

大鼠后肢热诱导的缓激肽和 P 物质的释放

唐法娣¹, 米原典史, 今井康夫, 滝内 正, 猪木今三, 卞如濂¹
(大阪大学齿学部药理学教室, 大阪 565, 日本国)

R 965.2

Releases of bradykinin and substance P by heating hind paw of rat

radioimmunoassay inbred BN rats; heat; kallikrein-kinin system

TANG Fa-Di¹, YONEHARA Norifumi, IMAI Yasuo, TAKIUCHI Sou, INOKI Reizo, BIAN Ru-Lian¹ (Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Osaka University, Osaka 565, Japan)

ABSTRACT Contribution of kallikrein-kinin system to heat-induced substance P (SP) release into the periphery was studied by using plasma kininogens-deficient strain Brown Norway Katholiek (B/N-Ka) and normal strain Brown Norway Kitasato (B/N-Ki) rats. Bradykinin (BK) and SP levels in the sc perfusates of the hind instep were measured by radioimmunoassay. In B/N-Ki rat, immersion of hind paw into hot water (47 °C) for 20 min led to an increase of BK ($43 \pm 34 \text{ fmol} \cdot \text{min}^{-1}$) and SP ($11.1 \pm 9.7 \text{ fmol} \cdot \text{min}^{-1}$) in the perfusate, whereas those in B/N-Ka rat (BK $1.3 \pm 1.0 \text{ fmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ($P < 0.01$), SP $5.5 \pm 3.5 \text{ fmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ($P < 0.05$)) were remarkably less. Heat-induced extravasation (leakage of Evans blue) in B/N-Ka rat was also less than that in B/N-Ki rat ($P < 0.05$).

Results suggest that kallikrein-kinin system is involved in the release of SP into the periphery, ie, BK released into the extravascular space by noxious heat stimulation intervenes in SP release.

KEY WORDS bradykinin; substance P;

Received 1992-08-31

Accepted 1993-08-11

¹ Now in Department of Asthmatic Drug Research, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006, China.

A 摘要 用放射免疫法测定缓激肽(BK)和 P 物质(SP)含量。发现正常大鼠(B/N-Ki)左后肢用 47 °C, 热水刺激 20 min, 后肢足跖皮下灌流液中 BK 和 SP 含量分别为 43 ± 34 和 $11.1 \pm 9.7 \text{ fmol} \cdot \text{min}^{-1}$, 比热刺激前显著增加, 但在血浆激肽原缺乏大鼠(B/N-Ka), BK 和 SP 含量分别为 1.3 ± 1.0 和 $5.5 \pm 3.5 \text{ fmol} \cdot \text{min}^{-1}$, 明显低于 B/N-Ki 大鼠。B/N-Ka 大鼠的 Evans 蓝漏出量也低于 B/N-Ki 大鼠。表明热刺激时产生的 BK 可介导 SP 的释放。

关键词 缓激肽; P 物质; 放射免疫测定; 褐色挪威大鼠; 热; 激肽释放酶-激肽系统

P 物质(substance P, SP)不仅存在于感觉神经的中枢端, 也存在于末梢端, 特别是在皮肤主要分布于毛细血管周围⁽¹⁾。大鼠后肢 47 °C 热水刺激可使足跖皮下灌流液中 SP 含量增加, 足跖 sc SP, SP 量加大, 水肿加重⁽²⁾。ia SP 可引起血管通透性亢进⁽³⁾。用高分子激肽原耗竭剂 stem bromelain 和缓激肽(bradykinin, BK)生成阻断剂 emorfazone iv, 热刺激时 SP 的释放增加受到抑制⁽³⁾。为了探索激肽释放酶-激肽系统所产生的 BK 在血管外参与感觉神经末梢释放 SP 及与血管通透性的关系, 选用血浆中激肽原(kininogen)缺乏的大鼠 Brown Norway Katholiek (B/N-Ka)和正常大鼠 B/N-Kitasato (B/N-Ki), 用后肢同轴灌流法, 热刺激, 观察灌流液中 SP 含量的变化及血管通透性的改变。

MATERIALS AND METHODS

大鼠 B/N-Ka 大鼠是遗传性血浆中高分子激肽原和低分子激肽原缺损的大鼠⁽⁴⁾, B/N-Ki 正常大鼠。从日本北里大学得到种鼠, 繁殖供实验用。实验用大鼠 10—12 wk, 0.18±0.04 kg, ♀♂ 皆用, ip 乌拉坦 780 mg·kg⁻¹ 麻醉。

