DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.023

WKY大鼠与 SHR血管平滑肌神经肽 Y受体数量及其亲和力的对照研究

曾春雨* 刘光耀 周 勇 王宝文 程绍钧** 张广运** (第三军医大学附属大坪医院心血管内科)重庆, 400042

提 要 目的: 了解 Wistar-Kyoto大鼠 (Wistar-Kyoto rats, WKY)、自发性高血压大鼠 (Spontaneously hypertensive rats, SHR)血管平滑肌细胞 (Vascular smooth muscle cells, VSMC)上神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY)受体的表达水平及其差异。方法: 应用 Iodogen法对 NPY受体进行了测定。结果: NPY蛋白质标记率为 70%,比活度为 3.36 MBq/μg VSMC在 (1.0~5.0)×10⁶细胞/ml的范围内, ^{125}I-NPY的特异性结合量与 VSMC细胞数之间呈线性关系; SHR的 NPY受体最大结合量 (Bmax)和受体复合物解离常数 (Kd)均明显高于 WKY,相关分析显示 Bmax, Kd与血压增高程度呈正相关。结论: NPY受体数目和亲和力的增加可能在高血压的发病机制中占有重要的地位。

关键词 神经肽 Y受体;大鼠近交 WKY血管平滑肌;大鼠,近交 SHR
中图法分类号 R392.11

神经肽 Y是一种含有 36个氨基酸的多肽,它广泛地分布于中枢神经系统和外周多种组织器官,无论测定高血压病人或是自发性高血压大鼠血中 NPY含量均明显升高,提示 NPY可能在高血压的发病机制中占有一定的地位[1],离体动脉血管内灌注 NPY可以产生强有力的、长时间的收缩血管作用,这种作用不被 α、β受体阻滞剂所阻断,提示有 NPY受体存在于动脉血管中[2],并且放射自显影技术已证实了 VSMC上确有 NPY受体存在[3]。但对于 VSMC上的定量情况目前尚缺乏研究,本实验利用 Iodogen法对 NPY进行 ^{125}I标记,以 ^{125}I-NPY作为放射性配基,测定 NPY受体在 SHR WKY的 VSMC上的分布情况,并进行对比研究,探讨 NPY受体在高血压发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Na-^{125}I为中国原子能科学研究所产品; NPY购自 Sigma公司; RPMI-1640培养基为 GIBCO-BRL公司产品; Actin单克隆抗体购自宝灵曼公司; SHR WKY由中国医学科学院阜外医院动物所提供 (动物编号 9308R021),雌雄各半,每组 10只,两组动物体重差异不显著 ($P > 0.05$), SHR的血压明显高于 WKY ($P < 0.01$)。

1.2 NPY的 ^{125}I 标记

按照我科实验室建立的 NPY ^{125}I标记法进行[4]。Iodogen 1 mg溶于 2 ml氯仿中,取该溶液 0.1 ml加入水平底试管中,旋转试管使溶液包被试管内壁,然后用 N_2吹干。向试管中加入 NPY标准品 10 nmol、5 mCi Na^{125}I、PBS液 40 ml (pH7.4 0.1 mol/L),混匀,24℃下反应 5 min,不断搅拌, 150μl PBS液终止反应。反应完毕后反应液加入已有 5% BSA 200μl的试管中,混匀,上 Sep-Pak C18柱,用 0.027 mol/L甲酸 (内含 0.2% BSA 0.02%叠氮钠)洗脱,定量分管收集洗脱液,测定洗脱液放射性,绘制洗脱曲线,计算蛋白标记率和比活度。

表 1 大鼠的一般状况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of general characteristics of rats ($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Weight (g)	Systolic blood pressure (mmHg△)
SHR	257.67±47.23	217±10**△
WKY	243.40±34.21	141±6△

△: 1 mmHg = 0.133 kPa; ** : $P < 0.01$ *vs* WKY

1.3 VSMC的消化、分离及培养

常规大鼠麻醉后剖腹取出主动脉,按照我科高血压实验室建立的复合胶原酶消化、分离、收集 VSMC[5],用 10%小牛血清培养液调整细胞密度为 1×10⁵/ml,将调整后的细胞悬液接种于培养瓶内,置 37℃、5% CO_2培养箱内培养,培养后的 VSMC用免疫组化、透射电镜鉴定。

1.4 VSMC上 NPY受体的放射配基结合法测定

收集培养的 VSMC, 4℃ 1000 r/min离心 30 min,用 RMPI 1640培养液调整细胞数为 1.5×10⁶/ml,取 1 ml此悬液分别与 (0.1~1.5)×10⁻⁹ mol/L的 ^{125}I-NPY混合,非特异管加入 1×10⁻⁶ mol/L NPY,混合物于 37℃下水浴 30 min,冰浴停止反应,离心沉淀细胞,用 D-Hanks液洗涤 3~4次,检测沉淀细胞的放射计数。

