

# 兔及大鼠不同脑区褪黑素受体鉴定及意义

## Identification of melatonin receptors in different encephalic regions of rabbits and rats

赵 瑛(第二军医大学长征医院神经内科,上海 200003)

**[摘要]** **目的:**证实兔及大鼠不同脑区存在<sup>125</sup>I褪黑素结合位点。**方法:**采用 Scatchard 分析方法检测兔及大鼠大脑及脊髓<sup>125</sup>I褪黑素结合最大结合容量( $B_{max}$ )及平衡解离常数( $K_d$ ),动力学分析研究<sup>125</sup>I褪黑素解离过程,以及药物对<sup>125</sup>I褪黑素特异结合的影响。**结果:**兔及大鼠视网膜特异结合的 $B_{max}$ 最高,视交叉及嗅球次之;下丘脑、海马及脑干也较多;动力学分析表明褪黑素与其受体为可逆性结合;特异性结合分析提示对褪黑素呈高度特异性。**结论:**兔及大鼠脑和脊髓组织存在<sup>125</sup>I褪黑素结合位点。

**[关键词]** 受体,褪黑素;放射性碘标记;脑;脊髓

**[中图分类号]** R 329.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0801-03

我们先前的工作<sup>[1]</sup>证实,人胚胎不同脑区存在<sup>125</sup>I褪黑素结合位点(<sup>125</sup>I-Mel),为进一步了解在生物体神经系统内分布特点及规律,分析其可能的功能特点,我们分别观察<sup>125</sup>I-Mel在大鼠、兔脑及脊髓中分布及特点。

### 1 材料和方法

1.1 材料 6个月龄兔及3个月龄SD大鼠脑及脊髓组织各5例。<sup>125</sup>I-Mel(81.4 TBq/mmol)为美国Dupont公司产品。

1.2 膜蛋白提取 兔和大鼠断头后立即取脑组织、脊髓,加入Tris-HCl缓冲液(1:10)匀浆,低温高速44 000×g离心25 min,然后洗涤1次,应用Lowry法测定蛋白浓度。亚细胞组分提取:先1 000×g离心10 min,分离出核组织,然后以27 000×g离心10 min,分离出线粒体;再以100 000×g离心60 min,分离出微粒体及胞质。

1.3 <sup>125</sup>I-Mel 特异结合分析<sup>[2]</sup> 调整蛋白的质量浓度为4~8 mg/ml,向总结合管加入100 μl膜制备液,200 μl Tris-HCl缓冲液,50 μl <sup>125</sup>I-Mel(4~200 pmol/L中选12个浓度)。非特异结合管加膜制备液、缓冲液、非标记Mel( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)各100 μl,<sup>125</sup>I-Mel 50 μl 37℃孵育60 min,应用冷Tris-HCl缓冲液终止反应,然后迅速通过玻璃纤维滤膜(孔径1 μm,英国Whatman公司)真空抽吸进行清洗。应用γ计数器(Beckman公司)测定其放射活性。应用Scatchard分析检测兔和大鼠大脑及脊髓<sup>125</sup>I-Mel 特异结合最大结合容量( $B_{max}$ )及平衡解离常数( $K_d$ )。动力学分析:37℃孵育5、10、20、40、60、80、100 min后,测定不同时间<sup>125</sup>I-Mel 的特异结合量,孵育40

min,加入非标记的Mel( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)后5、10、20、40、60、80 min终止反应,研究<sup>125</sup>I-Mel 的解离过程。

1.4 药物对<sup>125</sup>I-Mel 特异结合的影响 将Mel、2-碘-Mel、6-氯-Mel、色胺、3-乙酰吲哚、去甲肾上腺素、肾上腺素、乙酰胆碱等9种化合物,每种选7个浓度( $10^{-1} \sim 10^{-4}$  mol/L)加入5-羟色胺反应体系中,计算对<sup>125</sup>I-Mel 的取代率(IC<sub>50</sub>)。

### 2 结果

2.1 不同中枢神经部位<sup>125</sup>I-Mel 特异结合饱和分析 结果见表1,兔和大鼠视网膜特异结合的 $B_{max}$ 最高,视交叉及嗅球次之,下丘脑、海马及脑干也较多。

2.2 <sup>125</sup>I-Mel 特异结合动力学分析 兔及大鼠不同脑区<sup>125</sup>I-Mel 特异结合动力学分析结合常数( $K_1$ )、解离常数( $K_{-1}$ )及平衡解离常数( $K_d$ )见表2。从实验中可见结合过程在40 min均达到饱和,当加入非标记Mel后特异结合量迅速降低。

