

血管壁上埃托啡及苯环利定特异结合部位的放射自显影观察<sup>1,2</sup>

孙凤艳、李宽娅、张玲妹、卢毓青、张安中 (上海医科大学神经生物学教研室, 上海 200032, 中国)

**Autoradiographic study on etorphine and phencyclidine specific binding sites in rabbit mesenteric artery**SUN Feng-Yan, LI Kuan-Yan, ZHANG Ling-Mei, LU Yu-Qing, ZHANG An-Zhong  
(Department of Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

**ABSTRACT** Autoradiography was used to study the localization of Kappa and PCP/sigma receptors in the blood vessels. Slices of rabbit mesenteric arteries were incubated with 0.4 nmol/L [<sup>3</sup>H]etorphine or/and 10 μmol/L etorphine for 45 min at 25°C, or incubated with 5.2 nmol/L [<sup>3</sup>H]PCP or/and 20 μmol/L PCP for 60 min at 4°C. Then, slices were covered with emulsion coated coverslip and kept for 8-10 wk at 4°C. The results were as follows:

**Microscopy** Autoradiographic analysis indicated that etorphine and PCP specific binding sites were both located in the outer-layer and the smooth muscle of the artery. However, most of these binding sites were lost in the 6-OHDA pretreated arteries in which the adrenergic nerve endings were destroyed.

**Microspectrophotometry** The absorbance (A) of [<sup>3</sup>H]etorphine autoradiographic density for total binding (TB) and nonspecific binding (NSB) in control group were 0.416 ± 0.056 and 0.044 ± 0.011, respectively ( $P < 0.01$ ), and for TB after incubation with 6-OHDA was 0.068 ± 0.013

which was different from the A value of TB in the control ( $P < 0.01$ ).

The A value of [<sup>3</sup>H]PCP autoradiographic density for TB and NSB in the control were 0.546 ± 0.087 and 0.023 ± 0.060, respectively ( $P < 0.01$ ), and for TB after incubation with 6-OHDA was 0.065 ± 0.015 which was significantly less than that of TB in the control group ( $P < 0.01$ ).

The results suggest that both etorphine and PCP/sigma opiate receptors in the rabbit mesenteric artery are located on the adrenergic nerve terminals which seem to distribute mainly in the outer-layer and in the smooth muscle of the vessels.

**KEY WORDS** mesenteric arteries; autoradiography; etorphine; phencyclidine; endorphin receptors

**摘要** 为了解kappa和PCP/sigma型阿片受体在血管壁上的分布,本文采用兔肠系膜上动脉、[<sup>3</sup>H]etorphine和[<sup>3</sup>H]PCP(苯环利定)作了离体血管放射自显影的研究。显微镜下观察及显微分光光度测定法的分析结果提示血管壁上有能与[<sup>3</sup>H]etorphine及[<sup>3</sup>H]PCP作特异结合的部位,它们均主要分布于血管壁的外膜及肌层的交感神经末梢上。

**关键词** 肠系膜动脉;放射自显影术;埃托啡;苯环利定;内啡肽受体

我室曾先后发现外周血管上有kappa型及PCP/sigma型阿片受体<sup>(1,2)</sup>,这两种受体兴奋后,分别以相反的方向调节交感神经末梢释放

Received 1988 Sep 23 Accepted 1988 Dec 22

<sup>1</sup> Read before the 5th Southeast Asian/Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, 1988 Jul 7, Beijing, China.

<sup>2</sup> Project partially supported by the Young Award Research Foundation of the Academy of Sciences of China, 1986.

去甲肾上腺素(norepinephrine, NE), 从而产生舒或缩血管的生物效应<sup>(3,4)</sup>, 并参与全身血压的调节<sup>(5)</sup>。然而, 这些受体究竟分布在血管壁的哪一层, 以及其分布与交感神经末梢有何联系等问题有待阐明。本文用离体血管放射自显影技术, 结合化学切割手段, 藉以光学显微镜和显微分光光度计的观察, 对上述问题作了研究

