

图版说明

PE: 色素上皮层, ONL: 外核层, INL: 内核层
IPL: 内网状层, GL: 神经节细胞层。

A. 示幼年猫视网膜无长突细胞中的递质共存。
A₁ 示神经紧张素 (NT) 能细胞, A₂ 示 γ -氨基丁酸 (GABA) 能细胞, A₃ 示甘氨酸 (Gly) 能细胞。特征性标记物: 血管 (◆*◆) 和节细胞 (GC)。双箭头示 Gly/GABA 共存细胞。单箭头示 Gly/GABA/NT 共存细胞。×700

B. 示幼年猫正常位置的多巴胺能无长突细胞。
×750

C. 示幼年猫迁移的多巴胺能无长突细胞。×750

参 考 文 献

- [1] Gosselin, E.J. et al., 1986, *Amer. J. Anat.*, 175: 135—160.
[2] Erlandsen, S. L. et al., 1979, *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1286—1289.

- [3] Rodning, C. B. et al., 1980, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 199—205.
[4] Takamiya, H. et al., 1980, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 1041—1049.
[5] Brecha, N. C. et al., 1985, in *Retinal Transmitters and Modulators: Models for the Brain*, Vol. 1, 93—118, CRC Press, Boca Raton, Fla.
[6] Lillie, R. D. et al., 1972, *Stain Technol.*, 47: 13—16.
[7] Basken, D. G. et al., 1979, *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1290—1292.
[8] Wang, H. H. et al., 1990, *Visual Neurosci.*, 4: 159—175.
[9] Mayor, H. D. et al., 1961, *J. Biophys. Biochem.*, 9: 909—910.
[10] Cardno, S. S. et al., 1965, *Am. J. Clin. Path.*, 43: 1.
[11] Lane, B. P. et al., 1965, *J. Histochem. Cytochem.*, 13: 579—582.

新生牛肝脏再生刺激物质的部分纯化及生物学特性

戴 炜* 雷姚攀 彭志刚 林汝洪 骆抗先

(广州, 第一军医大学南方医院传染科 510515)

细胞增殖与分化机制的研究正日益依赖于各种调节因子的寻找与分析。在众多因子中, 组织和细胞特异的调节因子更引起人们的兴趣。本实验室曾报道肝部分切除后大鼠再生肝中的肝刺激物质 (Hepatic Stimulator Substance, HSS), 可使成年原代大鼠肝细胞 DNA 合成增加^[1]。由于再生肝操作复杂, 来源困难, 实际应用受到限制。本文从新生牛肝胞质液中提取出同样具有刺激肝细胞增生的物质, 对其有效成分进行了部分纯化及理化性质的分析, 并用成年原代大鼠肝细胞和肝源性肿瘤细胞初步测定了其生物学活性。

材 料 与 方 法

一、HSS 的制备

新生牛生后 24 hr 内杀死, 无菌取肝, 剪碎并用生理盐水漂洗, 按图 1 方法制备。

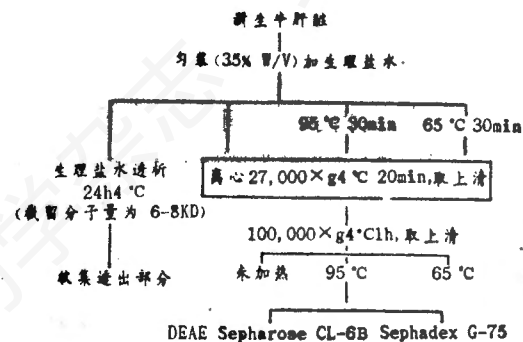


图 1 HSS 的纯化步骤

二、盐析

取 95°C 组样品两份, 分别加等量的生理盐水搅匀, 逐滴加入饱和硫酸铵, 使其终浓度分别达 30% 和 60%, 30 min 后经 $12,000 \times g$ 离心 20 min (4°C), 沉淀物用 PBS (pH 7.4) 溶解, 透析除盐后, 恢复至原样品体积。

* 现在北京佑安医院 100054。

三、液相色谱分离

95℃组经 0.45 μm 的过滤器过滤后, 用于离子交换、凝胶过滤色谱分离。收集各洗脱峰冻干浓缩、除盐后, 恢复至原样品体积, 直接测活性或 -20℃ 贮存。SDS-PAGE 测定分子量。

