

间硝地平对高血压心肌肥厚老龄鼠肾和肺细胞膜二氢吡啶受体的影响

徐毅* 奚涛** 饶曼人

(南京医科大学心血管药理研究室 南京 210029)

间硝地平(*m*-nifedipine, *m*-Nif)系我国研制的二氢吡啶(DHP)类钙拮抗剂,有扩张血管、降低血压和逆转高血压心肌肥厚和降低高血压心肌肥厚大鼠心肌 DHP 受体密度作用^(1~2)。但该药在逆转高血压心肌肥厚同时对肾和肺 DHP 受体密度影响研究尚未见报道,又鉴于肾和肺是高血压病的受累脏器,故本文拟在观察肾血管性高血压心肌肥厚大鼠的肾和肺 DHP 受体的变化以及*m*-Nif对这些变化的影响,以探讨其保护肾,肺功能的机制。

材料与方 法

药品 *m*-Nif 由天津医药工业研究所赠送;(+)[³H]isradipine(放射活性 3219 TBq·mol⁻¹)购自英国 Amersham 公司; (±) isradipine (PN₂₀₀₋₁₁₀)由瑞士 Sandoz 公司赠送;聚乙二醇 400 购自南京试剂厂(95%);其余试剂全部为 AR 级。

大鼠模型 成年 Sprague-Dawley ♂ 大鼠(江苏省动物中心提供),体重 470±30 g,12 月龄。本室饲养 1 周,用 3%戊巴比妥麻醉(3 mg·kg⁻¹ ip),仰卧固定,常规皮肤消毒,于腹正中线剖腹,近腹主动脉分离一段左肾动脉,将银夹(0.2 mm 孔内径)放置在左肾动脉上,不触及右肾(两肾一夹)。术前和术后大鼠给予常规固体饲料和瓶装饮水,以及每周测量一次空腹体重及清醒状态下大鼠血压(尾容积法,电脑大鼠血压心率仪, MRS III,上海高血压研究所监制)。术后 4 周测量大鼠血压达 23 kPa,术后 8 周作为实验动物(术后 8 周,肾血管性高血压大鼠左心室湿重与体重之比>50%,视为左心室肥厚)⁽³⁾。大鼠随机分为 3 组,每组 4 只。(1)高血压治疗组(*m*-Nif 组)术后 9 周,取 *m*-Nif 溶于聚乙二醇 400,按 20 mg·kg⁻¹ ig, qd×9 周。(2)高血压对照组(左心室肥厚组, LVH);术后 9 周,聚乙二醇 400 2 ml·kg⁻¹ ig, qd×9 周。(3)正常血压对照组(Normal 组);未行手术,聚乙二醇 400 2 ml·kg⁻¹ ig, qd×9 周。

肾和肺细胞膜悬浮液制备 术后 18 周,大鼠全部断颈处死,取肾和肺,剪去肾和肺周围结缔组织,用预冷的匀浆液(20 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, 0.1 mmol·L⁻¹ PMSF)洗去血液,剪碎,按 Glossmann 和 Ferry⁽⁴⁾方法制得匀浆,以 1500×g 和 25000×g 离心 8 次,取沉淀悬浮于 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(0.1 mmol·L⁻¹ PMSF, pH 7.4)中,置入-20℃冰箱保存。实验前用考马斯亮兰法测定蛋白含量。

本文于 1994 年 4 月 21 日收到。

* 现在为湖南医科大学心血管生理研究室博士

** 现在为南京大学生物化学系博士后 编政编码 210008

放射配体结合分析法 按 Glossmann 和 Ferry 法⁽¹⁾进行配体结合试验。反应管置于冰浴中,分别加入 0.1 ml 肾和肺细胞膜悬液(含 0.25~0.50 mg·ml⁻¹蛋白),不同浓度(+) [³H] PN₂₀₀₋₁₁₀ (0.015~1 nmol·L⁻¹), 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 和(±) PN₂₀₀₋₁₁₀ 1 μmol·L⁻¹, 反应管内终容量为 0.25 ml。反应管在 37℃ 孵育 60 min, 69 号玻璃纤维滤纸过滤反应液。过滤时,每反应管用预冷 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液快速冲洗 3 次,每次 8 ml。滤过的滤膜烘干后加入闪烁液(0.4% PPO 二甲苯溶液)4 ml,静置 4 h。由液闪仪(Packard, Tricarb 2200 USA)测定。仪器效率为 40%,非特异结合占总结合 20~30%。