材料 SP (Peptide Institute Inc, Japan), SP 抗血清(本研究室自制), [¹²⁵I][Tyr⁸]SP (New England Nuclear Co, Boston, USA), BK (Peptide Institute Inc, Japan), BK 抗体(NZK IBAS, 日本脏器制药), {2,3-[3,4-³H]prolyl}BK (New England Nuclear Co, Boston, USA)。

大鼠足跖皮下灌流实验 按 Rocha e Silva⁽⁵⁾ 足跖皮下灌流法进行。制作外径 4 mm, 长约 4 cm 的聚乙烯软管, 管内插入外径 1 mm 的细聚乙烯软管, 固定, 前端比外管长 5 mm 的二重同轴套管, 从仰位左后大腿外侧切口处经皮下向足趾方向插入, 使前端到达足背皮下。从细管用恒速泵带动, 0.1 ml·min⁻¹ 的流速, 从细管泵入生理盐水灌流液(内含 bestatin 30 mg·L⁻¹ 和 captopril 0.1 mmol·L⁻¹ 以防止 SP 分解, 在收集管中用无水乙醇 2 ml 防止 BK 分解)。在冰浴中收集外管的滴出液, 每管 1 ml。得到的样本冰冻干燥后, 用 Yonehara 方法⁽⁶⁾ 进行 [¹²⁵I]SP 放射免疫测定和 [³H]BK 放射免疫测定。

热刺激 将灌流侧足浸在 47±0.5 °C 热水中 20 min。

大鼠 Evans 蓝漏出实验 用同上大鼠足跖灌流法, 在大鼠足跖皮下灌流开始 40 min 后, 从对侧足股静脉插管内注射 Evans 蓝 10 μmol·kg⁻¹, 30 min 后, 将左后肢浸在 47±0.5 °C 的热水中 20 min, 灌流液中 Evans 蓝量用岛津 UV-240 分光光度计 620 nm 测定。

RESULTS

B/N-Ki, B/N-Ka 大鼠热刺激后肢足跖皮下灌流液中 BK 的含量 两组大鼠在热刺激前灌流液中 BK 含量有显著差异, B/N-Ka 大鼠显著低于 B/N-Ki 大鼠 ($P < 0.01$)。热刺激中, B/N-Ki 大鼠灌流液中 BK 含量增加, 而 B/N-Ka 大鼠无明显增加, 低于 B/N-Ki 大鼠

($P < 0.01$) (Tab 1)。

Tab 1. Immunoreactive bradykinin (BK) and substance P (SP) (fmol·min⁻¹) in sc perfusate of hind instep before, during, and after 47 °C stimulation (St) for 20 min. $\bar{x} \pm s$. ^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs B/N-Ki rat; ^d $P > 0.05$, ^e $P < 0.01$ vs before St.

| Group | B/N-Ki rat (n) | B/N-Ka rat (n) |
|--------------|-----------------------------|----------------------------|
| BK Before St | 12.4±7.3 (15) | 0.8±1.2 (16) ^c |
| During St | 43.0±34.3 (15) ^f | 1.3±1.0 (16) ^{cd} |
| After St | 21.2±6.4 (15) | 1.1±1.6 (16) ^c |
| SP Before St | 2.8±2.8 (13) | 3.4±3.2 (15) ^e |
| During St | 11.1±9.7 (13) ^f | 5.5±3.5 (15) ^{cd} |
| After St | 3.7±3.0 (13) | 3.8±3.0 (15) ^e |

B/N-Ki, B/N-Ka 大鼠热刺激后肢足跖皮下灌流液中 SP 的含量 热刺激前两组大鼠 SP 含量相近 ($P > 0.05$), 热刺激中 B/N-Ki 大鼠足跖皮下灌流液中 SP 含量增加 ($P < 0.01$), B/N-Ka 大鼠的这种增加低于 B/N-Ki 大鼠 ($P < 0.05$), 与热刺激前比较无显著差异 ($P > 0.05$) (Tab 1)。

B/N-Ki, B/N-Ka 大鼠热刺激后肢足跖皮下灌流液中 Evans 蓝漏出量 B/N-Ka 大鼠在热刺激时足跖皮下灌流液中 Evans 蓝漏出量低于 B/N-Ki 大鼠 ($P < 0.05$) (Tab 2)。

