吗啡对北京鸭红细胞膜腺苷酸环化酶的影响

张德昌　安　岩　金荫昌

（中国医学科学院基础医学研究所药理研究室，北京）

一、引　言

Collier 等[1]发现阿片类药物能通过阿片受点抑制前列腺素 E_1 及 E_2（PGE_1，PGE_2）激活的大鼠脑匀浆腺苷酸环化酶（AC）活性．随后，Sharma[2] 等证实，吗啡及若干阿片类药物都能抑制 PGE_1 激活的神经母细胞瘤×神经胶质瘤杂交细胞的 AC，并且其相对抑制作用与它们和阿片受点结合的能力相对应．亮氨酸脑啡肽[3]、甲硫氨酸脑啡肽[4]、α、β、γ-内啡肽[5]及某些 β-lipotropin 的片段[6]都具有这种抑制作用．从而提出了阿片受点与 AC 偶联的可能性．

Abood[7] 等曾报道人类红细胞膜上存在特异的阿片结合点，但未见进一步的报道．迄今为止，几乎所有关于阿片受点的研究都是在神经组织或与神经组织密切关联的离体器官模型上进行的．

北京鸭红细胞膜上存在与 AC 偶联的 β- 肾上腺素受点[8]，本文则观察了吗啡对该细胞膜 AC 的影响．发现吗啡抑制氟化钠（NaF）和去甲肾上腺素（NA）激活的 AC，并且这种抑制作用能被阿片受点拮抗剂纳络酮所逆转．提示北京鸭红细胞膜上可能存在阿片受点，并且这种受点与 AC 偶联．

二、材料与方法

北京鸭雄性，体重 2.5kg 左右，颈动脉插管放血，肝素抗凝．红细胞膜制备基本依 Bilezikian[9]．测定吗啡作用时，必须使用新鲜制备的膜．

AC 测定方法基本同前[8]，但缓冲体系修改如下：50mM Tris-苹果酸（pH7.5），内含 EGTA 0.2mM，$MgSO_4$ 2mM，茶碱 10mM，ATP2mM；每测定管加入新鲜北京鸭红细胞膜制备物 50 或 100μl，相当于 0.4mg 蛋白左右．其余药物浓度见结果．总反应体积 500μl．反应在 30℃ 水浴中保温 15 分钟，然后置沸水中 3 分钟终止酶反应．离心后取上清 50μl，用蛋白激酶结合法测定 cAMP 产量．每次实验中，每一药物浓度都测试了复管，每管 cAMP 均做双管测定．每个实验至少重复 3 次．蛋白含量用 Lowry 氏[11]法测定．

不同药物作用差别的显著性用 Student-t 测验证实，IC_{50} 值用直线回归法求出[12]．

三、结　果

1. 吗啡在 10^{-10}—$10^{-6}M$ 之间抑制 NA（$10^{-4}M$）激活的 AC 但当浓度提高到 $10^{-5}M$ 时，其

本文 1981 年 12 月 9 日收到．

表 1　吗啡对 NA 激活的北京鸭 RBC 膜之 AC 的抑制作用

	吗　　啡　　(M)							
	0	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
AC 活性	30.3±2.1	26.0±2.2	28.8±0.6	*23.4±3.6	*19.3±2.4	*15.6±1.6	*12.8±1.1	*24.6±1.3
%	100	85.8	95.0	77.2	63.7	51.5	42.2	81.2

NA = $10^{-4}M$, AC 活性单位为 cAMPpmol/15 分/mg 蛋白,表列数字为均数 ±SD, $n = 3$.
* 表示 $P<0.05$.

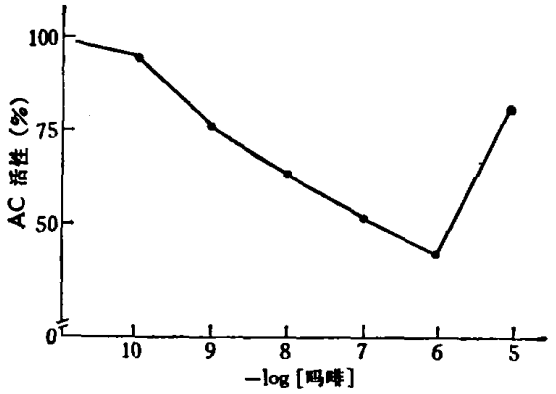


图 1　吗啡对 NA 激活的北京鸭红细胞膜 AC 的影响

以未加吗啡时 AC 活性为 100% (NA = $10^{-4}M$), 50mM Tris-苹果酸 (pH7.5), 茶碱 10mM, EGTA0.2mM, $MgSO_4$2mM, ATP 2mM, 30℃, 15 分钟

