

# 新型 M 受体激动剂 MA9701 的促智作用

崔永耀, 冯菊妹, 刘慧中, 朱亮, 荣征星, 陆阳, 陈红专

上海第二医科大学药物研究所, 上海 200025

**摘要 目的:** 观察新型莨菪类化合物 MA9701 对小鼠记忆障碍模型的学习与记忆影响, 以及对大鼠皮层海马组织的 M 受体动力学特性的影响。**方法:** 建立小鼠乙醇致记忆再现障碍和东莨菪碱致记忆获得障碍模型, 用避暗法测定学习与记忆功能。用受体放射配基法测定 M 受体动力学参数。**结果:** 与模型组比较, MA9701 3、10 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量均可显著延长乙醇致记忆障碍小鼠自明处进入暗处的潜伏期, 减少错误次数, 量效曲线呈倒 U 型; MA9701 5、10 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量, 可使东莨菪碱致记忆获得障碍小鼠的错误次数显著降低, 而潜伏期无显著延长。MA9701 对大鼠皮层海马组织的 M 受体具有较强的亲和力, 其 K<sub>i</sub> 分别为氧化震颤素、槟榔碱的 6 及 23 倍。**结论:** 新型莨菪类衍生物 MA9701 能明显改善乙醇和东莨菪碱所致小鼠学习与记忆障碍功能, 其作用可能与激动脑内皮层和海马中枢 M 胆碱受体有关。

**关键词** 药理学; 莨菪烷化合物; M 受体激动剂; 学习与记忆; 放射配基分析

中图分类号: R965; R971.92

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2003)05-0503-03

脑内皮层和海马等胆碱能神经系统退化, 是造成阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 记忆缺失的重要病理因素。药物直接激动脑内皮层和海马组织的 M 受体, 是潜在的治疗 AD 的最佳途径之一<sup>[1-3]</sup>。M 受体有多种亚型, 迄今药理学分型有 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、

M<sub>4</sub> 4 种, 脑内皮层和海马富含的 M<sub>1</sub> 受体主要位于突触后膜, 而 M<sub>2</sub> 受体则主要位于突触前膜, 并对乙酰胆碱 (ACh) 的释放起负反馈调节作用。因而选择性激动脑内 M<sub>1</sub> 受体或 (和) 拮抗 M<sub>2</sub> 受体的药物将更好地发挥促智疗效。本研究所于上世纪 70 年代, 率先发现具有 M 受体激动作用的包甲素 [(S, S) 2β-羟基-6β-乙酰氧基去甲莨菪烷], 以此为先导化合物合成了一系列类似物, 并进行定量构效关系方面的长期研究<sup>[6,7]</sup>, 找到相对选择性亲和 M 受体亚型起关键作用的活性基团, 以及改变亲脂性方法。通过分子设计, 进一步定向合成了一系列具有 M 受体亚型相对选择性和易透过血脑屏障的新颖化学实体, 经转入 M 受体亚型基因的 CHO 细胞、离体器官和整体动物等一系列实验表明, MA9701 是具有 M 受体激动作用的高效低毒新型莨菪类化合物之一。本文研究 MA9701 对小鼠记忆障碍模型的促智作用, 以及对大鼠皮层海马 (富含 M<sub>1</sub> 受体) 组织的 M 受体动力学特性的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料和仪器** 氧化震颤素、槟榔碱、阿托品, 均为 Sigma 产品; 氢溴酸东莨菪碱, 上海禾丰制药有限公司产品; [<sup>3</sup>H]-QNB, 1.89 TBq·mmol<sup>-1</sup>, 51 Ci·mmol<sup>-1</sup>, 英国 Amersham 公司产品; MA9701-新型莨菪类化合物, 纯度 97%, 本药物研究所合成提供。多用光控条件逃避反射仪 (中国中医研究院)。

**1.2 动物** 昆明种小鼠, 雌雄兼用, 体重 20±2 g; Wister 大鼠, 体重 200±40 g, 雌雄兼用。

**1.3 学习与记忆功能测定** 小鼠置于暗箱避暗训练, 训练前将小鼠置于明箱, 适应环境 3 min, 然后通以电流 38 V, 5 min。小鼠一进入暗箱受到电击, 即返回明箱。24 h 后进行测试, 记录 5 min 内小鼠自明箱到钻洞进入暗箱的错误次数及潜伏期 (首次进入暗箱时间)。合格小鼠随机分为空白对照组、模型

