

• 实验研究 •

生地、龟板和附子、肉桂对“甲亢”大鼠 β -肾上腺素能受体的影响

上海第二医科大学 药理教研室 冯国平 荣征星 易宁育
基础部同位素室 张世德 张惠民 夏宗勤

内容提要 本文用放射配基结合分析法观察了滋阴药生地、龟板和助阳药附子、肉桂对甲状腺激素过多大鼠模型肾脏 β -肾上腺素能受体最大结合容量和亲和力的影响,结果表明,用注射 T_3 的方法造成的甲状腺激素过多大鼠模型,其肾脏 β -受体最大结合容量显著较正常组增加,生地、龟板能使之恢复正常,而附子、肉桂则使之进一步升高。正常模型及用药组间亲和力无明显差异。结合以往的研究结果,我们认为从分子水平调节 β -受体的最大结合容量可能是某些滋阴药和助阳药的重要作用机理之一。

以往的研究表明^[1],甲状腺激素过多的动物模型注射 β -受体激动剂异丙肾上腺素后,血浆cAMP升高明显超过正常,说明病理动物 β -受体cAMP系统对 β -受体激动剂反应性异常增高,滋阴药生地、龟板能使这种升高的反应性趋向正常,而助阳药附子、肉桂则使之进一步升高,说明二者均可调节这一系统的反应性,但作用方向相反。基于细胞膜受体与环核苷酸系统的密切关系,且上述研究是在使用 β -受体激动剂的基础上进行的,因此考虑这种环核苷酸系统反应性改变的环节及药物的作用是在相应的受体上。本文采用放射配基结合分析法*测定了甲状腺激素过多(以下简称甲亢)的大鼠模型肾脏 β -受体最大结合容量(RT)及亲和力(用介离常数 K_D 表示)的变化及生地、龟板和附子、肉桂的作用。

材料和方法

一、试剂及中药:放射配基用 3H -双氢心得舒(3H -Dihydroalprenolol, 简称 3H -DHA)比放射性为45 Ci/mmol (Amersham 产品)或46 Ci/mmol (北京401所产品)。拮抗剂用消旋心得安(北京制药厂)。玻璃纤维滤膜用虹光69型(上海虹光造纸厂)。

中药生地(*Rehmannia glutinosa*)、龟板(*Plastrum testudinis*)、附子(*Aconitum carmichaeli*)和肉桂(*Cinnamomum cassia*)均由上海市药材公司

供给,并经上海医科大学生药学教研室鉴定。生地和龟板水提物每毫升含生药1g和0.6g,附子和肉桂水提物每毫升含生药各1g,以下简称生龟和附桂。

二、动物模型:Wistar大鼠,体重150~200g,雌雄不拘。按体重配对,随机分为正常、 T_3 及 T_3 +中药组。后二组间口皮下注射 T_3 500 μ g/kg/次,共3次,正常组注射等量生理盐水。 T_3 +中药组则同时每天用生龟2ml或附桂1ml灌胃,余二组灌等量水,共6天。灌服最后一次中药后禁食6~12小时测耗氧率,以对照组为100%,计算给药组耗氧率的相对值。次日同时平行测定各组肾脏的 β -受体。

三、 β -受体测定:大鼠断头放血,迅速取肾脏,称重后加入6~倍体积的预冷(4 $^{\circ}$ C)0.1M KH_2PO_4 -NaOH缓冲液(pH 7.7,含0.25M的蔗糖和10mM的 $MgCl_2$),冰浴匀浆。3000 $\times$ g低温(0 $^{\circ}$ C)离心10分钟,取上清液再于30000 $\times$ g低温离心15分钟。弃上清液,沉淀用培育缓冲液(上述缓冲液中去0.25M蔗糖,加0.2%的维生素C)匀浆悬浮,使最终蛋白质含量为2~4mg/ml(Lowry法)。

在棕色试管中加入不同浓度的 3H -DHA(1~5nM)及适量缓冲液,非特异结合管加消旋心得安(最终浓度 5×10^{-6} M),最后加膜蛋白200 μ l,总体积为400 μ l。置37 $^{\circ}$ C恒温水浴振荡10~20分钟,然后迅速经玻璃纤维滤膜减压抽滤,并用15~20ml 4 $^{\circ}$ C缓冲液快速(30秒以内)抽洗,以洗去未结合的 3H -DHA。滤膜经80 $^{\circ}$ C烤干后置闪烁液(含0.4%B-PBD的二甲苯5ml)中经YSJ-76型液闪仪测定。含心得安各管的结合率

