DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.03.014

过敏性哮喘豚鼠肺组织β受体和cAMP-PDE活力的变化

宋平方 凌培基* 毛宝龄* 李天星△ （第三军医大学大坪医院 呼吸内科） 630042

提 要 本实验采取放射配基结合法、放射酶测定法和放射免疫法观察了过敏性哮喘豚鼠肺组织β受体、cAMP-PDE活力和cAMP的变化。哮喘组与对照组比较：肺组织细胞膜β受体减少25%，肺组织cAMP下降36%，而cAMP-PDE活力上升35%，相关分析表明肺组织cAMP与β受体呈正相关，与cAMP-PDE呈负相关。

关键词 哮喘；β受体；磷酸二酯酶；环磷酸腺苷

支气管哮喘是一种常见病，其发病机理尚未完全明确。本实验旨在通过观察过敏性哮喘豚鼠肺组织β受体和磷酸二酯酶(cAMP-PDE)活力的变化，以探讨支气管哮喘的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

H^3-DHA（H^3-双氢心得舒，比放射性48Ci/mmol，北京原子能研究院），H^3-cAMP（比放射性22Ci/mmol，北京原子能研究院），玻璃纤维滤膜（海光49，上海虹光造纸厂），cAMP（Serva），腺苷（BDH），Dowex-氯型200～400目阴离子交换树脂（Serva），眼镜王蛇蛇毒（广西医学院蛇毒研究所），心得安（Sigma）。仪器：LKB-1217型液体闪烁计数仪（芬兰）。

1.2 实验动物及分组

本院动物室提供的体重为300g左右的健康雄性豚鼠，共20只，随机分为2组：（1）正常对照组：腹腔注射生理盐水1.0ml，两周后用生理盐水超声雾化任动物自行吸入，每日1次，连续8天，末次后15min内处死供实验用。（2）哮喘发作组：用10%的卵白蛋白腹腔注射1.0ml以致敏动物，两周后1%的卵白蛋白超声雾化吸入，至哮喘发作出现咳嗽、呼吸困难和紫绀等，余同对照组。

1.3 肺组织β受体测定方法

1.3.1 肺组织细胞膜制剂的制备：豚鼠经断头处死后，立即取出双肺，洗去血污，除去大血管、气管，将肺组织剪碎，加入冰冷的50mmol Tris-HCl/10mmol $MgCl_2$缓冲液（pH7.4），在冰浴中20 000r/min匀浆2 min，然后在4℃以400×g离心10min，上清以40 000×g在4℃离心20min。以缓冲液稀释至蛋白质含量为2 mg/ml，Lowry法蛋白定量。

1.3.2 结合试验：参照Taki[1]的方法，肺细胞膜制剂100μl与最终浓度为1nmol～5nmol的H^3-DHA在20℃水浴中保温15min。非特异性结合管加入10^{-4}mol心得安50μl。反应总体积为250μl。反应结束后，加冰冷缓冲液终止反应，以玻璃纤维滤膜迅速抽滤，5 ml冰冷缓冲液冲洗2次。膜片在80℃烤干后置0.5%PPO甲苯中测定其放射性。

1.4 cAMP-PDE活性的测定

参照张华林[2]的方法，酶反应体系含有50mmol Tris-HCl/5 mmol $MgSO_4$（pH7.4）、75mmolβ-巯基乙醇、3nmol cAMP（H^3-cAMP 4×10^4cpm），加粗酶200μg。酶活性以pmol·min^{-1}·mg $protein^{-1}$表示。

1.5 肺组织cAMP的测定

cAMP的提取参照陈海鑫[3]的方法，具体操作照说明书。

1.6 实验数据的统计学处理

用我校数学教研室提供的医学数理统计程序包中的PDA-2和PDA-3对数据进行统计分析[4]。

*指导教师 △免疫室

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

2 结　果

2.1 正常豚鼠肺组织β受体及cAMP-PDE活力的检定

2.1.1 β受体

正常豚鼠肺细胞膜制剂与标记的β受体配基H^3-DHA，在一定条件下进行结合实验，从图1可见随着H^3-DHA浓度的递增，结合逐渐饱和。将所得数据按Scatchard[5]处理并作图，求得最大的结合容量（Bmax）为217.35±50.32fmol/mg protein，Kd（平衡解离常数）为5.57±2.36nmol。

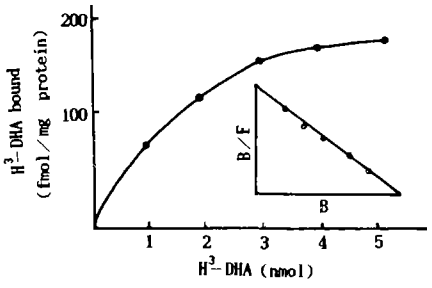


图1 豚鼠肺细胞膜中β受体与H^3-DHA结合的饱和曲线和Scatchard图

Fig. 1. Saturation curves of specific H^3-DHA binding lung membranes. Insert: Scatchard analyssi of specific H^3-DHA binding lung membrane.

