

文蛤心肌上乙醯膽素接受器之特性

傅利芳* 李小惠** 林金盾**

*私立嘉南藥學專科學校

** 國立臺灣師範大學生物學系所

摘 要

本實驗在探討文蛤(*Meretrix lusoria*)心肌上乙醯膽素接受器的特性。實驗時，先分離心臟，再用張力測定儀及吸引電極分別測定其收縮力及活動電位，又以乙醯膽素及其擬似劑或拮抗劑灌流離體心臟，觀察並紀錄其效應。處理30分鐘內，乙醯膽素對文蛤心肌的抑制作用具有劑量效應，有效濃度為 $1.0 \times 10^{-11}M$ 。若濃度為 $1.0 \times 10^{-8}M$ ，則在1分鐘內可達100%抑制效果。carbacol的抑制效應和乙醯膽素一樣。膽素性接受器的M型拮抗劑(atropine、scopolamine)，N型拮抗劑(hexamethonium bromide、curare)對乙醯膽素($1.0 \times 10^{-8}M$)的抑制效應有拮抗效果。本實驗證明文蛤心肌上的乙醯膽素接受器，與脊椎動物組織上的接受器不同，既不屬於M型，亦不屬於N型，可能是另一種新的類型。

關鍵詞：文蛤、心臟、乙醯膽素、接受器

緒 言

有關動物心肌方面的生理結論，多以脊椎動物為對象的研究結果而來，很少直接以無脊椎動物為材料研究而來。其實像軟體動物之心肌對化學物質十分敏感，已經成為從事神經傳遞物質(neurotransmitters)，神經調節物質(neuromodulators)，神經遞液(neurohumors)，神經激素(neurohormones)之分析與檢驗的好材料(Kobayashi and Muneoka, 1990; Lloyd, 1986; Twarog, 1988)。

文蛤是國內重要的經濟貝類，多產於本省西南沿海的養殖場。乾季常有突然大量死亡的報導(Jeng, 1975; Jeng and Chen, 1975)。可是因為缺乏基本的生理資料可查，故始終無法解釋死亡的真正原因。在國內以往雖有一些關於文蛤心臟的實驗報告(林和吳, 1980; 林等, 1981)，然而，對於調節文蛤心臟活動之機制，尚不清楚。

就調節心臟活動的神經化學物質而言，我們曾經證得文蛤的心臟和脊椎動物相同，以乙醯膽素為其抑制性的神經化學物質(李等, 1992; Lee *et al.*, 1993)。已知在脊椎動物

的組織中，乙醯膽素的接受器可分為 M 型 (muscarinic type) 和 N 型 (nicotinic type) 兩類 (Strange, 1988)。文蛤的心臟對乙醯膽素也十分敏感，但是，其接受器是屬於那一類型呢？至今沒有報告。為了解決這個問題，我們嘗試以幾種脊椎動物組織中，常見的乙醯膽素接受器的拮抗劑，來測試文蛤離體心臟，以探討文蛤心肌上此種接受器的特性。

材料與方法

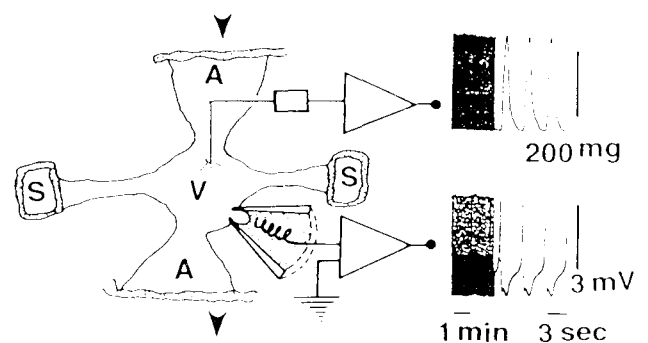
實驗動物與實驗裝置

選購體重(帶殼)約 21 ± 2 克的文蛤 (*Meretrix lusoria*)，於人工海水馴化一天，再取為實驗材料。分離出心臟後，在兩個閉殼肌和兩個心房處用微細的鋼針固定於實驗槽中，使離體心臟呈十字形撐開，用人工海水(林和吳, 1980)循環灌流，任其自發性進行收縮和舒張的活動。用細鉤子鉤住部分心室壁，接至張力測定儀(myograph 76601-A)紀錄心室收縮時的機械張力，並以吸引電極吸住對側的心室壁，紀錄心室收縮時的心肌活動電位(圖一)，再經前置放大器(Grass P511K)放大，經直讀紀錄式示波儀(Gould 1604)監視離體心臟活動的變化，用感熱式紀錄器(San-Ei 8K21)隨時紀錄結果。同時，用訊號儲存器(Toshiba Dx-900)將結果同步轉存於磁帶內，以供詳細分析數據之用。

