DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.016

促甲状腺素释放激素与μ、δ和κ阿片受体的作用关系初步观察*

刘良明 陈惠孙 胡德耀 卢儒权 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室)
重庆,630042

提 要 本实验用豚鼠回肠,小鼠输精管和兔输精管为实验对象,用特异性阿片受体激动剂和拮抗剂为工具药,从定性,定量两方面研究了促甲状腺素释放激素(TRH)与μ,δ,κ亚型阿片受体的关系。结果显示 TRH(0.01 mmol/L)可拮抗 D-丙2,D-亮5-脑啡肽(DADLE)抑制小鼠输精管的收缩反应,同时可使 DADLE 的对数浓度反应曲线(LCCRC)右移,其拮抗参数 pA2值为9.3,但 TRH不拮抗双氢埃托啡(DHE)抑制豚鼠回肠及埃托啡(Eto)抑制兔输精管的收缩反应,对 DHE及 Eto的 LCCRC无明显影响,结果提示 TRH拮抗阿片肽的作用有一定的受体亚型选择性,这种选择性可能与 δ阿片受体有关。

关键词 促甲状腺素释放激素;体外实验;阿片受体拮抗剂;豚鼠回肠;小鼠输精管;兔输精管
中图法分类号 R575.14

国内外大量研究表明促甲状腺素释放激素(TRH)对多种循环休克均有良好的治疗作用,目前其抗休克作用较为肯定[1],但其抗休克作用机理尚不明了,据文献资料推论 TRH的抗休克作用与内阿片肽(endogenous opioid peptides, EOP)系统密切相关[2],TRH解除 EOP的心血管抑制作用可能是 TRH抗休克作用的重要途径之一[3]。但 THR是否从受体水平上拮抗内阿片肽的作用,值得深入研究,澄清这一问题对于今后 TRH用于临床抗休克特别是与阿片受体拮抗剂合用抗休克有重要的指导意义。本实验室以前的研究发现,TRH可拮抗β-内啡肽的心血管效应,证实了在体内 TRH与内阿片肽的关系,本实验拟在体外利用生物鉴定法进一步了解 TRH与阿片肽的关系,并初步探讨 TRH对阿片受体的选择性作用。

1 材料与方法

TRH由上海东风生化试剂厂提供,双氢埃托啡(Dihydroetorphine, DHE)、埃托啡(Etorphine, Eto)、纳洛酮(Naloxone, NAL)为中国军事医学科学院产品,D-Ala2, D-leu5, enkephalin(DADLE)为 Sigma公司产品,δ阿片受体选择性拮抗剂 ICI174, 864和κ阿片受体选择性拮抗剂 Norbinaltorphimine(Nor-BNI)由 John Holaday博士馈赠。豚鼠,日本大耳白兔,新西兰小鼠由第三军医大学实验动物中心提供。

按文献制备鼠回肠[4]、小鼠[5]和兔输精管[6]。各标本电场刺激参数为:频率为1/3 Hz,波宽4 ms,电压豚鼠回肠为:70 V,小鼠输精管为70 V~100 V,兔输精管为50 V~60 V,平衡张力小鼠输精管为200 mg,豚鼠回肠和兔输精管均为400 mg,浴槽温度(31±1)℃,通以95% O_2和5% CO_2混合气体,标本平衡50 min待收缩平稳后开始给药。

实验分两步进行,第一步为定性观察,观察 TRH(10^{-5} mol/L)对 DHE(pmol/L), DADLE(4×10^{-14} mol/L),和 Eto(3×10^{-12} mol/L)分别抑制电场刺激豚鼠回肠,小鼠输精管和兔输精管收缩反应的影响,同时平等观察 NAL(μmol/L), ICI_{174}, 864(7×10^{-7} mol/L), Nor-BNT(7×10^{-7} mol/L)对上述阿片受体激动剂抑制这些标本收缩反应的影响,豚鼠回肠标本8个,小鼠输精管10个,兔输精管8个,每只动物只取一个标本,第二步为定量研究,主要观察 TRH对 DHE, DADLE和 Eto的对数累积浓度反应曲线(LCCRC)的影响。以 NAL(5.45×10^{-9} mol/L), ICI174, 864(7.22×10^{-10} mol/L), Nor-BNI(6.8×10^{-9} mol/L)为阳性对照。每一标本都作出无拮抗剂存在时各阿片受体激动剂的 LCCRC和有一定浓度拮抗剂或 TRH存在时的 LCCRC,为防止标本疲劳所引起的收缩减弱,实验时给药秩序前后交替。