2.1.2 cAMP-PDE

图2A是酶量对cAMP-PDE活性的影响，在酶量50μg～400μg范围内，酶活性与酶量呈直线关系。图2B是cAMP-PDE的反应进程曲线，在5min～20min内，产物随时间递增呈直线上升。正常豚鼠肺组织cAMP-PDE活力为20.28±3.81pmol·min^{-1} mg protein^{-1}。

2.2 过敏性哮喘豚鼠肺组织β受体、cAMP和cAMP-PDE活力的变化

2.2.1 β受体

在哮喘组动物，肺细胞膜对H^3-DHA结合的Bmax为162.40±44.72fmol/mg protein Kd为40.2nmol±1.60nmol，与对照组比较，β受体Bmax减少25%，统计分析相差具有显著意义（$P<0.05$），如图3A、图3B。

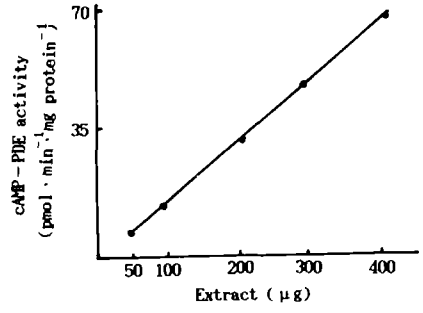


图2A 酶量对cAMP-PDE活力的影响

Fig. 2 A Dose-dependent hydrolysis of cAMP by cAMP-PD E from crude extracts prepared from guinea Pig lung

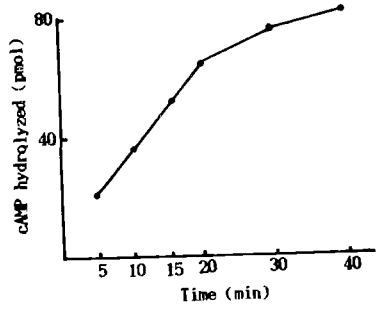


图2B 酶反应进程曲线

Fig. 2 B Time course of the hydrolysis of cAMP by cAMP-PDE from crude extracts prepared from the guinea pig lung

2.2.2 cAMP

对照组肺组织cAMP为6.54±2.09 pmol/mg湿肺组织。哮喘组为4.13±2.07 pmol/mg湿肺组织，比对照组减少36%，统计分析相差具有显著意义（$P<0.05$）。

2.2.3 cAMP-PDE

哮喘组肺组织cAMP-PDE活力为27.49±4.55pmol·min^{-1} mg Proein^{-1}，比对照组升高35%，统计分析两者相差具有显著意义（$P<0.05$）。

2.2.4 β受体、cAMP和cAMP-PDE的相关分析

哮喘组肺组织cAMP与β受体Bmax呈正相关，$r=0.35$，统计分析具有极显著意义（$P<0.0001$），

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

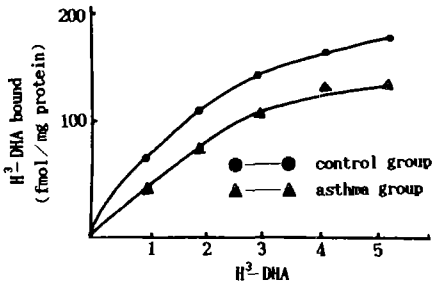


图3A 饱和曲线

Fig.3A Saturation curves

•—•control group

▲—▲asthma group

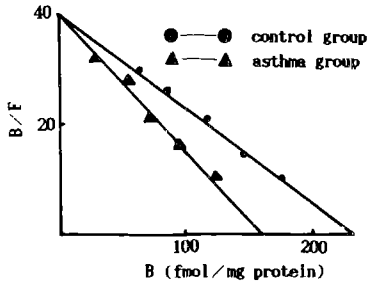


图3B Scatchard图

Fig.3B Scatchard analyss

•—•control group

▲—▲asthma group

cAMP与cAMP-PDE活力呈负相关，$r=-0.40$，统计分析相关有极显著意义（$P<0.0001$）。

附表 过敏性哮喘豚鼠β受体、cAMP-PDE活力和cAMP的变化

Tab.The Changes of Beta-adrenoceptors, cAMP-PDE Activity and cAMP in the Allergic Asthmatic Guinea Pigs

