

强啡肽 A 1-13 的放射免疫测定

王成海、祝元祥、吴崇仁、宋朝佑、林葆城 (第二军医大学生理学教研室, 上海 200433)

葛邦轮 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要 应用强啡肽 A 1-13 抗原免疫兔, 获得了具有较高滴度(1:70 000)、亲和力(最小检出量为 6 pg、 IC_{50} 为 345 pg、亲和常数为 1×10^{10} L/mol)和特异性的抗血清, 建立了强啡肽 A 1-13 的放射免疫测定, 并用此法研究了强啡肽 A 1-13 在麻醉大鼠中的变化。

关键词 强啡肽 A1-13; 免疫血清; 放射免疫测定; 麻醉

强啡肽(dynorphin) A系从猪垂体中提取到的一种内源性阿片肽⁽¹⁾, 其放射免疫测定(RIA), 国外虽已建立⁽²⁾, 但国内尚未见报道。本工作旨在通过制备抗强啡肽 A 1-13 血清, 建立灵敏可靠的 RIA, 为国内开展强啡肽 A 1-13 的研究创造条件。

材料与方 法

药物 强啡肽 A 1-13、强啡肽 A 1-17 系美国 Peninsula 实验公司产品, 氯胺 T、甲状腺球蛋白系美国 Sigma 公司产品, 戊二醛系上海化学试剂厂产品, 无载体 $Na^{125}I$ 系中国科学院原子能研究所产品, Bio-Gel P₄ 系 Bio-Rad Laboratories 产品, 乌拉坦系上海化学试剂厂产品。

^{125}I 标记强啡肽 A 1-13

1. 标记 采用改进的氯胺 T 法^(3,4), 将 5 μ g 强啡肽 A 1-13 溶解于 50 μ l 0.5 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中, 加入 $Na^{125}I$ 29.6 MBq, 混匀后加入氯胺 T 30 μ g/15 μ l, 反应 60 s 后加入偏重亚硫酸钠 40 μ g/20 μ l, 使反应终止。

2. 分离与纯化 将碘化反应混合液用 Bio-Gel P₄ 柱层析, 以 0.1 mol/L 冰醋酸溶液

洗脱, 分段收集, 逐管计数。第一峰为 [^{125}I] 强啡肽 A 1-13, 第二峰为游离碘。纯化纯度达 92%。

3. 比放射性 用放射免疫自身取代法测定, [^{125}I] 强啡肽 A 1-13 放射性活度为 8.8 MBq/ μ g。

4. 过量抗体结合率 以 1:500 抗强啡肽 A 1-13 血清进行实验, 结合率(B/T)为 91.3-94.7%。

抗强啡肽 A 1-13 血清的制备

1. 免疫原合成与免疫 以戊二醛为偶联剂, 把强啡肽 A 1-13 与甲状腺球蛋白连接起来, 并加入等体积的福氏完全佐剂, 制成乳剂, 背部多点皮内注射, 免疫 2 只 σ 新西兰兔⁽²⁾。在基础免疫后, 每两周加强免疫一次, 并改用福氏不完全佐剂。经 8 次加强免疫, 两兔均获满意的抗血清。

2. 抗血清效价的测定 A、B 号兔抗血清效价分别为 1:70 000(图 1)与 1:10 000。

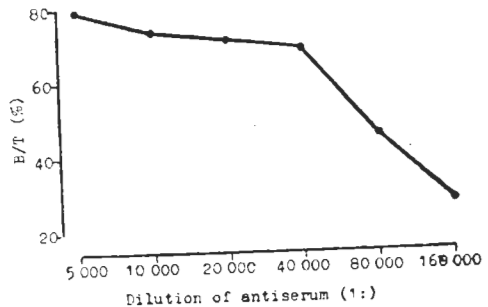


Fig 1. Dilution curve of rabbit dynorphin A1-13 antiserum.

竞争抑制曲线

1. 强啡肽 A 1-13 的 RIA 在标准管中, 分别加入强啡肽 A 1-13 标准液 50 μ l 含量为

0.5-8192 fmol; 1:2000 抗强啡肽 A 1-13 血清稀释液 100 μ l (最终浓度为 1:10 000); [125 I]强啡肽 A 1-13 液 50 μ l (约 14 000 cpm); 最后加入 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.6)⁽⁶⁾, 使总量补足为 500 μ l。0 标准管不加强啡肽 A 1-13 标准品。非特异性结合对照管不加标准品与抗血清。各管加样混匀后, 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 加入 1:4 羊抗兔丙种球蛋白 100 μ l 与正常兔血清 30 μ l, 再孵育 24 h, 2300 \times g, 20 min, 弃上清, 用自动 γ 谱仪测定各管沉淀的 cpm, 计算各管的结合 % (B/B₀)。非特异性结合在 3% 以内。以 B/B₀ 为纵坐标, 标准品浓度为横坐标制图。B 号兔 4 个月内 5 次标准曲线综合见图 2。