2.3 <sup>125</sup>I-Mel 特异结合特异性分析 结果见表3,兔和大鼠大脑皮质、下丘脑的<sup>125</sup>I-Mel 特异结合位点对<sup>125</sup>I-Mel 及其激动剂呈高度特异性,对5-羟色胺、肾上腺素能及乙酰胆碱能受体激动剂几乎无亲和力。

2.4 <sup>125</sup>I-Mel 特异结合亚细胞分布 兔及大鼠大脑皮质、视交叉、中脑及脊髓亚细胞成分<sup>125</sup>I-Mel 特异结合量测定结果见表4、5,细胞核含量最高,线粒体次之。

**[作者简介]** 赵 瑛,教授,博士生导师。

E-mail:LZM@sh163.net

表 1 兔和大鼠中枢神经不同部位<sup>125</sup>I-Mel 特异结合分析

(n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

组织	兔		大鼠	
	$B_{max}$ ( $m_B/fmol \cdot mg^{-1}$ )	$K_d$ ( $c_B/pmol \cdot L^{-1}$ )	$B_{max}$ ( $m_B/fmol \cdot mg^{-1}$ )	$K_d$ ( $c_B/pmol \cdot L^{-1}$ )
额叶	1.11±0.5	48±5	2.51±0.5	38±7
颞叶	1.21±0.3	56±7	2.13±0.5	56±4
顶叶	1.03±0.4	48±4	2.46±0.4	38±4
枕叶	0.94±0.3	51±7	2.54±0.4	54±6
海马	2.38±0.3	56±8	3.01±0.3	42±5
扣带回	2.12±0.2	32±9	3.12±0.3	66±7
视网膜	5.28±0.3	71±8	6.48±0.3	78±5
视交叉	4.92±0.4	69±7	5.26±0.4	81±7
嗅球	4.87±0.5	54±4	5.12±0.4	36±5
丘脑	3.29±0.3	38±6	4.38±0.3	42±5
下丘脑	3.12±0.3	51±7	4.07±0.4	31±7
胼胝体	0.08±0.2	48±6	2.06±0.5	41±8
脑桥	2.83±0.3	71±4	3.42±0.5	38±6
中脑	2.96±0.2	65±6	3.87±0.4	56±4
小脑	2.38±0.2	58±7	3.09±0.5	39±5
延髓	2.46±0.2	27±5	3.96±0.4	42±7
颈膨大	2.57±0.3	38±1	3.33±0.3	69±5
脊髓	1.94±0.2	41±2	2.78±0.3	71±3

表 2 兔和大鼠<sup>125</sup>I-Mel 特异结合动力学分析

(n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

	大鼠			兔		
	$K_1$ ( $mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$ )	$K_{-1}$ ( $\times 10^{-3} min^{-1}$ )	$K_d$ ( $c_B/pmol \cdot L^{-1}$ )	$K_1$ ( $mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$ )	$K_{-1}$ ( $\times 10^{-3} min^{-1}$ )	$K_d$ ( $c_B/pmol \cdot L^{-1}$ )
大脑皮质	36.6	7.3	19.9	43.8	9.8	22.4
下丘脑	57.8	2.4	4.2	62.5	7.6	12.2
视网膜	63.1	3.6	5.7	51.7	5.4	10.4
小脑	52.3	2.8	5.4	49.2	8.2	16.7
脊髓	54.8	7.5	13.7	69.4	6.9	9.9

表 3 兔和大鼠<sup>125</sup>I-Mel 特异结合取代率(IC<sub>50</sub>)

(n=5,  $\bar{x} \pm s, c_B/nmol \cdot L^{-1}$ )

化合物	兔		大鼠	
	大脑皮质	下丘脑	大脑皮质	下丘脑
褪黑素	8.9±2.1	10.2±3.1	7.9±2.3	8.7±2.8
2-碘褪黑素	5.4±1.7	8.3±1.5	3.2±1.1	4.3±1.6
6-氯褪黑素	48.3±9.8	56.1±8.7	41.2±6.5	78.6±9.1
5-羟色胺	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
色胺	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
3-乙酰吲哚	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
肾上腺素	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
去甲肾上腺素	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
乙酰胆碱	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>

表 4 兔不同脑区<sup>125</sup>I-Mel 特异结合亚细胞分布[n=5,  $\bar{x} \pm s$ ,  $m_B/\text{fmol} \cdot \text{mg}^{-1}(\%)$ ]