LCCRC作好后,用对数变换法将药物的 LCCRC变为直线,再经直线回归求出抑制最大收缩50%的药物浓度(IC_{50}),按下列公式求出 TRH或阿片受体拮抗剂的拮抗参数 pA2值:

$$pA2 = pAX + \mathrm{Log}(X-1)$$

pAX为拮抗剂质量摩尔浓度的负对数,X为用拮抗剂后产生50%最大反应的激动剂浓度与用拮抗剂前产生50%抑制的激动剂浓度之比,用配对 t检验或 Student's t检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 定性实验

TRH对μ,δ,κ阿片受体激动剂抑制豚鼠回肠,小鼠和兔输精管收缩反应的影响。

DHE(10^{-12} mol/L)可抑制豚鼠回肠的收缩反应,抑制率为35.4%,TRH(10^{-5} mol/L)不拮抗 DHE的作用,NAL(5×10^{-6}

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39370663
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mol/L)可拮抗 DHE的抑制作用。DADLE(4× 10^{-14} mol/L)可显著抑制小鼠输精管的收缩反应,抑制率为40.2%,TRH(10^{-5} mol/L)与 ICI174,864(7× 10^{-7} mol/L)相同,均可拮抗 DADLE对小鼠输精管的抑制作用,Eto(3× 10^{-12} mol/L)能显著抑制兔输精管的收缩反应,抑制率为39.3%,TRH(10^{-5} mol/L)不拮抗 Eto的这一抑制作用,κ-阿片受体特异性拮抗剂 Nor-BNI(7× 10^{-7} mol/L)可拮抗 Eto对兔输精管的抑制作用,见图1。

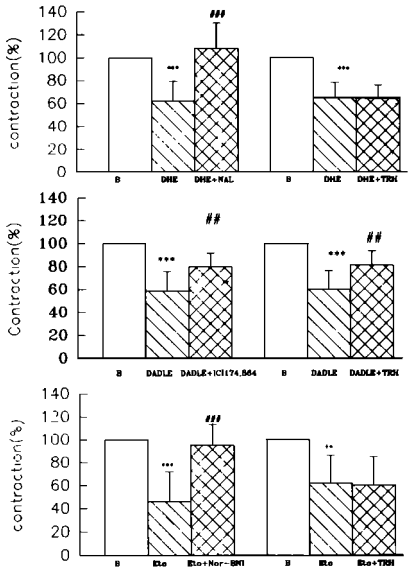


图1 TRH对 DHE DADLE Eto抑制电场刺激豚鼠回肠,小鼠和兔输精管收缩反应的影响

Fig 1 Effects of TRH on DHE, DADLE and Eto inhibition of electirc field stimulated isolated guinea pig ileum, mouse vas deferens and rabbit vas deferens

B: baseline, ***: $P < 0.001$ *vs* B, ###: $P < 0.01$, ####: $P < 0.001$ *vs* DHE, DADLE, or Eto

2.2 定量实验

TRH对 DHE, DADLE, Eto抑制豚鼠回肠,小鼠和兔输精管 LCCRC的影响。

DHE可呈剂量依赖性抑制豚鼠回肠的收缩反应,其 IC50为(1.59± 0.88)× 10^{-13} mol/L,在 TRH(1.38× 10^{-7} mol/L)存在条件下,DHE的 LCCRC似有轻度左移现象,NAL(5.45× 10^{-9} mol/L)可使 DHE的 LCCRC明显右移,其 pA2为11.4,见图2。

