



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110487646 A

(43)申请公布日 2019. 11. 22

(21)申请号 201910682645.0

(22)申请日 2019.07.26

(71)申请人 西安医学院

地址 710021 陕西省西安市碑林区含光北路74号

(72)发明人 余琦 赵安东 卫梦倩

(74)专利代理机构 西安弘理专利事务所 61214
代理人 杜娟

(51)Int.Cl.

G01N 3/28(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

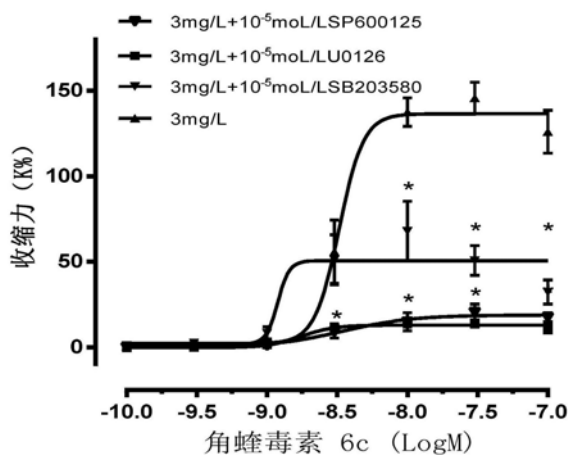
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种体外检测血管收缩功能的方法

(57)摘要

本发明一种体外检测血管收缩功能的方法,包括如下步骤:(1)相同条件下离体培养大鼠肠系膜动脉后,使用蛋白免疫印迹法测量受体蛋白的含量;(2)对两组样本的受体蛋白含量进行计算,若 $p \leq 0.05$,则用步骤1中药物浓度和抑制剂培养血管,培养后利用离体微血管张力测试仪测量大鼠肠系膜动脉在受体激动剂刺激下收缩力变化;(3)使用Graph Pad Prism软件对步骤2中数据进行分析。本发明的有益效果是:利用药物培养大鼠肠系膜动脉,确定受体蛋白的种类,然后加入抑制剂和受体蛋白对应的受体激动剂,快速检测出药物使血管收缩可能的通道,进而可以探讨药物如何引起血管收缩的机制,从而为临床提供依据。



1. 一种体外检测血管收缩功能的方法,其特征在于,具体按照以下步骤实施:

步骤1、相同条件下离体培养实验样本组、对比样本组中大鼠肠系膜动脉,其中,对比样本组不加所需验证的药物,实验样本组中加入所需验证的药物;培养结束后,使用蛋白免疫印迹法测量对比样本组和实验样本组中大鼠肠系膜动脉受体蛋白的含量;

步骤2、对步骤1中对比样本组和实验样本组的大鼠肠系膜动脉受体蛋白含量进行统计学计算概率P,若 $P \leq 0.05$,则在相同条件下培养三组加药组和一组对比组大鼠肠系膜动脉,其中加药组用所需验证的药物和抑制剂共同离体培养大鼠肠系膜动脉,所需验证的药物浓度与步骤1中实验样本组所需验证的药物浓度相同,对比组只加入与加药组相同浓度的所需验证的药物,培养结束后利用离体微血管张力测试仪测量加药物组和对比组血管在受体激动剂刺激下大鼠肠系膜动脉收缩力发生的变化;

步骤3、使用Graph Pad Prism软件对步骤2中大鼠肠系膜动脉收缩力变化进行分析。

2. 根据权利要求1所述的一种体外检测血管收缩功能的方法,其特征在于,所述步骤1中大鼠肠系膜动脉为大鼠肠系膜一级动脉。

3. 根据权利要求1所述的一种体外检测血管收缩功能的方法,其特征在于,所述步骤1中大鼠肠系膜动脉受体蛋白为血管平滑肌上内皮素A或内皮素B。

4. 根据权利要求3所述的一种体外检测血管收缩功能的方法,其特征在于,所述步骤2三组加药组中抑制剂为U0126、SP600125、SB203580中的一种。

5. 根据权利要求1所述的一种体外检测血管收缩功能的方法,其特征在于,所述步骤2中抑制剂浓度为 10^{-5} mol/L。

6. 根据权利要求3所述的一种体外检测血管收缩功能的方法,其特征在于,所述步骤2中受体激动剂为角蝰毒素或内皮素1。

7. 根据权利要求1所述的一种体外检测血管收缩功能的方法,其特征在于,所述步骤1和2中的培养条件:温度为 37°C ,空气中二氧化碳的体积分数为5%,时间为24h。