Tab 2. Evans blue level (μg·ml⁻¹·10 min⁻¹) in the sc perfusate of the hind instep before, during and after noxious heat stimulation. $\bar{x} \pm s$. ^b $P < 0.05$ vs B/N-Ki rat.

| Group | B/N-Ki rat (n) | B/N-Ka rat (n) |
|------------------------|----------------|--------------------------|
| Before St | 0.6±0.9 (8) | 0.1±0.1 (8) |
| During St First 10 min | 4.2±2.7 (8) | 1.0±0.9 (8) ^b |
| During St Last 10 min | 5.8±2.9 (8) | 2.5±1.7 (8) ^b |
| After St | 2.4±1.4 (8) | 2.3±1.5 (8) |

DISCUSSION

激肽原缺乏的大鼠足跖皮下灌流液中 BK

含量甚微, 而 SP 的含量与正常大鼠相同。

热刺激可使 SP 释放增加, 这有可能与存在于感觉神经 C 纤维和 A δ 纤维的多型感受器 (polymodal receptor) 有关, 多型感受器对炎症化学介质致痛物质 BK 有很高的亲和性, 另外, 已知 BK 的致炎作用之一就是介导 C 纤维的兴奋⁽⁷⁾。Rocha e Silva⁽⁵⁾ 曾经报道, 用 47 °C 左右的热刺激, 在足跖灌流液中显著增加的是 BK, 而不是 5-HT, 组胺。本研究室先前的研究发现用高分子激肽原耗竭剂 stem bromelain 和 BK 阻断剂 emorfazone, iv, 热刺激时, SP 的释放增加受到抑制⁽²⁾。本研究发现热刺激时 B/N-Ki 正常大鼠 BK 释放显著增加, BK 释放增加的同时 SP 的释放亦增加, 反之, 在激肽原缺乏的 B/N-Ka 大鼠, 由于热刺激时, 激肽释放酶-激肽系统产生 BK 量少, SP 的释放量明显低于 B/N-Ki 大鼠。因此猜想, 热伤害刺激时产生的 BK 引起多型感受器兴奋, 在感觉神经的末梢端通过轴索反射, 使感觉神经末梢释放 SP。Evans 蓝漏出量测定发现 BK 缺乏可使血管通透性降低。本研究提示激肽释放酶-激肽系统参与 SP 的释放, 即 BK 释放到血管外介导感觉神经末梢 SP 的释放, BK 还可直接作用于血管引起血管通透性增加。

REFERENCES

- 1 Hokfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res* 1975; **100** : 235-52.
- 2 Yonehara N, Shibutani T, Imai Y, Inoki R, Matsuura H. Involvement of substance P in a thermal injury reaction. *Jpn J Inflammation* 1987; **7** : 425-30.
- 3 Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1979; **310** : 175-83.
- 4 Oh-ishi S, Hayashi I, Utsunomiya I, Hayashi M, Yamaki K, Yamasu A, et al. Roles of kallikrein-kinin system in acute inflammation: studies on high- and low-molecular weight kininogens-deficient rats (B/N-Katholiek strain). *Agents Actions* 1987; **21** : 384-86.
- 5 Rocha e Silva M, Antonio A. Release of bradykinin and mechanisms of production of a thermic edema (45 °C) in rat paw. *Med Exp* 1960; **8** : 371-82.
- 6 Yonehara N, Shibutani T, Tsai H-Y, Inoki R. Effects of opioids and opioid peptide on the release of substance P-like material induced by tooth pulp stimulation in the trigeminal nucleus caudalis of the rabbits. *Eur J Pharmacol* 1986; **129** : 209-15.
- 7 Jancsó G, Király E, Jancsó-Gábor A. Chemosensitive pain fibres and inflammation. *Int J Tiss React* 1980; **2** (2) : 57-66.

首届中法药理学术交流会在沪举办

经中国药理学会批准, 由中法药理学家金正均教授、苏定冯教授、Advenier 教授、Sassard 教授等筹办, 由上海第二军医大学承办的首届中法药理学术交流会将于 1994 年 10 月在上海举办, 现已开始征文, 请与 200433 上海市翔殷路 594 号上海市药理与毒理学会谭建权教授联系, 电话 (021)-549-0018×41191。