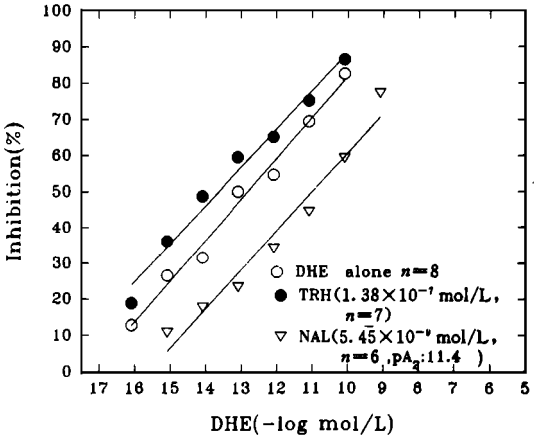


图2 TRH对 DHE抑制电场刺激豚鼠回肠收缩反应 LCCRC的影响

Fig 2 Effect of TRH on DHE inhibition of electric field stimulated isolated guinea pig ileum

DADLE抑制小鼠输精管收缩反应,IC50(1.25± 0.29)× 10^{-15} mol/L,TRH和 ICI174,864均可使 DADLE的 LCCRC明显右移,TRH的 pA2值为9.3,ICI174,864的 pA2值为14.3,见图3。Eto抑制兔输精管收缩反应的 IC50为(2.63± 0.81)× 10^{-13} mol/L,TRH不能使 Eto的 ICCRC右移,Nor-BNI则可使其明显右移,其 pA2为10.7,见图4。

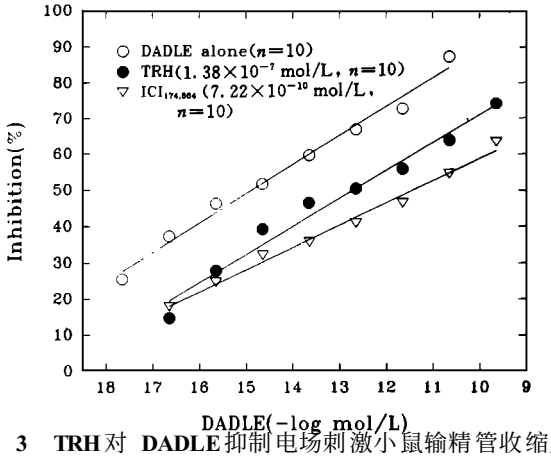


图3 TRH对 DADLE抑制电场刺激小鼠输精管收缩反应的 LCCRC的影响

Fig 3 Effect of TRH on DADLE inhibition of electric field stimulated isolated mouse vas deferens. PA_2 of TRH is 9.3, of ICI174,864 is 14.3

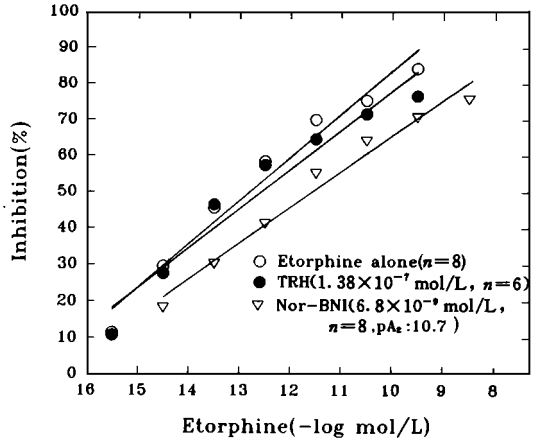


图4 TRH对 Eto抑制电场刺激兔输精管收缩反应 LCCRC的影响

Fig 4 Effect of TRH on etorphine inhibition of electric field stimulated isolated rabbit vas deferens

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

3 讨论

定性实验结果显示,TRH可拮抗 DADLE对小鼠输精管的抑制作用,与 δ阿片受体拮抗剂 ICI174,864作用相似,而不拮抗 DHE对豚鼠回肠和 Eto对兔输精管的抑制作用,豚鼠回肠除含有 μ阿片受体外,还含和 κ受体,小鼠输精管除含 δ阿片受体外,还含有 μ和 κ受体,兔输精管含相对单一的 κ受体[7]。TRH不拮抗 DHE对豚鼠回肠和 Eto对兔输精管的抑制作用,却可拮抗 DADLE对小鼠输精管的抑制作用,提示 TRH拮抗阿片肽的作用可能有一定的亚型阿片受体选择性,综合分析上述结果提示 TRH对 δ受体可能有一定的选择性,而对 μ和 κ受体可能选择性不大。

