

溶性胎盘阿片受体与凝集素的相互作用

葛邦轮、周德和、张鸿萍 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 [^3H]etorphine 对洋地黄皂甙/硫酸镁 制得的溶性胎盘阿片受体的平衡离解常数和 最大结合量分别为 6.62 nmol/L 及 54.1 pmol/g 蛋白, 其结合特性类似于脑或其它组织中的 κ 亚型阿片受体。研究它与 5 种凝集素的相互作用, 结果表明: 麦胚凝集素与溶性胎盘阿片受体具有糖专一的亲和作用, 用麦胚凝集素-琼脂糖柱可使胎盘阿片受体纯化约 10 倍。

关键词 溶性胎盘内啡肽受体; 糖蛋白; 内啡肽; 琼脂糖; 洋地黄皂甙; 硫酸镁; 外源凝集素; [^3H]依托啡

人体胎盘中存在有阿片受体已为多个实验室所证实, 从对胎盘膜及溶性阿片受体的研究倾向于认为类似于脑或其它组织中的 κ 亚型阿片受体, 前曾报道溶性胎盘阿片受体用二性离子去垢剂 CHAPS 制备, 但 该品昂贵且无国产。本文报道用洋地黄皂甙/硫酸镁溶液制备溶性胎盘阿片受体, 并研究了其某些结合特点。某些动物脑溶性阿片受体能滞留于麦胚凝集素-琼脂糖层析柱。并能由此而获得 初步 纯化⁽¹⁾。Valette 等⁽²⁾报道了先用 [^3H]etorphine 结合 人体胎盘膜阿片受体, 再用洋地黄皂甙溶介受体-配基复合物, 证实了其 与麦胚凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA) 有亲和性。本文以洋地黄皂甙/硫酸镁制备溶性胎盘阿片受体, 并研究了它与 5 种凝集素的亲和作用。

材 料 和 方 法

[^3H]etorphine 比放射性 1.48 TBq/mmol (40 Ci/mmol) 上海医科大学放射医学研究所提供; 健康足月分娩新鲜人胎盘由上海国际妇幼保健院提供; 1300-100 型树脂为上海医药工业研究院产品; 洋地黄皂甙 (digitonin) 杭州第一制药厂出品; 麦胚凝集素-琼脂糖为美 Vector 公司产品; U-50488 H 为美 Upjohn 公司

产品; 羟甲芬太尼 (ohmefentanyl) 为本室合成; β -naltrexamine 由还原胺基化制得⁽³⁾; DTLET 由 BP Roques 教授 惠赠; VBL-sepharose 柱为本室偶联制备⁽⁴⁾; 其它凝集素均为王锋提供。

洋地黄皂甙 / 硫酸镁溶性胎盘阿片受体的制备 人胎盘除去脐带及胎膜, 切成 1 cm² 小片, 用 Tris 10 mmol/L (pH 7.5) 洗涤数次以除去血污, 稍滤干后称重, 以组织重二倍的上述 Tris 缓冲液悬浮胎盘片, 2 S-83-1 型内切式匀浆器匀浆, 1000 × g 离心, 取上清液, 上清液经 100 000 × g 离心 30 min, 沉淀部份加 Tris 50 mmol/L 混悬, 使蛋白含量大致为 10 mg/ml, 为制备溶性胎盘受体加入等体积的 2% 洋地黄皂甙及 MgSO₄ 10 mmol/L 冰浴搅拌 30 min, 100 000 × g 离心, 上清液加入 1300-100 型树脂, 冰浴搅拌 1 h, 过滤除去树脂, 溶液 -40℃ 保存备用。

胎盘 P₂ 部份蛋白质含量测定采用 双缩脲比色法⁽⁵⁾, 以 Tris 50 mmol/L 缓冲液为对照; 溶性受体中的蛋白质含量用考马士兰法⁽⁶⁾, 以 0.02% 洋地黄皂甙为对照。

受体结合活性的测定 P₂ 部份结合活性用过滤法测定⁽⁷⁾, 所用 [^3H]etorphine 的浓度为 1 nmol/L; 溶性受体活性测定用 PEG 法, [^3H]etorphine 的浓度为 4 nmol/L。IC₅₀ 值从浓度-机率单位作图的线性回归测得, 每个数据均为三复管, 平均误差不超过 10%。

溶性胎盘阿片受体与凝集素相互作用的试验分别采用沉淀法和层析法⁽⁸⁾进行。

层析法初步纯化胎盘阿片受体 取 10 ml 麦胚凝集素-琼脂糖装柱, 并用 0.02% 洋地黄皂甙 tris 缓冲液平衡, 置 20 ml 溶性胎盘阿片受体于柱上, 自然过柱后, 用同样缓冲液洗柱至无蛋白峰检出, 约用缓冲液 120 ml, 用 5 ml 含 N-acetylglucosamine 0.1 mol/L 的缓冲液淋洗, 收集 280 nm 检测下的蛋白质峰, 共 15 ml,

