DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.030
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
442 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)05-0442-03

血管平滑肌条在磺脲受体研究中的应用

Application of vascular smooth muscle strips in the study of sulfonylurea receptors

李 军[1],张乐之[1],何华美[1],付爱玲[1],徐红梅[1],谭 娅[1],魏 斌[1],汪 海[2],肖文彬[2] (1 第三军医大学基础医学部药理学教研室,重庆 400038;2 军事医学科学院毒物药物学研究所,北京 100850)

提 要:目的 评价血管平滑肌条在研究磺脲受体结合特性中的应用。方法 对比研究[^{3}H]格列本脲(Glibenclamide, Gli)与主动脉平滑肌条和主动脉平滑肌细胞膜在不同实验条件下的特异性结合。结果 在pH 7.40的HEPES缓冲液中25 ℃孵育60 min时,3 nmol/L[^{3}H]Gli与大鼠主动脉平滑肌细胞膜特异性结合为(0.5±0.2) fmol/mg,3 nmol/L[^{3}H]Gli在pH 6.00~8.50,特异性结合为(16.8~19.2) fmol/mg湿重;在2~8 mg,特异性结合量与主动脉条湿重呈线性关系;在4~25 ℃范围内特异性结合随温度增加而增加。[^{3}H]Gli与主动脉平滑肌条结合反应的平衡时间为60 min,其特异性结合的变异系数较与主动脉平滑肌细胞膜特异性结合的变异系数小。结论 利用主动脉平滑肌条代替平滑肌细胞膜研究血管平滑肌磺脲受体的结合特性简便、快速、重复性好、节省动物。

磺脲受体(Sulfonylurea receptors, SURs)隶属ATP结合蛋白家族,是ATP敏感性钾通道(ATP sensitive K^+ channels, KATP)的调节亚单位[1]。KATP广泛分布于心脏、骨骼肌、胰腺、神经元和血管平滑肌等多种组织,在生理和病理条件下起着重要作用[2,3]。例如:分布于血管平滑肌的KATP参与调节血管张力[4]。由于SURs亚型的多样性,为我们寻找组织高选择性KATP调节剂提供了可能。目前认为钾通道开放剂和阻断剂先与SURs结合,然后通过SURs产生调节作用[5]。因此,研究SURs在不同组织的结合特性对合成筛选新药具有重要意义。格列本脲(Glibenclamide, Gli)是SURs的特异性阻断剂,是研究SURs的常用工具药。近年,人们对心肌、骨骼肌、胰腺、肾脏和脑组织SURs与[^{3}H]Gli的结合特性已进行了深入研究[6]。由于血管的组织学特点,制备组织匀浆常常存在困难,而且操作程序复杂,需要消耗大量动物,大大限制了血管平滑肌SURs结合特性的研究。本研究探讨用血管平滑肌条进行[^{3}H]Gli结合实验的方法。

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar大鼠,雄性,体质量(235±21) g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂和溶液

[^{3}H]Gli(比活性50.0 Ci/mmol)系美国Dupont公司产品;非标记Gli、ATP、苯甲基磺酰氟、抑胃酶肽、苯丁抑制素、Tris系Sigma公司产品,HEPES系Boehringer Mannheim产品。

1.3 主动脉平滑肌条的制备

大鼠断头处死后迅速取出主动脉,置于冰冷的10 mmol/L HEPES缓冲的生理盐溶液,小心分离剪去外膜及微小管分支,除去血迹,然后将各血管剪成长约3~5 mm,湿重约3~5 mg的环,剪开,吸去水分,并用湿棉签擦去血管内皮,称重后加入含缓冲液的反应管中。

1.4 血管平滑肌膜的制备

按1.3的方法分离主动脉并去除血管内皮,血管平滑肌条剪碎后置于约10倍体积的冷缓冲液(Tris、HEPES、或PBS)中,冰浴下先后用内切式金属匀浆器和聚氟乙烯-玻璃匀浆器匀浆(7 000和6 000 r/min,20 s,3次)。所得匀浆先以1 000× g 低温离心15 min,上清液再以40 000× g 低温离心20 min,弃上清,沉淀物在同样条件下第3次离心后,再溶于同一缓冲液中,得到平滑肌膜蛋白标本。膜蛋白定量用Lowry法,蛋白浓度稀释至2 mg/ml。