定量观查结果显示,TRH不拮抗 DHE或 Eto抑制豚鼠回肠或兔输精管的收缩反应,LCCRC均未发生右移,但特异性阿片受体拮抗剂 NAL或 Nor-BNI则可使其右移,表明 TRH对 μ和 κ受体选择性不大,相反 TRH似乎可使 DHE的 LCCRC轻度左移,结合以前的实验结果,TRH本身有一定的镇痛作用[8],提示 TRH对 μ阿片受体可能有一定的激动作用,有待进一步研究证明。TRH使小鼠输精管 DADLE的 LCCRC明显右移,与 δ阿片受体特异性拮抗剂 ICI174,864作用相似,结合 TRH不使 DHE和 Eto抑制豚鼠回肠和兔输精管 LCCRC右移,进一步支持 TRH对 δ阿片受体可能有一定选择性,上述结果由于是在三种标本上进行的,所选的阿片受体拮抗剂或激动剂为相对选择性,因此所得结论有一定局限性,要明确 TRH与阿片受体的确切作用关系,有待进一步用放射受体结合实验来证实。

参考文献

1 Hu Deyao, Chen Huisun, Liu Liangming *et al*. Antishock property of TRH and its mechanisms. Chin J Traumatol (Eng), 1993; 9(6): 22

2 Bhargava H N, Gulati A, Rahmani N H. Down-regulation of central receptors for thyrotropin releasing hormone in kappa opiate agonist-induced abstinece in the rat. Neurophamacol, 1992; 31(2): 137

3 Liu Liangming, Chen Huisun, Hu Deyao *et al*. Thyrotropin releasing hormone antagonizes the inhibitory effects of beta-endorphin on cardiovascular system. J Med College PLA, 1996; 11(1): 57

4 Kosterlitz H W, Lydon R J, Watt A J. The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α and β-adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. Br J Pharmacol, 1970; 39: 398

5 Hughes J, Kosterlitz H W, Lesile F M. Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics. Br J Pharmacol, 1975; 53: 371

6 Oka T, Negishi K, Suda M. Rabbit vas deferens: a specific bioassay for opioid κ-receptor agonists. Eur J Pharmacol, 1981; 73: 235

7 金文桥.阿片受体亚型的某些进展.生理科学进展, 1986; 17(1): 9

8 刘良明,胡德耀,陈惠孙等. TRH对吗啡镇痛作用的影响及其对呼吸循环和中枢的影响.现代应用药学, 1991; 8(4): 1

(收稿: 1995-12-24;修回: 1996-08-27)

(编辑　张大春)

Relationship between thyrotropin releasing hormone and effects of μ-, δ- and κ-opioid receptors*

Liu Liangming, Chen Huisun, Hu Deyao, Lu Ruquan (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract The relationship between thyrotropin releasing hormone (TRH) and effects of μ-, δ- and κ-opioid receptors was qualitatively and quantitatively studied using guinea pig ileum and mouse and rabbit vas deferens as the subjects and specific agonists and antagonists to opioid receptors as tool drugs. It was found that TRH (0.01 mmol/L) antagonized the inhibition of contraction of isolated mouse vas deferens by D-Ala2 and D-Leu5-enkephalin (DADLE) with a antagonizing parameter (pA2) of 9.3 to result in the right shift of the logarithm cumulative concentration response curve (LCCRC) of DADLE. But it did not antagonize the inhibition of the contraction of guinea pig ileum and rabbit vas deferens respectively by dihydroetorphine (DHE) and

* This project was supported by the National Natural Science Fundation of China, No. 39370633

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

etorphine (Eto) to result in no significant changes of their LCCRC. These findings suggest that TRH selectively antagonize the subtypes of opioid receptors, which might be associated with only the δ-opioid receptor.

