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。

中,用培养皿底托住钢架,用培养皿盖罩在钢架上方(图版图1)。每只摇篮只培养一只鸡胚(图版图2)。鸡胚放入摇篮后,移回39℃孵育箱中,再培养2天。待鸡胚发育至20期^[5]时取下眼睛,置生理盐水中剥出晶体。以右眼晶体为实验组,左眼晶体为对照组,分别培养于含有1ml培养液的无菌塑料小指管中。实验组培养液为含有单克隆抗体NC6^[1]的条件培养液(培养杂交瘤细胞的培养液,我们称其为条件培养液);对照组培养液为不含抗体的条件培养液。指管口以无菌棉花塞塞住。仍置39℃孵育箱中培养。分别培养8小时、16小时、20小时及24小时。为了同步停止生长,用Bouin氏液将实验组和对照组标本同时进行固定。然后在解剖镜下测量水晶体的长径和宽径,进行统计学处理。测量后再进行整体立体观察和摄影。

为了排除鸡胚左右眼水晶体本身存在大小差异的可能性,我们进行了两组正常发育的对照实验。第一组是把20期鸡胚的左右眼水晶体分别放入两管1ml同样不含抗体的条件培养液中,39℃培养24小时后,Bouin氏液固定;第二组是选取20期鸡胚,不作任何处理,置摇篮中,39℃培养24小时后,Bouin氏液固定,然后剥出左右眼水晶体。最后都同样进行大小测定及统计学处理。

与此同时,我们还进行了原位眼内注射。当鸡胚在摇篮内发育至20期,向其右眼内注射2 μ l的NC6,左眼不注射作为对照。39℃下分别培养16小时和24小时后,Bouin氏液固定。然后剥出水晶体,同样进行大小测定、统计学处理及整体观察和摄影。

结果和讨论

离体培养实验的水晶体大小测量结果见表1。统计学分析结果指出,NC6对水晶体大小的影响与培养时间正相关:在离体培养8小时或16小时的实验中,实验组水晶体的大小与对照组之间无明显差异(表1, $p > 0.05$);当培养时间延长至20小时,实验组已明显大于对照组(表1, $p < 0.05$);当培养时间增至24小时,这种差异就变得非常显著(表1, $p < 0.001$)。但是,当左右眼水晶体被离体培养于同样的不含抗体的条件培养液中,培养时间虽达24小时,两者之间仍无明显的大小差别;20期鸡胚正常培养24小时后,其原位水晶体大小在左右两侧之间亦无明显差异(表2, $p > 0.05$)。说明鸡胚左右眼水晶体本身不存在

表1 单克隆抗体NC6对离体水晶体生长的影响

培养时间	培养液	n	$\bar{X} \pm SE$	t	p
8	长度 培养液 + NC 6	5	390.0 $\pm$ 28.50	0.0211	>0.05
	单纯培养液	5	412.5 $\pm$ 67.31		
	宽度 培养液 + NC 6	5	372.5 $\pm$ 25.62	0.6404	
	单纯培养液	5	395.0 $\pm$ 74.27		
16	长度 培养液 + NC 6	7	426.8 $\pm$ 47.56	1.8999	>0.05
	单纯培养液	8	360.9 $\pm$ 80.02		
	宽度 培养液 + NC 6	7	398.2 $\pm$ 48.10	1.6420	
	单纯培养液	8	343.8 $\pm$ 75.00		
20	长度 培养液 + NC 6	4	412.5 $\pm$ 32.27	3.1683	<0.05
	单纯培养液	5	345.0 $\pm$ 31.37		
	宽度 培养液 + NC 6	4	403.1 $\pm$ 38.70	3.3365	
	单纯培养液	5	330.0 $\pm$ 27.39		
24	长度 培养液 + NC 6	9	677.6 $\pm$ 49.81	5.5023	<0.001
	单纯培养液	9	529.9 $\pm$ 63.31		
	宽度 培养液 + NC 6	9	647.0 $\pm$ 49.85	5.6167	
	单纯培养液	9	507.6 $\pm$ 55.81		