细胞分布	特异结合量(特异结合率)			
	大脑皮质	视交叉	中脑	脊髓
细胞核	1.7±0.6(47.2±16.7)	2.1±0.8(52.5±20.0)	1.2±0.3(52.2±13.0)	1.0±0.3(47.6±14.3)
线粒体	1.2±0.4(33.3±11.1)	1.7±0.6(42.5±15.0)	0.7±0.2(30.4±8.7)	0.7±0.2(33.3±9.5)
微粒体	0.6±0.2(16.7±5.6)	0.8±0.2(12.5±5.0)	0.3±0.1(13.0±4.3)	0.3±0.1(14.3±7.8)
细胞质	0.1±0.1(2.8±2.8)	0.2±0.1(5.0±2.5)	0.1±0.1(4.3±4.3)	0.1±0.1(7.8±7.8)

表 5 大鼠不同脑区<sup>125</sup>I-Mel 特异结合亚细胞分布[n=5,  $\bar{x} \pm s$ ,  $m_B/\text{fmol} \cdot \text{mg}^{-1}(\%)$ ]

细胞分布	特异结合量(特异结合率)			
	大脑皮质	视交叉	中脑	脊髓
细胞核	2.1±0.5(52.5±12.5)	3.0±1.1(51.7±19.0)	1.9±0.6(51.4±16.2)	1.5±0.5(46.9±15.6)
线粒体	1.3±0.4(32.5±10.0)	2.1±0.9(31.2±15.5)	1.0±0.4(27.0±11.0)	1.1±0.3(34.4±10.0)
微粒体	0.5±0.2(12.5±5.0)	0.8±0.3(8.6±5.2)	0.6±0.3(16.2±8.1)	0.4±0.1(12.5±3.1)
细胞质	0.1±0.1(2.5±2.5)	0.2±0.1(3.4±1.7)	0.2±0.1(5.4±2.7)	0.2±0.1(6.3±3.1)

### 3 讨论

本实验结果表明,兔及大鼠脑及脊髓内存在<sup>125</sup>I-Mel特异结合位点,其特点为:(1)低结合容量( $B_{\max}$ 0.94~5.28 fmol/mg 蛋白);(2)高亲和力( $K_d$ 为27~81 pmol/L);(3)呈可逆性结合;(4)对Mel及激动剂具高度特异性,符合特异结合位点的基本条件。Hill系数接近1(0.92~0.98),表明为单一亲和力受体。与人胚胎中枢神经系统比较,结合容量的分布基本一致,视网膜和视交叉的<sup>125</sup>I-Mel特异结合容量最高,与该部位主要功能光感受器相一致;嗅球次之,下丘脑含量也较高,提示可能与嗅觉及内分泌功能的调节作用相关。从动物进化角度分析,<sup>125</sup>I-Mel特异结合容量鼠含量最高,兔次之,人胚

胎组织含量最低,说明随着动物进化,褪黑素受体有减少趋势。

亚细胞分布的研究与人胚胎结果基本一致,细胞核含量最高,线粒体次之,提示褪黑素除作用于细胞膜外,尚可作用于细胞核,影响DNA转录和蛋白质合成过程;线粒体含量也较高,与褪黑素主要功能之一——抗氧化应激作用相一致。

### [参考文献]

- [1] 赵 瑛,邵福源,何淑芬,等.人胚胎中枢神经系统褪黑素受体的鉴定及生物学特性[J].第二军医大学学报,2001,22:12.
- [2] 刘志民,邹俊杰,沈玉美,等.人胚胎外周组织褪黑素受体的鉴定[J].第二军医大学学报,2001,22:8-11.

[收稿日期] 2007-05-20

[修回日期] 2007-06-12

[本文编辑] 尹 茶

## 《老年心血管疾病》已出版

《老年心血管疾病》已由人民军医出版社于2007年2月出版,小16开,平装。

《老年心血管疾病》ISBN:978-7-5091-0511-5,定价:39.00元。该书对老年心血管疾病进行了全面、系统地介绍,阐述了老年心血管疾病的病因病机、临床表现,特别是在实验室检查和其他检查中列举了大量的心电图,以及诊断和鉴别诊断、可能出现的并发症及处理,重点叙述了西医的辨病治疗和中医的辨证治疗和名老中医验方精选、组方、加减、方解,使心血管疾病各阶段的中医诊疗技术有章可循,并对预后与转归、难点与对策进行了概括描述,为专科医师开发临床纵向思维提供了广泛空间。该书适合健康、亚健康人群尤其老年患者及其家属阅读。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市100036信箱188分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168 E-mail:wanglan@pmpm.com.cn