一种体外检测血管收缩功能的方法

技术领域

[0001] 本发明属于血管收缩检测技术领域,具体涉及一种体外检测血管收缩功能的方法。

背景技术

[0002] 血管收缩指血管管腔收窄,这会造成血压上升,与血管收缩相反的过程称为血管舒张。

[0003] 目前有许多药物会引起血管收缩,但大多数作用机制尚不清楚,也无法快速检测出药物使血管收缩的机制,因此无法对临床用药有指导作用。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种体外检测血管收缩功能的方法,解决了现有技术无法快速检测出药物使血管收缩的机制的问题。

[0005] 本发明所采用的技术方案,一种体外检测血管收缩功能的方法,包括如下步骤:

[0006] 步骤1、相同条件下离体培养实验样本组、对比样本组大鼠肠系膜动脉,其中,对比样本组不加药物,实验样本组中加入所需验证的药物;培养结束后,使用蛋白免疫印迹法测量对比样本组和实验样本组中大鼠肠系膜动脉受体蛋白的含量;

[0007] 步骤2、对步骤1中对比样本组和实验样本组的大鼠肠系膜动脉受体蛋白含量进行统计学计算概率P,若 $P \leq 0.05$,则在相同条件下培养三组加药组和一组对比组大鼠肠系膜动脉,其中加药组用所需验证的药物和抑制剂共同离体培养大鼠肠系膜动脉,所需验证的药物浓度与步骤1中实验样本组所需验证的药物浓度相同,对比组只加入与加药组相同浓度的所需验证的药物,培养结束后利用离体微血管张力测试仪测量加药物组和对比组血管在受体激动剂刺激下大鼠肠系膜动脉收缩力发生的变化;

[0008] 步骤3、使用Graph Pad Prism软件对步骤2中血管收缩力变化进行分析。

[0009] 本发明的特点还在于:

[0010] 步骤1中大鼠肠系膜动脉为大鼠肠系膜一级动脉。

[0011] 步骤1中大鼠肠系膜动脉受体蛋白为血管平滑肌上内皮素A或内皮素B。

[0012] 步骤2中三组加药组中抑制剂为U0126、SP600125、SB203580中一种。

[0013] 步骤2中抑制剂浓度为 10^{-5} mol/L。

[0014] 步骤2中受体激动剂为角蝰毒素或内皮素1。

[0015] 步骤1和2中的培养条件:温度为 37°C ,空气中二氧化碳的体积分数为5%,时间为24h。

[0016] 本发明的有益效果是:利用药物培养大鼠肠系膜动脉,确定受体蛋白的种类,然后加入抑制剂和受体蛋白对应的受体激动剂,快速检测出药物使血管收缩可能的通道,进而可以探讨药物如何引起血管收缩的机制,从而为临床提供依据。

附图说明

- [0017] 图1是本发明一种体外检测血管收缩功能的方法中实施例1的离体微血管张力图；
[0018] 图2是本发明一种体外检测血管收缩功能的方法中实施例1的离体微血管张力图；
[0019] 图3是本发明一种体外检测血管收缩功能的方法中实施例1的离体微血管张力图。