表2 左右眼水晶体的比较

		n	X±SE (X Sd)	t	p
离体	长度 右侧	4	759.3±114.79	0.1363	>0.05
	长度 左侧	4	771.8±144.00		
	宽度 右侧	4	727.9±117.73	0.3629	>0.05
	宽度 左侧	4	690.3±170.85		
原位	长度 右侧	10	895.0	10.41	0.4804
	长度 左侧	10	890.0		
	宽度 右侧	10	865.0	14.46	0.5188
	宽度 左侧	10	847.5		

表3 单克隆抗体 NC 6 对原位水晶体生长的影响

培养时间			n	X	Sd	t	p
16	长度	注射侧	8	590.6	9.15	2.0491	>0.05
		未注射侧	8	571.3			
	宽度	注射侧	8	57.81	9.07	2.4123	<0.05
		未注射侧	8	556.3			
24	长度	注射侧	9	706.9	5.82	5.3935	<0.001
		未注射侧	9	675.6			
	宽度	注射侧	9	690.3	7.18	3.9451	<0.01
		未注射侧	9	661.9			

大小差异,这就意味着,在上述离体培养实验中,实验组水晶体的增大确是由单克隆抗体 NC 6 所引起。

原位注射实验的结果见表 3。它的统计学结果与离体培养资料(见表 1)相似。当培养时间为 16 小时,原位水晶体的宽径大小在实验组与对照组之间出现明显差异(表 3, $p < 0.05$),但其长径差异仍不明显(表 3, $p > 0.05$);当培养时间达到 24 小时,实验组原位水晶体的长径和宽径均非常明显地大于对照组(表 3, $p < 0.001$ 或 $p < 0.01$)。也就是说,在原位注射实验中,NC 6 对水晶体生长的影响也与培养时间正相关。众所周知,离体培养实验的结果不受胚胎体内其他机制的影响。本文离体培养实验的结果与原位注射实验的结果相一致这一事实表明,胚胎体内的其他机制也没有明显影响原位实验的结果。这可能与水晶体

的结构特点有关。综上所述,本文结果证实了以前原位眼内微注射的结果^[1,6]是可信的。

已知 NC 6 是利用鸡水晶体纤维细胞连接蛋白分子的细胞外侧区片段作抗原制备出来的单克隆抗体^[1],已被认为这类抗体可专一地结连接蛋白分子细胞外侧区的抗原决定簇,因而具有阻断间隙连接形成的作用^[1,7]。曾弥白^[8]早已利用冰冻断裂技术在形态上直接证明了抗连接蛋白抗体能阻断间隙连接的形成。我们最近的电镜观察亦已证明 NC 6 处理可明显减少间隙连接的数量^[9]。所以,无论是以前的原位眼内注射实验^[1,6],还是本文的器官培养及原位注射,它们所揭示的 NC 6 促使水晶体增生的结果均可能与间隙连接形成的被阻断直接相关。Loewenstein^[10]曾指出,连接通道在进行生长控制分子的细胞间转运过程中起作用;连接通道的缺乏或被阻塞将导致细胞生长控制失

调。我们推测,正是由于间隙连接的形成受到抗体 NC 6 的作用而减少,从而使细胞分裂失控,水晶体的增大正是细胞分裂失控的反映。我们过去的原位注射实验结果^[6]可支持这种推测,因为它证明,在 NC 6 作用下,水晶体的增大与纤维细胞数的增多是同时发生的。正因为 NC 6 影响水晶体生长的直接原因可能是由于细胞分裂失控,所以这种影响与培养时间正相关,培养时间越长,影响越明显(见表 1 和表 3)。

整体水晶体的立体观察指出,无论是原位水晶体(图版图 3、4),还是离体培养水晶体(图版图 5—8),其实验组与对照组水晶体都十分相似,说明抗体 NC 6 并不影响水晶体的形态。