試藥處理及統計

試藥處理前，先用人工海水灌流離體心臟10分鐘，紀錄正常的心室收縮機械張力和活動電位，穩定之後，再以待測的化學物質灌流30分鐘，並觀察其變化，最後以人工海水灌流使心臟活性恢復。本實驗之溫度為 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 測試藥物包括：乙醯膽素 (ACh) 及其相關藥物 (carbacol、choline、atropine sulphate、scololamine、curare、hexamethonium bromide、phenyltrimethyl ammonium 均購自 Sigma 藥廠) 溶於人工海水配成 10^{-4}M ，必要時再稀釋。動物槽容積只有3毫升，灌流速率為7毫升/分，試藥完全置換時間約為3分鐘。

數據之統計採用平均值 \pm 標準差，並以 Student's T-test 驗證其差異是否有意義。



圖一、文蛤離體心臟之機械收縮力和活動電位的紀錄裝置。上面曲線為張力測定儀所測得的收縮力，下面曲線為吸引電極所測得的活動電位。箭頭表示人工海水及測試藥物循環灌流之方向。(A: 心房, V: 心室, S: 閉殼肌)

結 果

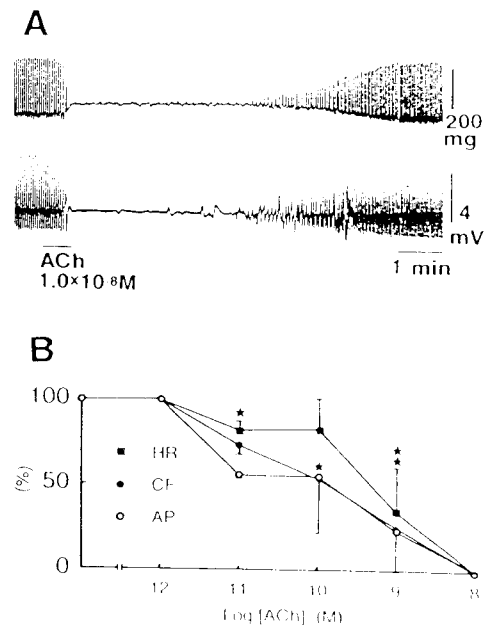
文蛤離體心臟自發性的心跳率和收縮力，隨著灌流液的溫度及文蛤的個別差異而不同。本實驗恆定溫度為 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，所得的心跳率每分鐘平均約為20次，機械張力平均約為300毫克，心肌活動電位為5mV(圖二A)。

乙醯膽素的效應

乙醯膽素對文蛤心室收縮力與心肌活動電位的抑制作用，有效濃度為 $1.0 \times 10^{-11}\text{M}$ 。以乙醯膽素($1.0 \times 10^{-8}\text{M}$)灌流時，心肌活動減弱至完全停止，機械張力及心肌活動電位均為0。以人工海水灌流洗去藥物後，心臟完全恢復正常律動(圖二A)。圖二B表示乙醯膽素對文蛤心室收縮力，心跳率與心肌活動電位，均有劑量性的藥理效應(dose response)。本結果顯示文蛤心肌與脊椎動物的心臟一樣，對乙醯膽素非常敏感， $1.0 \times 10^{-11}\text{M}$ 處理30分鐘內即出現有意義的抑制藥效， $1.0 \times 10^{-8}\text{M}$ 處理1分鐘內即出現完全性的抑制(圖二A、B)。

Carbacol是不受乙醯膽素分解酵素(acetylcholinesterase)分解的乙醯膽素擬似劑(agonist)，對M型或N型之乙醯膽素接受器均有藥效。本實驗結果證明carbacol對文蛤心肌的作用類似乙醯膽素，有效作用濃度為 $1.0 \times 10^{-10}\text{M}$ 。洗去carbacol後，心肌活動的回復均緩慢而且不完全。choline的作用類似乙醯膽素，但是

濃度必須提升到 $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ 對文蛤心肌收縮力與心肌活動電位才有抑制藥效。本結果顯示文蛤離體心肌上，確實有乙醯膽素接受器，故對於乙醯膽素及其擬似劑均有敏感的反應。



圖二、A：乙醯膽素($1.0 \times 10^{-8}\text{M}$)可逆性抑制文蛤離體心臟機械張力(上)和活動電位(下)的慢速紀錄圖。B：不同濃度的乙醯膽素對文蛤離體心臟之機械張力(CF)，活動電位(AP)和心跳率(HR)的效應。豎立短線表示標準差(n=9)。* P<0.05 ** P<0.01