具体实施方式

- [0020] 下面结合附图和具体实施方式对本发明进行详细说明。
- [0021] 本发明一种体外检测血管收缩功能的方法,具体按照以下步骤实施:
- [0022] 步骤1、温度为37℃,空气中含有5%二氧化碳条件下离体培养大鼠肠系膜一级动脉24h,其中,对比样本组不加药物,实验样本组中加入所需验证的药物;培养结束后,使用蛋白免疫印迹法测量对比样本组和实验样本组中大鼠肠系膜一级动脉血管平滑肌上受体蛋白内皮素A或内皮素B的含量;
- [0023] 其中,大鼠肠系膜一级动脉的处理方法如下:
- [0024] 将大鼠小肠大肠部分放入盛放血管保存液(PSS+1%双抗)的培养皿中,在解剖显微镜下轻轻移除肠系膜上动脉并从粘附组织中除去。通过用0.1% TritonX-100灌注血管10秒,然后用生理缓冲溶液再灌注10秒来剥离内皮。然后将大鼠肠系膜动脉切成1mm长的圆柱形段整个分离过程在无菌操作间完成。
- [0025] 其中,肠系膜一级动脉中蛋白质的提取及含量测定方法如下:
- [0026] 将肠系膜一级动脉置于5mL匀浆器中球状部位,用液氮将其冷冻;按0.1g膜动脉加500uL RIPA裂液裂(含PMSF)于匀浆器中,进行匀浆,然后置于冰上;每隔5min进行研磨再置于冰上,30min后用移液器将裂解液移至1.5mL离心管中,然后在4℃、12000rpm条件下离心10min,吸取上清液转移到另一个1.5mL离心管中;利用免疫印迹法测受体蛋白的含量,即使用聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行测量,所得结果使用Image j进行图像光密度分析。
- [0027] 步骤1的目的是确定大鼠肠系膜一级动脉血管平滑肌上受体蛋白。
- [0028] 步骤2、对对比样本组和实验样本组的大鼠肠系膜一级动脉血管平滑肌上受体蛋白内皮素A或内皮素B含量进行统计学计算p,若 $p \leq 0.05$,即有显著性差异;则培养三组加药组和一组对比组大鼠肠系膜一级动脉,其中加药组用步骤1中实验样本组所需验证的药物浓度和 10^{-5} mol/L抑制剂共同离体培养,三组加药组中,抑制剂分别为U0126、SB203580、SP600125,对比组只加入与加药组相同浓度的所需验证的药物,培养结束后利用离体微血管张力测试仪在温度为37℃且通入氧气的情况下测量加药组和对比组在受体激动剂角蝥毒素(s6c)或内皮素1(ET-1)刺激下大鼠肠系膜一级动脉收缩力发生的变化,其中大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化表示为60mol/L高钾缓冲液中K⁺诱导的收缩反应的百分比;
- [0029] 其中,P值即概率,反映某一事件发生的可能性大小。统计学根据显著性检验方法所得到的P值,一般以 $P < 0.05$ 为显著, $P < 0.01$ 为非常显著,其含义是样本间的差异由抽样误差所致的概率小于0.05或0.01。
- [0030] 其中,受体激动剂亦称完全受体激动剂,对受体蛋白有较强亲和力和内在活性,能通过受体兴奋发挥最大效应的药物。
- [0031] 加抑制剂是确认受体蛋白增加的可能通道。
- [0032] 步骤3、使用Graph Pad Prism软件计算步骤2的血管收缩力变化进行分析。

[0033] 实施例1

[0034] 步骤1、温度为37℃，空气中二氧化碳的体积分数为5%的条件下离体培养大鼠肠系膜一级动脉24h，其中，对比样本组不加所需验证的药物，实验样本组中加入3mg/L所需验证的药物索拉非尼；培养结束后，使用蛋白免疫印迹法测量对比样本组和实验样本组中大鼠肠系膜一级动脉血管平滑肌上受体蛋白内皮素B，即etb，含量；

[0035] 步骤2、对对比样本组和实验样本组的受体蛋白etb含量进行统计学计算后，对比样本组和实验样本组中受体蛋白etb的含量分别为0.83、1.48， $p \leq 0.05$ ，即对比样本组和实验样本组有显著性差异；则培养三组加药组和一组对比组大鼠肠系膜一级动脉，其中加药组培养液中加入3mg/L索拉非尼和 10^{-5} mol/L抑制剂，三组加药组中，抑制剂分别为U0126、SB203580、SP600125，对比组培养液中索拉非尼浓度为3mg/L，培养结束后加入受体激动剂角蝥毒素，即s6c，利用离体微血管张力测试仪在温度为37℃且通入氧气的情况下测量加药组和对比组大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化，其中大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化表示为60mol/L高钾缓冲液 K^+ 诱导的收缩反应的百分比；

