互作用一点在相加线之右上

用靶位既非疏水区也非亲水区,而是亲疏水两性分子区域。

讨 论

在过去的数十年内,大量进行了各种全麻药对所有配体门控型离子通道影响的分子研究。结果是多数情况下麻醉药对这些通道有抑制和增强两种效应,提示通道内有许多麻醉药结合位点^[7]。进一步分析发现,各种配体门控型离子通道之间大的结构差别并不导致对麻醉药敏感性的显著变化,而小的结构改变,如单个氨基酸突变,却可引起麻醉药效应的显著变化,提示有关键的蛋白质效应相关位点。目前总体证据显示麻醉药是通过影响变构(如干扰闸门)的方式而非竞争(如与配体结合位点直接相互作用)的方式调节离子通道的功能。由于缺乏麻醉药与 CNS 靶位相互作用的高分辨力的结构资料,不能更详尽的理解为什么麻醉药相对微弱的结合却对蛋白质功能产生如此巨大影响。

新近的研究发现临床相关浓度的异氟烷通过干扰淋巴细胞功能相关抗原 1 (lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1) 整合蛋白的活化,抑制 T 细胞与靶细胞的相互作用以及配体激发的细胞内信号^[3]。核磁共振图像显示异氟烷与 LFA-1 配体结合区的变构调节腔(袋状结构)结合,此处已被以前的研究证实是一个小分子变构拮抗剂(抑制低亲和力向高亲和力构象状态过渡)的结合部位。Zhang 等^[8] 则通过 X 线衍射结晶分析法描绘了 LFA-1 配体结合区异氟烷复合体的晶体结构,首次详尽地揭示了异氟烷与这一已经确认的变构腔结合的原子景象,因而证明了 VAs 抑制外周蛋白质的变构调节功能。这一机制可能具有普遍性,对全麻药一元论原理很给力,但需要更多的实验支持。

果蝇由于遗传背景清楚、神经系统与脊椎动物类似且相对简单^[9]、吸入麻醉药的 ED₅₀ 与哺乳类动物有良好的相关性^[10] 而适用于作用机制的研究。大瓶法的优点是实验样本量大、麻醉气体浓度相对稳定,可减少

实验误差。本实验结果充分证明这些药物之间为相加作用,因为同类之间的 6 对相加作用与以往的实验结果相同^[11-12],而异类之间的 7 对也全部为相加作用。因此有力支持麻醉作用机制的一元论,至于麻醉药具体靶位的性质,本研究既不支持传统麻醉药提示的脂质区 (MAC × O/G),也不支持烷烃类提示的极性区 (MAC × O/G × S/G),而是支持具有亲疏水两性分子的特定区域,与 Streiff 等^[2] 根据其他蛋白质模型研究提出的亲疏水两性分子“袋状结构”观点一致。由于麻醉药要到达作用部位需通过许多生物膜及其界面,疏水性则成为第一要素,传统麻醉药因亲水性不成问题而表现为与 O/G 相关,烷烃类则因亲水性是主要问题而表现出与 O/G × S/G 相关。

CNS 内亲疏水两性分子的“袋状结构”是否就是变构调节腔的袋状结构仍有待于进一步研究,但 VAs 作用机制的 5 埃理论^[13] 提示的作用靶位特点与变构调节腔的“功能袋状结构”极其相似。有关 VAs 可能与两个不同的、空间上分隔的位点发生相互作用的假设^[14] 认为:(1)两个位点之间的距离等于 4 或 5 个碳原子,大约等于 5 Å,2001 年进一步证明直线长度可达 6 碳^[15]; (2)两个位点必须同时受影响才能产生最大的麻醉(不动)效应;(3)当麻醉药活性基团之间的空间与两个位点之间的距离最相匹配时,麻醉效价强度最大。而且一旦麻醉药分子中的氢完全被氟化则因失去氢的亲水性和氢键而丧失麻醉作用。因此 5 埃理论既符合 CNS 亲疏水两性分子的“袋状结构”的一元论,也暗示这一存在二个相应作用位点的具有特殊空间的“功能袋状结构”可能就在配体结合区的变构调节腔内。其他研究也支持变构调节的一元机制^[16-20],但也有学者认为,相加作用并不一定表示麻醉分子机制相同^[21]。