乙醯膽素接受器之類型

為了檢驗文蛤心肌上的乙醯膽素接受器之類型，我們選用一些常用的乙醯膽素拮抗劑(antagonist)，灌流離體文蛤心臟，以確認接受器之類型。結果所試用之拮抗劑(濃度 $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$)對文蛤心肌收縮力與心肌活動電位均無藥效。如果先用拮抗劑灌流5分鐘，再以等濃度拮抗劑

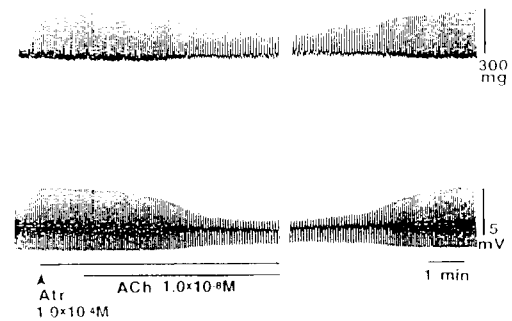
配成乙醯膽素($1.0 \times 10^{-8}M$)灌流，結果發現在處理30分鐘內，心肌活動雖然減弱，但是不會完全停止(圖三)。具有這種拮抗效應，屬於M型的藥劑有atropine和scopolamine；屬於N型的有curare和hexamethonium bromide。但是，屬於N型拮抗劑的phenyltrimethyl ammonium，則完全沒有拮抗作用。本結果顯示文蛤離體心肌上的乙醯膽素接受器，對於在脊椎動物所歸類的乙醯膽素拮抗劑，不論M型或N型均有藥效。

討 論

本實驗證明乙醯膽素對文蛤心臟的作用與一般脊椎動物相似，具有抑制心臟活動的效用。但是，文蛤心肌上的乙醯膽素接受器，與脊椎動物的接受器不同，既不屬於M型，亦不屬於N型，可能是另一種新的類型。

乙醯膽素和腎上腺素是調節脊椎動物心臟活動的主要神經化學物質。前者屬於抑制性，後者屬於促進性。但是，乙醯膽素和血清張力素分別為軟體動物心臟的抑制性和興奮性之神經化學物質(Hill, 1974, Hill and Yantorno, 1979; Irisawa *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 1993)。可見就調節心臟活動的神經化學物質而言，軟體動物與脊椎動物是有明顯的差異。

在脊椎動物組織中，膽素性接受器(cholinergic receptor)可分為M型和N型兩種。M型接受器屬於慢反



圖三、atropine對乙醯膽素抑制文蛤心臟活動的拮抗效應。先以atropine ($1.0 \times 10^{-4}M$)灌流，再以乙醯膽素灌流，30分鐘之內心肌活動仍不被乙醯膽素($1.0 \times 10^{-8}M$)完全抑制。

應型，其作用機制與鉀離子孔道(potassium ion channel)及G蛋白質(G-protein)有關；而N型接受器屬於快反應型，其作用機制與鈉，鉀離子孔道的開閉有關(Strange, 1988, Hille, 1992)。由於作用機制(mechanism)不同，故有不同的特定擬似劑及拮抗劑，可以區別接受器的類別。本實驗先以atropine、scopolamine(M型拮抗劑)，curare、hexamethonium bromide(N型拮抗劑)處理文蛤心肌均無藥效。再以乙醯膽素同時處理，發現兩型拮抗劑均有拮抗功效。因此，目前我們判定文蛤心肌上的膽素性接受器，可能既非為M型，亦非是N型。有些報告指出軟體動物心臟的乙醯膽素接

受器與脊椎動物不同。他們認為乙醯膽素對貝類心臟的抑制效應是由於氯離子的通透性改變所引起 (Irisawa *et al.*, 1973)。本實驗的結果支持Irisawa等人的看法，軟體動物心臟的乙醯膽素接受器，有可能是另一種新的類型。由於目前的結果尚不夠充足，尚需進一步的研究，才能肯定。至於有關文蛤心肌上膽素性接受器的離子通透性機制，更需日後的努力。

Carbacol對文蛤心肌具有與乙醯膽素相同的抑制效應，可見文蛤心肌上確實具有膽素性接受器。在本實驗中，carbacol處理後，心臟收縮力的回復較緩慢，此乃由於carbacol不受乙醯膽素分解酵素所分解 (Bonaventure *et al.*, 1987)，故堆積carbacol而延遲心肌回復的時間。

