

人外周淋巴细胞多巴胺受体的测定方法研究

董竞武 刘春芳 全新荣 丁训诚

(上海市劳动卫生职业病研究所毒理研究室)

提 要

用 $[^3\text{H}]$ -spiperone 作为特异配体,与人的淋巴细胞膜上多巴胺受体进行结合反应,在淋巴细胞浓度 1×10^6 个/ml,反应温度 37°C ,反应时间 60min 条件下,此结合反应具有低容量和高亲和力的特点。 $K_d = 8.87\text{nmol/L}$, $B_{\max} = 181\text{fmol}/1 \times 10^6$ 个淋巴细胞。用单点法分析,34 例正常人特异结合平均值为 $139(\text{fmol}/1 \times 10^6 \text{LC})$ 。此法用量少重复性优,从而适用于临床研究。

脑纹状体多巴胺 (DA) 受体的抑制已经证明是引起巴金森氏症及锰等重金属中毒的重要原因。G. le Fur. (1980) 等报道了人淋巴细胞 (LC) 膜上存在 DA 受体,并且通过巴金森氏症病人脑纹状体和血淋巴细胞多巴胺 (LC-DA) 受体的检测,了解到二者存在密切相关^[1]。由此可以通过检测血中 LC-DA 受体来反映脑内纹状体 DA 受体的功能。我们从受体检测的角度结合有关精神神经系统临床诊断及治疗的实际需要,采用一种可行的由人外周血 LC-DA 受体的测定来反映脑 DA 受体的功能状态,具有取材容易可多次重复等优点。目前有关人 LC-DA 受体的研究尚开始不久,我们以放射配体分析 (Radiolig and Assay) 来检测 DA 受体的功能,测定人外周 LC 的 $[^3\text{H}]$ -spiperone 特异结合,为 DA 受体的临床进一步研究建立了必要的方法。

材 料 和 方 法

1. 试剂

$[^3\text{H}]$ -spiperone 英国放化中心 (Amersha-

m) 产品,703 GBq/mmol 氟哌啶醇 上海第十二制药厂产品。49-型玻璃纤维滤膜 上海虹光造纸厂产品。闪烁体 ppo 上海试剂一厂产品, popop 上海试剂一厂产品。

2. 方法

(1) 淋巴细胞的分离和鉴定 采用密度梯度离心法将 LC 分离并鉴定^[2,3]。用此法分离所得 LC 纯度为 90%, LC 存活率 95% (用台盼蓝染色后计数)。再进行 LC 计数板计数,以 Hank's 液调整浓度至 $1 \times 10^7 \text{LC/ml}$ 。 4°C 条件下保存备用。

(2) DA 受体特异结合测定 按文献 [4] 方法改进,取 $1 \times 10^7 \text{LC/ml}$ 的 LC 悬液 $100\mu\text{l}$, 加入用 Hank's 液稀释的 $[^3\text{H}]$ -spiperone $50\mu\text{l}$ (浓度 0.25 — 16nmol/L), 每反应管中用 Hank's 液补足体积至 $1000\mu\text{l}$, 作双复管为总结合管; 同时在另外双复管中加入浓度高于 $[^3\text{H}]$ -spiperone 1000 倍的氟哌啶醇 $50\mu\text{l}$ (排除非特异结合), 每管反应总体积为 $1000\mu\text{l}$ 。 37°C 保温 60min 并振荡混匀。反应结束后反应管置冰浴中终止反应 5min, 用 49 型微孔滤膜抽滤收集

[6] 刘永明等:《江西医学院学报》,1987, 4 (在印刷中)。

[7] 南国华等:《生物化学与生物物理进展》,1984, (11),

LC 膜,并用预冷的 Hank's 液洗二次,每次 5ml。取下滤膜于 80℃ 烘箱中干燥 15min,置于闪烁液中(每 1000ml 二甲苯中含 ppo 5克, popop 0.5 克),用液体闪烁计数仪测 cpm。

结 果

1. [³H]-spiperone 特异结合的 K_d 和 B_{max} (Scatchard 作图法)