此溶液不需处理即可直接用于测定结合活性,并测定蛋白质含量,以每 mg 蛋白质结合的标记配基量以计算其纯化倍数。

结 果

洋地黄皂甙/硫酸镁 制得的溶性 胎盘阿片受体的结合特性 溶性胎盘阿片受体对 $[^3\text{H}]$ etorphine 具有良好的结合活性,典型实验中蛋白质回收率为 15%,活性回收率为 26%,所制得的溶性受体清澄,易于保存,在 -40°C 保存 2 个月,活性损失 10%,由于未用 NaCl 作为助溶的试剂,故此溶性受体可与激动剂结合,与 $[^3\text{H}]$ etorphine 的结合呈饱和性,其饱和曲线和 Scatchard 分析如图 1 所示。平衡离解常数和最大结合量分别为 6.62 nmol/L 及 54.1 pmol/g 蛋白质。

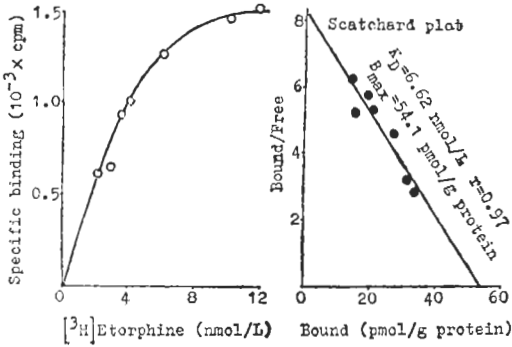


Fig 1. Saturation curve and Scatchard analysis of $[^3\text{H}]$ etorphine binding to soluble placental opioid receptors.

为验证用洋地黄皂甙/硫酸镁制备的溶性胎盘阿片受体仍如像胎盘 P_2 膜那样为 κ 亚型结合点,测定了某些专一性配基对 $[^3\text{H}]$ etorphine 与溶性胎盘阿片受体结合的影响,其 IC_{50} 值有较大的不同;以典型的 κ 激动剂 U-50488 H 为最强,达到 0.18 nmol/L ;而 DTLET 及羟甲芬太尼等 δ 及 μ 较为专一的配基则比较弱,其 IC_{50} 值分别为 $0.81 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 及 62 nmol/L ; β -naltrexamine 的 IC_{50} 为 4.3 nmol/L 。这表明了用洋地黄皂甙/硫酸镁制备的胎盘溶性阿片受体的结合特性仍为 κ 亚型。

4 种凝集素对胎盘溶性阿片受体的亲和能力 伴刀豆凝集素,花生凝集素,稻胚凝集素等 3 种凝集素不能沉淀溶性胎盘中的阿片受体;而麦胚凝集素则可以 100% 地沉淀阿片受体,使上清液中的结合活性完全丧失,而当孵育时存在 N -acetylglucosamine (0.2 mol/L) 时,上清液中的阿片受体活性全部恢复。以上结果说明麦胚凝集素对阿片受体有糖专一性的亲和力。

麦胚凝集素-琼脂糖及三齿草藤凝集素-葡聚糖柱对溶性胎盘阿片受体初步纯化的比较 胎盘溶性阿片受体通过麦胚凝集素柱后,大部份阿片受体滞留在柱上,经专一性糖 N -acetylglucosamine 洗脱后测定活性,表明经过麦胚凝集素柱后受体活性可以提高约 10 倍(基于上柱前后每 mg 蛋白质结合的 cpm 值之比而测算),而三齿草藤凝集素柱在同样条件下则不能起到滞留阿片受体的作用,用该凝集素的专一性糖 α -methylmannose 洗柱后的流出液中,不能测得受体的活性,用麦胚柱部份纯化胎盘溶性受体的具体结果列于表 1 中。

Tab 1. Enrichment of soluble placental opioid receptors by wheat germ agglutinin-agarose column. Average of duplicate experiments.

