

自发性高血压大鼠肾上腺苯二氮草受体的变化¹

宋烈昌、周廷冲

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100800)

提要 用选择性作用于“外周型”苯二氮草受体的标记配体 $[^3\text{H}]\text{PK-11195}$, 测定自发性高血压大鼠(SHR)及其对照组(WKY)大鼠肾上腺苯二氮草受体的最大结合数 B_{max} 和表观平衡离解常数 K_D 。SHR 和 WKY 的 B_{max} 分别为 11.9 ± 1.7 和 $22.8 \pm 1.9 \text{ pmol/mg protein}$, 前者显著低于后者; K_D 值则分别为 8.1 ± 1.9 和 $8.6 \pm 1.9 \text{ nM}$, 两者间无明显差异。

关键词 自发性高血压大鼠; 肾上腺; 外周型苯二氮草受体; 1-(2-氯苯基)-N-甲基-N-(1-甲基[2, 3- ^3H]丙基)-3-异唑啉甲酰胺; 离解常数

中枢神经系统发现存在苯二氮草受体, 在肾, 肝, 肺等外周组织也发现 $[^3\text{H}]$ 安定结合部位⁽¹⁾。此结合部位性质不同于脑内的 $[^3\text{H}]$ 安定结合部位; 氯硝安定对其亲和力很弱而 4'-氯安定(RO 5-4864)对其亲和力则很强, 称“外周型”苯二氮草受体, 生理功能未明。近发现与苯二氮草结构相近的异唑啉衍生物 PK-11195(图 1)对此受体亲和力高, 选择性强⁽²⁾。本文用 $[^3\text{H}]\text{PK-11195}$ 作为标记配体, 测定自发性高血压大鼠(SHR)及正常血压大鼠(WKY)肾上腺苯二氮草受体的最大结合数 B_{max} 和表观平衡离解常数 K_D , 比较了两种大鼠间的差异。

材料与 方法

药物 $[^3\text{H}]\text{PK-11195}$ 1333.2 GBq/mmol 及非标记的 PK-11195 由法国 Pharmuka 实验室 G Le Fur 教授赠送。

动物 自发性高血压大鼠(SHR)及其对照组正常血压大鼠(WKY)由中国医学科学院动物饲养中心供应, ♀, 14 wk, 体重分别为

$224 \pm 5 \text{ SD g}$ 和 $225 \pm 9 \text{ g}$ 。

受体结合试验 受体(膜碎片)制备参照文献(3)。大鼠断头后取出双侧肾上腺, 剥净脂肪, 在 Na/K 磷酸盐缓冲液(PBS: Na^+ 181 mM, K^+ 9.5 mM, PO_4^{3-} 50 mM, Cl^- 100 mM, pH 7.4)中匀浆。组织湿重与 PBS 容量比约为 6 mg 组织加 1 ml PBS。将匀浆用 PBS 稀释 40-50 倍, 使其蛋白质浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 。每支测定管取 0.40 ml 匀浆稀释液, 加入 50 μl PBS(非特异结合管加入 50 μl 0.01 mM 非标记 PK-11195), 和 50 μl 各种浓度的 $[^3\text{H}]\text{PK-11195}$ 。反应体系的终容量为 0.50 ml, $[^3\text{H}]\text{PK-11195}$ 的终浓度由 0.62 至 50 nM 共十个浓度, 每个浓度取三复管。混合液在冰水浴中保冷 60 min, 然后在负压微孔过滤器上经 Whatman GF/C 滤纸过滤。每管用冰冻的 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 ml。滤纸烘干后移入含亲脂性闪烁液(二甲苯 1000 ml, 闪烁体 TP 8 g, POPOP 4 mg) 4 ml 的闪烁杯中, 用 LKB 自动液闪仪测定放射性计数效率 50% 左右, 非特异性结合约占总结合计数的 10%。