* 曾春雨,男, 29岁,主治医师,硕士
** 医学检验系核医学教研室 重庆, 400038

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

1.5 数据处理

所有数据行非线性最小二次方曲线拟合。

^{125}I-NPY特异性结合是由总结合(TB)减去非特异性结合(NSB)所得。Scatchard作图,求受体的Bmax和Kd

2 结果

2.1 VSMC的培养

VSMC在相差显微镜、普通显微镜下呈梭形,长条或椭圆形,胞质密度高,不透明,有数个或一个核仁位于中央。用Actin单克隆抗体进行特异的免疫组化染色,在光镜下仍呈梭形或长条形,胞质染色呈棕色,Actin染色阳性是VSMC的特征之一。透射电镜下可以见到一个细胞核,核膜有切迹,胞质中充满肌丝,核的两端无肌丝,胞膜下有密斑,胞质内有密体。

2.2 VSMC上NPY受体的测定

SHR的Bmax和Kd均明显高于WKY(Bmax: 456172±3607位点/细胞 *vs* 176059±6951位点/细胞, t = 113.11, P < 0.01; Kd: 37.22±4.22 *vs* 19.91±2.54, t = 11.11, P < 0.01)。相关分析显示Bmax、Kd与血压增高程度正相关(r = 0.747, P < 0.01; r = 0.580, P < 0.05)。

3 讨论

^{125}I标记NPY有Iodogen法和氧胺T法等,Iodogen为固相氧化剂,使水溶性的I蛋白质快速碘化,具有标记率高、反应体积小以及生物活性损失小等优点,越来越被人们所接受。我们的实验结果显示,Iodogen法标记的^{125}I-NPY经分离后具有较好的生物活性、稳定性和放化纯度,可作为放射配基用于受体结合分析。

对测定方法的检测:① 测定结果的准确性。将同一份样品的VSMC悬液分成四份,同时测定其与^{125}I-NPY的结合,10次实验结果的CV为4.33%±1.54%,表明该方法重复性好、准确度高。② 将VSMC悬液浓度调成不同浓度[(0.5~5.0)×10^6细胞/ml],加入等量的^{125}I-NPY,测定其特异结合量与细胞数间呈线性关系(r = 0.853, P < 0.01, n = 6),换算成每个细胞的结合位点,其数量基本相同,提示测定结果不受吸附于容器上的放射性影响。

原发性高血压的发病机制目前尚不甚明了。已发现NPY可能通过收缩血管、增强缩血管物质的作用、减轻舒血管物质的作用、促进VSMC增殖等几种途径而参与原发性高血压的发病机制[6],NPY在原发性高血压病中的作用已逐渐得到承认,但关于原发性高血压时NPY相应受体的情况则缺乏研究,本实验利用放射配基结合分析法测定了VSMC上NPY受体的分布情况,发现SHR VSMC上NPY受体无论最大结合容量和亲和力均高于WKY,相关分析显示Bmax、Kd与血压增高程度呈正相关,此结果难以用血中NPY变化同种调节NPY受体解释,说明可能是因为SHR NPY受体相应基因异常使NPY受体蛋白翻译水平提高所致,也进一步说明了NPY受体Bmax、Kd的增加可能在高血压的发病中占有一定地位。

参考文献

1 Howe P R, Rogers P F, Morris M J, *et al*. Plasma catecholamine and neuropeptide Y as indices of sympathetic nerve activity in normotensive and stroke spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol, 1986, 8(6): 113
2 Maclean M R, Hiley C R. Effect of neuropeptide Y on cardiac output, its distribution, regional blood flow and organ vascular resistance in the pithed rat. Brit J Pharmacol, 1990, 99(2): 340
3 Sheikh S P, Roach E, Fuhendorff J, *et al*. Localizaton of Y_1 receptors for NPY and PYY on vascular smooth muscle cells in rat pancreas. Am J Physiol, 1991, 260(23): G250
4 曾春雨,刘光耀,王旭开,等.神经肽Y放免方法的建立.第三军医大学学报,1997,19(5):478
5 王旭开,刘光耀,杨成明,等.复合胶原酶法分离人血管平滑肌细胞的新方法.第三军医大学学报,1993,15(4):357
6 McDermott B J, Millar B C, Piper H M. Cardiovascular effects of neuropeptide Y: receptor interaction and cellular mechanism. Cardiovasc Res, 1993, 27(6): 893

(收稿: 1997-12-22;修回: 1998-09-17)
(编辑 冯崇英)

A contrastive study on changes number and maximal binding capacity of neuropeptide Y receptors on vascular smooth muscle cells between spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats

Zeng Chunyu, Liu Guangyao, Zhou Yong, Wang Baowen, Cheng Shaojun, Zhang Guangyun (Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the expression of neuropeptide Y (NPY) receptors on vascular

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

smooth muscle cells (VSMCs) in spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKR) and determine the difference between the two kinds of rats. **Methods:** NPY was radioiodinated with Na125 I by means of Iodogen method and NPY receptors were detected with radioligand binding assay. **Results:** The labeling rate of NPY was 70% and the specific radioactivity of ^{125}I-NPY was 33.67 MBq/(g. When the density of VSMCs was in the range of 1~ 5× 10^6 cells/ml, the number of VSMCs was closely related with ^{125}I-NPY binding quantity. The maximal binding capacity (Bmax) and equilibrium dissociation contant (Kd) were significantly higher in SHR than in WYR. These two parameters were positively correlated to the increment of blood pressure. **Conclusion:** The increase in number and Bmax of NPY receptors might play an important role in pathogenesis of hypertension.

