DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.019

内毒素对大鼠肝、肠内皮素受体的影响*

刘宝华** 文亚渊 陈惠孙 王代科 周继红 肖 南 (第三军医大学附属大坪医院普通外科)重庆,400042

提 要 目的:探讨内毒素对大鼠肝、肠组织内皮素受体(ETR)活性变化及内皮素 A型受体 mRNA转录表达的影响。方法:选用 Wistar大鼠30只,分为对照组、内毒素组。自左股静脉给予10 mg/kg内毒素,观察了伤后3、6、12、24 h 4个时相点肝、肠组织 ETR活性和内皮素 A型受体 mRNA相对含量。结果:肝、肠组织 ETR的解离常数无明显变化,最大结合数伤后3 h明显降低,持续24 h;内皮素 A型受体 mRNA相对含量均高于对照组。结论:内毒素能使肝、肠细胞膜表面 ETR的最大结合数目降低;并在转录和翻译水平使内皮素 A型受体合成增加。

关键词 内毒素;肝;肠;内皮素;受体

中图法分类号 R392.11

内皮素(Endothelins, ETs)具有强烈而持久的缩血管效应,血管平滑肌细胞是 ETs作用的主要靶细胞,几乎全身所有血管平滑肌细胞均含有内皮素受体(Endothelin receptor, ETR)[1]。目前研究表明,ETR有3种亚型,分别为 ET_A、ET_B和 ET_C受体。ET_A受体为内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)选择性受体,主要分布于血管平滑肌细胞,参与血管收缩[2]。本实验旨在观察内毒素血症时大鼠肝、肠 ETR的活性变化,ET_A受体 mRNA的转录表达,初步探讨 ETR在内毒素血症时的变化机理,并了解 ETR在肝、肠损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌内毒素(O_{111}: B_4)、猪内皮素-1(Porcine endothelin-1)购自美国 Sigma公司。^{125}I-ET-1由中国原子能研究院同位素研究所标记。ET_A受体 cDNA由日本国 Ihara教授惠赠。地高辛标记药盒购自德国宝灵曼公司。

1.2 动物分组及处理

取 Wistar大鼠30只,分为对照组6只,内毒素组的各时相点各6只。10 mg/kg内毒自股静脉注入,分别于伤后3、6、12和24 h取肝右叶组织、小肠组织,测定肝、肠组织 ETR的活性和 ET_A受体 mRNA的相对含量。对照组自股静脉给予生理盐水。

1.3 肝、肠细胞膜制备[3]及受体结合实验

取0.2 g肝、肠组织加2 ml含1 nmol/L EDTA的0.25 mol/L蔗糖溶液,充分匀浆后,4℃、10000× g离心10 min,取上清。4℃、100000× g离心1 h,弃上清,沉淀溶于200 μl含1 nmol/L EDTA的0.25 mol/L蔗糖溶液,-70℃保存备用。测定前调蛋白浓度为1 mg/ml。^{125}I-ET-1按递减浓度加样,分别为4.8、2.4、1.2、0.6、0.3、0.15和0.075 nmol/L,终浓度分别为1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05和0.025 nmol/L。加样后混匀,4℃反应24 h,加入含1 nM EDTA的0.25 mol/L蔗糖冷溶液终止反应。4℃,80000× g离心30 min,弃上清,沉淀在γ计数仪上计数。计算受体的特异性结合数,根据 Scatchard作图,利用直线回归方程求出受体最大结合数(Bmax)和解离常数(KD)。

1.4 RNA提取及斑点杂交

采用异硫氰酸胍小量快速提取肝、肠组织总 RNA,严格按照文献[4]行斑点杂交。杂交结果扫描进入计算机,测定灰度积分,以标准品为对照进行计算。

1.5 实验数据统计分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 Student's t 检验统计分析。

2 结果

2.1 肝、肠组织 ETR活性变化

图1为正常肝组织 ETR的 ^{125}I-ET-1的饱和曲线和 Scatchard作图。正常肝组织 ETR的 Bmax为1.0288 pmol/mg·P, KD为0.0328 nmol/L。图2为正常肠组织 ETR的 ^{125}I-ET-1的饱和曲线和 Scatchard作图。正常肠组织 ETR的 Bmax为1.2303 pmol/mg·P, KD为0.1263 nmol/L。给予内毒素后,随时间延长,肝、肠组织 ETR的 Bmax逐渐减少,3 h已明显低于

