

研究工作

恒河猴脾肾细胞中的 ANP 样物质

戴宗祥 许如君 戴长柏 赵石 罗其胜 王庆玲

(昆明, 中国医学科学院医学生物学研究所 650107)

ANP(atrial natriuretic peptide), 心房利钠多肽)是心脏肌细胞分泌的一种多肽激素。具有强大的利钠、利尿、扩张血管和降低血压作用^[1,2], 心房肌细胞是合成、贮存、分泌 ANP 的主要场所, 而 ANP 的受体广泛分布在肾肺、心血管系统、神经系统等多种组织和器官^[3,4], 因此, 人们称它是体内的循环激素, 在调节体内水盐平衡和血压的过程中起着极为重要的作用。我们用 PAP 免疫组织化学的方法, 观察了 ANP 在恒河猴脾、肾组织中的分布和定位, 并从猴脾脏中初步提取了具有 ANP 样作用的活性多肽。

材 料 和 方 法

一、组织切片的制备 10 只正常(2—3 岁令)恒河猴, 经 220 v 电刺激休克后, 开腹取出脾肾组织, 放入 4% 多聚甲醛液固定 24 小时, 经 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 浸泡后脱水、透明、石蜡包埋, 切成 4—5 μm 厚的连续切片。

二、抗血清 兔抗人 α-ANP 血清, 由河北省医学科学院提供。滴度为 1:3600, 与强啡肽(DYN), 亮氨酸脑啡肽(L-EK)等非 ANP 均无交叉反应, PAP 复合物和羊抗兔 IgG, 由上海医科大学病理教研室制备。正常羊血清、兔血清, 由本实验室制备。

三、标记方法 采用 PAP 免疫酶标技术。PAP 标记基本参照 Sternberger^[5]方法(1979), 在与标记抗体作用前, 切片置入 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液中 30 分钟, 以消除内源性过氧化物酶。α-ANP 抗体稀释度为 1:200, 4℃ 孵育不超过 24 小时, 羊抗兔 IgG 为 1:20, PAP 复合物为 1:100, 均在 37℃ 下孵育 1 小时, DAB (diamino-benzidine tetrahydrochloride) 用 0.05 mol/L, pH 7.6 的 Tris-HCl 溶解后加入 0.03% H₂O₂, 显色 10—15 min。

以上抗血清的稀释和各步反应间的清洗均用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。

四、对照实验 对照片 1. 以正常兔血清代替第一抗体(1.2-ANP 抗体), 2. PBS 代替第一抗体, 3. 正常羊血清代替第二抗体(羊抗兔 IgG), 其他步骤同上。

五、恒河猴脾 ANP 样物质提取 40 g 新鲜猴脾脏用 PBS(0.05 mol pH 7.2 0.9% NaCl)制成匀浆, 沸水浴 15 min, 冷却后, 4℃ 500 rpm 离心 30 min, 上清为脾粗提物, 冻干浓缩后, 用 Sephadex G-15 分离脱盐^[6], 分别收集各多肽组分, 冷冻干燥, 生物活性测定。

六、放射免疫测定 ANP 放射免疫分析试剂盒, 同济大学上海放射免疫分析技术研究所制备, 双抗-PEG 法测定。

七、降压、利尿试验 实验用 270 g 左右的 wistar 大鼠。大鼠在乌拉坦(urathane)麻醉下, 经颈总动脉插管, 接生理记录仪记录血压, 颈静脉插管输液, 30 分钟使动物体重增加 10% (输入生理盐水, 进行水负荷), 控制体温于 36℃—37℃, 待尿量稳定后, 每 20 分钟收集给药前三次、给药后 5 次尿量, 测量比较尿量变化及钠量变化。

结 果 与 讨 论

10 只恒河猴脾、肾组织中部观察到大小不均匀的 ANP 样免疫反应物质, 呈棕色颗粒为阳性反应(图版图 1、2、4、5)。在肾组织切片, 大量的棕色颗粒分布在肾小管, 密集于肾小管上皮细胞核两端的胞质中(图版图 2)。在脾组织切片, 这些棕色颗粒主要分布于脾脏白髓, 围绕在脾淋巴细胞的核周, 几乎充满整个细胞质(图版图 5), 脾肾组织对照片,