[0036] 步骤3、使用Graph Pad Prism软件计算步骤2中大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化进行分析。

[0037] 在3mg/L索拉非尼和 10^{-5} mol/L的抑制剂U0126、SB203580或SP600125分别存在下培养24小时后，受体激动剂诱导的大鼠肠系膜一级动脉的收缩反应曲线，收缩反应表示为60mM K^+ 诱导的收缩反应的百分比，由图1可知，受体蛋白内皮素B增加的通道按照可能性大小依次为U0126、SP600125、SB203580。

[0038] 实施例2

[0039] 步骤1、温度为37℃，空气中二氧化碳的体积分数为5%条件下离体培养大鼠肠系膜一级动脉24h，其中，对比样本组不加所需验证的药物，实验样本组中加入所需验证的药物双酚A，其浓度为 1.15×10^{-2} mg/L；培养结束后，使用蛋白免疫印迹法测量对比样本组和实验样本组中大鼠肠系膜一级动脉血管平滑肌上受体蛋白eta的含量；

[0040] 步骤2、对对比样本组和实验样本组的受体蛋白eta含量进行统计学计算后，其含量分别为0.016、0.038， $p \leq 0.05$ ，即对比样本组和实验样本组有显著性差异；则培养三组加药组和一组对比组大鼠肠系膜一级动脉，其中加药组培养液中加入 1.15×10^{-2} mg/L双酚A和 10^{-5} mol/L抑制剂，三组加药组中，抑制剂分别为U0126、SB203580、SP600125，对比组培养液中双酚A浓度为3mg/L，培养结束后加入受体激动剂内皮素1，即et1，利用离体微血管张力测试仪在温度为37℃且通入氧气的情况下测量加药组和对比组大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化，其中大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化表示为60mol/L高钾缓冲液 K^+ 诱导的收缩反应的百分比；

[0041] 步骤3、使用Graph Pad Prism软件计算步骤2中大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化进行分析。

[0042] 在 1.15×10^{-2} mg/L双酚A和 10^{-5} mol/L的抑制剂U0126、SB203580或SP600125分别存在下培养24小时后，受体激动剂诱导的大鼠肠系膜一级动脉的收缩反应曲线，收缩反应表示为60mM K^+ 诱导的收缩反应的百分比，由图2可知，受体蛋白内皮素a增加的通道按照可能性大小依次为U0126、SB203580、SP600125。

[0043] 实施例3

[0044] 步骤1、温度为37℃,空气中二氧化碳的体积分数为5%条件下离体培养大鼠肠系膜一级动脉24h,,其中,对比样本组不加所需验证的药物,实验样本组中加入所需验证的药物马兜铃酸,其浓度为40mg/L;培养结束后,使用蛋白免疫印迹法测量对比样本组和实验样本组中大鼠肠系膜一级动脉血管平滑肌上受体蛋白etb,即内皮素b的含量;

[0045] 步骤2、对对比样本组和实验样本组的受体蛋白含量进行统计学计算后,其受体蛋白etb的含量分别为0.05、0.13, $p \leq 0.05$,对比样本组和实验样本组有显著性差异;则培养三组加药组和一组对比组大鼠肠系膜一级动脉,其中加药组培养液中包括40mg/L马兜铃酸和 10^{-5} mol/L抑制剂,三组加药组中,抑制剂分别为U0126、SB203580、SP600125,对比组培养液中马兜铃酸浓度为40mg/L,培养结束后加入受体激动剂角蝥毒素,即s6c,,利用离体微血管张力测试仪在温度为37℃且通入氧气的情况下测量加药组和对比组大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化,其中大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化表示为60mol/L高钾缓冲液 K^+ 诱导的收缩反应的百分比;

[0046] 步骤3、使用Graph Pad Prism软件计算步骤2中大鼠肠系膜一级动脉收缩力变化进行分析。

[0047] 在40mg/L马兜铃酸和 10^{-5} mol/L的抑制剂U0126、SB203580或SP600125分别存在下培养24小时后,受体激动剂诱导的大鼠肠系膜一级动脉的收缩反应曲线,收缩反应表示为60mM K^+ 诱导的收缩反应的百分比,由图2可知,受体蛋白内皮素b增加的通道按照可能性大小依次为SP600125、SB203580、U0126。

