

用放射免疫分析法测定受照大鼠 组织激肽释放酶的变化*

张 皓 乐 敏 陈识杰 姜雅梅

胡昱兴 范佩芳 励杏娣 金为翹

(上海医科大学 放射医学研究所, 上海)

摘要 采用放射免疫分析法,测定了大鼠经 8.5 Gy 照射后肾和尿中组织激肽释放酶含量及尿中组织激肽释放酶活力的变化。发现在照后 6 h 受照组肾和尿中组织激肽释放酶的含量显著高于对照组,而在照后 72 h 尿中该酶活力显著低于对照组。

关键词 组织激肽释放酶, 放射免疫分析法, 酶活力, γ 辐照

激肽释放酶(EC.3.4.21.8)系一组丝氨酸蛋白水解酶^[1,3],它的主要作用是水解激肽原释放激肽,并通过激肽的作用参与一系列重要的生理功能^[3,4]。激肽释放酶分为两大类:血浆激肽释放酶和组织激肽释放酶,这两类酶在结构和抗原性上有显著的差异。组织激肽释放酶主要存在于肾脏、尿液及唾液腺中^[5]。曾有人报道对不同射线照射动物体内的激肽变化进行了研究,但有关激肽释放酶在射线影响下的变化报道则很少。本文建立了该酶的放免法,结合其活力测定,对 8.5 Gy γ 射线照射后大鼠肾脏和尿中组织激肽释放酶的变化作了探讨。

材 料 与 方 法

1. 试剂

辅酶 I、醇脱氢酶、抑肽酶均为 Sigma 公司产品, Sepharose-4 B 为 Pharmacia 公司产品, DEAE-纤维素为 Watman 公司产品。N^α-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)为上海东风生化试剂厂产品。其余化学试剂均为国产 AR 级。Na¹²⁵I 为北京原子能所产品。

2. 方法

(1) 激肽释放酶的纯化 参照 Oza 等方法^[1,2],经活性及电泳鉴定,与国外文献报道相符^[1,6]。

(2) 酶活性测定 参照 Trantschold 等方法^[6],活力单位定义为在该反应体系中每分钟 340 nm 光密度值上升 0.01 所需的酶量为 1 毫单位激肽释放酶活力。

(3) 兔抗大鼠尿组织激肽释放酶抗体的制备 参照 Wehe 方法^[7],该抗体经免疫扩散鉴定为专一的 RUK 抗体。

(4) 放射免疫分析法(RIA)的建立 酶的 ¹²⁵I 标记采用氨胺 T 法,标记抗原的比放强度为 $(7.4 \sim 11.1) \times 10^4$ Bq/ μ g。RIA 的建立参照 Wehe 方法^[7]。

* 本工作由国家自然科学基金资助

(5) 大鼠照射及取样 Wistar 雄性大鼠(合格证号为上海*24)。体重 180—200 g, 随机分五组, 4 组 ^{60}Co γ 射线一次全身照射 8.5 Gy, 剂量率 1.56 Gy/min, 照后 6、24、72 和 168 h 采用膀胱插管法留取 3 h 尿样, 取其右肾。

(6) 肾匀浆液制备 参照 Leeuwen 等方法^[8]。

(7) 蛋白含量测定 采用 Lowry 法。

(8) 数据处理 所有数据用平均值 $\pm$ 标准误差表示, 组间比较用 Student's *t* 检验法作统计学处理。

结 果

用本实验室提纯的组织激肽释放酶建立 RIA, 批间误差不大于 8%, 批内误差不大于 6% ($n=10$)。20 ng 纯化的酶加入大鼠尿和肾匀浆中, 回收率分别是 98.4% 和 97.1%。Scatchard 分析得一直线。从图 1 中可见一典型的放免标准曲线, 同时肾匀浆和尿的稀释曲线显示与标准曲线相当好的平行。

用该放免法分别测定了受照大鼠与正常大鼠肾、尿的激肽释放酶含量, 同时用酯酶活力测定法测定了尿中该酶活力的变化。结果发现在照射组肾和尿中酶含量皆在照后 6 h 达到最高值, 为对照组的两倍, 两组相比差异有显著意义 ($P<0.01$), 以后随时间的推移逐渐下降, 至第 7 d 为最低。见图 2。

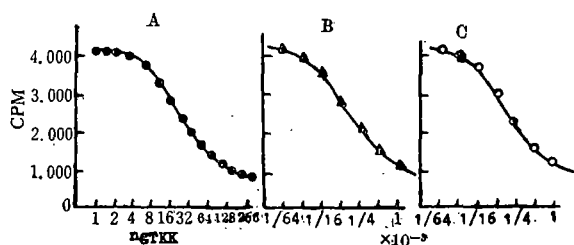


Fig 1. The standard curve of RIA and diluting curve of urine and kidney
(A) standard curve
(B) diluting curve of urine
(C) diluting curve of kidney

受照大鼠尿中酶活力的变化与其含量相似, 但照后 6 h 上升仅为对照组的 1.2 倍, 无统计学意义; 而在 72 h 时, 下降为对照组的 35%, 有统计学意义, 且随时间继续下降。见图 3。