	Before column	After column
Total volume	20 ml	16.5 ml
mg protein/ml	2.4	0.105
Total protein (mg)	48	1.73
Recovery of protein		3.6%
Specific binding (cpm/mg protein)	333	3557
Binding recovery		38.4%
Enriched folds		10

讨 论

洋地黄皂甙/硫酸镁可溶解鼠脑阿片受体⁽⁹⁾,王锋等也曾用类似的方法制得大鼠脑溶性阿片受体并用它顺利地进一步纯化⁽⁴⁾,我们用此组合制备胎盘溶性阿片受体也获得了满意的结果。使用 MgSO_4 以代替 Simon 等使用的

NaCl, 这样在测定受体活性时不仅可以使拮抗剂, 也可使用激动剂, 所制得的胎盘溶性受体与用 CHAPS 法制得的性质基本相似, 其结合特性也类似于脑或其它组织中的 κ 亚型。这表明洋地黄皂甙/硫酸镁是一种较为满意的制备溶性阿片受体的去垢剂组合。

对 5 种凝集素与溶性胎盘阿片受体的亲和力研究使用了两种方法, 仅麦胚凝集素在两种方法上均显示与阿片受体有糖专一性的亲和作用。表明溶性胎盘阿片受体也是糖蛋白, 其中并存在有 *N*-acetylglucosamine, 这与 Valette 等先用 [3 H]etorphine 与胎盘 P_2 结合后再溶解通过麦胚凝集素柱所得到的结果是一致的。在本实验中所制得的具有活性的初步纯化的胎盘阿片受体, 可作为继续纯化之用。

值得注意的是三齿草藤凝集素与胎盘阿片受体并没有明显的糖专一性的亲和作用, 而王锋等⁽⁴⁾用此凝集素柱纯化阿片受体(大鼠脑)较之用麦胚柱效果好得多, 与我们的初步结果明显不同, 这表明胎盘阿片受体至少在糖基组成上可能与鼠脑中的阿片受体有所不同, 不含有 α -methylmannose, 值得研究。

本文退修过程中, 作者见到美国 Simon 等发表的类似报告, 其中对麦胚凝集素相互作用部份与我们得到的结果相类似⁽¹⁰⁾。

参 考 文 献

- 1 Gioannini T, Foucaud B, Hiller JM, Hatten ME, Simon EJ. Lectin binding of solubilized

- opiate receptors. Evidence for their glycoprotein nature. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 105 : 1128
- 2 Valette A, Rouget P, Cros J, Simon EJ. Interaction with lectins of kappa opioid binding sites solubilized from human placenta. In: *Abstracts of the International Narcotics Research Conference* Cambridge: UK, 1984 : poster 26
- 3 Jiang JB, Hanson RN, Portoghese PS. Stereochemical studies on medicinal agents. 23. Synthesis and biological evaluation of 6-amino derivatives of naloxone and naltrexone. *J Med Chem* 1977; 20 : 1100
- 4 Wang F, Chi ZQ. Isolation and purification of active opioid receptors from rat brain. *Acta Pharmacol Sin* 1987; 8 : 490
- 5 Gornall AG, Bardawill CJ, Dald MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177 : 751
- 6 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72 : 248
- 7 徐 珩、陈 洁、池志强. 羟甲芬太尼 (ohmefentanyl): 一个新的 μ 阿片受体激动剂. 中国科学 [B] 1984; (8) : 733
- 8 王 锋、李志毅、池志强、孙 册. 洋地黄皂甙/氯化钠溶性阿片受体的特征及其与六种凝集素相互作用的研究. 科学通报 1986; 31: 952
- 9 Demoliou-Mason CD, Barnard EA. Solubilization in high yield of opioid receptors retaining high affinity delta, mu and kappa binding sites. *FEBS Lett* 1984; 170 : 378
- 10 Valette A, Rouget P, Coulais E, Potonnier G, Cros J, Simon EJ. Interaction with lectin of kappa binding sites solubilized from human placenta. *Life Sci* 1987; 40 : 535

Acta Pharmacologica Sinica 1988 May, 9 (3) : 221-224

Interactions between soluble placental opioid receptors and lectins

GE Bang-Lun, ZHOU De-He, ZHANG Hong-Ping

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT The final concentration of 1% of digitonin and $MgSO_4$ 5 mmol/L were added to human placental P_2 . After solubilization and absorption of excess detergent

the supernatant was referred to be the digitonin/ $MgSO_4$ solubilized placental opioid receptors. The K_D and B_{max} of [3 H]etorphine binding to this preparation was 6.62 nmol/

L and 54.1 pmol/g protein respectively. The IC_{50} of selected ligands for [3H]etorphine to this preparation showed that the binding characteristics of this preparation were more similar to the kappa subtype opioid receptors of brain and other tissues.

The results in studying sugar affinity between 5 lectins and the soluble placental opioid receptors by precipitation method and/or column method showed that only wheat

germ agglutinin could bind soluble placental opioid receptors with sugar affinity.

After passing WGA-agarose column, the placental opioid receptors were enriched by about 10 folds.

KEY WORDS soluble placental endorphine receptors; glycoproteins; sepharose; endorphins; digitonin; magnesium sulfate; lectins; [3H]etorphine