1.5 [^{3}H]Gli与主动脉平滑肌条的特异性结合测定

测定总结合时,3 nmol/L[^{3}H]Gli分别与不同湿重的主动脉平滑肌条,在不同pH的HEPES缓冲液和不同温度,孵育不同时间,孵育毕,加入9 ml冰冷的Quench溶液终止反应,浸洗1 min后取出标本,吸干水分,转入闪烁瓶中,然后依次加入50 μl 60%高氯酸和100 μl 36%双氧水,于80 ℃密闭消化2 h,冷却后依次加入乙二醇乙醚2.5 ml,含1% B-BPD(2-4-叔丁基苯-1-3.4-二唑)的二甲苯闪烁液5 ml,静置8 h后,液闪计数测定CPM。测定非特异性结合时各反应管中分别加入非标记格列本脲10 μmol/L。主动脉平滑肌条的特异性结合由总结合减去非特异性结合得到。

1.6 统计学处理

采用 t 检验和直线相关分析。

2 结果

2.1 [^{3}H]Gli与主动脉平滑肌细胞膜的特异性结合

2.1.1 膜标本在不同缓冲液中的特异性结合 在pH 7.40

作者简介:李 军(1970—),女,四川省简阳市人,实验师,主要从事分子药理学方面的研究。电话:(023)68752265

收稿日期:2001-09-29;修回日期:2002-07-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的 Tris-HCl、HEPES 和 PBS 3 种不同的缓冲液中, [^{3}H] Gli 与大鼠主动脉平滑肌细胞膜标本 25 ℃孵育 60 min 时的特异性结合分别为总结合的 8.3%, 8.8%和 7.4%, 各组特异性结合无明显差别。

2.1.2　温度和 pH 对膜标本特异性结合的影响　　于 pH 7.40 的 HEPES 缓冲液中 25 ℃孵育 120 min, [^{3}H] Gli 与大鼠主动脉平滑肌细胞膜标本的总结合和非特异性结合均较 4 ℃时明显增加。pH 7.40 时[^{3}H] Gli 与大鼠主动脉平滑肌细胞膜标本于 HEPES 缓冲液中 25 ℃孵育 120 min, 其总结合和非特异性结合均较 pH 4.0 时明显减少。相比较, [^{3}H] Gli 与大鼠主动脉平滑肌细胞膜标本在 pH 7.40 的 HEPES 缓冲液中 25 ℃孵育 60 min 时的特异性结合与 25 ℃或 37 ℃孵育 120 min 时无显著差别。

2.2　[^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条的特异性结合

2.2.1　缓冲液 pH 对特异性结合的影响　　3 nmol/L [^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条在 HEPES 缓冲液中 25 ℃孵育 60 min 时, 在 pH 6.00~8.50, [^{3}H] Gli 的特异性结合为 16.8~19.2 fmol/mg 湿重, 占总结合的 56%~62%, 特异性结合量不受 pH 变化的影响, 但 pH 低于 6.00 时, 特异性结合量随 pH 降低而增加, 见图 1。

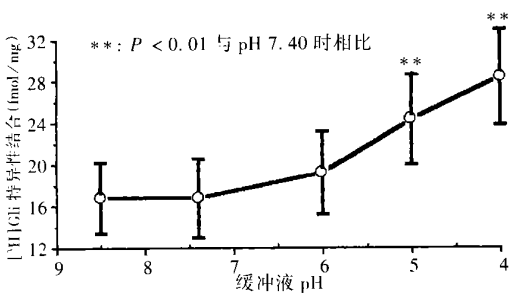


图 1　缓冲液 pH 变化与大鼠主动脉平滑肌条[^{3}H] Gli 特异性结合的关系(n=4)

2.2.2　主动脉条湿重对特异性结合的影响　　在 2~8 mg, 3 nmol/L[^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条在 pH 7.40 的 HEPES 缓冲液中于 25 ℃孵育 60 min 时, 其特异性结合与主动脉条湿重呈线性关系, 相关系数 r=0.993, P<0.01。

2.2.3　孵育温度对特异性结合的影响　　[^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条在 HEPES 缓冲液(pH 7.40)中孵育时, 在 4~25 ℃ 3 nmol/L[^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条的特异性结合随温度增加而增加, 但在 25~37 ℃, [^{3}H] Gli 的结合不再随温度增加而明显增加。

2.2.4　特异性结合的时间依赖性　　在 25 ℃及 37 ℃孵育条件下, [^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条在 HEPES 缓冲液(pH 7.40)中孵育时, 结合反应较快, 特异性结合达最大反应一半的时间分别为(9.4±1.6) min 和(8.6±1.3)min, 结合反应的平衡时间为 60 min。