*放射配基受体(或受点)结合分析法是利用放射性同位素标记的高比放射性配基,研究它们和相应受体结合反应的动力学特性和受体数量的方法

代表非特异性结合,一般占总结合的30%以内。

上述受体分析法主要参考Williams等方法^(2~4)作了如下改进:(1)用0.1M KH_2PO_4 -NaOH代替文献中常用的Tris-HCl缓冲液取得较好效果。从几次比较实验看,前者使 β -受体与 ^3H -DHA的结合率和亲和力均有所提高,且大大减少了每次实验的费用,也比较接近生理条件。(2)在分离结合和游离 ^3H -DHA过程中,我们使用了多头细胞收集器,可定时定量用缓冲液同时分离12个反应管,减少了误差,提高了效率。

实验结果用Scatchard作图法计算受体最大结合容量(R_T)和亲和力(以介离常数 K_D 表示)⁽⁵⁾。

结 果

一、上述改进后的受体测定方法比较稳定,实验结果表明,一定数量的膜蛋白结合的放射配基随着配基浓度的增加而渐趋饱和,Scatchard作图法得到一根直线,用最小二乘法处理数据,线性关系良好。用Hill法计算得Hill系数为0.99,提示所测定的反应体系中无结合位点间的协同或拮抗作用。据此,我们编制了计算机程序,全部数据用IBM-PC/XT或SHARP PC-1500计算机处理并作图。

二、注射 T_3 后(甲亢)大鼠肾脏 β -受体最大结合容量显著增加,与正常组相比, $P<0.01$,而受体对标记DHA的亲和力(以 K_D 表示)则未见显著变化,且二阶段的实验重复性良好(表1、2)。

表1 生龟对甲亢大鼠肾脏 β 受体的作用 ($M\pm SE$)

	R_T (fmol/mg蛋白)	K_D (nM)	耗氧率(%)	实验次数
正常组	73.20 ± 2.40	3.11 ± 0.24	100	19
T_3 组	$89.49\pm 4.06^*$	2.90 ± 0.27	149 ± 6	21
T_3 +生龟组	$75.42\pm 3.32^{**}$	2.60 ± 0.25	$123\pm 5^{**}$	19

*与正常组比, F检验 $P<0.01$,

**与 T_3 组比, F检验 $P<0.01$,下同

三、表1数据表明,用滋阴药生地、龟板治疗“甲亢”大鼠后,可使其增加的肾脏 β -受体 R_T 数量恢复到正常,同时对动物耗氧率的测定也证明了生龟有明显纠正“甲亢”动物耗氧率的作用。

四、实验结果表明,给“甲亢”动物服用附桂后,其肾脏 β -受体 R_T 值增加程度显著较未服中药的“甲亢”动物为高($P<0.05$),说明附子、肉桂能使“甲亢”大鼠肾脏 β -受体 R_T 值的异常增加更趋恶化,对动物耗氧率的测定结果也与此一致(表2)。

表2 附桂对甲亢大鼠肾脏 β -受体的作用 ($M\pm SE$)

	R_T (fmol/mg蛋白)	K_D (nM)	耗氧率(%)	实验次数
正常组	73.21 ± 2.98	1.84 ± 0.16	100	17
T_3 组	$90.89\pm 3.61^*$	1.96 ± 0.16	145 ± 5.1	19
T_3 +附桂组	$103.38\pm 4.55^{***}$	2.13 ± 0.18	$162\pm 4.3^{**}$	19

***与 T_3 组比, F检验 $P<0.05$ 。

讨 论

近年来,放射配基结合分析法已成为研究受体的有力工具,我们参照国内外文献建立了 β -受体测定方法,并作了改进,所测正常大鼠肾脏 β -受体最大结合位点(R_T 值)及介离常数(K_D 值)均与文献报道相符⁽⁷⁾,用同法也测定了正常大鼠心、肺、脑等其它组织 β -受体,所得数据也与文献报道一致。其它一系列的考核结果也表明上述方法是稳定可靠的。

我们曾报道“甲亢”动物注射异丙肾上腺素后血浆cAMP升高超过正常⁽¹⁾,国内外文献报道“甲亢”时大鼠心脏和脑等组织 β -受体增加⁽⁸⁾,但未见有关肾脏 β -受体变化的报道。本实验结果表明注射 T_3 后大鼠肾脏 β -受体结合位点明显增加,“甲亢”大鼠 β -受体变化涉及的脏器较广泛, β -受体结合位点的增加有利于激动剂起作用,因此其环核苷酸系统对受体激动剂反应性的异常很可能有一个环节是在于病理情况下受体结合位点的增加。

从实验结果可见,滋阴药生地、龟板能明显纠正甲亢大鼠肾脏 β -受体结合位点数量的异常,而助阳药附子、肉桂则使之恶化,这不仅验证了以往报道的滋阴药和助阳药对病理的动物环核苷酸系统反应性的相反调节作用,也说明滋阴药和助阳药的作用环节之一在于改变细胞膜 β -受体结合位点的数量。