2003-05-04 收稿 2003-05-18 修回

国家自然科学基金项目 (No30070860); 上海市教委科技发展基金项目 (98B5, 02BZ30); 上海市教委重点学科研究基金项目 (No9970204)。

崔永耀, 男, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向: 受体药理学。

陈红专, 通讯作者, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子药理学和临床药理学。

Tel: 021-63846590-776451 E-mail: yaoli@shsmu.edu.cn

组和用药组。测试前 1 h, MA9701 3 个剂量组 ip 给药 1 次。参考文献<sup>[8]</sup>, 于避暗测试前 30 min 分别 po 30% (0.1 ml·10 g<sup>-1</sup>) 乙醇或 ip 东莨菪碱 1.5 mg·kg<sup>-1</sup> 建立乙醇致记忆再现障碍模型和东莨菪碱致记忆获得障碍模型。空白对照组 ip 等容量生理盐水。

**1.4 放射配基结合实验** 大鼠断头取脑, 分离出大脑皮层和海马, 称重后按 20 ml·g<sup>-1</sup> 比例加 0.32 mol·L<sup>-1</sup> 蔗糖溶液作匀浆, 5 000 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 10 min, 取上清液后 15 000 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 30 min, 弃上清液, 取沉淀物悬浮于钠钾磷酸缓冲液 (50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4) 中备用。用 Lowry 法测定蛋白含量。

**饱和实验:** 每管加入的蛋白浓度分别为皮层、海马 (0.04 nmol·L<sup>-1</sup>), [<sup>3</sup>H]-QNB 浓度在 0.02 ~ 2 nmol·L<sup>-1</sup> 之间, 用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 钠钾磷酸缓冲液加至总体积 400 μl, 此为总结合管, 35 °C 以下孵育 30 min, 加入冰冷缓冲液 3 ml 终止反应, 迅速抽滤至玻璃纤维膜上 (红光 59 型), 并用 3 ml 冰冷磷酸缓冲液洗涤 3 次, 滤膜烘干后投入二甲苯闪烁液, 用液体闪烁仪测定放射性强度。

**竞争结合实验:** 取皮层、海马膜蛋白 (0.04 mg/管) 分别加入 [<sup>3</sup>H]-QNB 0.95 nmol·L<sup>-1</sup>, 用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 钠钾磷酸缓冲液加至总体积 400 μl, 此为总结合管, 非特异结合管在总结合管基础上再加入 10 μmol·L<sup>-1</sup> 阿托品, 测试管则另加不同浓度的待测药物。35 °C 以下孵育 30 min, 以后步骤同饱和实验。每一浓度作双复管, 每一独立实验重复 3 次。

**1.5 数据处理** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。统计采用 ANOVA 分析, 组间比较用 Student's *t* 检验。放射配基结合实验用 Scatchard 方程式计算受体密度和亲和力, 并采用 Cheng-Prusoff 方程求出 *K<sub>i</sub>* 值。

## 2 结果

**2.1 MA9701 对乙醇致小鼠记忆障碍的改善作用** 乙醇致小鼠记忆障碍模型组较对照组的潜伏期明显减短, 错误次数显著增加 (表 1)。MA9701 3、10 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组的潜伏期均显著延长, MA9701 3、10 和 30 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组较模型组错误次数显著减少, 量效曲线呈倒 U 型。提示 MA9701 具有改善乙醇致小鼠记忆再现障碍作用。

**2.2 MA9701 对东莨菪碱致小鼠记忆障碍的改善作用** 东莨菪碱致小鼠记忆障碍模型组较对照组潜伏期明显减短, 错误次数显著增加 (表 2)。MA9701 5、10 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组的错误次数显著降低, 而潜伏

期无显著延长。提示 MA9701 具有改善东莨菪碱致小鼠记忆获得障碍的作用。

表 1 不同剂量 MA9701 对 30% 乙醇 (0.01 ml·g<sup>-1</sup>) 致小鼠记忆再现障碍的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 15)

