

天气: 晴 温度: 13 °C 湿度: 70 %

日期: 10/23/2024

姓名: 何昱晖 班级: 药 3 同组人: 荣子健、马逸然、赵方一澜

阿托品对乙酰胆碱的竞争性拮抗作用和 pA_2 的测定

1 实验的目的和原理

1.1 实验目的

- (1) 观察阿托品对乙酰胆碱的竞争性拮抗作用;
- (2) 学习受体激动剂的量效关系曲线的绘制方法;
- (3) 掌握受体激动剂 pD_2 和受体拮抗剂 pA_2 的测定的方法和意义

1.2 实验原理

pD_2 是评价受体激动剂的效应强度的指标, 其定义为: 能引起最大效应的 50% 时的药物剂量的摩尔浓度负对数。 $pD_2 = -\lg K_d$ (其中 K_d 是药物的解离常数)。其计算方法为: 以 E_x/E_{\max} 为纵坐标 (其中 E_x 是药物效应, E_{\max} 是药物的最大效应, $\lg C$ 为横坐标作图, 得到 S 型曲线, 其中间部分为一条直线, 计算纵坐标为 0.5 时的横坐标值为 $\lg C_0$, 取负数为 pD_2 。

pA_2 是一种用于来表示竞争性拮抗作用的强度指标, 其意义是能使激动剂浓度提高到原来 2 倍时, 可产生与原来浓度相同效应所需的拮抗剂浓度的负对数, pA_2 值越大, 说明拮抗剂的作用越强。其计算方法为: 加入某定量的抑制剂后, 再加入上述剂量的激动剂, 以 E_x/E_{\max} 为纵坐标, $\lg C$ 为横坐标作图, 得到一条拟合直线, 纵坐标为 0.5 时, 计算得到的横坐标值为 $\lg C_1$ 。

$$pA_2 = pA_x + \lg \left(\frac{C_1}{C_0} - 1 \right)$$

其中:

- pA_x 为拮抗剂摩尔浓度的负对数;
- C_1 为加入拮抗剂后引起 50% 效应的激动剂摩尔浓度;
- C_0 为引起 50% 效应的激动剂摩尔浓度。

公式推导过程:

根据占领模型, 即激动剂占领受体的比例即为药效与最大药效的比例:

$$\frac{[DR]}{R_0} = \frac{[D]}{[D] + K_d} \Rightarrow C_0 = K_d$$

加入阿托品后可以计算 C_1 :

$$\frac{[DR]}{[R_0]} = \frac{[D]}{D + K_d \left(1 + \frac{[A_x]}{K_a}\right)} = \frac{1}{2} \Rightarrow \frac{C_1}{C_1 + C_0 \left(1 + \frac{[A_x]}{K_a}\right)} = \frac{1}{2} \Rightarrow \frac{[A_x]}{K_a} = \frac{C_1}{C_0} - 1$$

又 pA_2 定义为当激动剂浓度提高到原来的 2 倍时, 可产生与原来浓度相同效应所需的拮抗剂浓度的负对数, 得:

$$\frac{[DR]}{[R_0]} = \frac{2K_d}{2K_d + K_d \left(1 + \frac{[A_2]}{K_a}\right)} = \frac{1}{2} \Rightarrow [A_2] = K_a$$

因此

$$\frac{[A_x]}{[A_2]} = \frac{C_1}{C_0} - 1 \Rightarrow pA_2 = pA_x + \lg \left(\frac{C_1}{C_0} - 1 \right)$$

2 实验材料

- 实验动物: 豚鼠 1 只, 350 ~ 500g;
- 药品和试剂: 阿托品 (1×10^{-7} mol/L)、乙酰胆碱 (10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L)、台氏液、氧气等;
- 实验器材: 离体组织灌流装置、麦氏浴槽、张力换能器、PowerLab 数据采集系统、注射器、外科手术器械等。