结 果

m-Nif 对大鼠血压和心脏湿重的影响

手术前各组大鼠血压为 13.3±2.7 kPa。术后 4 周, LVH, *m*-Nif 组大鼠血压分别为 24.8±1.1 和 24.2±0.6 kPa,较手术前增加 80±1 和 81±3%。服药后(术后 18 周),*m*-Nif, LVH 组较服药前分别降低了 45±6, 4±1%。心脏湿重: LVH 组大鼠左心室湿重与体重之比,较正常组增加 63±6% ($P<0.001$); *m*-Nif 组大鼠左心室湿重与体重之比,较 LVH 组减少 31±7% ($P<0.001$),与 Normal 组比较无显著差异(见表 1)。

Tab 1 Effects of *m*-Nif on blood pressure and weight of left ventricle in two kidney-one clip hypertensive elderly rats ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

| Group | BP (kPa) | | | Weight | | |
|---------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|------------|----------------------------|-------------------------|
| | Control | Before | After | BW (g) | LVFWW (mg) | LVFWW/BW (mg/g) |
| Normal | 14.3±0.9 | 13.7±0.5 | 13.4±0.9 | 436.9±35.2 | 500.0±50.0 | 1.2±0.2 |
| LVH | 13.8±0.6 ⁺⁺⁺ | 24.8±1.1 ^{####} | 23.9±1.9 ^{####} | 456.9±39.4 | 870.0±78.9 ^{####} | 1.9±0.1 ^{####} |
| <i>m</i> -Nif | 13.4±1.0 ⁺⁺⁺ | 24.2±0.6 ^{####} | 13.3±0.9 ^{+++***} | 426.3±47.2 | 550.0±50.0 ^{***} | 1.3±0.1 ^{***} |

LVH: left ventricle hypertrophied; *m*-Nif: LVH regressed by *m*-Nif at 9 wk postclipping; Control: basic blood pressure; Before: BP before administration of drugs; After: BP after administration of drugs; BW: body weight; LVFWW: left ventricle free wall wet weight. ⁺⁺⁺ $P<0.001$ compared with before; ^{***} $P<0.001$ compared with LVH; ^{####} $P<0.001$ compared with normal.

m-Nif 对肾和肺 DHP 受体密度和亲和力的影响

用 Scatchard 法处理得一直线,由直线斜率的负倒数得到大鼠肾和肺 DHP 受体的平衡解离常数(亲和力) K_D ,由直线在横座标上的截距得到受体最大结合(受体密度) B_{max} , Hill 系数为 1,结果见表 2。

肾 Normal, LVH, *m*-Nif 3 组的肾细胞膜 K_D 比较无显著差异。LVH 组肾细胞膜 B_{max} 较 Normal 组增加 42±9% ($P<0.001$), *m*-Nif 组肾细胞膜 B_{max} 较 LVH 组减少 31±9% ($P<0.001$),见表 2。

肺 Normal, LVH, *m*-Nif 组肺细胞膜 K_D 相比无显著差异, LVH 组肺细胞膜 B_{max} 较 Normal 组增加 100±9% ($P<0.001$),见表 2。

Tab 2 Effects of *m*-Nif on characteristics of DHP binding sites in the cell membranes of kidney and lung from LVH induced by two kidney-one clip (2k-1c) hypertension in elderly rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

| | K_D ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) | | B_{max} $\text{fmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ | |
|---------------|--|-------------------|--|-------------------------|
| | Kidney | Lung | Kidney | Lung |
| Normal | 0.090 ± 0.032 | 0.118 ± 0.029 | 492.7 ± 58.0 | 379.7 ± 50.6 |
| LVH | 0.107 ± 0.049 | 0.116 ± 0.003 | $699.3 \pm 112.3^{***}$ | $759.1 \pm 34.5^{***}$ |
| <i>m</i> -Nif | 0.094 ± 0.019 | 0.106 ± 0.015 | $481.7 \pm 28.7^{####}$ | $380.8 \pm 33.2^{####}$ |

m-Nif: LVH regressed by *m*-Nif at 9 wk postclipping, *** $P < 0.001$ compared with LVH; #### $P < 0.001$ compared with normal.