四、细胞系及原代细胞培养法

FSK-7901 细胞为小鼠肝癌细胞系(第四军医大学提供); BEL-7402 为人肝癌细胞系(军事医学科学院提供)。培养液: RPMI-1640 培养液(含 10% 新生牛血清(NCS)、50 u/ml 庆大霉素及 2 mM L-谷氨酰胺)。成年大鼠肝细胞按 Seglen 报道^[1]的胶原酶循环灌注法分离后进行接种和培养, 4 hr 后换无血清培养液。

五、³H-TdR 掺入及液体闪烁计数

各种细胞悬液均以 5×10^5 /ml 的细胞密度接种于 φ 35 mm 的培养皿中, 每孔 1.2 ml。在换无血清培养液同时, 各加不同处理制备的 HSS 以及不同浓度的 HSS, 37℃、5%CO₂ 培养 22 hr 后, 每孔加 ³H-TdR 5 μCi, 2 hr 后, 加消化液(0.05%胰蛋白酶、0.02% EDTA)0.5 ml/孔, 待细胞全部悬浮时, 收集细胞, 进行 β 计数, 结果以 dpm 值表示。

实验数据以 3 复孔的均数 ± 标准差 (M ± SD) 表示, 显著性分析用 Student's t 检验。

结 果

一、新生牛 HSS 的部分纯化

1. 硫酸铵沉淀 表 1 中 95℃HSS 的活性成分完全不被 30% 的硫酸铵沉淀, 60% 的硫酸铵也只能沉淀很少的活性成分。说明该浓度不宜用于 HSS 的提纯。

表 1 硫酸铵沉淀

| 处 理 | dpm/6 × 10 ⁵ cell(M ± SD) | IS* |
|----------|--------------------------------------|------|
| 空 白 | 3964 ± 600 | |
| 95℃ cHSS | 19920 ± 1190 | 5.03 |
| 30% | 4206 ± 345 | 1.06 |
| 60% | 6206 ± 451 | 1.57 |

* index of stimulation.

2. 离子交换色谱 图 2 为 95℃ HSS 经 DEAE Sepharose CL-6 B 分离色谱图。图中 I-V 为色谱保留时间及样品的峰型, 其中 I(I_a、I_b) 为穿过峰, 在 0.3—0.5 mol/L NaCl 浓度梯

度中洗脱出来的 IV、V 峰为活性峰。该步提纯使蛋白含量较 95℃ HSS 降低了约 21 倍, 而特异活性提高了 4.6 倍(FSK-7901 细胞), 95℃ HSS 是对照组的 7.25 倍。

3. 凝胶过滤色谱 图 3 为 95℃ HSS 经 Sephadex G-75 分离色谱图。分出 4 个主要组分, I、II 为活性峰, 并以 II 峰为高; 每毫升培养液中 130 ng HSS 使 BEL-7402 细胞 DNA 合成增加 6.3 倍。各峰的分子量分别为 I 峰: 59—67 KD、II 峰: 43 KD、III: 35 KD、IV: <18 KD(SDS-PAGE; 银染色)⁽³⁾。

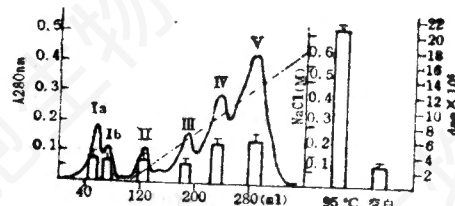


图 2 HSS 经 DEAE Sepharose CL-6 B 分离色谱图

洗脱液: 0.02 mol/L Tris-HCl(pH 8.5)、0.0—0.6 mol/L NaCl 梯度。

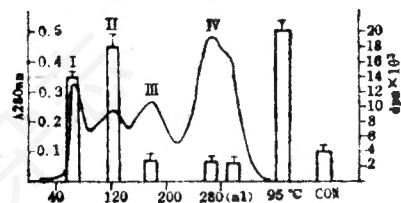


图 3 HSS 经 Sephadex G-75 分离色谱图

洗脱液: 0.02 mol/L PBS(pH 7.4)。

4. HSS 的纯化及刺激反应(表 2)

表 2 HSS 的部分纯化及特异活性

| 步 骤 | 蛋白含量 (mg/ml) | IS | 特异活性 (IS/mg protein) | 纯化倍数 |
|----------|--------------|------|----------------------|------|
| 匀浆 | 50.000 | — | — | — |
| 未加热 | 20.500 | — | — | — |
| 95℃ | 2.000 | 7.25 | 3.63 | 1.0 |
| DEAE | 0.096 | 1.60 | 16.67 | 4.6 |
| Sephadex | 0.065 | 6.30 | 96.92 | 26.7 |