Group	n	β-adrenoceptor		cAMP-PDE	cAMP
		Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nmol)	(pmol·min^{-1}·mg protein^{-1})	(pmol·mg wet lung tissue^{-1})
Control	10	217.35±50.32	5.57±2.36	20.28±3.81	6.54±2.09
Asthma	10	162.10±44.72$^{\Delta}$	4.02±1.60	27.49±4.55$^{\Delta}$	4.13±2.07$^{\Delta}$

$^{\Delta}$ $P<0.05$ Versus control

3 讨 论

过敏性哮喘主要是由于特异性抗原进入体内与肥大细胞膜的IgE结合，使其脱颗粒释放过敏介质如组胺、白三烯等，引起支气管平滑肌收缩所致。因此，肥大细胞过敏介质释放和支气管平滑肌收缩是哮喘发病的两个重要环节。近年来对核苷酸在细胞内生物效应的研究表明：cAMP是调节细胞内代谢、传递细胞外信息、激活细胞内生成合成的第二信使。cAMP为β受体兴奋后活化腺苷酸环化酶催化ATP分解而成。通过cAMP-PDE的作用，cAMP转变为5′-AMP失活。因此，β受体和cAMP-PDE对维持细胞内cAMP的相对稳定起重要作用。目前一致认为cAMP松弛支气管平滑肌，并抑制肥大细胞过敏介质的释放。

本实验结果表明，过敏性哮喘豚鼠肺组织β受体Bmax减少，比正常下降25%，Kd值无明显变化，这与Taki[1]及吕宝璋[6]等人的研究结论一致。由于肺细胞膜β受体减少，对内源性儿茶酚胺反应性减弱，使cAMP生成不足，导致支气管平滑肌收缩等。因此，β受体减少可能是过敏性哮喘的发病因素之一。

本实验结果还表明过敏性哮喘豚鼠肺组织组织cAMP-PDE活力上升，比正常增加35%，本结果与Chan[7]的报道一致。由于cAMP-PDE活力上升，肺组织细胞内cAMP分解加速，因此，也可能成为过敏性哮喘发病参与因素之一。

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

综上所述，本实验证实了cAMP的减少系由于肺组织β受体减少及cAMP-PDE活力上升，使cAMP生成减少而降解增加，从而导致肥大细胞释放过敏介质和支气管平滑肌收缩，这可能是过敏性哮喘发病的一个重要环节。

（本实验得到呼吸内科陈摩端、杨肇亨主任的支持，谨致谢意。）

考 参 文 献

1. Taki F,Takagi K,Satake T,et al.The rold of phosphlipase in reduced beta-adrenergic responsiveness in experimental asthma. Am Rew Respir Dis 1986; 133:362～366
2. 张华林 吴兆峰 刘秉文，等。一种快速可靠的3'-5'-cAMP磷酸二酯酶测定法。生物化学与生物物理进展 1986; 3:58～60
3. 陈海鑫 李振甲。组织中cAMP和cGMP放射免疫分析法的改变。生物化学与生物物理进展 1986; 5:76
4. 苑锡光。以电子计算机为工具的医用统计分析。成都：四川科技出版社，1985; 94～104
5. Scatchard G. The attractions of protein for small molecules and ions.Ann NY Acad Sci 1949; 51:660～672
6. 吕宝璋 王小兵 单京瑞。豚鼠肺组织中β和M受体的检定及其在实验性哮喘时的变化。中华医学杂志 1985; 7:385～388
7. Chan SC, Hanifin JM, Holden CA, et al. Elevated leukocyte phosphodiesterase as basis for cyclic adenocine monophosphate response in the Basenaji greyhound dog model of asthma. J Allergy Clin Immunol 1985; 76:148～158

（收稿：1990.04.16；修回：1991.02.01）

Changes of Beta-adrenergic Receptors and cAMP-PDE Activity of Asthmatic Lung Tissue in Guinea Pigs

Song Pingfang, Ling Peiji, Mao Baoling, et al (Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical College, Chongqing 630042)

Abstract The changes of the number of beta-adrenergic receptors, the activity of cAMP-PDE and the level of cAMP were observed in the guinea pigs with allergic asthma with radioligand assay, radioenzyme assay and radioimunoassay respectively. It was found that there were a 25% decrease of the number of beta-adrenergic receptors on the lung membrane, a 36% decrease of the level of cAMP in the lung tissue, and a 35% increase of cAMP-PDE activity in the asthmatic animals as compared with those of the control. A close positive correlation was observed between the number of beta-adrenergic receptors and cAMP level,but a negative correlation between cAMP-PDE activity and cAMP level in the asthmatic group.

key words: asthma; beta-adrenergic receptor; phosphodiesterase; cyclic adenocine monophosphate

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