Key words thyrotropin releasing hormone (TRH); *in vitro* experiment; opioid receptor antagonist; guinea pig ileum; mouse vas deferens; rabbit vas deferens

镇肝熄风汤对实验动物肾素活性及一些细胞免疫指标的影响*

Effect of Chinese medicine "zhengan xifeng" decoction on PR-A and some parameters of celluar immunity in experimental animal

黄文权 (第三军医大学附属新桥医院中医科) 重庆,630037

根据高血压患者易出现阴虚阳亢症状,而多巴胺能升高血压这一基本原理,探索性采用给实验动物耳静脉注射多巴胺的方法,模拟此证型的客观表现同时,观察了镇肝熄风汤的治疗作用及此方与红细胞受体(RBC_{C3b})、红细胞免疫复合物(RBC_{IC})、T淋巴细胞亚群(T_3、T_4、T_8)、肾素活性(PR-A)及血管紧张素Ⅱ(AⅡ)等之间的相互关系。现报道如下。

1 材料及方法

1.1 材料

纯种大白兔36只(由第三军医大学实验动物中心提供),雌雄各半,体重在1.5 kg~2 kg之间。多巴胺注射剂由上海天丰药厂生产,批号为9402021,医用生理盐水由我院药厂生产,批号为9412272红细胞免疫试剂药盒由成都中医学院免疫室提供,T淋巴细胞亚群试剂药盒由武汉生物制品所提供,血浆肾素活性及血管紧张素Ⅱ放免药盒均由中国北方免疫试剂研究所提供。

1.2 研究方法

将动物随机分为A、B、C、D 4组,每组各9只。A组:单纯多巴胺组,给动物耳静脉注射多巴胺,2 mg/kg体重,1次/d,待症状达到顶峰且维持3 d后停药观察。B组:多巴胺+中药组,静注多巴胺方法同上,待症状达到顶峰且维持3 d后给予灌服镇肝熄风汤浓煎剂,10 ml/kg体重,1次/d C组:生理盐水组,耳静脉注射生理盐水2 ml/kg体重,1次/d,与A组同步停药观察。D组:生理盐水+中药组,静注生理盐水方法同上,与B组同步灌服中药,剂量、方法同上,具体方法参照文献[1]。

1.3 方剂组成及诊断标准

镇肝熄风汤来源于清代医学家张锡纯《医学衷中参西录》一书,药物组成为怀牛膝30 g 代赭石30 g 生龙骨15 g 生牡蛎15 g 生龟板15 g 白芍15 g 玄参15 g 天冬15 g 川楝子6 g 生麦芽6 g 茵陈6 g 甘草6 g 诊断标准参照《实用中医内科学》[2]:动物出现心率明显加快,周围毛细血管充盈,皮肤潮红,性情急躁易怒等。

1.4 指标检测

各组于用药前、静注用药后阴虚阳亢症状达到顶峰且相对平稳3 d后(对照组同步)、停药7 d后(对照组同步)、加中药组服中药3 d后(对照组同步)分别抽取耳静脉血检测PR-A、AⅡ、RBC_{C3b}、RBC_{IC}、T_3、T_4、T_8肾素血管紧张素用放射免疫法,红细胞免疫指标用玫瑰花环法,T淋巴细胞亚群用单克隆抗体法。

1.5 统计方法

数据输入微机,采用方差分析。

2 实验结果

A组用药后其心率明显加快,周围毛细血管充盈程度逐渐加重,由局部发展到全身,性情逐渐急躁易怒,出现喜跳跃→抓人、抓铁笼→咬人、咬铁笼此一渐进过程,第5日后上述症状体征达到顶峰,且出现相对平稳期,停药7 d后基本恢复正常。B组加中药后上述变化3 d即恢复正常。C组及D组上述症状体征均无异常变化。

A组用药后其PR-A、AⅡ明显高于用药前,停药7 d后基本恢复正常,RBC_{C3b}、T_3、T_4用药后均显著低于用药前,停药7 d后仍维持在较低水平,而RBC_{IC}、T_8用药前后差异均无显著性意义。B组加用中药治疗后3 d其PR-A、AⅡ降至正常水平,RBC_{C3b}、T_3、T_4升至正常水平,而对RBC_{IC}、T_8无改变。

生理盐水组(C组、D组)用药前后及加用中药后以上各项指标比较差异均无显著性。

多巴胺实验组(A组+B组)静注用药后其PR-A、AⅡ明显高于同期生理盐水对照组(C组+D组),RBC_{C3b}、T_3、T_4明显低于同期对照组,而RBC_{IC}、T_8两组比较差异无显著性。

(下转419页)

* 校科研基金资助课题

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