讨 论

肾血管性高血压大鼠应用 *m*-Nif 后, 血压下降, 左室湿重明显减轻, 提示心肌组织超负荷状态是引起 LVH 的重要原因, *m*-Nif 逆转 LVH 可能机制主要是通过降低血压, 减轻心肌组织超负荷状态^(2,6)。

实验发现, 在 Normal, LVH 和 *m*-Nif 3 组的肾和肺组织检测出一个高亲和力结合位点的 DHP 受体。其具体表现有(1)随着标记配基浓度的增高, 结合达到了平衡, 即呈可饱和性;(2)由动力学研究和结合饱和实验所求得的 K_D 值, 均在 $10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内;(3)由 Hill 作图求得 Hill 系数在 1 左右。本实验表明 Normal, LVH, *m*-Nif 组大鼠肾和肺组织 DHP 受体的 K_D 值无变化, 说明 LVH, *m*-Nif 组大鼠肾和肺组织 DHP 受体亲和力无变化。其机制尚不清楚。

Lee HR 等发现, DOCA-salt 型高血压大鼠肾和肺 DHP 受体数目较正常对照组大鼠增多⁽⁶⁾, 本实验亦发现 LVH 大鼠肾和肺组织 DHP 受体的 B_{max} 较 Normal 组大鼠增多, *m*-Nif 组大鼠肾和肺组织 DHP 受体 B_{max} 较 LVH 组大鼠减少。*m*-Nif 可使 LVH 大鼠肾和肺 DHP 受体数目降低。产生上述变化的机制仍不明了。有文献认为 LVH 心肌 DHP 受体增多是因为心肌适应舒张收缩功能的需要, 增加细胞内钙, DHP 受体代偿性增多^(2,7)。而在高血压时, 肾损害与钙超负荷有关, 钙拮抗剂具有阻断钙离子内流, 对肾有保护作用^(5,8)。我们推测 LVH 大鼠肾和肺 DHP 受体数目也是代偿性增多, 与 Ca^{2+} 有关, 而钙拮抗剂降低肾和肺 DHP 受体数目与对肾、肺的保护作用的关系有待进一步研究。

关键词 间硝地平; 高血压; 受体; 二氢吡啶

参 考 文 献

- 1 饶曼人, 等. 间硝地平对猫冠脉流量, 心肌耗氧量的量效关系. 中国药理学与毒理学杂志 1992; 6: 207.
- 2 Xi T, Rao MR. Effects of *m*-Nif on dihydropyridine binding sites in cardiac and cerebral cortex membranes from left ventricular hypertrophied rats. *Acta Pharmacol Sin* 1993; 14: 405.
- 3 丁小凌, 李云霞. 大鼠肾血管性高血压心肌肥厚的产生和逆转. 湖南医科大学学报 1989; 14: 209.
- 4 Glossmann H, Ferry D. Assay for calcium channels. *Methods Enzymol* 1985; 109: 513.
- 5 Frohlich ED. Pathophysiology of hypertension; Effects of calcium antagonists on heart and kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: S11.
- 6 Lee HR, et al. Decreased [^3H] nifedipine binding in the brainstem of deoxycorticosterone-NaCl

- hypertensive rats. *Life Sci* 1985;37: 971.
- 7 Chatelain P, et al. Comparison of [^3H] nitrendipine binding to heart membranes of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6: 220.
- 8 Anderson S. Renal hemodynamic effects of calcium antagonists in rats with reduced renal mass. *Hypertension* 1991;17: 288.

EFFECTS OF *m*-NIFEDIPINE ON DIHYDROPYRIDINE BINDING SITES IN THE CELL MEMBRANES OF KIDNEY AND LUNG FROM LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHIED ELDERLY RATS

Y Xu, T Xi and MR Rao

(Department of Cardiovascular Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

ABSTRACT Effects of *m*-nifedipine (*m*-Nif) on the affinity and density of dihydropyridine (DHP) binding sites in the cell membranes of kidney and lung were investigated using the LVH (left ventricular hypertrophy) induced by Goldblatt (2k-1c) renovascular hypertension in elderly rats. *m*-Nif markedly reduced blood pressure, left ventricular weight, and decreased the density (B_{\max}) of DHP binding sites in the cell membranes of kidney and lung from 699 ± 112 , 759 ± 35 fmol \cdot mg $^{-1}$ protein to 482 ± 29 , 381 ± 33 fmol \cdot mg $^{-1}$ protein. No difference was observed between groups in dissociation constant (K_D) values of DHP binding sites. The results suggest that *m*-Nif could markedly decrease DHP binding sites in the membranes of kidney and lung from cardiac hypertrophied elderly rats.

Key words *m*-nifedipine; Hypertension; Receptor; Dihydropyridine