表2中蛋白浓度测定按“体积相当法”，即每提纯步骤完成后将样品恢复至原样品体积。

二、HSS的理化性质

HSS对热是稳定的，未加热处理的肝细胞匀浆提取成分在原代大鼠肝细胞无血清培养中不表现出HSS的活性，而且见细胞浆混浊、细胞脱颗粒，死亡加速，提示该成分中具有细胞毒性或细胞抑制物质(表3)。

表3 HSS的物理性质

| 处 理 | dpm/6 × 10 ⁵ cell(M±SD) | IS |
|-------|------------------------------------|------|
| 空 白 | 3964 ± 600 | |
| 透 析 | 11895 ± 805 | 3.00 |
| 未 加 热 | 2405 ± 150 | 0.61 |
| 65℃ | 13790 ± 113 | 3.48 |
| 95℃ | 19920 ± 1190 | 5.03 |

表4 HSS的化学性质

| 处 理 | dpm/6 × 10 ⁵ cell(M±SD) | IS |
|----------|------------------------------------|------|
| 空 白 | 4664 ± 350 | |
| 95℃ | 16640 ± 892 | 3.57 |
| pH 2.0 | 2592 ± 156 | 0.56 |
| pH 9.4 | 4974 ± 287 | 1.07 |
| 1%β-巯基乙醇 | 29181 ± 792 | 6.26 |
| 0.1%SDS | 4476 ± 192 | 0.96 |

95℃ HSS经0.1mol/L乙酸缓冲液(pH2.0)、0.1mol/L甘氨酸缓冲液(pH 9.4)及0.1%SDS处理后(20 hr, 4℃)，活性完全丧失，而经1%β-巯基乙醇处理后，活性是95℃ HSS的1.75倍($p < 0.05$)。对照组用生理盐水处理同样时间(表4)。

表5中各种酶均购自Sigma公司。各种酶解反应均在最佳反应条件下进行。取95℃ HSS(2.0 mg/ml蛋白质)分别与胰蛋白酶(Trp)、蛋白酶K(PrK)各200 μg/ml 37℃、2 hr; DNase和RNase各100 μg/ml, 37℃、30 min; 然后95℃、15 min以终止酶解反应, 27,000 × g离心20 min, 取上清。实验结果表明, 胰蛋白酶处理后, HSS活性大部分消失, 与95℃对照组比较 $p < 0.001$, 但与空白组比较 $p <$

表5 HSS的酶解反应

| 处 理 | dpm/6 × 10 ⁵ cell(M±SD) | IS |
|----------------|------------------------------------|------|
| 空 白 | 4664 ± 350 | |
| 95℃HSS | 17864 ± 778 | 3.83 |
| 95℃HSS + Trp | 6898 ± 1120 | 1.48 |
| 95℃HSS + PrK | 3836 ± 1241 | 0.82 |
| 95℃HSS + DNase | 23588 ± 2094 | 5.06 |
| 95℃HSS + RNase | 20877 ± 630 | 4.48 |

0.05, 提示经胰蛋白酶处理后的小分子量物质也可能具有一定的活性, 而经蛋白酶K处理后, 活性完全丧失; 核酸酶处理对活性没有影响。

讨 论

重症肝炎发病机理复杂; 病情严重, 病人预后取决于肝细胞坏死程度和残存肝细胞的再生能力。因此, 积极寻求既能阻止肝坏死又能促进肝再生的物质和药物, 是目前临床肝脏病学面临的一大任务。

本实验从新生牛肝胞质液中提取出有效成分, 经加热95℃、30 min、一定的离心及凝胶过滤色谱分离后, 蛋白浓度降低近770倍, 特异活性提高26.7倍(表2)。该步骤对HSS的初步提纯是必要的。