* 全军重点实验室课题

** 刘宝华,男,40岁,副教授,副主任医师,博士

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

对照组（$P < 0.01$或0.05），24 h仍明显降低（$P < 0.01$）。肝、肠组织ETR的KD值均无明显变化（$P > 0.05$）。见表1

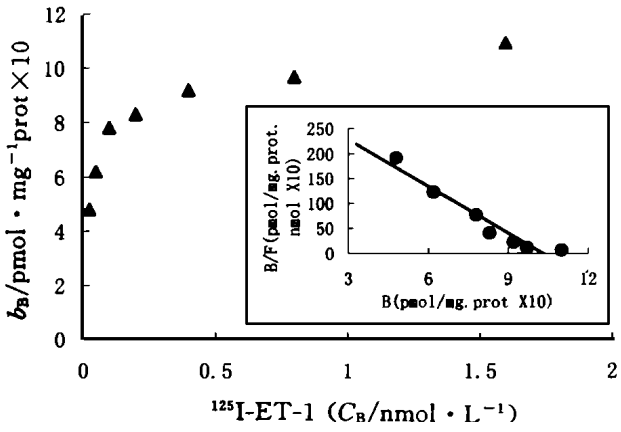


图1 正常肝组织ETR的^{125}I-ET-1的饱和曲线和Scatchard作图

Fig 1 Specific binding of ^{125}I-ET-1 on liver hemogenates and corresponding Scatchard plot for normal rats KD= 0.0328 nmol Bmax = 1.0288 pmol/mg

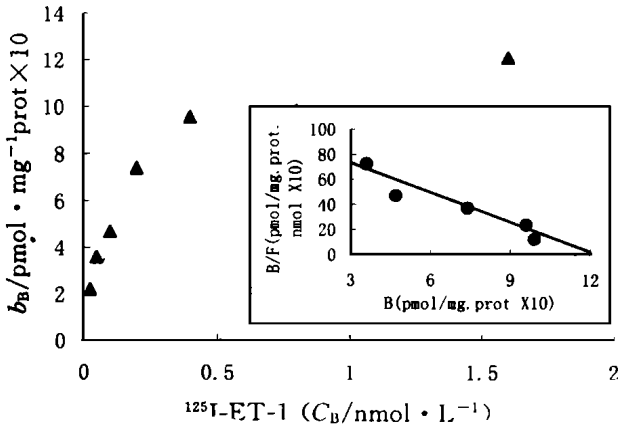


图2 正常肠组织ETR的^{125}I-ET-1的饱和曲线和Scatchard作图

Fig 2 Specific binding of ^{125}I-ET-1 on intestine hemogenates and corresponding Scatchard plot for normal rats KD= 0.1263nmol Bmax= 1.2303 pmol/mg

表1 内毒素对大鼠肝，肠ETR的影响

Tab 1 Effect of endotoxin on hepatic and intestinal ETR of rat

	Control	Endotoxin group (t/h)			
		3	6	12	24
Liver					
Bmax (b_B/pmol·mg^{-1}P)	0.9969±0.0155	0.7476±0.0356**	0.5590±0.0219	0.4258±0.0156**	0.5826±0.0586**
KD(C_B/nmol·L^{-1})	0.0328±0.0018	0.0338±0.0016	0.0332±0.0014	0.0324±0.0010	0.0333±0.0017
Intestine					
Bmax (b_B/pmol·mg^{-1}P)	1.2950±0.2070	0.8810±0.1026*	0.6340±0.2109**	0.5199±0.2260**	0.6226±0.2120**
KD(C_B/nmol·L^{-1})	0.1309±0.0183	0.1344±0.0140	0.1181±0.0173	0.1281±0.0173	0.1260±0.0169

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$ *vs* control group

2.2 肝、肠组织ET_A受体mRNA相对含量

内毒素组肝组织ET_A受体mRNA相对含量在伤后3 h较对照组显著增加（$P < 0.01$）；6、12 h增加更加明显，24 h仍持续升高（$P < 0.05$），见表2。给予内毒素后，与肝组织相比，肠组织ET_A受体mRNA量增加的幅度相对较小；但正常肠组织ET_A受体mRNA量相对高于肝组织，见表2

表2 内毒素对大鼠肝、肠ET_A受体mRNA相对含量的影响（μg DNA/g RNA）

Tab 2 Effect of endotoxin on ralitive quantity of hepatic and intestinal ET_A receptor mRNA(μg DNA/g RNA)