3 实验方法

3.1 实验流程

- 1 PowerLab 仪器参数设置: 使用「张力测定实验.adiset」文件, 测试仪器使用 1 通道, 设置参数采样速率为 200/s, 量程 10g, 调零;
- 2 台氏液每组 300mL, 37°C 保温, 取 20mL 用氧气饱和备用;
- 3 麦氏浴槽中加 20mL 台氏液, 调节温度 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 氧气 2 ~ 3 个气泡/秒;
- 4 豚鼠回肠标本制备: 取豚鼠, 用木棒猛击头部处死, 迅速解剖腹腔, 找到回肠, 剪取 20cm 左右回肠置于氧饱和和台氏液中, 剥离脂肪, 用眼科剪剪成 2 ~ 2.5cm 左右的肠段, 冲洗干净内容物。将肠管标本两端用缝针穿线, 打结固定; 一端打空结 (约 1cm 左右), 另一端穿长线打结, 用眼科镊钳住空结固定于弯钩上, 放入麦氏浴槽, 固定弯钩; 将另一端长线与张力换能器相连;

- 5 调整张力换能器高度，使得前负荷为 5 ~ 7g 左右；回肠标本在浴槽内平衡，每 10min 换液一次，共换液 3 次；
- 6 最后一次换液后，浴槽中加入台氏液 20mL 平衡 10min，秒级一段正常曲线，随后按照表 1 次序，小剂量连续加入乙酰胆碱 (Ach)，制作 Ach 的累积效应曲线。每加一次药时都需标记，指标加药序号即可，直至曲线上升至最高峰不再升高为止。每次加样前，用移液枪先取出槽内相应体积的溶液，再加入药液；
- 7 放掉麦氏浴槽中的溶液，用新鲜台氏液冲洗肠管 3 次，每次平衡 10 min，稳定标本共 30min，随后加入阿托品 0.2 mL (终浓度位 10^{-9} mol/L)，1min 后加入乙酰胆碱，按照上述方法制作 Ach 累积效应曲线；
- 8 实验结束，清洗所用容器和麦氏浴槽，关闭仪器。

表 1: 乙酰胆碱加样浓度和加样量

加药次序	Ach 浓度 (mol/L)	加入量 (mL)	浴槽中 Ach 累计浓度 (μ mol/L)
1	10^{-7}	0.2	0.001
2	10^{-7}	0.4	0.003
3	10^{-6}	0.14	0.01
4	10^{-6}	0.4	0.03
5	10^{-5}	0.14	0.1
6	10^{-5}	0.4	0.3
7	10^{-4}	0.14	1
8	10^{-4}	0.4	3
9	10^{-3}	0.14	10
10	10^{-3}	0.4	30
11	10^{-2}	0.14	100
12	10^{-2}	0.4	300

3.2 注意事项

- 1 处死豚鼠取肠要迅速、轻巧，并置于氧饱和台氏液中保持活性；
- 2 给予回肠肠管的前负荷不能太大（最开始时为 5 ~ 7g，随着孵育时间的延长，其张力会降低）；
- 3 每次给予 Ach 时需等到前一次反应达到最大值时才能给下一个剂量的药物，即描记曲线到达平台阶段。制作整个累积量效曲线过程中不能换溶液；
- 4 切勿随意更改生物信号处理采集系统的实验参数设置。

4 实验结果

图 1 是未加阿托品时测定的乙酰胆碱累积效应曲线图，平衡时的负荷约为 4.5g，最高值约为 7g:

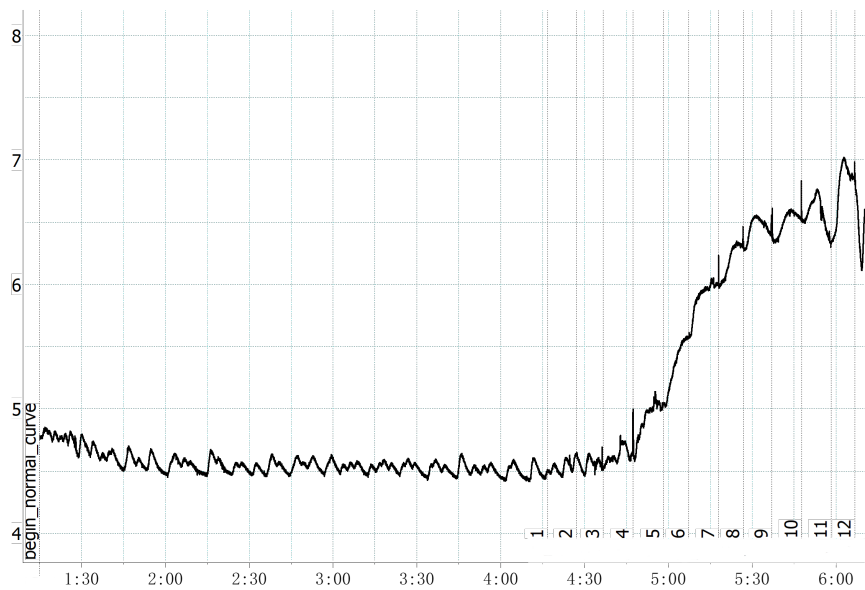


图 1: 未加阿托品时的乙酰胆碱累积效应曲线

图 2 是加入阿托品时测定的乙酰胆碱累积效应曲线图，平衡时的负荷约为 5.25g，最高值约为 7g:

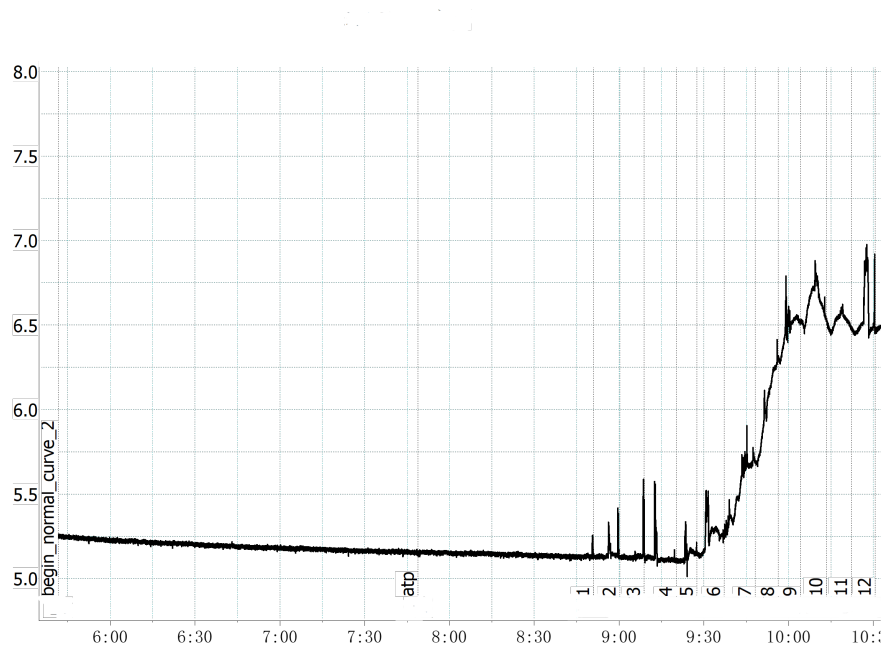


图 2: 加入阿托品时的乙酰胆碱累积效应曲线

表 2 是测定曲线中各段的平均值对比：

表 2: 对照组与实验组各阶段平均值比较

阶段	对照组	实验组
校准平衡	4.5377	5.2161
加入阿托品	/	5.1461
1	4.535	5.1459
2	4.563	5.1417
3	4.6307	5.1334
4	4.9187	5.1393
5	5.3415	5.2531
6	5.8949	5.5183
7	6.1906	6.0077
8	6.4545	6.4767
9	6.4946	6.6281
10	6.5708	6.5234
11	6.7552	6.5532
12	6.7491	6.8002

5 课后思考题