临床上滋阴药能显著改善甲亢等阴虚患者交感肾上腺素能神经兴奋症状,我们认为这一作用是有其物质基础的。综合以往的研究结果,可以认为其作用环节之一很可能是纠正了某些脏器疾病情况下细胞膜 β -受体结合位点的异常。长期的临床实验证明,助阳药附子、肉桂的作用与滋阴药截然相反,本实验结果表明,附桂虽也能调节甲亢动物 β -受体的结合位点数,但其方向恰与生龟相反。耗氧量的测定也证明它使甲亢动物病情恶化,与临床应用完全吻合。

临床研究表明,滋阴药能明显纠正甲亢症状⁽⁸⁾,使血浆cAMP含量趋向正常,但此时血清 T_3 、 T_4 仍显

著高于正常。本文中我们同时测定了各组动物血清 T_3 、 T_4 水平，结果表明生龟对体内 T_3 、 T_4 水平并无明显影响。因此，我们认为它们可能是通过某种机制直接调节了细胞膜 β -受体的最大结合容量，而不是通过改变 T_3 、 T_4 水平间接影响细胞膜 β -受体，但深入的机制有待于进一步研究。

补益药的最大特点是对病理机能状态的整体调节作用。现代科学技术已经证明，细胞膜受体受多种生理病理情况的调节，与整体机能状态密切相关。因此从这一角度进一步研究滋阴药和助阳药的药理机制是有一定意义的。

参 考 文 献

1. 易宁育，等。一些助阳药和滋阴药对环核苷酸系统反应性

的调节作用。核技术1984；2：35。

2. Williams LT. et al Thyroid hormone regulation of β -receptor number. J Biol Chem 1977；252：2887。

3. 黄胜利，等。用放射配基结合法测定 β -肾上腺素能受体。中华核医学杂志1983；3(1)：12。

4. 冯亦璞，等。 β -肾上腺素能受体的测定及我们的一些实验。中华核医学杂志1983；3(1)：8。

5. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann N Y Acad Sci 1949；51：660。

6. 夏宗勋，等。四种“虚证”模型的建立及其与环核苷酸系统的关系。中西医结合杂志1984；4(9)：453。

7. Gavendo S. β_1 -adrenergic receptors in kidney tubular cell membrane in the rat Kidney International 1980；17：764。

8. 邱安莹，等。甲减症和甲亢症的中西医结合临床研究。中医杂志；1980；21(11)：27。

丹参酮II_A磺酸钠的促纤溶作用 (摘要)

苏州医学院生化室 王中枢 杨宏德 李惠珍 杨保津*

从丹参中提取的几种纯品成分的实验结果显示，丹参酮II_A磺酸钠有一定程度的促纤维蛋白溶解的活性。经初步观察，其作用与纤溶酶原激活为纤溶酶有关。

方 法 按T. Astrup法制成含有纤溶酶原的纤维蛋白平皿和去纤溶酶原的纤维蛋白平皿。

将丹参酸、隐丹参酮、丹参酮II_A、II_B、II_C磺酸钠、原儿茶醛和丹参素等几种纯品成分各用其最适溶媒溶解后，分别点样(10 μ l)于两种平皿上，37℃保温24小时后，观察纤维蛋白溶解情况，并用尿激酶对照。

二、将有活性的样品加一定量的纯纤溶酶原点样于去纤溶酶原的纤维蛋白平皿上，经37℃保温24小时后，观察其纤溶情况，同样用尿激酶对照。

结 果 1. 在去纤溶酶原平皿上，所有各纯品均不显纤维蛋白溶解的透明圈，尿激酶亦同。在有纤溶酶原的纤维蛋白平皿上，只有II_A磺酸钠和尿激酶显出纤维蛋白溶解的透明圈，其纤溶面积与浓度有正相关关系。