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	潜伏期 /min	5 min 错误次数
对照组	—	1.81 ± 0.64 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.37 <sup>a</sup>
模型组	—	1.29 ± 0.55	2.23 ± 0.77
MA9701	3	1.85 ± 0.64 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.50 <sup>a</sup>
MA9701	10	1.89 ± 0.61 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.38 <sup>a</sup>
MA9701	30	1.61 ± 0.73	1.64 ± 0.58 <sup>b</sup>

与模型组比较<sup>b</sup> *P* < 0.05, <sup>a</sup> *P* < 0.01

表 2 不同剂量 MA9701 对东莨菪碱 (1.5 mg·kg<sup>-1</sup>) 致小鼠记忆获得障碍的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 15)

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	潜伏期 /min	5 min 错误次数
对照组	—	1.88 ± 0.39 <sup>a</sup>	1.65 ± 0.37 <sup>a</sup>
模型组	—	1.42 ± 0.46	2.81 ± 0.98
MA9701	2.5	1.42 ± 0.47	2.45 ± 0.78
MA9701	5	1.59 ± 0.40	2.05 ± 0.66 <sup>a</sup>
MA9701	10	1.48 ± 0.26	1.88 ± 0.52 <sup>a</sup>

与模型组比较<sup>a</sup> *P* < 0.01

**2.3 MA9701 对大鼠脑皮层和海马的 M 胆碱受体动力学影响** [<sup>3</sup>H]-QNB 放射配体与大鼠脑皮层、海马组织匀浆 M 受体结合的 *B<sub>max</sub>* 值为 529 nmol·g<sup>-1</sup> 蛋白, *K<sub>d</sub>* 值为 0.045 nmol·L<sup>-1</sup>, 其 Hill 系数为 1.014, 表明 [<sup>3</sup>H]-QNB 与皮层、海马组织匀浆 M 受体结合符合单位点模型。竞争结合试验结果显示 MA9701 与经典 M 受体激动剂氧化震颤素、槟榔碱对大鼠脑皮层、海马的 M 受体的亲和力 (*K<sub>i</sub>*) 值分别为 6.6、36.5 和 150 nmol·L<sup>-1</sup> (图 1)。表明 MA9701 对大鼠脑皮层和海马 M 受体具有较强亲和力。

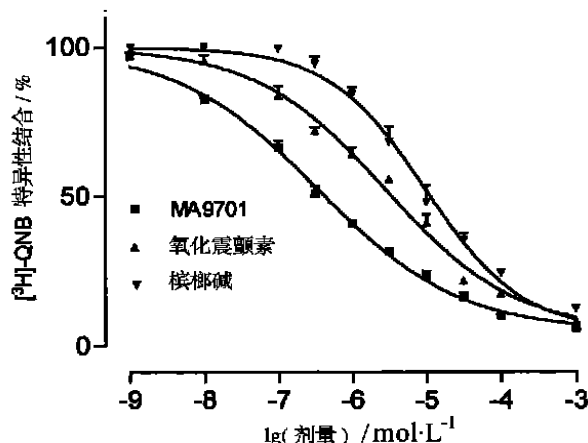


图 1 MA9701、氧化震颤素及槟榔碱对大鼠脑皮层和海马 M 受体动力学影响

### 3 讨论

补偿中枢胆碱能功能是目前治疗 AD 的主要策略。乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)通过抑制 ACh 的降解而提高递质 ACh 的效用,但其疗效依赖于胆碱能神经元的完整程度,随着病程进展,能释放 ACh 的神经元越来越少,AChEI 的疗效也就降低。而在整个病程中,突触后膜毒蕈碱型胆碱受体(M 受体)的数目变化不大,因此设计新型 M 受体激动剂治疗 AD 的探索已成为重要医学研究课题。M 受体激动剂其疗效和不良反应受两个关键因素的影响,其一是脂溶性,只有能透过血脑屏障的药物才能发挥疗效;其二是亚型选择性,对脑内 M<sub>1</sub> 受体选择性高的药物疗效好,外周不良反应少。目前大部分 M 受体激动剂包括乙酰胆碱本身均为季铵类化合物,不易透过血脑屏障,槟榔碱是天然存在的具有 M 胆碱受体激动作用的叔铵类化合物之一,虽然槟榔碱因体内快速水解而无治疗价值,但以槟榔碱为先导化合物的治疗 AD 新药已进入临床试验。MA9701 是以包甲素为先导化合物通过分子设计定向合成的新型莨菪类化合物,转入 M 受体亚型基因的 CHO 细胞和离体器官的受体结合和功能试验表明 MA9701 在细胞和组织水平上具有较好 M 受体亚型选择性激动作用。本实验证明 MA9701 可剂量依赖性地翻转乙