## MATERIALS AND METHODS

兔 6 只, 体重  $2.8 \pm SD 0.3$  kg, ♀♂不拘, 本校自行繁殖。 [<sup>3</sup>H]Etorphine (1.6 TBq/mmole, 23 GBq/ml) 及 [<sup>3</sup>H]苯环利定 ([<sup>3</sup>H]PCP, 1.4 TBq/mmole, 37 GBq/ml) 由上海医科大学药学院同位素实验室提供; etorphine 及苯环利定 (phencyclidine, PCP) 由本校药学院药物化学合成教研室提供; 6-羟多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 由日本东京理科大学药理学博士久保田和彦教授惠赠; 核乳胶-4 型系北京原子能研究所产品。

**切片的制备** 将兔处死, 速取其肠系膜上动脉, 用冰冷的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.4) 洗去血液, 去除血管周围的结缔组织, 将动脉剪成 1 cm 长二段, 其中一段为对照组, 另一段为 6-OHDA 组。

6-OHDA 组动脉浸入含 6-OHDA 的 Tris-HCl 缓冲液中 (6-OHDA 的浓度为 0.3%, 内含 1% 抗坏血酸) 孵育 10 min (4°C), 再将动脉移入 Tris-HCl 缓冲液内 (4°C), 以后每隔 30 min 换一次溶液, 每次 50 ml, 共 3 h。

对照组动脉除不用 6-OHDA 处理外, 其余实验条件和步骤均与 6-OHDA 组相同。

孵育完毕将组织作冰冻 (-12—16°C) 切片, 厚度为 25 μm, 切片溶贴于事先浸过明胶的载玻片上, 保存于 -20°C, 供放射结合分析用。保存期不超过 48 h。

**放射结合分析** 作放射结合分析 (radio-binding assay) 时, 将 6-OHDA 组和对照组的动脉再分成总结合 (total binding, TB) 和非特

异结合 (non-specific binding, NSB) 组。

1 Etorphine 的放射结合分析<sup>(1)</sup> TB 组加 [<sup>3</sup>H]etorphine 0.4 nmol/L, NSB 组加 [<sup>3</sup>H]etorphine 0.4 nmol/L 和 etorphine 10 μmol/L。加样毕, 将组织切片置于 24°C 水浴槽内孵育 45 min, 然后用冰冷的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.4, 内含 0.05% 牛血清白蛋白) 冲洗组织 6 次, 浸洗 4 次, 再将组织切片置于 80°C 烘 10 min, 待干燥后作放射自显影。

2 PCP 放射结合分析<sup>(2)</sup> TB 组加 [<sup>3</sup>H]PCP 5.2 nmol/L, NSB 组加 [<sup>3</sup>H]PCP 5.2 nmol/L 和 PCP 20 μmol/L。加样毕, 组织置于 4°C 孵育 60 min, 再用冰冷 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.8, 内含 50 mmol/L 蔗糖及 0.05% 牛血清白蛋白) 冲洗, 其余实验条件均同 etorphine 组放射结合分析过程。

**曝光、显影、定影和染色** 用重蒸水按 1:1 至 1:2 比例稀释核乳胶, 再涂于清洁的盖玻片上, 干燥后即成乳胶干板。将反应后的组织与乳胶干板紧贴, 避光保存于 4°C 至 8-10 wk, 以利充分曝光。用 Kodak D-19 b 型显影液及 Kodak F-5 型定影液进行显影及定影, 再用中性红染色法作组织染色。

**实验结果观察** 用 Nikon UFX-II 显微镜作组织切片观察, 再用 Nikon FX-35 A 摄像机将观察结果拍摄下来, 以示放射自显影颗粒的分布。用 Opton MPMO 1 K 型显微分光光度计测量单位面积内放射自显影颗粒的分布密度, 以作半定量分析。测定条件为: 4 号光栏 (0.4 mm), 放大倍数为 50 倍, 每测定面积 50.27 μm<sup>2</sup>。按下式求出各部位的光密度吸收值 (absorbance, A),

$$A = \log(\text{本底光强度值} / \text{组织光强度值})$$

采用 *t* 检验进行显著性检验。

## RESULTS

### 血管壁上阿片受体放射自显影颗粒的分布

1 [<sup>3</sup>H]Etorphine 放射自显影颗粒的分布 经放射自显影处理后的组织, 在光学显微镜下

观察, 可看到 TB 组的血管壁外膜上有密集的黑色银颗粒, 血管壁的肌层上也有这种颗粒, 从外膜到内膜的肌层壁, 黑色银颗粒逐渐减少 (Fig 1 A, Plate 1, 以下各图同); 而 NSB 组的血管壁上几乎看不到这种颗粒 (Fig 1 B)。将 TB 组的颗粒减去 NSB 组的颗粒, 即为特异结合 (specific binding) 的放射自显影颗粒, 实验结果显示了血管壁上存在能与 [<sup>3</sup>H] etorphine 作特异结合的部位, 该部位主要分布在血管壁的外膜及肌层组织上。