Scatchard 分析 B_{max} 和 K_D 值按单相法推算⁽⁴⁾资料用 t test 进行统计学处理。蛋白质含量测定用比色法⁽⁵⁾。

血压和心率的测定 用 Natsume KN-209 型大鼠尾部血压心率测定仪测定, 每鼠连续测 3 次, 取平均值。

结 果

平均动脉压和心率 14 wk 的 SHR 和 WKY 平均动脉压分别为 162 ± 5 和 $117 \pm 5 \text{ mm Hg}$, 两者差异显著($p < 0.01$); 而在心率方面,

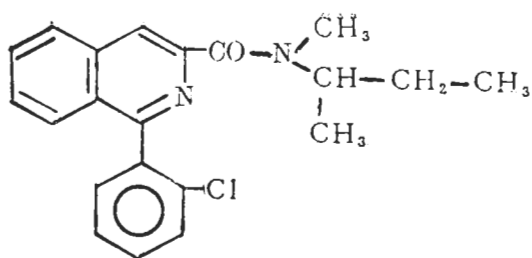


Fig 1. PK-11195 [1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide]

两者无明显差异。

受体结合的饱和性试验 在受体制备的蛋白质浓度，保温时间和温度等条件恒定的前提下，WKY 肾上腺匀浆(膜碎片)与 [^3H]PK-11195 的特异性结合随着 [^3H]PK-11195 浓度的增加而增加，到约 35 nM 后达到饱和；而其非特异性结合的增加则呈直线型，见图 2。SHR 肾上腺匀浆(膜碎片)与 [^3H]PK-11195 的结合亦为同样性质，图略。

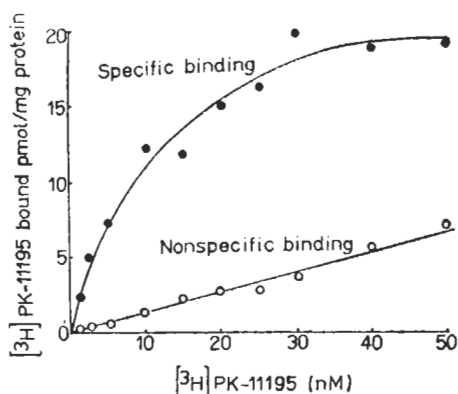


Fig 2. Saturation isotherm of [^3H]PK-11195 binding to Wistar-Kyoto normotensive rats adrenal homogenates.

受体结合的 Scatchard 分析 上述受体结合饱和性试验的数据经 Scatchard 分析，表明两种大鼠肾上腺膜碎片上苯二氮草受体与 [^3H]PK-11195 的结合符合一个结合位点的模型，见图 3。在严格对照的条件下，测定了 5 个 SHR 和 5 个 WKY 肾上腺膜碎片上 [^3H]PK-11195 特异结合的最大结合数 B_{\max} 和表现平

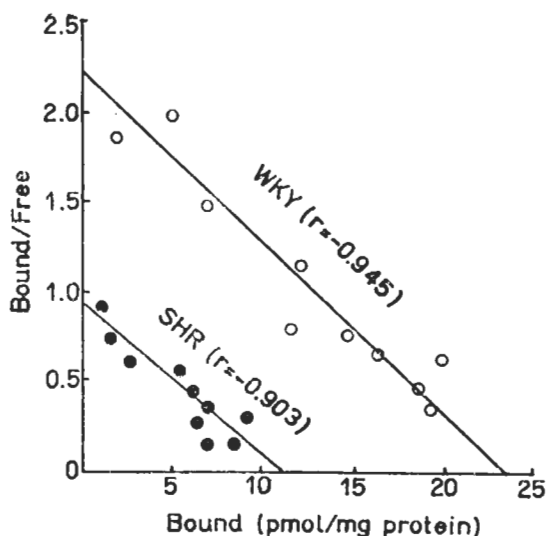


Fig 3. Scatchard plot of [^3H]PK-11195 binding to Wistar-Kyoto normotensive rats and spontaneously hypertensive rats adrenal homogenates.