2.3　精确性实验

在 25 ℃, pH 7.40 的 HEPES 缓冲液中测定 3 nmol/L[^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条和主动脉平滑肌细胞膜标本特异性结合的批内和批间变异系数, 结果表明用主动脉平滑肌条代替平滑肌细胞膜标本研究[^{3}H] Gli 与血管平滑肌磺脲受体特异性结合的批内变异系数降低 27.6%, 批间变异系数降低 42.4%, 见表 1。

表 1　[^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条和平滑肌细胞膜标本特异性结合的变异系数

变异来源	主动脉平滑肌条			主动脉平滑肌膜		
	n	特异性结合(fmol/mg)	变异系数	n	特异性结合(fmol/mg)	变异系数
批内变异	6	17.4±3.6	0.21	5	0.7±0.2	0.29
批间变异	5	16.2±3.1	0.19	4	0.6±0.2	0.33

3　讨论

在心肌、胰腺、肾脏和脑组织, 利用细胞膜标本容易检测到[^{3}H] Gli 与磺脲受体的特异性结合, 特异性结合量一般为总结合量的 60%~83%[6~10]。但在大鼠主动脉, 利用平滑肌细胞膜标本却难检测到[^{3}H] Gli 与磺脲受体的特异性结合[10]。本实验比较研究了 [^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌细胞膜标本和主动脉平滑肌条的结合特性。在 HEPES 缓冲液(pH 7.40), 25 ℃孵育 60 min, [^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌细胞膜标本特异性结合为总结合的 10.3%, 特异性结合量明显低于[^{3}H] Gli 与心肌、胰腺、肾脏和脑组织细胞膜标本的结合。在大鼠主动脉平滑肌细胞膜标本, [^{3}H] Gli 与磺脲受体特异性结合降低的原因可能是: ①膜标本制备过程使磺脲受体发生了变性; ②[^{3}H] Gli 结合所必须的胞浆因子丧失; ③磺脲受体的胞浆环境丧失。

在 pH 6.00~8.50 HEPES 缓冲液, 25 ℃孵育 60 min 时, [^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条的特异性结合为总结合的 56%~62%, 较在主动脉平滑肌细胞膜标本的特异性结合增加 5~6 倍。显然, 应用大鼠主动脉平滑肌条代替平滑肌细胞膜标本明显增加[^{3}H] Gli 与磺脲受体的特异性结合。关于[^{3}H] Gli 与主动脉平滑肌条结合反应的温度, 由于在 25~37 ℃, 特异性结合量不随温度升高而明显增加, 故而认为进行结合反应的温度可在此范围内选择。选择 25 ℃可在室温下进行实验, 选择 37 ℃可使反应温度近似生理状态。关于结合反应的 pH, 尽管 pH 低于 6.0 时特异性结合量较 pH7.40 时明显增加, 但前者见于酸中毒, 后者属生理状态。故而在研究正常动物的血管平滑肌标本时 pH 选择 7.40 为宜。关于结合反应的时间, 如进行饱和实验、竞争结合实验和解离动力学实验, 反应时间应不少于 60 min, 否则结合反应达不到平衡状态。关于组织湿重, 由于在 2~8 mg, 主动脉平滑肌条湿重与特异性结合呈线性关系, 因此从理论上讲, 在此范围内选择任何湿重的主动脉平滑肌条进行实验均是可行的。但是, 选择较大湿重的主动脉平滑肌条会造成动物浪费, 而选择较少湿重的主动脉平滑肌条则可节省动物。

至今为止, 在所有组织的细胞膜标本测定的[^{3}H] Gli 与磺脲受体的特异性结合量的变异均较大, 本研究用主动脉平滑肌条和平滑肌细胞膜标本测定的结果也

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

不例外。我们比较了用主动脉平滑肌条和平滑肌细胞膜标本测定[^{3}H] Gli 与磺脲受体特异性结合的批内和批间变异，结果表明，用主动脉平滑肌条测定 [^{3}H] Gli 与磺脲受体特异性结合的批内和批间变异系数均较用平滑肌细胞膜标本测定时小，可重复性较好。

综上所述，利用主动脉平滑肌条代替平滑肌细胞膜标本研究血管平滑肌磺脲受体简便、快速、重复性好、节省动物，避免了在细胞膜标本制备过程中因匀浆离心等破坏磺脲受体的生理性质和生理环境，从而增加特异性结合量，因而值得推广应用。

关键词：磺脲受体；格列本脲；主动脉；平滑肌细胞；特异性结合

中图法分类号：R322.12，R962　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Inagaki N, Gonoi T, Clement I V J P, *et al*. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor[J]. Science, 1995, 270(5239): 1166－1170.

