

内啡肽的离体豚鼠回肠生物鉴定 并介绍一种简单的换能器

吴时祥 赵丹丹 邹 冈

(中国科学院上海药物研究所)

近年来发现,动物脑、垂体及血液中存在着一类统称为内啡肽的内源性吗啡样物质,它们具有较强的生理活性,在脑内可能是一类新的神经递质,与脑内抗痛机制和精神活动有关^[1]。目前仍不断从组织中提取到新的内啡肽。

离体豚鼠回肠纵行肌是吗啡样活性测定最常用的生物鉴定标本^[2],是内啡肽的提取、化学合成研究中必不可少的工具之一。内啡肽类似吗啡可以抑制其电刺激引起的收缩,拮抗剂纳洛酮能够逆转之。为了配合内啡肽的提取工作,我们结合本实验室的条件制成了一种简单的换能器及有关设备,使内啡肽的鉴定工作得以顺利进行。简易换能器同样适用于离体小白鼠输精管标本,经过两年多应用证明性能灵敏,稳定可靠。本文介绍这种设备及实验技术。

1. 豚鼠离体回肠纵行肌制备

取 200—300 克重的豚鼠,性别不限。棒击枕部处死,立即解剖取出近盲肠端的回肠 5 厘米长二段,放入盛有 37℃ Krebs 氏溶液^[3]〔每 1000 毫升内含神经节阻断剂六烃季铵 (C_6) 25 毫克;苯海拉敏 50 微克;胆硷 2.8 毫克;通 95% 的氧气、5% CO_2 〕的小玻璃培养皿中,湿润后套在一根细玻璃棒上。玻璃棒可固定在实验台支架上,便于剥离纵行肌。沿回肠壁与肠系膜连结处的一条纵行血管,用不锈钢钟表镊子镊住边缘,轻轻从回肠的一端至另一端将表层纵行肌与环形肌逐步扩大分离,如图 1。把表层的纵行肌与回肠的环形肌全部分离。分离出的

纵行肌如一张极薄的玻璃纸,首先把它浸在盛有 Krebs 氏溶液的培养皿中,在其一端用零号丝线缚成一小圈准备套在玻璃电极小钩上,其另一端缚一根长的丝线用胶泥粘附在换能器磷铜片尖端。取回肠及分离纵行肌操作过程的时间尽量快些,制备好后立即放入盛 Krebs 氏液恒温的小浴管中,并通氧气及二氧化碳,否则标本易死亡。

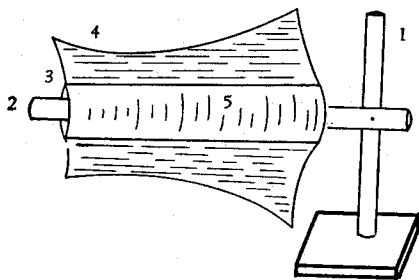


图 1 豚鼠离体回肠纵行肌分离法

1. 固定支架; 2. 固定玻璃棒; 3. 豚鼠回肠;
4. 表层纵行肌; 5. 环形肌

2. 电极制备

用方波电场刺激引起离体豚鼠回肠纵行肌收缩,刺激参数^[3,4]: 波宽 0.5—1 毫秒,频率 6 次/分,电压 80 伏左右。刺激通过电极玻璃上下两铂金环,在 Krebs 氏溶液中作电场刺激,电极制备见图 2。将豚鼠回肠纵行肌一端的丝线圈勾在电极棒下端玻璃小钩上,另一端的丝线穿过底部及上部两铂环电极中心,最后用胶泥悬挂在换能器的铜片尖端。

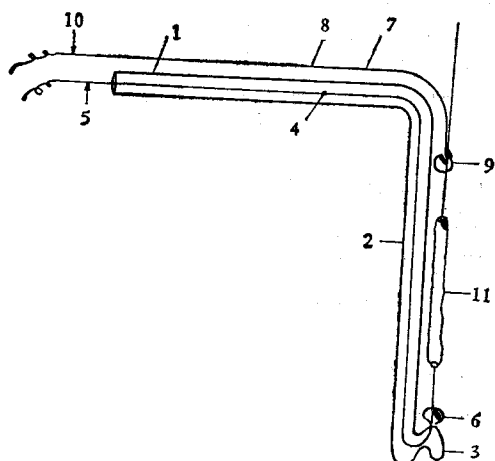


图2 固定离体标本的电极示意图

1. 电极玻璃棒横段作固定用； 2. 电极玻璃棒垂直段；
3. 玻璃小钩； 4. 玻璃管内铂丝焊接单根导线接点处；
5. 玻璃管内接出的单根导线，接方波电刺激器； 6. 从玻璃管底部穿出小钩处制成直径 4.5 毫米铂金小环；
7. 玻璃管外从横段到垂直段管处的铂丝(直径 0.5 毫米)； 8. 焊接一根外部单根导线的接头； 9. 管外铂丝 7 于管垂直段 2 厘米处制成的平面小环(直径为 4.5 毫米)； 10. 为管外导线接 7 铂丝，再接方波电刺激器； 11. 豚鼠回肠纵行肌活体标本