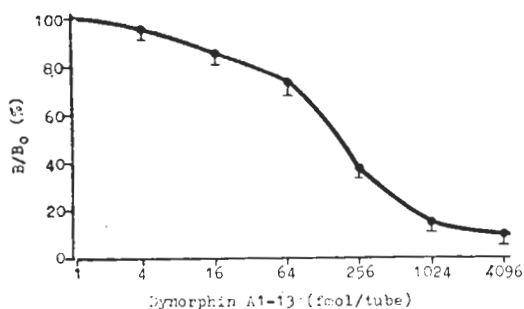


Fig 2. Competitive inhibition curve of dynorphin A1-13. $\bar{x} \pm SD$

2. 特异性 抗强啡肽 A 1-13 血清与强啡肽 A 1-6、强啡肽 A 1-7、强啡肽 A 1-8、强啡肽 A 1-10、强啡肽 B、 β -内啡肽、甲-脑啡肽、亮-脑啡肽、神经降压素、生长抑素、催产素、加压素交叉反应极微 (均 < 0.01%), 与强啡肽 A 1-17 交叉反应 A、B 号兔抗血清分别为 5.2 与 1.8%。

结果与讨论

方法评价 最小检出量为 6 pg; IC₅₀ 为 345 pg; 亲和常数为 1×10^{10} L/mol。回收率 (以加入中脑提取液中标准品的测出量计算) 为 94-102%。脑提取液加入量与强啡肽 A 1-13 免疫活性物质 (ir-Dyn A 1-13) 的测出量基本呈

直线关系。批内误差 (n = 6) CV = 2.7%; 批间 (5 次实验结果) 误差 CV = 2.2-5.1%。按效点系统 (power-point system) 记分⁽⁶⁾, 本法获 33 分, 达到优良级水平。

大鼠组织样本测定 体重为 $168 \pm SD$ 9 g 的 σ 大鼠 6 只, 迅速断头, 取脑、脊髓与垂体, 经沸生理盐水煮 5 min, 用滤纸吸去样本外的水滴, 分离脑区。各脑区、脊髓与垂体称重后置于玻璃匀浆管内, 加入 1 ml HAC (1 mol/L), 制成匀浆, 倒入塑料指形管中, 放置 100 min, 加入中和液 1 ml NaOH (1 mol/L), 摇匀, 2300 \times g, 30 min, 取上清液进行 RIA, 并根据同批实验所作标准曲线, 查出各样品管中 ir-Dyn A 1-13 的含量, 再换算成每 mg 湿重脑、脊髓与垂体内 ir-Dyn A 1-13 的 pg 数。测定正常大鼠脑、脊髓和垂体内 ir-Dyn A 1-13 含量, 以垂体含量为最高, 下丘脑次之, 丘脑、海马、纹状体、皮层、中脑、桥延脑、脊髓更次之, 小脑含量最低。具体含量见表 1, 与文献 (7) 报道相近。

Tab 1. Contents of immunoreactive dynorphin A1-13 in pituitary, brain areas and spinal cord of normal and urethane-anaesthetized rats. n = 6, $\bar{x} \pm SD$. All p values were < 0.01

	Contents (pg/mg wet weight)	
	Normal rats	Urethane rats
Pituitary	210.5 \pm 31.8	136.3 \pm 19.1
Hypothalamus	60.0 \pm 8.3	40.0 \pm 11.9
Striatum	24.1 \pm 3.8	2.6 \pm 1.2
Thalamus	16.0 \pm 3.7	6.0 \pm 1.6
Hippocampus	14.0 \pm 3.2	3.7 \pm 1.6
Pons-medulla	11.2 \pm 2.2	3.0 \pm 0.9
Cerebrum	8.7 \pm 0.3	3.3 \pm 1.2
Midbrain	8.7 \pm 1.9	2.3 \pm 0.8
Cerebellum	0.2 \pm 0.02	—
Spinal cord	14.9 \pm 4.5	4.2 \pm 1.9

强啡肽原系统是阿片肽 3 个家族中发现最早的, 强啡肽 A 是这一家族中最重要的成员之一。本工作获得了具有高滴度、亲和力和特异性的抗强啡肽 A 1-13 血清, 并建立了强啡肽 A 1-13 的 RIA, 这有助于开展强啡肽 A 生理、