	Control	Endotoxin group (t/h)			
		3	6	12	24
Liver	17.13±2.11	57.96±11.51**	86.35±16.01**	95.50±13.24**	27.93±3.05**
Intestine	38.43±3.86	48.32±4.31**	69.42±8.21**	68.61±10.24**	42.41±3.73

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$ *vs* control group

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

3 讨论

内皮素作为体内最强的缩血管因子,广泛分布于全身多种组织,具有广泛的生物学效应[5]。但是,内皮素必须与靶细胞膜上 ETR结合,启动一系列细胞生化过程,才能发挥其生物学效应[6]。本实验结果表明,内毒素血症时,肝、肠组织 ETR的亲和力无明显改变,ETR的最大结合数目呈逐渐下降趋势,伤后 3 h显著低于对照组,24 h虽有所回升,仍明显低于对照组。给予内毒素后,肝、肠细胞膜受体最大结合数目减少,可能与内毒素血症时内皮素含量增加有关。Roubert等[7]报道 10^{-9} mol/L的 ET-1加入培养的平滑肌细胞培养液中,血管平滑肌细胞膜上 ETR的最大结合数目降低 50%。内毒素血症时,内皮素含量增加,与细胞膜受体结合的数目增加,结合部位的受体细胞膜内陷,进入细胞内。因此,内皮素水平越高,结合受体的数目就越多,细胞膜表面 ETR数目减少就越明显。

内毒素血症时,肝、肠 ET_A 受体 mRNA相对含量明显增加,说明内毒素能在 ET_A 受体 mRNA水平调节 ET_A 受体的合成。ET_A 受体合成增多,但 ETR的最大结合数目(代表细胞膜表面的受体)在伤后一直处于低水平。这可能是机体存在自我调节机理,这种受体的下调作用(Down regulation)可能有利于防止内皮素产生过强的收缩作用,以减轻组织和器官损伤。内毒素血症时,ETR的变化和作用机理还有待进一步探讨。

参考文献

1 刘宝华,陈惠孙,胡德耀.内皮素的血管生物学效应研究进展.国外医学:创伤与外科基本问题分册,1996,17(2):66

2 Luscher T F, Omemar B S, Boulanger C M *et al*. Molecular and cellular biology of endothelin and its receptor Part Ⅱ. J Hypertention, 1993, 11(2): 121

3 Koseki C, Imai M, Hirata Y *et al*. Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide. Am J Physiol, 1989, 25(25): R858

4 蔡文琴,王伯　主编.实用免疫细胞化学与核酸分子技术.成都:四川科学技术出版社,1994.406~435

5 Masaki T, Kimmra S, Yanagisawa M *et al*. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. Circulation, 1991, 84(4): 1457

6 Kitsukawa Y, Gu Z F, Hildebrand P *et al*. Gastric smooth muscule cells posses two classes of endothelin receptor but only alters contraction. Am J Physiol, 1994, 266(29): G713

7 Roubert P, Gillard V, Plas P *et al*. Down regulation of endothelin binding sites in rat vascular smooth muscule cells. Am J Hypertens, 1990, 3(4): 31

(收稿:1997-03-21;修回:1997-08-26)

(编辑　汪勤俭)

Effects of endotoxin on endothelin receptor in hepatic and intestinal tissues after endotoxemia in rats

Liu Baohua, Wen Yayuan, Chen Huisun, Wang Daike, Zhou Jihong, Xiao Nan (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To explore the effects of endotoxin on the activity of endothelin receptor (ETR) and the transcription and expression of endothelin A receptor (ETAR) mRNA in hepatic and intestinal tissues. Methods: 30 Wistar rats were randomized into the endotoxin-treated group and the control group. The activity of ETR and relative quantity of ETAR mRNA in hepatic and intestinal tissues were determined at the 3rd, 6th, 12th and 24th hour after endotoxin administration (10 mg.kg^{-1}). Results: The maximal binding capacity (Bmax) of ETR was significantly decreased while no remarkable changes of affinity were found in the endotoxin-treated group as compared with the control. The expression of ETAR mRNA in hepatic and intestinal tissues was significantly higher in the endotoxin-treated group than in the control. Conclusion: Endotoxin can decrease the Bmax of ETR on the membrane of hepatic and intestinal cells and increase the synthesis of ETAR mRNA on the level of transcription and translation.

Key words endotoxin; liver; intestine; endothelin; receptor; rat

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