Key words neuropeptide Y receptor; vascular smooth muscle; rats, inbred WKY; rats, inbred SHR

(上接 208页)

2.3 注意事项

2.3.1 患者取平卧位,暴露热敷部位,避免受凉。

2.3.2 热敷部位垫一毛巾,以防烫伤皮肤。

2.3.3 热敷过程中如药包冷却,可再行热蒸。

2.3.4 在药包上盖一塑料薄膜,使药包热度保持时间较长。

3 疗效判断标准[1]及治疗结果

温经活血通络方对所有病例全部有效。

3.1 痊愈

5例。泄泻症状消失,大便成形,每日 1~ 2次;中医证候的主症、次症消失,舌苔基本恢复正常,与泄泻相关的疾病其相应的客观指标证实确有显著改善。

3.2 显效

3例。大例次数每日 2~ 3次,近似成形,或便溏而每日仅 1次,中医证候的主症、次症改善程度在 2级以上(卅~ +),与泄泻相关的西医疾病其相应的客观指标已接近正常。

3.3 有效

1例。大便次数和质地、中医证候的主症、次症均有好转,与泄泻相关的西医疾病其相应的客观指标有好转。

3.4 无效

症状无改善或有加重,与泄泻相关的疾病及其相应的客观指标均无改善。

4 讨论

泄泻首载于《内经》。《素问·气交变大论》记有“鹜溏”、“飧泄”、“濡泻”、“注下”等病名。脾主运化,胃主受纳。长期饮食失调、或劳倦内伤、或久病缠绵,均可导致脾胃虚弱,不能受纳水谷和运化精微,致水反为湿,谷反为滞,湿滞内停,清浊不分,混杂而下,遂成泄泻。脾阳不振,运化失常,则饮食减少,脘闷不舒,稍进油腻食物则大便次数增多。久泻不止,脾胃虚弱,气血化源不足,故面色萎黄、肢倦乏力。脾阳虚衰,阴寒内盛,则手足不温,喜热畏寒。久泻不愈,中气下陷,则见脱肛。脾气虚无力推动血行可见血瘀之证。舌淡胖或有齿印、苔薄白、脉细弱为脾胃虚弱之征象。治以健脾益气为法。

国内学者认为微循环障碍是慢性腹泻的基本病理变化,其中免疫功能低下和自身免疫反应是发病的重要原因。有医者[2,3]在辨证基础上加用活血化瘀方药内服和/或灌汤治疗慢性腹泻,取得了满意疗效。活血化瘀方药不仅能直接改善微循环,促进炎症吸收和组织修复,还能通过影响免疫系统而达到增强抗炎和调节免疫功能作用。

温经活血通络方是由散寒通络、活血化瘀、消炎止痛、运行气血的中药组成。药物热敷具有温经通络、行气活血、祛湿逐寒、防病保健作用。“经脉所通,主治所及”。所敷部位中、下腹部为任脉和足阳明胃经经脉循行部位,两经脉腧穴均可治胃肠病。神阙穴具有温阳补虚、化寒湿积滞功效,关元、气海穴具有强壮作用,均为保健要穴,可益气固本、止泻、调节人体免疫机能;天枢穴可调胃肠、理气血、消食化滞。通过药物局部热敷透过皮肤毛孔吸收,作用于经络腧穴,益气健脾、逐湿祛寒、温经通络、行气活血,故可起到治疗作用。

温经活血通络中药腹部外敷用于脾虚泄泻患者,治愈率高,疗效好,方法简便易行,目前尚未发现毒副作用,且价格低廉,易被患者接受,是治疗脾虚泄泻的一种较好的方法。

关键词　泄泻;脾虚;外治法

中图法分类号　R244.9

参考文献

1 中华人民共和国卫生部.中药新药治疗泄泻的临床研究指导原则.中药新药临床研究指导原则(第 1辑),1993.126~ 130

2 许成群.活血化瘀治疗慢性结肠炎机理探讨.贵阳中医学院学报,1994,16(3):17

3 张荣华,洪多伦,艾九松.中药内服及灌肠治疗溃疡性结肠炎 86例.湖北中医杂志,1997,19(1):8

(收稿:1998-09-15;修回:1998-11-06)

(编辑　张大春)

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