3. 换能器制备

换能器是本实验的关键，它能把离体豚鼠回肠纵行肌仅几十毫克微弱的收缩力转变成电能，经放大后推动记录仪的描笔将收缩描绘出来。换能器所用的零件在图 3 线路中叙述，按图 3 线路联接即可完成。另备磷铜皮 1 块(厚 0.5 毫米，阔 1 厘米，长 4.5 厘米制成等腰三角形，并取其总长的四分之三用锉刀磨成薄片，其

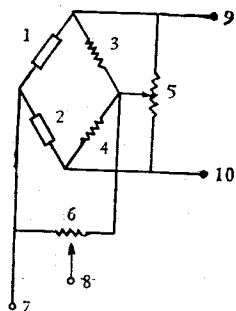


图3 换能器的线路

- 1, 2——60 欧姆炭质电阻； 3, 4——60 欧姆应变片(华东电子仪器厂出品)； 5, 6——4.7K 欧姆可变电位器(微型)； 7, 8——输出线，接平衡记录仪；
- 9, 10——电源输入端，接直流稳压电源 1—3 伏)

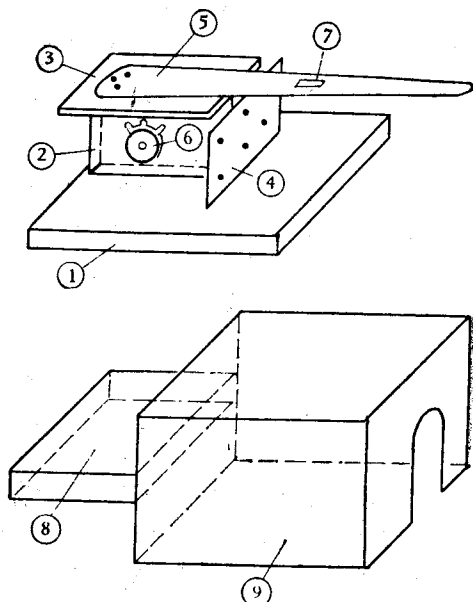


图4 换能器支架及外壳

1. 取长 4 厘米，宽 3 厘米，厚 0.3 厘米有机玻璃一块作底座；
2. 取高 2.3 厘米，厚 0.2 厘米，阔 2 厘米有机玻璃一块，固定于底座中间； 3. 在 2 的顶部水平方向用一块厚 2 毫米，长 1.7 厘米，宽 1 厘米的有机玻璃固定在上； 4. 在 2 的前方固定一小块绝缘板作电阻焊接支架； 5. 制作好的磷铜片固定于 3 有机玻璃上； 6. 在 2 垂直有机玻璃板上左右两侧各按装 4.7K 欧姆可变电位器(半导体收音机作音量调制用)一只； 7. 60 欧姆应变片贴附在磷铜片上下两面各一片； 8. 作固定用； 9. 有机玻璃制罩壳

厚度为 0.2 毫米)。换能器的支架及外壳全部用有机玻璃粘制成，具体制法见图 4。

贴附半导体应变片首先把制作好的软而有弹性的磷铜片用乙醚擦净其表面污物，涂上一层绝缘漆，凉干，再加热 100℃ 固化 2 小时，冷却后在磷铜片中心处，正反两面各用绝缘漆贴上 60 欧姆应变片各一片，再经烘箱 100℃ 烘 2 小时，取出固定于有机玻璃支架 3 上。再按照图 3 线路图接线，接好后，换能器有输入及输出两组线，输入接稳压电源，输出接记录仪。把以上各部分联在一起，就成为一套离体鉴定内啡肽的实验装置。见示意图 5。