總之，文蛤心肌對乙醯膽素的生理反應，與脊椎動物相似，但不相同。其相異之意義是值得日後繼續探討的。

誌 謝

感謝國立臺灣師範大學生物學系黃主任的鼓勵和借用部份器材，使本實驗得以順利完成。本文承行政院國家科學委員會短期科技研究計畫 (NSC 83-0115-C-003-0005) 補助部分經費，謹此致謝。

參 考 文 獻

- Bonaventure, N., B. Jardon, N. Wioland, and G. Rudolf, 1987. Physiological effects of muscarinic vs nicotinic ACh antagonists upon ganglion cell activity in the frog retina. *Vision Res.* **27(12)**:2061-2072.
- Hill, R. B. 1974. Effects of acetylcholine on resting and action potentials and on contractile force in the ventricle of *Dolabella auriculaia*. *J. Exp. Biol.* **61**:629-637.
- Hill, R. B. and R. E. Yantorno, 1979. Inotropism and contracture of *Aplysia* ventricles as related to the action of neurohumors on resting and action potentials of molluscan hearts. *Amer. Zool.* **19**:145-162.
- Hille, B. 1992. "The nicotinic ACh receptor is a cation-permeable channel with little selectivity among cations" In: *Ionic channels of excitable membranes*. Ed. by Sinauer Associates, Inc. USA
- Irisawa H., L. A. Wilkens, and M. J. Greenberg, 1973. Increase in membrane conductance by 5-hydroxytryptamine and acetylcholine on the hearts of *Modiolus demissus demissus* and *Mytilus edulis* (Mytilidae, bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.* **45(A)**: 653-666.
- Jeng, S. S. 1975. Effects of river water pollution on the mass mortalities of cultured shellfishes along the southwest coast of Taiwan. *J. Fisheries Soc. Taiwan* **4(1)**:51-65.
- Jeng, S. S. and S. J. Chen 1975. Acute toxicities of Po-Tsu River water and the mass mortalities of cultured shellfishes. *J. Fisheries Soc. Taiwan* **4(1)**:73-83.
- Kobayashi, m. and Y. Muneoka, 1990. Structure and action of molluscan neuropeptides. *Zool. Sci.* **7**:810-814.
- Lee, C. M., J. T. Lin, and T. S. Tsai, 1993. Effects of neuroactive agents on the isolated heart activities of marine bivalve *Meretrix lusoria*. *Chinese J. Physiol.* **36(3)**: 165-170.

- Lloyd, P. E. 1986. The small cardioactive peptides: a class of modulatory neuropeptides in *Aplysia*. *Trends Neurosci.* **9**:428-431.
- Strange, P. G. 1988. The structure and mechanism of neurotransmitter receptors. *J. Bio-chem.* **249**:309-318.
- Twarog, B. M. 1988. Serotonin: history of a discovery. *Comp. Biochem. Physiol.* **91C**: 21-24.
- 林金盾、吳京一, 1980. 氯化汞急性毒害文蛤心肌之效應. 師大生物學報 **15**:9-16.
- 林金盾、張麗芬、吳京一, 1981. 半胱胺酸、二硫氫丙醇及硫代硫酸鈉對無機汞中毒之解毒研究. 生物科學 **18**:1-10.
- 李淑芬、李佳銘、林金盾, 1991. 調節文蛤心臟活動的神經遞液. 師大生物學報 **26**:34-41.

Characteristics of Ach Receptors on the Isolated Heart of Marine Bivalve *Meretrix lusoria*

Lih-Fang Fuh*, Sheau-Huey Li**, and Jin-Tun Lin**

* Chia-Nan Junior College of Pharmacy

** Department of Biology
National Taiwan Normal University

ABSTRACT

The aim of present study was to investigate the characteristics of ACh receptors on the isolated heart of a marine bivalve, *Meretrix lusoria*. The contractile force was measured by force transducer and the action potential recorded by suction electrode. The isolated heart activities were studied in response to the agonists and antagonists of ACh receptors. Results showed that both ACh and carbachol inhibited the heart activities with dose response. The threshold concentration is at $1.0 \times 10^{-8}M$. The heart activities were completely inhibited at $1.0 \times 10^{-11}M$ after 1 minute treating. Applications of antagonists of both ACh M receptors -- atropine, scopolamine and ACh N receptors -- hexamethonium bromide, curare do antagonize the inhibition of ACh on the heart activities. This study proved that the receptor type of ACh on the marine bivalve is not similar to that of vertebrates. It is neither M type nor N type and may be a new type of ACh receptors.

key words: *Meretrix lusoria*, heart, ACh, receptor