摘 要

用器官培养技术研究了抗连接蛋白单克隆抗体 NC 6 对鸡胚水晶体发育的影响,同时进行了原位眼内注射 NC 6 的实验。水晶体大小的统计分析结果指出,离体器官培养结果与原位眼内注射结果完全一致:实验组水晶体均明显地大于对照组;这种差异显著性又与培养时间正相关。但正常水晶体左右侧之间无显著的

(上接12页)

CFU 和 GM-CFU 测定对 SFM-1 和 SCM 进行全面比较后显示, SFM-1 和 SCM 对上述造血祖细胞的生长支持作用没有显著性差异,而且 SFM-1 优于另外 2 种无血清培养基(SFM-2 和 SFM-3)。未发现 SFM-1 对细胞形态、表型和结构有明显影响。

参 考 文 献

- [1] Hayashi, I., et al., 1984, In: Cell culture methods for molecular and cell biology. Ed: Barnes, D. W., et al., volume 2, p. 1-216, Alan R. Liss, Inc., New York.
- [2] 吴祖泽主编, 1988, 造血干细胞移植基础, p. 124-126, 人民卫生出版社。
- [3] 顾涵英等, 1990, 生物化学与生物物理进展, 17(4): 255-259.
- [4] 李黎等, 1990, 国外医学(预防、诊断、治疗用生物制品分册), 13(3): 118-120.

大小差异。这些结果表明, NC 6 确有促使水晶体增大的作用。以前的工作已经证明, NC 6 能阻断间隙连接的形成。因此,作者推测,可能是 NC 6 阻断了水晶体纤维细胞中的间隙连接形成,造成了细胞分裂的失控,从而导致水晶体的增大。本文结果进一步证实了间隙连接在生长控制中起重要作用。

参 考 文 献

- [1] 李新人等, 1988, 实验生物学报, 21(3): 393-399.
- [2] Bennett, MVL., et al., 1981, *Am. Zool.*, 21: 413-427.
- [3] Warner, AE., et al., 1984, *Nature*, 311: 127-131.
- [4] Caveney, S., 1985, *Ann. Rev. Physiol.*, 47: 319-335.
- [5] 蒋晞东, 1983, 鸡胚发育图谱, 科学出版社, 北京, 34-46 页。
- [6] 李新人等, 1989, 自然杂志, 12: 715-716.
- [7] Sas, DF., et al., *Curr. Eye Res.*, 4: 1171-1182.
- [8] Zeng, M.-B. (曾弥白), 1987, *J. Electron Microscopy-Technique*, 7: 85-89.
- [9] 林文娜等, 1990, 显微与亚显微形态科学会第四届第六次学术讨论会文集, 湖南索溪峪, 38 页。
- [10] Loewenstein, WR., 1979, *Biochem. Biophys. Acta*, 560: 1-65.

- [5] 黎旭光等, 1988, 中华微生物学和免疫学杂志, 8(1): 38-41.
- [6] 崔运昌等, 1989, 中华微生物学和免疫学杂志, 9(3): 190.
- [7] 施渭康等, 1987, 细胞生物学杂志, 9(2): 77-79.
- [8] Dai, Y. C., et al., 1987, *Int. J. Cell Cloning.*, 5: 480-491.
- [9] Iscove, N. N., Melchers, F., 1978, *J. Exp. Med.*, 147: 923-933.
- [10] 唐佩弦、扬天檀主编, 1985, 造血细胞培养技术, p. 161-170, 陕西科学技术出版社。
- [11] Hayashi, I, Sato, G. H., 1976, *Nature*, 259: 132-134.
- [12] Konwalinka, G., et al., 1986, *Exp. Hematol.*, 14: 899-903.
- [13] Darfler, F. J., Insel, P. A., 1983, *J. Cell. Physiol.*, 115: 31-36.
- [14] Whisler, R. L., Newhouse, Y. G., 1982, *Cell Immunol.*, 69: 34-45.