4. 结果与讨论

离体豚鼠回肠纵行肌用方波电刺激器刺激，使其收缩，通过自制的换能器，应用国产稳压电源，国产平衡记录仪及本所电子室自制的方波电刺激仪得到灵敏度高而稳定的等长收缩

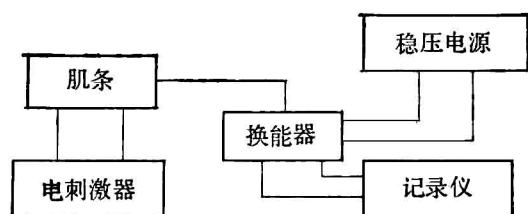


图5 鉴定内啡肽离体实验装置示意图

(图6)。用吗啡或我所液相合成的甲硫氨酸脑啡肽(每毫升 0.3 微克)均有明显的抑制作用,且可为纳洛酮(每毫升 0.15 微克)所逆转。

本离体装置建立已二年,证明性能稳定,自制的换能器同样通用于肌力更小的离体小白鼠输精管,从而促进了我们从生物组织提取内啡肽的工作顺利进行,并用以比较各种合成方法

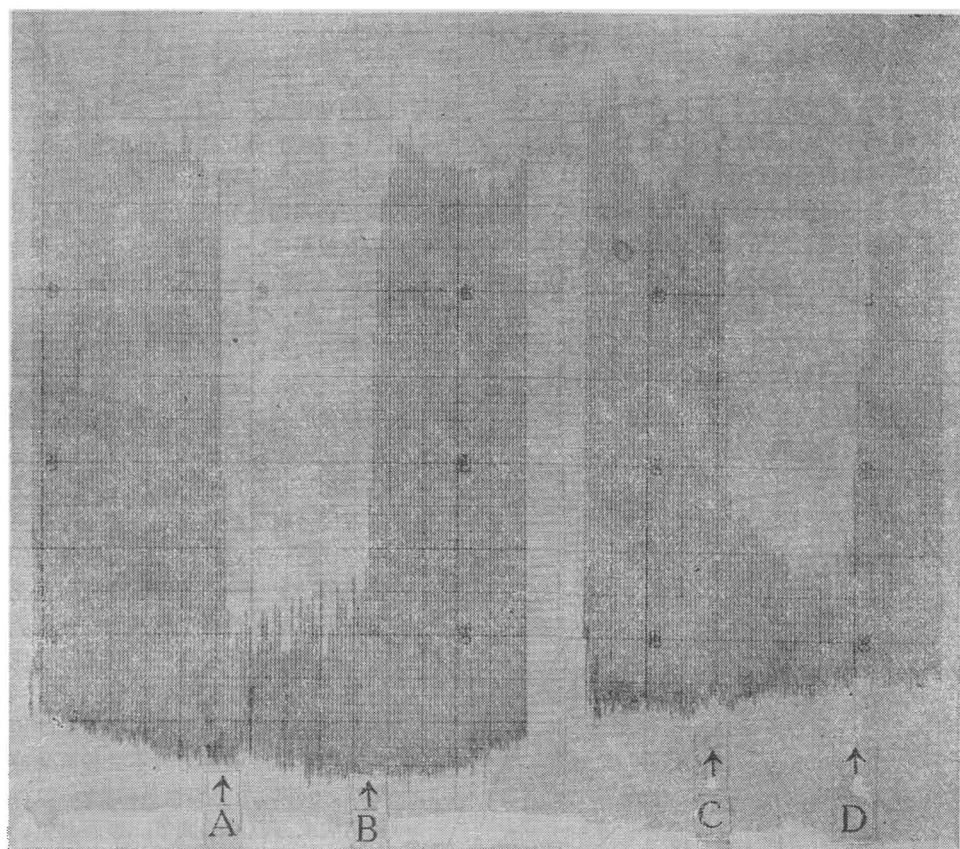


图6 内啡肽生物鉴定记录

A. 液相合成甲硫氨酸脑啡肽(每毫升 0.3 微克)电刺激离体豚鼠回肠纵行肌收缩明显抑制; B. 甲硫氨酸脑啡肽抑制情况下加入吗啡拮抗剂纳洛酮(每毫升 0.15 微克)其收缩恢复到原高度; C. 吗啡(每毫升 0.3 微克)电刺激离体豚鼠回肠纵行肌收缩明显被抑制; D. 吗啡抑制情况下加吗啡拮抗剂纳洛酮(每毫升 0.15 微克)其收缩立刻恢复到原高度。

制备的脑啡肽活力。我们用的浴管为 6.5 毫升,较国外常用的 2.5 毫升为大,若将浴管体积进一步缩小,则灵敏度可以提高。但生物鉴定方法主要是配合内啡肽的提取分离和合成,不是测定生理情况下内啡肽含量的变化,因此灵敏度不是主要问题。至于生理情况下的内啡肽含量变化,目前都用放射受体分析及放射免疫法,其结果将另行发表。

参 考 文 献

- [1] Goldstein, A.: *Science*, 193, 108, 1976.
- [2] Hughes, J.: *Brain Res.*, 88, 295, 1975.
- [3] Henderson, G., Hughes, J., Kosterlitz, H. W.: *Brit. J. Pharmac.*, 46, 764, 1972.
- [4] Famey, J. P., Fontane, J., Reuse, J.: *Agents & Actions*, 5, 354, 1975.

[本文于 1978 年 2 月 11 日收到]