2. 丹参酮II_A磺酸钠和尿激酶分别加纯纤溶酶原后都能在去纤溶酶原的纤维蛋白平皿上出现纤维蛋白

溶解的透明圈。

讨 论 我们曾多次用丹参水提液和注射液进行同样实验均未能得到阳性结果，仅见平皿周围有色素环扩散出现，原因是丹参水提液和注射液中都含有大量杂质，尤其鞣质干扰试验。例如鞣质能使蛋白质变性沉淀，酶失去活性，而在血液凝固和纤维蛋白溶解的试验中，纤维蛋白原是一个关键物质，如血浆中纤维蛋白原被鞣质部分沉淀后即可表现出溶解纤维蛋白原的假象；此种血浆遇凝血酶当然就不容易凝固，又表现为抗凝效应，实际也是一种假象。当设法将鞣质除去后，又易被认为丹参对纤溶、凝血两方面都没有作用。本实验结果提示：(1)丹参酮II_A经磺酸化或水溶性后，具有促纤溶活性，经初步观察其作用不是直接溶解纤维蛋白而是与纤溶酶原激活为纤溶酶有关，其详细机理尚待探索。(2)脂溶媒溶解的脂溶性成分不适于本实验，因为脂溶媒本身足以使平皿上的蛋白质变性，为此，虽然没有测出脂溶性成分的阳性结果，还不能排斥丹参中还另有致纤溶的成分。(我们按药物所提供的展层剂试验发现在最前沿还有一个未知的成分，亦有明显的促纤溶作用)。(3)我们认为当用中草药粗提液或注射液试验时，往往出现抑制酶活性的效应是一种假象，其原因也常常是其中所含的鞣质对蛋白质的变性沉淀所致。

* 中国科学院上海药物研究所

Effects of *Rehmannia glutinosa*, *Plastrum testudinis* and *Aconitum carmichaeli*, *Cinnamomum cassia* on the Beta-Adrenergic Receptors of Hyperthyroid Rat Kidneys

Feng Guoping (冯国平), Zhang Shide (张世德), Yi Ningyu (易宁育), et al
Shanghai Second Medical University, Shanghai

The effects of some Yin tonics (*Rehmannia glutinosa* and *Plastrum testudinis*) and Yang tonics (*Aconitum carmichaeli* and *Cinnamomum cassia*) on the beta-adrenergic receptors of kidney of rats with T_3 injection-caused hyperthyroid were studied. The maximum binding capacity (RT) and dissociation constant (KD) were determined with 3H -DHA binding assays. The results were as follows: (1) The RT value of hyperthyroid rat kidney (89.5 ± 4.1) was significantly higher than normal (73.2 ± 2.4 , $P < 0.01$). There was no significant difference in KD values between the two groups. (2) By administration of *Rehmannia* and *Plastrum*, the RT of hyperthyroid rat was reduced to normal (75.4 ± 3.3 , $P < 0.01$), while *Aconitum* and *Cinnamomum* further increased the RT value of the hyperthyroid rat (103.4 ± 4.6 , $P < 0.05$). Both *Rehmannia*, *Plastrum* and *Aconitum*, *Cinnamomum* did not change the KD value of the hyperthyroid rat. (3) The measurements of the oxygen consumption rate were also coincided with the above results (control, hyperthyroid, hyperthyroid treated with *Rehmannia* and *Plastrum* and treated with *Aconitum* and *Cinnamomum* were 100%, $149 \pm 6\%$, $123 \pm 5\%$ and $162 \pm 6\%$ respectively)

Combined with other studies we concluded tentatively that Yin tonics (*Rehmannia* and *Plastrum*) and Yang tonics (*Aconitum* and *Cinnamomum*) could regulate the RT value of beta-adrenergic receptors along the opposite directions in hyperthyroid rat kidneys, which may be one of the important mechanisms of Yin and Yang tonics.

(Original article on page 606)

Observation on the Anti-Inflammatory Action of Propyl Gallate

Zhang Jiajun (张家俊), Liu Chunmei (刘春梅), Chen Wenwei (陈文为)
Dept. of Biochemistry, Central Laboratory, Beijing College of TCM, Beijing

Propyl gallate, i.e. 801, is a derivative of gallic acid, which is isolated from Chinese herbal drug *Paeonia rubra*. It has strong ability in scavenging superoxide anion radical, inhibiting the increase in capillary permeability induced by intraperitoneal injection of 0.7% acetic acid 10 ml/kg in mice and the swelling of hind paw induced by hypodermic injection of 0.1% histamine 0.1 ml in rats, and reducing the polymerization of hyaluronic acid induced by superoxide anion radical. It is presumed that the compound possesses anti-inflammatory action.

(Original article on page 609)

Experimental Study on Anti-Tumor Action of Berbamine in Mice

Zhu Xiwei (朱希伟), Sui Wenzuo (隋文作), et al
Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang

This paper reports on the effect of berbamine treatment of tumor in mice. After hypodermic transplantation of 4.0×10^5 S_{180} cells and intraperitoneal transplantation of 4.0×10^5 HAC or EAC ascitic tumor cells, the mice in the berbamine treated group was given 20 mg/kg berbamine intraperitoneally, once daily for ten days. The growth suppressing rate of S_{180} tumor cells was 75~78%, and the lifespan extension rate of the mice with HAC and EAC was 68~80% in the berbamine treated group. Light and electron microscopic examination showed that there were necrosis and metabolic disturbance in the tumor cells treated by berbamine. The experimental result showed that berbamine can suppress the transplanted tumor in mice effectively.

(Original article on page 611)