醇或东莨菪碱所致小鼠学习与记忆障碍功能;MA9701 与学习记忆功能密切相关脑皮层、海马组织 M 受体具有较强的亲和力, K<sub>i</sub> 为槟榔碱 23 倍,提示 MA9701 的促智作用可能通过中枢 M 胆碱系统介导机制。

### 参考文献

- 1 吴兴军,陈红专. M<sub>1</sub> 胆碱受体激动剂治疗阿尔茨海默病研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003; 8: 485—9
- 2 Qiu Y, Chen HZ, Wu XJ, *et al.* β-Acetoxy nortropane regulated processing of amyloid precursor protein in CHOm1 cells and rat brain[J]. Eur J Pharmacol, 2003; 468: 1—7
- 3 Fisher A, Brandeis R, Bar-Ner RH, *et al.* TAF150(S) and AF267B: M<sub>1</sub> muscarinic agonists as innovative therapies for Alzheimer's disease[J]. J Mol Neurosci, 2002; 19: 145—53
- 4 Adam C, Bartolomeo, Herman Morris, *et al.* The preclinical Pharmacological Profile of WAY-132983, a Potent M<sub>1</sub> Preferring Agonist[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000; 292: 584—96
- 5 Each TG. Muscarinic agonists as preventative therapy for Alzheimer's disease[J]. Curr Opin Investing Drugs, 2002; 3: 1633—6
- 6 陆阳,陈泽乃. 新缩瞳剂包甲素及其类似物的构效关系和构象分析[J]. 上海第二医科大学学报, 1996; 16: 1—4
- 7 崔永耀,冯菊妹,刘慧中,等. 新型莨菪烷类化合物对豚鼠回肠肌 M 受体动力学研究[J]. 上海第二医科大学学报, 2000; 1: 22—4
- 8 张均田. 记忆障碍动物模型[A]. 见: 张均田,主编. 现代药理实验法[M]. 第 1 版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1229—31

## Effect of anovel muscarinic receptor agonist MA9701 on cognitive improvement

CUI Yong-Yao, FENG Ju-Mei, LIU Hui-Zhong, ZHU Liang, RONG Zheng-Xing, LU Yang, CHEN Hong-Zhuan

*Institute of Drug Research, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China*

**ABSTRACT** **AIM:** To evaluate the cognitive improvement of MA9701, a newly synthesized nortropane and its binding properties at muscarinic receptor in the cortex and hippocampus. **METHODS:** Learning and memory performance was studied using step-through test in mice. The kinetics for the binding to muscarinic receptor in the cortex and hippocampus were determined using [<sup>3</sup>H]-QNB. **RESULTS:** Compared with ethanol model group, MA9701 (3 and 10 mg·kg<sup>-1</sup>) obviously decreased the number of errors in five minutes and prolonged the foot-shock passive avoidance latency in a dose-dependent and

U-shaped manner. And also, MA9701 (5 and 10 mg·kg<sup>-1</sup>) could significantly reverse scopolamine-induced memory impairment. Radioligand binding assays showed that MA9701 had 6 and 23 times higher affinities to muscarinic receptor in the cortex and hippocampus than oxo and arecloine, respectively. **CONCLUSION:** Novel nortropane MA9701 might exert potent cognitive improvement by the activation of muscarinic receptor in the cortex and hippocampus.

**KEY WORDS** pharmacology; M receptor agonist; learning and memory; radioligand binding assay