衡离解常数 K_D 。SHR 和 WKY 的 B_{\max} 分别为 11.9 ± 1.7 和 22.8 ± 1.9 pmol/mg protein 两者差异显著 ($p < 0.01$)，而两种大鼠的 K_D 值则无明显差别。

讨 论

Sprague-Dawley 大鼠单侧肾切除并形成 DOCA-盐性高血压后，其肾脏苯二氮草受体的 B_{\max} 增大⁽⁶⁾；SHR 肾脏苯二氮草受体的 B_{\max} 却显著低于 WKY 组^(7,8)。在大脑前叶，小脑，脑桥髓质以及心脏等脏器，SHR 和 WKY 两组大鼠苯二氮草受体的结合动力学参数无明显差异⁽⁸⁾。苯二氮草受体在 Sprague-Dawley 大鼠肾上腺的密度很高，达 0.01 nmol/mg protein，比心脏肾脏高 1 个数量级，比大脑高 2 个数量级⁽²⁾；且它集中在肾上腺皮质⁽³⁾。本文的结果表明 Wistar 系大鼠肾上腺亦存在高密度的苯二氮草受体，在自发性高血压的病理状况下其密度显著下降，但亲和力未见明显改变。

致谢 [^3H]PK-11195 由法国 Gennevilliers, Pharmuka 实验室 G Le Fur 教授赠送

参 考 文 献

- 1 Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity (^3H) diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74 : 3805
- 2 Le Fur G, Perrier ML, Imbault F, et al. Peripheral benzodiazepine binding sites: Effect of PK 11195. *Life Sci* 1983; 32 : 1839
- 3 Benavides J, Malgouris C, Imbault F, et al. "Peripheral type" benzodiazepine binding sites in rat adrenals; Binding studies with [^3H]PK 11195 and autoradiographic localization. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1983; 266 : 38
- 4 Zivin JA, Waud RR. How to analyse binding, enzyme and uptake data: the simplest case, a single phase. *Life Sci* 1982; 30 : 1407
- 5 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 6 Regan JW, Yamamura HI, Yamada S, Roeske WR. High affinity renal [^3H]flunitrazepam binding: characterization, localization and alteration in hypertension. *Life Sci* 1981; 28 : 991
- 7 Taniguchi T, Wang JKT, Spector S. Changes in platelet and renal benzodiazepine binding sites in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1981; 70 : 587
- 8 Thyagarajan R, Brennan T, Ticku MK. GABA and benzodiazepine binding sites in spontaneously hypertensive rat. *Ibid* 1983; 93 : 127

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Jul, 7 (4) : 318-320

Changes in adrenal benzodiazepine receptors in spontaneously hypertensive rats¹

SONG Lie-chang, ZHOU Ting-chong (T C Chow)

(Inst Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)

ABSTRACT [^3H]PK-11195 [1-(2-chlorophenyl)-*N*-methyl-*N*-(1-methyl [2, 3- ^3H] propyl)-3-isoquinolinecarboxamide] is a labelled ligand with high affinity selectively binding to "peripheral type" benzodiazepine receptors. The kinetic constants of [^3H]PK-11195 binding to the adrenal homogenates of spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto normotensive rats (WKY) were measured. Scatchard analysis of the specific binding showed a single class of binding site with a maximal capacity (B_{max}) of 11.9 ± 1.7 and 22.8 ± 1.9 pmol/mg protein for SHR and WKY, and an apparent equilibrium dissociation constant (K_D) of 8.1 ± 1.9 and 8.6 ± 1.9

nM for SHR and WKY, respectively.

These results demonstrate that the adrenal benzodiazepine binding sites in SHR are less than those in WKY, but the affinities are similar.

KEY WORDS spontaneously hypertensive rats; adrenal glands; peripheral benzodiazepine receptors; 1-(2-chlorophenyl)-*N*-methyl-*N*-(1-methyl [2, 3- ^3H] propyl)-3-isoquinolinecarboxamide (PK-11195); dissociation constant

¹ Project supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences No 152