表 2　吗啡对 NA 激活的北京鸭 RBC 膜之 AC 的抑制作用及纳络酮的拮抗作用

	吗　　啡　　(M)						
	0	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Nx = 0	39.3±1.3	41.4±3.9	40.0±6.0	34.4±2.9	*15.9±1.0	*12.8±5.5	37.5±10.8
Nx = Mor	38.3±1.4	38.1±1.4	36.3±8.3	31.0±3.8	*27.8±4.1	*19.4±9.0	*25.0±1.4
Nx = 10Mor	39.2±1.3	39.4±9.6	39.1±3.5	46.1±1.6	34.1±2.3	47.3±2.3	35.3±5.3

说明同表 1. Nx: 纳络酮; Mor: 吗啡.

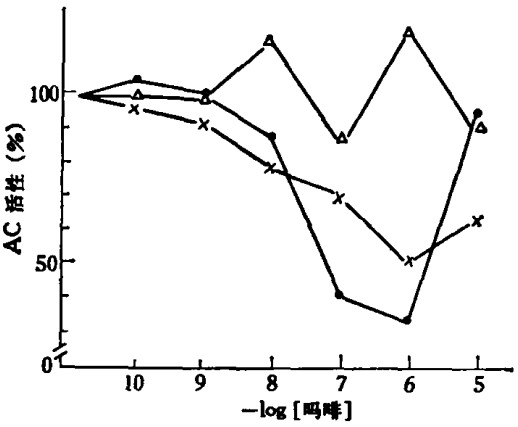


图 2　吗啡对 NA 激活的北京鸭红细胞膜 AC 的影响及纳络酮的拮抗作用

以未加吗啡时 AC 活性为 100%, 反应条件同图 1. ●—●—● 未加纳络酮; ×—×—× 纳络酮浓度与吗啡浓度相等; △—△—△ 纳络酮浓度为吗啡浓度的 10 倍

抑制作用消失(表 1、图 1). 说明其抑制作用仅仅发生于较低的浓度. 直线回归法求得吗啡对 NA 激活的 AC 之 IC_{50}(抑制酶活性 50% 时吗啡的浓度)为 $5.6 \times 10^{-9}M$($r = 0.995$).

吗啡对 NA 激活的 AC 之抑制作用能被纳络酮逆转(表 2、图 2). 当吗啡的浓度与纳络酮的浓度相同时,纳络酮仅能部分地拮抗吗啡的作用,此时 IC_{50} 值为 $2.6\times10^{-8}M$($r = 0.995$),而当纳络酮浓度为吗啡浓度的 10 倍时,吗啡的作用就完全被拮抗. 未发现纳络酮本身影响 NA 激活的 AC 活性.

在目前实验条件下,未能观察到吗啡对酶基本活性的影响.

2. 吗啡抑制 NaF 激活的 AC 活性如图 3 及表 3 所示. 值得指出的是,当吗啡的浓度仅为 10^{-8}—$10^{-9}M$ 时,即已达到最大抑制效应. 与对 NA 激活的 AC 之最大抑制浓度比较,要低 2—3 个数量级. 对 NaF 激活的 AC 这种抑制作用也能被纳络酪拮抗(表 3、图 3).

表 3 吗啡对 NaF 激活之北京鸭 RBC 膜之AC 的抑制及纳络酮的拮抗作用

	吗 啡 (M)				
	0	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
Nx = 0	176.8±27.8	170.3±20.3	132.0±29.5	*118.5±7.8	138.8±2.5
Nx = $10^{-10}M$	176.8±27.8	200.0±31.0	178.0±12.8	161.0±16.5	160.3±3.3

NaF = 10mM, Nx: 纳络酮. 其余说明同表 1.

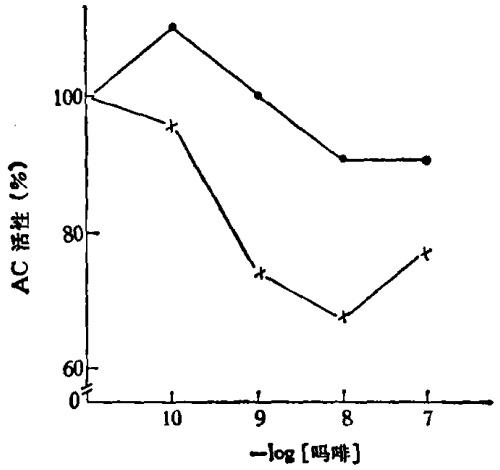


图 3 吗啡对 NaF 激活的北京鸭红细胞膜 AC 的影响及纳络酮的拮抗作用
以未加吗啡时 AC 活性为 100% (NaF = $10^{-2}M$), ×—×—× 未加纳络酮; ●—●—● 纳络酮 = 10^{-10}. 其余反应条件同图1, 但未加 NA

经液氮冷冻后,环化酶仍能被 NaF 及 NA 激活,但不能再观察到吗啡的抑制作用.