为确定 [³H]-spiperone 与 LC 膜 DA 受体的饱和浓度,用 Hank's 液配制不同浓度的 [³H]-spiperone 溶液,浓度分别为 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 12, 16nmol/L 于 37℃ 保温 60min,收集 LC 膜测 cpm,计算浓度为 1×10^6 LC/ml 所结合的 [³H]-spiperone 的 fmol 数,并以浓度对结合的 fmol 值作特异结合浓度曲线,结果有明显的饱和现象(图 1),在 Scatchard 图上成一直线,其回归方程的相关系数 $r = -0.955$, $K_d = 8.87$ nmol/L, $B_{max} = 181$ fmol/ 1×10^6 LC,说明人外周 LC 上的 [³H]-spiperone 特异结合部位具有低容量和高亲和力的特点。

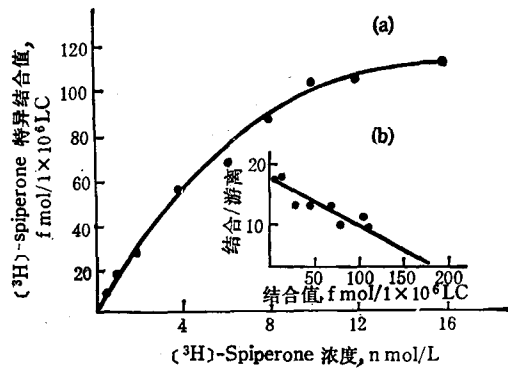


图 1 正常人淋巴细胞 [³H]-spiperone 的特异结合 (a) 饱和曲线, (b) Scatchard 图

2. 正常人、LC[³H]-spiperone 特异结合量

为减少用血量,取人静脉血 8ml 分离出 LC,采用单点法用接近饱和浓度的 [³H]-spiperone 10 nmol/L 测定了 34 例,特异结合平均 (fmol/ 1×10^6 LC) 为 139 ± 70 ,其中男 16 例,女 18 例,特异结合分别为 123 ± 58 , 157 ± 79 。

讨 论

1. 不同浓度 LC 的特异结合

用浓度为 $0.5 - 3.5 \times 10^6$ 个/ml 的 LC 悬液进行结合反应,结果表明:在上述细胞浓度的范围内, [³H]-spiperone 特异结合量和细胞数之间呈线性关系(图 2),若细胞浓度低于 0.5×10^6 个/ml 时,测定结果往往不稳定,可能因结合的 [³H]-spiperone 的 cpm 计数低,误差增大所致。

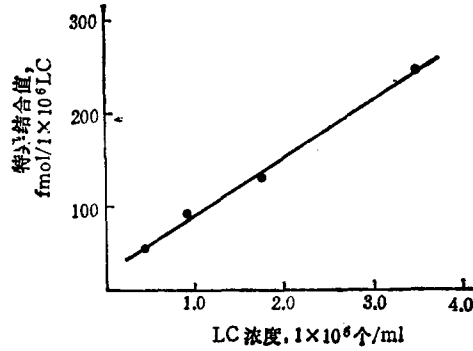


图 2 细胞浓度对 [³H]-spiperone 特异结合的作用

2. 保温时间对结合反应的影响

将 10nmol/L 的 [³H]-spiperone 和 1×10^6 个/ml LC 悬液进行结合反应,分别保温不同时间测定 LC 膜上结合的 [³H]-spiperone 的 cpm,以时间对每毫升 LC 结合的 [³H]-spiperone 的 fmol 数作图,可见最大结合量是在 50—60min (图 3)。