注: 本文图片由石怀生同志拍摄, 特此致谢。

没有观察到同样的棕色颗粒,呈阴性反应(图版图3、6)。

猴脾粗提取物经 Sephadex G-15 层析分离,可得到6个峰(见图),用20%磺基水杨酸检查分别收集到3、4、5三个多肽峰冷冻干燥后,经放免测定,取4、5峰,用生理盐水制成0.5 mg/ml(含相当人- α ANP 10 μ g)的蛋白溶液,分别给大鼠颈静脉注射1.5 ml,注射4峰后1分钟即出现明显的降压效果,2只大鼠动脉血压平均降低20 mmHg,延续15—20分钟,5峰则未出现明显的降压效果,但是40分钟左右出现了较强的利尿效应,2只大鼠1小时尿量比注射前平均增加了5倍,钠排出量增加2.3倍,4峰则没有利尿作用。

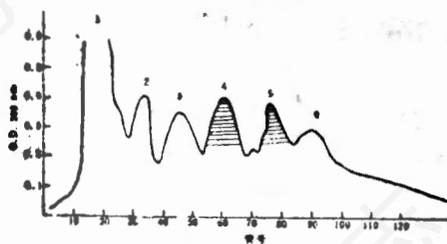


图 猴脾提取物 sephadex G-15 凝胶柱 (2.5 × 50 cm) 层析图谱(斜线部分为 ANP 放免测定活性峰)

上述结果表明,脾脏中存在有降压和利尿的多肽物质,降压作用出现和延续时间与入- α -ANP 的基本一致^[9],而利尿作用的时间比- α -ANP 出现得晚(约30分钟),本实验只是对脾脏降压、利尿物质做了一些探索性工作,对于这些物质的作用与性质有待进一步的深入研究。

目前认为,ANP 从心房中释放出来,通过血循环到达肾,发挥其利尿、利钠作用,然后也在肾中被降解^[7],所以,肾脏是内源性 ANP 的一个主要靶器官,本工作肾切片上的结果进一步证明了这一观点,1989年^[3],Hersey 给大鼠静脉注射 ¹²⁵I-ANP,在脾脏中也检测到 ¹²⁵I-ANP,说明脾脏中存在 ANP 的结合位点,我们的观察结果进一步表明,ANP 的结合位点是在脾脏的白髓部分,从马抗人- α

ANP 抗体反应的结果,可以推测,脾脏中的 ANP 可能与心房 ANP 有同源关系,所以有人提出心房 ANP 有可能参与人体免疫调节^[8]。我们用猴心房提取物经(Sephadex G-15 分离,G-75 纯化得到的降压、利尿、利钠成份)也可使 E 玫瑰花环的结合率比对照提高30%以上。结果提示,在心房中也可能存在一种免疫调节物,它与心房 ANP 和体内免疫功能的关系,还需进一步研究。

现在,许多研究也表明,ANP 是体内分布很广的一种激素,不仅心脏可以分泌,脑、肺等器官也可分泌 ANP^[9,10],从本实验的肾、脾切片(图版图2、5)可以看出,在肾小管上皮细胞和脾白髓的淋巴细胞质中都存在,大量的 ANP 样免疫反应物质,这些物质是否都是来源于心房中的 ANP,还不清楚,目前对于 ANP 在各种组织、脏器中的性质和作用尚不了解,人们对它的研究和认识还处于开始和进一步深入阶段。人体是复杂的,在内、外环境条件改变时,几乎每一种细胞都具有内分泌功能,一种细胞可以产生多种激素,一种激素亦可来源于不同的细胞,随着对 ANP 的深入研究,将推动细胞分泌学的发展,使人们进一步认识细胞的本质。

摘 要

用兔抗人- α -心房利钠多肽(atrial natriuretic peptide, ANP) 血清和 PAP 免疫组织化学方法,观察到恒河猴脾白髓和肾髓质上皮细胞中存在 ANP 样免疫活性物质,其棕色颗粒,主要分布于细胞核周质内。猴脾提取物经 Sephadex G-15 分离,可得到具有降压、利尿、利钠的组分,这些活性多肽的结构和功能需待进一步研究。