用 6-OHDA 孵育后的 TB 组, 血管壁上的银颗粒明显减少, 接近对照组的 NSB 组 (Fig 1 C),

2 [<sup>3</sup>H]PCP 放射自显影颗粒的分布 (Fig 1 D) 可见 TB 组中 [<sup>3</sup>H]PCP 的放射自显影颗粒主要分布于血管壁的外膜及中层。NSB 组中这种颗粒明显减少, 几乎消失 (Fig 1 E)。经 6-OHDA 处理后, 其 TB 组的放射自显影颗粒也几乎消失, 接近 NSB 组的 (Fig 1 F)。

**血管壁上阿片受体放射自显影颗粒密度的分析** Tab 1 列举了血管壁上 [<sup>3</sup>H]etorphine 及 [<sup>3</sup>H]PCP 放射自显影的颗粒密度分析值。从 Tab 1 可见, 在 [<sup>3</sup>H]etorphine 及 [<sup>3</sup>H]PCP 两组中, 其 TB 的 A 值均明显大于 NSB 组的, 统计有极显著意义。经 6-OHDA 处理后, A 值均明显减少, 与 NSB 组的 A 值相比, 相差均

不显著, 而与 TB 组相比,  $P < 0.01$ 。

## DISCUSSION

由放射自显影颗粒密度分析的结果可见, 不论是 etorphine 还是 PCP, 其 TB 组的 A 值都大于 NSB 组, 提示血管壁上存在 etorphine 和 PCP 的特异结合部位, 这与放射受体结合分析法所得结果<sup>(1,2)</sup>相符。进一步比较这两种特异结合的 A 值可见, PCP 放射自显影颗粒密度较 etorphine 的高, 这提示血管壁上 PCP 受体的数量较 etorphine 为多。在 Scatchard 分析中, [<sup>3</sup>H]PCP 与血管的最大结合能力 ( $B_{max}$ ) 为  $4.69 \pm 0.29$  pmol/mg 蛋白<sup>(2)</sup>, [<sup>3</sup>H]etorphine  $B_{max}$  仅为 14 fmol/mg 蛋白<sup>(1)</sup>。这些实验结果从形态学和受体生化学的角度一致证明血管壁上确实存在能与 etorphine 及 PCP 作特异结合的部位, 且 PCP 受体的密度较 etorphine 高。

已知 etorphine 对  $\mu$ 、 $\delta$ 、和  $\kappa$  型阿片受体均有较高的亲和力。在放射结合分析中, 血管上 etorphine 的特异结合仅能被强啡肽  $A_{1-13}$  所取代 (后者对  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  型阿片受体均有较高亲和力), 则不能被  $\mu$  型阿片受体配体 PL 017 及  $\delta$  型阿片受体配体 DADLE 所取代。结合此结果推测血管壁上 etorphine 的特异结合部位 (即阿片受体) 可能以  $\kappa$  型为主。

在生物检定实验中, 强啡肽  $A_{1-13}$  通过抑制交感神经末梢释放 NE, 从而抑制血管的电场刺激收缩效应 (待发表资料), 而 PCP 则通过促进 NE 的释放来加强血管的电场刺激收缩作用<sup>(2,4)</sup>, 因此设想埃托啡及 PCP 受体很可能位于交感神经末梢上。若这一设想成立的话, 则破坏或去除血管壁上的交感神经末梢, 就会导致该部位上这两种受体的数量减少或消失。因此本文采用 6-OHDA 孵育法<sup>(9,10)</sup>, 观察急性损毁血管壁上交感神经末梢后其受体密度的变化。从 Tab 1 可见, 交感神经末梢损毁后, 血管壁上 etorphine 及 PCP 的放射自显影颗粒数明显减少, 接近 NSB 组的颗粒数。由此表明血管壁上的 etorphine 及 PCP 受体主要分布在

Tab 1. Autoradiographic optical density of [<sup>3</sup>H] etorphine and [<sup>3</sup>H]phencyclidine in the rabbit mesenteric artery. Autoradiographic optical density was detected by microspectrophotometry.  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*\* $P < 0.01$  vs total binding.