药理作用的研究。

在合成免疫原时,本工作系运用戊二醛将人工合成的强啡肽 A 1-13 缩合到甲状腺球蛋白分子上。按照常规,应运用透析方法将连接及未连接到载体蛋白上的多肽分子分离,并借此除去过多的缩合剂。我们同意 Weber 等⁽⁸⁾的观点,省略透析这一费时的步骤,结果同样可获得满意的抗血清。这在我们制备生长抑素(somatostatin)与神经降压素(neurotensin)抗血清时也同样证明是可行的^(9,10)。

本工作获得的抗血清,与包括强啡肽 A 1-10 在内的其它较短片段均无交叉反应。这说明至少要保持强啡肽 A 氨基端 10 个以上氨基酸的完整,才能被抗体识别。这与 Goldstein 实验室的结果⁽²⁾基本一致。本抗体与强啡肽 A 1-17 的交叉反应很小,提示体内可能存在有天然形式的强啡肽 A 1-13,值得进一步研究。

致谢 张安中教授赠给强啡肽 A 1-17 标准品。

参 考 文 献

1 Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hun-
kapiller M, Hood L. Dynorphin-(1-13),
an extraordinarily potent opioid peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76 : 6666

2 Ghazarossian VE, Chavkin C, Goldstein A.
A specific radioimmunoassay for the novel
opioid peptide dynorphin. *Life Sci* 1980;
27 : 75

3 Hunter WM, Greenwood FC. Preparation
of iodine-131 labelled human growth
hormone of high specific activity. *Nature*
1962; 194 : 495

4 Höllt V, Przewlocki R, Herz A. Radio-
immunoassay of β -endorphin basal and
stimulated levels in extracted rat plasma.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1978;
303 : 171

5 邹 冈、易庆成、吴时祥,等。脑啡肽在针刺
镇痛中的作用:放射免疫测定。中国科学
1980; 5 : 492

6 Cerceo E. Power-point system to evaluate
radioimmunoassays. *Lab Pract* 1974; 23 : 625

7 Goldstein A, Ghazarossian VE. Immunore-
active dynorphin in pituitary and brain. *Proc
Natl Acad Sci USA* 1980; 77 : 6207

8 Weber E, Evans CJ, Chang JK, Barchas JD.
Antibodies specific for α -N-acetyl- β -endor-
phins: radioimmunoassays and detection of
acetylated β -endorphins in pituitary extracts.
J Neurochem 1982; 38 : 436

9 祝元祥、王成海、崔瑞耀、宋朝佑。生长抑素
的放射免疫测定。应用生理学杂志 1986;
2 : 214

10 祝元祥、宋朝佑、王成海、刘 真、陈家津、
崔瑞耀。神经降压素的放射免疫测定。动物学报
1986; 32 : 213

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Nov; 8 (6) : 494-497

Radioimmunoassay for dynorphin A 1-13

WANG Cheng-Hai, ZHU Yuan-Xiang, WU Chong-Ren, SONG Chao-You, LIN Bao-Cheng
(Department of Physiology, Second Military Medical College, Shanghai 200433)

GE Bang-Lun (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT The antisera against dynorphin A 1-13 were raised and the radioimmunoassay (RIA) for dynorphin A 1-13 was developed in the present work.

The immunogen was prepared by coupling synthetic dynorphin A 1-13 to porcine thyroglobulin with the method of glutaralde-

hyde. Male New Zealand rabbits were immunized by multiple intradermal inoculations.

The antisera possessed high titre (1 : 70 000), high affinity (detection limit 6 pg, IC₅₀ 345 pg, K_d = 1 × 10¹⁰ L/mol) and high specificity (no cross-reactivity to dynorphin A 1-6, dynorphin A 1-7, dynorphin

A 1-8, dynorphin A 1-10, dynorphin B and other 7 endogenous peptides).

By using this method, the contents of immunoreactive dynorphin A₁₋₁₃ were measured in pituitary gland, spinal cord, and some brain areas of normal and urethane-anaesthetized rats. Our results showed that the values in urethane-anaesthetized rats were

significantly reduced by 89, 74, 74, 73, 72, 62, 62, 35 and 33% in striatum, hippocampus, midbrain, pons/medulla oblongata, spinal cord, thalamus, cortex, pituitary and hypothalamus, respectively ($p < 0.01$).

KEY WORDS dynorphin A₁₋₁₃; immune sera; radioimmunoassay; anesthesia