讨 论

对于激肽在放射损伤时的变化, Epstein 等^[12]报道在紫外照射后, 正常人皮肤在 21 min 内有激肽产生; Oyvin 等^[11]报道在兔子受 β 线照射后早期给予抑肽酶(一种激肽释放酶的强抑制剂), 发现能抑制其皮肤损伤; 1972 年 Gaponyuk 等^[10]报道在

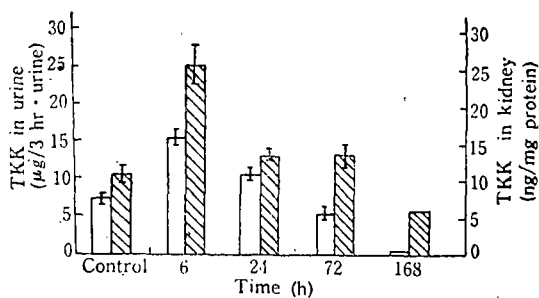


Fig 2. The change of TKK content in rat kidney and urine after irradiation (MEAN $\pm$ SEM)
□ TKK in urine,
▨ TKK in Kidney

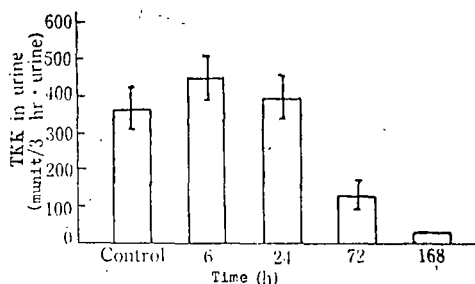


Fig 3. The change of TKK activity in rat urine after irradiation (MEAN $\pm$ SEM)
□ TKK activity in urine

大鼠全身照射 8.0 Gy 后,其体液内激肽含量有所变化。这些报道都提示受照早期体内参与激肽释放的系统一度相当活跃。本文直接测定了受照大鼠肾和尿中激肽释放酶含量及活力的变化,结果显示该酶在受照早期增高,然后随时间逐渐下降,与激肽含量的变化趋势一致^[10]。

根据实验结果,推测该酶的早期增高可能是机体应急反应的一种表现,随后因机体受损至使该酶的合成机制受损或抑制,导致了肾、尿中酶含量及活性的下降。其次,显示了尿中酶含量与活性在受照后的变化趋势虽一致,但程度不完全相符,可能与该酶在尿中存在有激活与非激活两种形式有关。因报道说^[3]在尿中非激活部分所占比例可在 25—75% 间变化。另外,受照后的第 168 h 组的实验结果尽管给予很好的提示,但由于受照动物的死亡,致使样本过少而无法进行统计学计算,这有待进一步实验证实。

参 考 文 献

- [1] N. B. Oza, V. M. Amin, R. K. McGregor, A. G. Scicli and O. A. Carretero, *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1607(1976).
- [2] M. Takaoka, M. Akiyama, K. Ho, H. Okmura and S. Morimoto, *Biochem. Biophys. Res. commun.*, 109(3), 841 (1982).
- [3] N. G. Levinssky, *Circulation Research.*, 44(4), 441, (1979)
- [4] O. A. Carretero and A. G. Scicli, *The American Physiol. Soccity* 247, 1980.
- [5] H. S. Mangolius, *Ann. Rev. Rhysiol.*, 46, 309, (1984).
- [6] I. Trautschold, E. Werle and G. Schweitzer, *Methods of Enzymatic Analysis*, 2 ed, 2, 1031 (1974).
- [7] J. E. Wehe, *The American Physiol. Soccity*, 228, 1983.
- [8] B. H. V. Leeuwen, S. M. Grinblat and C. I. Johuston, *Clin. Sci.*, 66, 207 (1984).
- [9] K. Nustad and J. V. Pierce, *Biochemistry*, 13 (11), 2312(1974).
- [10] P. Y. Gaponyuk, T. N. Kalinkina and I. E. Gaponyuk, *Radiobiology*, 12(5), 735 (1972).
- [11] I. A. Oyvin, L. I. Uklonskay and P. J. Gaponiuk, *Experinet.*, 23, 555(1967).
- [12] J. H. Epsteui, *Arch. Desmatology*, 95, 532 (1967).

(稿件收到日期: 1989 年 7 月 31 日)

DETECTING THE CHANGES OF RAT TISSUE KALLIKREIN AFTER IRRADIATION BY RIA

Zhang Hao, Le Ming, Chen Shijie, Jiang Yamei,

Hu Yuexin, Fan Peifang, Li Xindi and Jin Weiqiao

(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai Midical University, Shanghai)

ABSTRACT Using a direct radioimmunoassay, we examined the changes of tissue kallikrein in rat urine and kidney after a single whole-body 8.5 Gy irradiation. The enzymatic activity of tissue kallikrein in rat urine was examined. It was found that the tissue kallikrein content in kidney and urine of irradiated group were significantly higher than control group at 6 h, and the enzymatic activity of tissue kallikrein in rat urine of irradiated group was significantly lower than control group at 72 h.

KEY WORDS Tissue Kallikrein (TKK), Radioimmunoassay, Enzymatic Activity, γ -irradiation