Group	Absorbance (A/50.27 $\mu\text{m}^2$ )	
	Etorphine	Phencyclidine
Total binding	$0.416 \pm 0.36$ (n = 44)	$0.55 \pm 0.09$ (n = 40)
Non-specific binding	$0.044 \pm 0.07^{***}$ (n = 46)	$0.023 \pm 0.06^{***}$ (n = 23)
6-OHDA <sup>1</sup>	$0.068 \pm 0.06^{***}$ (n = 35)	$0.065 \pm 0.02^{***}$ (n = 29)

<sup>1</sup>6-OHDA = Total binding after incubation with  $\beta$ -hydroxydopamine.

交感神经末梢上。

Fig 1 显微镜下观察结果显示了, 交感神经末梢完整时, *etorphine* 及 *PCP* 的放射自显影颗粒特异地分布在血管壁的外膜及肌层组织上, 而交感神经末梢损毁后, 这种特异分布几乎消失。这提示血管壁上的 *etorphine* 及 *PCP* 受体主要分布于外膜及肌层的交感神经末梢上。

*Etorphine* 及 *PCP* 受体在血管壁上这种特异性分布, 对进一步阐明强啡肽及 *PCP* 调节血管舒缩活动的机理提供了形态学证据。

#### REFERENCES

- 1 Sun FY, Yu GH, Zhang AZ. Kappa-opiate receptor in blood vessels. *Acta Pharmacol Sin* 1983; 4 : 100
- 2 Zhu H, Zhang AZ, Zhang LM, Xu XR, Ye WL. Phencyclidine receptor in blood vessels. *Chin J Physiol* 1986; 2 : 47
- 3 Sun FY, Zhang AZ, Zhang LM, Yu GH. Inhibitory effects of dynorphin on electric field stimulation induced contraction of blood vessels *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5 : 245
- 4 Sun FY, Zhu H, Zhang LM, Xu XR, Zhang AZ. Dextrophan: an antagonist for phencyclidine receptors. *Life Sci* 1987; 40 : 2303
- 5 Giles T, Sander G, Merz H. Quaternary opiate antagonists lower blood pressure and inhibit leucine-enkephalin responses. *Eur J Pharmacol* 1983; 95 : 247
- 6 Quirion R, Hammer Jr RP, Herkenham M, Pert CB. Phencyclidine (angel dust) /  $\sigma$  "opiate" receptor: visualization by tritium sensitive film. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78 : 5881
- 7 Young WS, Kuhar MJ. A new method for receptor autoradiography: [ $^3\text{H}$ ]opioid receptors in rat brain. *Brain Res* 1979; 179 : 255
- 8 Sun FY, Zhang AZ. Dynorphin receptor in the blood vessels. *Neuropeptides* 1985; 5 : 595
- 9 Thoenen H, Tranzer JP. The pharmacology of 6-hydroxydopamine. *Annu Rev Pharmacol* 1973; 13 : 169
- 10 Aprigliano O, Hermsmeyer K. *In vitro* denervation of the portal vein and caudal artery of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 198 : 568

### Papers are welcome

*Acta Pharmacologica Sinica* publishes papers on a broad range of topics of general interest to pharmacologists and toxicologists, both experimental and clinical. Manuscripts in English or Chinese of original research, from any country, are welcome.

The "Instructions to authors" appeared in *Acta Pharmacol Sin* 1989 Jan; 10 (1): 1-6, which were essentially in accordance with the "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" published in *Ann Intern Med* 1988; 108 : 258-65 and *Br Med J* 1988; 296 : 401-5.

An ABSTRACT (no more than 150 words) is followed by 3-10 KEY WORDS, using terms from medical subject headings list from *Index Medicus* 1987 Jan, 28 (1 Pt 2) when possible. Mean values must be accompanied by SD (not SEM). Body weights are expressed in actually measured  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . Do not include more significant figures in the data than are justified by the accuracy of the determinations. Use the *Système International d'Unités* (SI units). The statistical significances are indicated by \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$ . The number of REFERENCES should not exceed 15.

Please send manuscripts to *Acta Pharmacologica Sinica*, 319 Yue-yang Road, Shanghai 200031, China. Telephone 311833, Telegram 3434, Telex 33275 CASS CN.