[2] Ashcroft S J, Ashcroft F M. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels[J]. Cell Signal, 1990, 2(3): 197－214.

[3] Ashcroft F M, Gribble F M. ATP-sensitive K^+ channels in health and disease[J]. Diabetologia, 1999, 42(8): 903－919.

[4] Jackson W F. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels[J]. Am J Physiol, 1993, 265(5Pt2): H1797－H1803.

[5] Inagaki N, Gonoi T, Clement I V J P, *et al*. Family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive potassium channels[J]. Neuron, 1996, 16(5): 1011－1017.

[6] Gopalakrishnan M, Johnson D E, Janis R A, *et al*. Characterization of binding of the ATP-sensitive potassium channel ligand, [^{3}H] glyburide, to neuronal and muscle preparations[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 257(3): 1162－1171.

[7] Giannaccini G, Lupi R, Trincavelli M L, *et al*. Characterization of sulfonylurea receptors in isolated human pancreatic islets[J]. J Cell Biochem, 1998, 71(2): 182－188.

[8] Quast U. ATP-sensitive K^+ channels in the kidney[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1996, 354(3): 213－225.

[9] Metzger F, Loffler C, Quast U. Sulphonylurea binding in rat isolated glomeruli: pharmacological characterization and dependence on cell metabolism and cytoskeleton[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997, 355(2): 141－149.

[10] Yamashita T, Masuda Y, Tanaka S. The effects of potassium channel openers and blockers on the specific binding sites for [^{3}H] glibenclamide in rat tissues[J]. Jpn J Pharmacol, 1995, 67(1): 35－44.

（编辑　张大春）

技术方法

文章编号：1000-5404(2003)05-0444-02

铝合金牙弓夹板的阳极氧化表面改性研究

The surface modification of the dental aluminum alloy splint by anodic oxidation

邵　方[1]，李明春[1]，杨　军[2]　（第三军医大学：[1] 基础医学部化学教研室；[2] 附属西南医院口腔科，重庆 400038）

提　要：目的　通过对铝合金牙弓夹板进行阳极氧化表面改性，以增强其耐蚀性。方法　采用硫酸阳极氧化法对铝合金牙弓夹板进行表面氧化处理；以失重法对比分析实验组与对照组试样在酸蚀液、碱蚀液、盐液、人工唾液中的腐蚀情况，并结合微波等离子体炬原子发射光谱技术检测人工唾液中铝的析出量，以评价阳极氧化处理对提高铝合金牙弓夹板耐蚀性的作用。结果　铝合金牙弓夹板经过阳极氧化处理后，表面生成一层致密的浅灰色水合氧化铝膜，使其在酸蚀液、碱蚀液、人工唾液中的腐蚀速度显著下降，人工唾液中铝的析出量显著降低。结论　阳极氧化处理能显著提高铝合金牙弓夹板的耐蚀性。

牙科用合金在口腔环境中的腐蚀已引起重视[1]。铝合金因具有高的强度/重量比、柔韧性好、易成型加工等特点，被普遍用于颌骨骨折与松牙固定（牙弓夹板）。尽管铝及其合金表面极易生成一层极薄的氧化膜，但该膜疏松多孔，抗蚀能力不强。如何增加铝合金材料的耐腐蚀性，降低铝离子析出，提高其生物相容性是迫切需要解决的问题。铝合金的阳极氧化被广泛用于工业铝材的防腐和表面装饰[2]，但未见用于牙弓夹板表面处理的文献报道。本文采用电化学阳极氧化技术对铝合金牙弓夹板进行表面氧化改性处理，并采用失重法与微波等离子体炬原子发射光谱法研究了阳极氧化膜的耐蚀性能。

1　材料和方法

1.1　试样材料及试剂

铝合金牙弓夹板（LD_7 铝合金，单根表面积 S_A 为 8.5 cm^2），为中国人民解放军成都军区总医院提供。铝国家标准溶液：

作者简介：邵　方（1963－），男，河南省南阳市人，硕士，副教授，主要从事生物电化学方面的研究，发表论文 19 篇。电话：(023)68752216

收稿日期：2001-11-28；修回日期：2002-03-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net