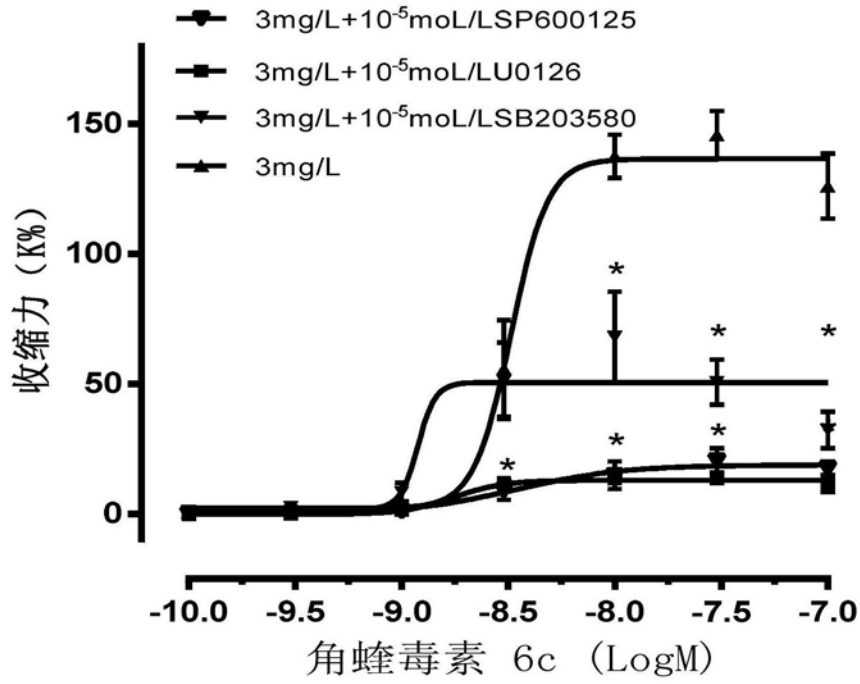


图1

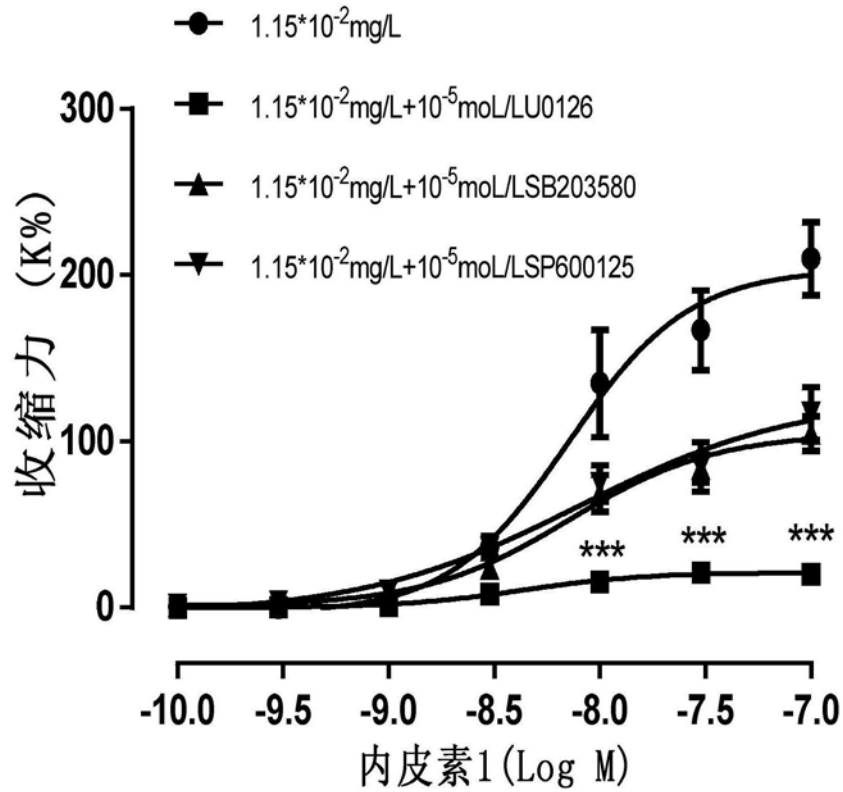


图2

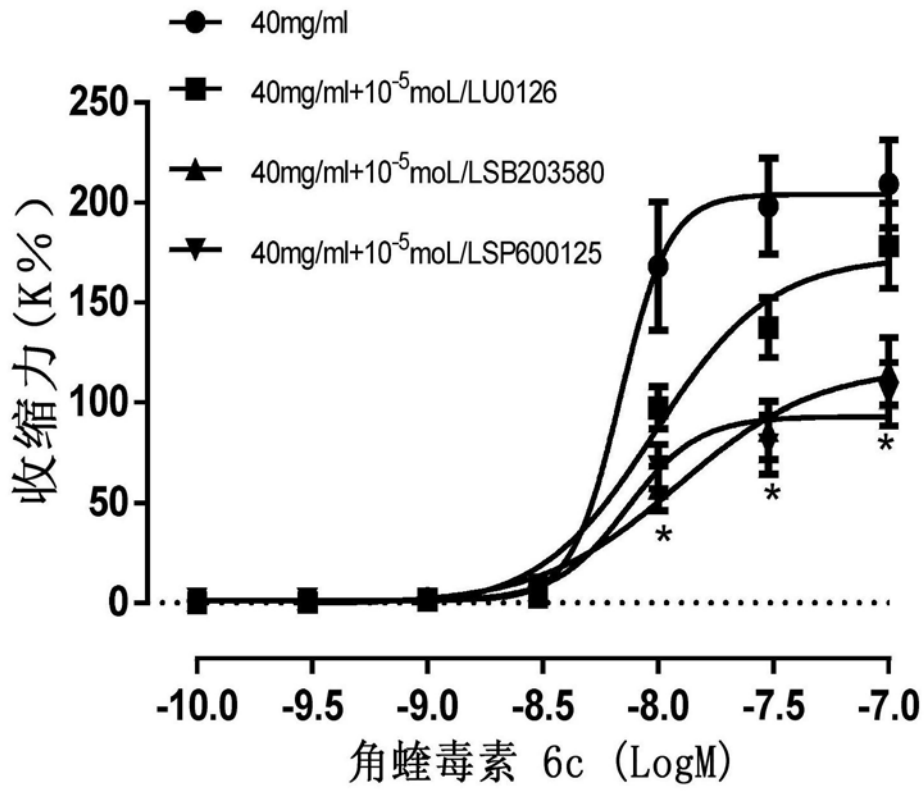


图3

专利名称(译)	一种体外检测血管收缩功能的方法		
公开(公告)号	CN110487646A	公开(公告)日	2019-11-22
申请号	CN201910682645.0	申请日	2019-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	西安医学院		
申请(专利权)人(译)	西安医学院		
当前申请(专利权)人(译)	西安医学院		
[标]发明人	余琦 赵安东 卫梦倩		
发明人	余琦 赵安东 卫梦倩		
IPC分类号	G01N3/28 G01N33/531		
CPC分类号	G01N3/28 G01N33/531		
代理人(译)	杜娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一种体外检测血管收缩功能的方法，包括如下步骤：(1)相同条件下离体培养大鼠肠系膜动脉后，使用蛋白免疫印迹法测量受体蛋白的含量；(2)对两组样本的受体蛋白含量进行计算，若 $p \leq 0.05$ ，则用步骤1中药物浓度和抑制剂培养血管，培养后利用离体微血管张力测试仪测量大鼠肠系膜动脉在受体激动剂刺激下收缩力变化；(3)使用Graph Pad Prism软件对步骤2中数据进行分析。本发明的有益效果是：利用药物培养大鼠肠系膜动脉，确定受体蛋白的种类，然后加入抑制剂和受体蛋白对应的受体激动剂，快速检测出药物使血管收缩可能的通道，进而可以探讨药物如何引起血管收缩的机制，从而为临床提供依据。