四、讨 论

目前一般认为,阿片受点很可能与 AC 偶联而发挥其生物效应. 但无论体内试验还是试管中的试验结果都还存在不少矛盾. 而且所有这些结果都是在神经组织或来源于神经组织的杂交瘤细胞中进行的. 由于脑组织本身的复杂性,许多矛盾的结果很可能是来源于材料本身或制备过程的差异,从而使问题更为复杂. 作为一种单一的细胞,杂交瘤细胞因而得到广泛的应用. 但由于它来源于肿瘤并且是人工培养的,所以未必能很好地代表正常情况. 本文报道

的北京鸭红细胞膜也是单一细胞的制备物，而且是正常细胞，再者它的来源远较杂交细胞容易，就更具实用价值.

本文结果表明，吗啡在低浓度时（10^{-10}—$10^{-6}M$）抑制 AC，而较高浓度时（$10^{-5}M$ 以上）其抑制作用减弱乃至消失. 一般认为，只有在低浓度时的作用才是通过阿片受点的特异性反应，而浓度提高后，则可能发生一些不通过受点的非特异性作用. 本文中，吗啡抑制 NA 激活的 AC 之 $IC_{50} = 5.6 \times 10^{-9}M$，这与 Pert 等[13]用放射受点结合法测定的吗啡 IC_{50} 值（$3 \times 10^{-9}M$）很接近. 也提示低浓度吗啡的作用是通过阿片受点发生的. 至于高浓度吗啡对 AC 的影响，Tang[14] 等曾报道，吗啡在 $2 \times 10^{-5}M$ 以上则不能抑制小鼠尾核匀浆的 AC 活性，继续增加吗啡浓度反而激活 AC. Walczak 等[15]报道，脑啡肽对猴杏仁核匀浆 AC 的抑制也仅仅发生于较低的浓度. 作者认为，由于吗啡浓度过高，超过了受点作用的水平，很可能产生一些非特异性的影响，使对 AC 的抑制作用被逆转或减弱.

总之，低浓度吗啡抑制 NA 及 NaF 激活的北京鸭红细胞膜的 AC，并且能被阿片受点拮抗剂纳络酮逆转. 这都说明吗啡的作用是通过阿片受点发生的. 并且，作者最近发现北京鸭红细胞膜制备物与 ^{3}H-etorphine 的特异性结合（未发表材料），这就进一步提示北京鸭红细胞膜——一种非神经组织的制备物上可能存在阿片受点.

由于 NA 是通过 β-受点激活 AC 的[8]，所以本文结果表明，吗啡受点激活后，能抑制 β-受点激活所致的 AC 升高.

近年来，一些作者证实[16-18]，氟离子是通过鸟苷酸调节蛋白（Guanine aucleotide regulatory protein, G/F factor）激活 AC 的. 氟 AC 的激活是不依赖受点状态的. 本文表明阿片受点激活后能抑制 NaF 的作用，并且所需浓度很低（10^{-9}—$10^{-8}M$）. 这就提出了进一步研究阿片受点与 G/F 因子—AC 催化部位之间关系的一个问题.

参 考 文 献

[1] Coller, H. O. J. et al., *Nature*, **248**(1974), 24.
[2] Sharma, S. K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**(1975), 590.
[3] Brandt, M. et al., *Nature*, **262** (1976), 311.
[4] Klee, W. A. et al., *Nature*, **263** (1976), 609.
[5] Brandt, M. et al., *FEBS Lett.*, **80** (1977), 251.
[6] Wahlstrom, A. et al., *FEBS Lett.*, **77** (1977), 28.
[7] Abood, L. G. et al., *L. Neurosci. Res.*, **2** (1976), 427.
[8] 张德昌等，科学通报，**26** (1981)，20: 1272.
[9] Bilezikian, J. P. et al., *J. Biol. Chem.*, **248**(1973), 5577.
[10] Gilman, A. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67** (1970), 305.
[11] Lowry, O. H, et al., *J. Biol. Chem.*, **193** (1951), 265.
[12] 上海第一医学院卫生统计学教研组，医学统计学方法，上海科学技术出版社，1979，29，206.
[13] Pert, C. B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70** (1974), 2243.
[14] Taug, L. C. et al., *Ibid.*, **75** (1978), 1546.
[15] Wlczak, S. A. et al., *Brain Res.*, **160** (1979), 105.
[16] Northup, J. K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77** (1980), 6516.
[17] Gilman, A. G., *Abstracts of 8th International Congress of Pharmacology*, 1981, 15.
[18] Downs, R. M. et al., *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 949.