参 考 文 献

- [1] Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms'

- concept. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2005, 18:386-391.
- [2] Streiff JH, Jones KA. Volatile anesthetic binding to proteins is influenced by solvent and aliphatic residues. *J Chem Inf Model*, 2008, 48:2066-2073.
- [3] Yuki K, Astrof NS, Bracken C, et al. The volatile anesthetic isoflurane perturbs conformational activation of integrin LFA-1 by binding to the allosteric regulatory cavity. *FASEB J*, 2008, 22:4109-4116.
- [4] Liu J, Laster MJ, Taheri S, et al. Effect of n-alkane kinetics in rats on potency estimations and Meyer-Overton hypothesis. *Anesth Analg*, 1994, 79:1049-1055.
- [5] 叶其泉, 何绍明, 姚热凤, 等. 单瓶连续法测定果蝇的吸入麻醉药 ED₅₀ 值. *中华麻醉学杂志*, 1998, 18:375-376.
- [6] 张尧庭. 定性资料的统计分析. 桂林: 广西师范大学出版社, 1991:122-123.
- [7] Dilger JP. The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. *Br J Anaesth*, 2002, 89:41-51.
- [8] Zhang H, Astrof NS, Liu JH, et al. Crystal structure of isoflurane bound to integrin LFA-1 supports a unified mechanism of volatile anesthetic action in the immune and central nervous systems. *FASEB J*, 2009, 23:2735-2740.
- [9] Allada R, Nash HA. *Drosophila melanogaster* as a model for study of general anesthesia: the quantitative response to clinical anesthetics and alkanes. *Anesth Analg*, 1993, 77:19-26.
- [10] Gamo S, Ogaki M, Nakashima-Tanaka E. Strain differences in minimum anesthetic concentrations in *Drosophila melanogaster*. *Anesthesiology*, 1981, 54:289-293.
- [11] Difazio CA, Brown RE, Ball CG, et al. Additive effects of anesthetics and theories of anesthesia. *Anesthesiology*, 1972, 36:57-63.
- [12] Eger EI 2nd, Xing Y, Laster M, et al. Halothane and isoflurane have additive minimum alveolar concentration (MAC) effects in rats. *Anesth Analg*, 2003, 96:1350-1353.
- [13] 何绍明. 吸入麻醉药作用机制的 5 埃理论. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2007, 28:41-43.
- [14] Eger EI 2nd, Halsey MJ, Harris RA, et al. Hypothesis: volatile anesthetics produce immobility by acting on two sites approximately five carbon atoms apart. *Anesth Analg*, 1999, 88:1395-1400.
- [15] Eger EI 2nd, Laster MJ. The effect of rigidity, shape, unsaturation, and length on the anesthetic potency of hydrocarbons. *Anesth Analg*, 2001, 92:1477-1482.
- [16] Bhattacharji A, Klett N, Go RC, et al. Inhalational anaesthetics and n-alcohols share a site of action in the neuronal Shaw2 Kv channel. *Br J Pharmacol*, 2010, 159:1475-1485.
- [17] Ouyang W, Herold KF, Hemmings HC Jr. Comparative effects of halogenated inhaled anesthetics on voltage-gated Na⁺ channel function. *Anesthesiology*, 2009, 110:582-590.
- [18] Hemmings HC Jr. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. *Br J Anaesth*, 2009, 103:61-69.
- [19] Joksovic PM, Weiergräber M, Lee W, et al. Isoflurane-sensitive presynaptic R-type calcium channels contribute to inhibitory synaptic transmission in the rat thalamus. *J Neurosci*, 2009, 29:1434-1445.
- [20] Herring BE, Xie Z, Marks J, et al. Isoflurane inhibits the neurotransmitter release machinery. *J Neurophysiol*, 2009, 102:1265-1273.
- [21] Brosnan RJ, Pham TL. Does anesthetic additivity imply a similar molecular mechanism of anesthetic action at N-methyl-D-aspartate receptors? *Anesth Analg*, 2011, 112:568-573.

(收稿日期:2011-09-19)

(本文编辑:吴莹)

何绍明, 王国军, 刘进. 挥发性麻醉药与烷烃相加作用的研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(9):2336-2340.

中华医学会