图 版 说 明

恒河猴脾肾细胞中的 ANP 样物质

1. 恒河猴肾小管上皮细胞可见到棕色颗粒(↑)

×500

2. 棕色颗粒见于细胞核周(↑)×1200
3. 恒河猴肾小管上皮细胞对照片中无棕色颗粒(↑)×500
4. 恒河猴脾白髓可见到棕色颗粒(↑)×500
5. 棕色颗粒见于白髓细胞核周(↑)×1200
6. 恒河猴脾白髓细胞中对照片无棕色颗粒(↑)×500

参 考 文 献

- [1] Do bold A. J., 1985, *Science*, 230:761
- [2] Crrie M. G. et al., 1984, *Science*, 233:67.
- [3] Hetsey R. M. et al., 1989, *Ceel bioche-*

mistry and function, 7(1):35.

- [4] 戴宗祥等, 1989, *医学生物学研究* 2:29.
- [5] Sternborget L. A., 1979, *Immunocytochemistry*, 2nd ed, John Will and Sone Inc NY. 124.
- [6] J Tang et al., 1986, *Life sci*, 40:2077.
- [7] 汤健等, 1984, *北京医学院学报* 16(3):198.
- [8] Angelika M. et al., 1989. *Life sci*, 45(14):1293.
- [9] Suhn H. K. et al., 1989. *Life sci*, 45(17):1293.
- [10] 汤健等, 1989, 循环系统的内分泌功能, P., 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社.

二乙基亚硝酸胺诱发肝癌的大鼠中维生素K 依赖性羧化酶的研究

包卫国 沈慧芬 李茂深

(上海医科大学基础医学部生物化学教研室 200032)

在凝血酶原等一些依赖于维生素K的蛋白质的生物合成过程中, 维生素K依赖性羧化酶参与其翻译后加工, 催化某些靠近N端的谷氨酸残基转变为 γ -羧基谷氨酸残基(Gla)。这些Gla为凝血酶原等在生理条件下被激活所必需。一旦缺乏维生素K或羧化作用被华法令等拮抗剂所阻断, 未被羧化的异常凝血酶原等将分泌入血。与正常凝血酶原相比较, 异常凝血酶原不能被钡盐所吸附, 也不能通过 Ca^{++} 和磷脂表面结合从而被生理性激活, 而只能通过非生理途径, 如巨齿蛇毒(ECV)的作用, 产生凝血酶^[1,2]。

1984年, Lieberman等^[3]首先在原发性肝癌患者的血浆中发现异常凝血酶原水平显著升高的现象。这为研究人员寻找更好的肝癌标志提供了新的可能性, 因而, 有关肝癌和异常凝血酶原的研究进展倍受学者的注目。

但是, 迄今为止有关肝癌患者血浆中异常凝血酶原升高的机理仍不清楚。这种羧化受阻

的现象究竟是由于肝癌组织中维生素K的缺乏还是由于其它原因造成的, 有关学者颇有争议。为此, 本文以二乙基亚硝酸胺(DENA)诱发肝癌的大鼠为模型, 观察了诱癌过程中肝脏维生素K依赖性羧化酶以及分泌入血的异常凝血酶原的变化。作者特别研究了肝癌组织中维生素K依赖性羧化酶的情况及其产生的原因, 对有关肝癌大鼠血浆中出现高水平异常凝血酶原的机理进行了探讨。

材 料 与 方 法

一、材料

$NaH^{14}CO_3$ (27居里/摩尔), 中国医学科学院放射所。多肽羧化底物 Boc-Glu-Glu-Leu-OMe, 美国 Wisconsin-Madison 大学 J.W. Suttie 教授惠赠。维生素K₁, 无锡制药厂产品。Chromozym P, 东风试剂厂产品。华法令(warfarin), ECV, Sigma 产品。Triton X-100, E. Merck 产品。二巯基赤鲜醇(DTT),

国家自然科学基金资助课题(第386092号),