在无血清培养条件下, 95℃HSS(4 μg/ml蛋白质)使原代大鼠肝细胞DNA合成增加5.03倍, 使FSK-7901细胞及BEL-7402细胞DNA合成分别增加7.25和7.23倍。无种属特异性。未经热处理的肝匀浆上清液未能检出HSS活性, 但经加热处理以及用透析法直接从肝细胞匀浆提取小分子物质(<10 KD), 却表现出HSS的活性。认为肝组织中可能存在常见的大分子非特异性细胞生长抑制物(如精氨酸酶等)受到破坏有关。HSS为耐热的蛋白质或多肽物质, 对蛋白酶敏感。而不受核酸酶影响; 主要活性成分的分子量在43—67 KD之间; 在pH 8.5条件下为带高度负电荷物质; 一定的酸碱条件以及一定浓度的变性剂可使HSS的活性受到破坏, 而1%β-巯基乙醇处理后, 活性有

一定的提高,表明 HSS 的活性必须具备一定的三级结构及巯基基团。

La Brecque 等^[4]从断乳鼠肝脏中提取的 HSS, 分子量为 12 KD 和 17.5 KD 的蛋白质, 0.1% SDS 不能使活性改变。谢明等^[5]从新生牛肝脏中提取的 HSS, 其活性成分的分子量为 15 KD。可能动物种类不同, HSS 不完全一样, 即 HSS 具有一定的异质性; 提取和测定方法的不同以及 HSS 可能有复合物形式存在等使 HSS 有许多不同的存在形式。

目前, 国内有报道^[6]直接应用动物肝 HSS 治疗重症肝炎收到一定疗效。新生牛肝来源丰富, 提取方便, 可为 HSS 的进一步研究和应用提供较理想的来源。

摘 要

新生牛肝胞浆液中存在刺激肝细胞 DNA 合成的物质, 经过一定的分离提纯, 可使其杂蛋白含量降低 770 倍, 特异活性提高 26.7 倍。

在无血清培养条件下, 可使成年原代大鼠肝细胞和肝源性肿瘤细胞 DNA 合成分别增加 5 倍及 7.2 倍左右。HSS 为耐热的蛋白质, 一定的酸碱及变性剂可使活性丧失, 主要活性成分的分子量在 43—67 KD 之间, 但小于 10 KD 的物质亦具有一定的活性。该实验结果提示: HSS 很可能是正常肝细胞分裂与再生时共同的调节因子。

参 考 文 献

- [1] 朱常诚等, 1990, 解放军医学杂志, 4: 244—246.
- [2] Seglen, P O., 1972, *Exp. Cell Res.*, 74: 450—454.
- [3] Laemmli, U K., 1973, *J. Mol. Biol.*, 80: 575—599.
- [4] LaBrecque, D R. et al., 1975, *J. Physiol.*, 248: 273—279.
- [5] 谢明等, 1990, 解放军医学杂志, 4: 248—250.
- [6] 张宜俊等, 1990, 临床肝胆病杂志, 6: 210—212.

用器官培养法研究抗连接蛋白单克隆抗体 对鸡胚水晶体发育的影响*

李新人 林文娜 李海缨** 张德宁 秦国强 张非常 夏仲豪

(南京大学生物系和**生物化学系 210008)

我们曾用原位眼内微注射的方法, 证明抗连接蛋白单克隆抗体能影响鸡胚水晶体的发育, 并认为是由于单克隆抗体减少了间隙连接形成的缘故^[1]。这项研究为间隙连接在发育中的重要作用^[2-4]提供了新的证据。但胚胎原位试验不能排除胚胎机体内部其他机制的影响, 有必要用体外培养的方法作进一步验证。为此, 我们利用水晶体器官培养法研究了抗连接蛋白单克隆抗体对鸡胚水晶体发育的影响。

材 料 和 方 法

实验材料为意大利红布罗种鸡胚的水晶体。由南

京尧辰种鸡场提供受精卵。受精卵先在 39℃ 孵育箱中孵育 2 天, 然后在无菌操作箱中敲开蛋壳, 使鸡胚无损地保留在卵黄上并和蛋清一起小心地转移到一种专用的“鸡胚摇篮”中。“鸡胚摇篮”是一种去壳鸡胚培养装置, 由钢架、薄膜及培养皿三部分组成。钢架包括直径为 80 mm 的不锈钢圈和高为 32 mm 的三根不锈钢支脚, 以及一只比钢圈直径稍小的夹持钢片; 薄膜为一般的市售保鲜薄膜, 培养皿稍大于钢架即可。使用时以夹持钢片把薄膜安装到钢圈上并使薄膜中部下垂成囊状, 去壳鸡胚就培养在这种囊状的薄膜摇篮

* 国家自然科学基金和江苏省科委基金资助项目。