3. 反应温度对结合反应的影响

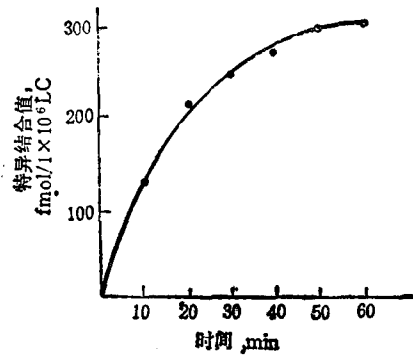


图 3 反应时间对 [³H]-spiperone 特异结合的影响

将 10nmol/L 的 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 和 1×10^6 个/ml 的 LC 悬液混和, 分别在不同温度反应 60min 后测定 LC 膜上结合的 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 的量, 以每毫升 LC 结合的 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 的 fmol 数作图, 可见在 $25\text{--}30^\circ\text{C}$ 时候特异结合率随温度升高而增加; 在 $30\text{--}37^\circ\text{C}$ 范围内, 特异结合反应基本达到稳定, 为操作方便, 选择 37°C 为反应条件(图 4)。

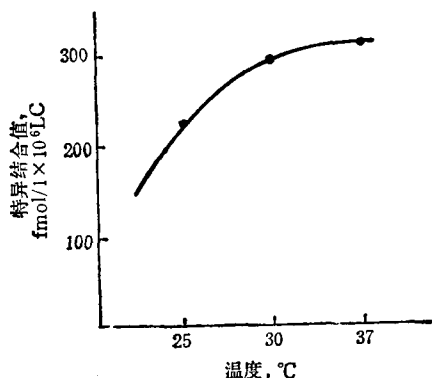


图 4 反应时间对 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 特异结合的影响

4. LC 悬液和全血的保存时间对特异结合的影响

为了确定在 4°C 条件下, LC 悬液和全血的保存时间是否影响 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 特异结合的时间, 测定了浓度为 1×10^6 个/ml LC 悬液的特异结合。结果表明, 无论是 LC 悬液保存还是全血保存, 其 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 的特异结合量, 均随着保存时间(天数)的延长而逐渐降低。同一天数时全血保存的结合量低于 LC 悬液保存的结合量(图 5)。这说明取血后应在 1 天内分离出 LC, 完成 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 特异结合的测定。

前阶段的几种动物模型, DA 受体测定方法已趋成熟^[5,6]。本方法想通过以上研究将动物实验转向临床应用, 为了切合临床实际, 必须解

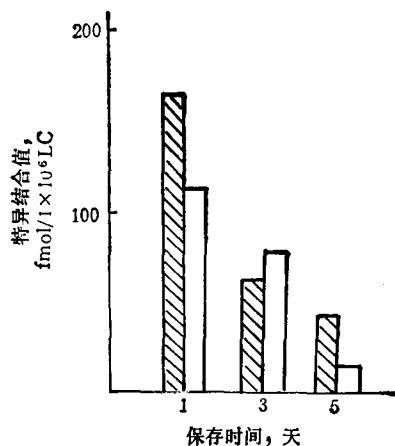


图 5 不同时间和不同保存方法对 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 特异结合的影响

□ 全血保存 ▨ 用 LC 悬液保存

决用血量的问题。我们采用单点法 (Single Assay) 测定 DA 受体, 仅需全血 7—8ml, 收集 LC 并调节 LC 浓度至 1×10^7 个/ml。用近饱和浓度的 $[^3\text{H}]\text{-spiperone}$ 作单点法分析, 在一般情况下能够近似地测出 LC 的最大特异结合量。以放射配体单点法检测人 LC-DA 受体水平, 同一血标本测定十次, 其变异系数为 11.7%, 方法稳定性较好。由于此方法具有用血量少的突出优点, 是临床上可行的研究手段。

参 考 文 献

- [1] G. le Fur, T. et al.: *Life Sciences*, 1980, 26, 1139.
- [2] 陈敏珠: 《药理实验方法学》, 人民卫生出版社, 北京, 1985, 940—943.
- [3] 李其英等主编: 《实用临床医学检验》, 湖北人民出版社, 武汉, 1980, 630—633.
- [4] G. le Fur, V. et al.: *Life Sciences*, 1980, 27, 1587.
- [5] 丁训诚等: 《中国药理学与毒理学杂志》, 1987, 1(3), 161.
- [6] 丁训诚等: 《中国药理学与毒理学杂志》, 1987, 1(3), 235.

[本文于 1987 年 8 月 11 日收到]