

- intracellular signals. Plenum Press New York.
- [14] 王代树等, 1985, 实验生物学报, 18: 171-176.
- [15] 吴曼等, 1976, 中华病理学杂志, 3: 105-112.
- [16] Tannock I. F. 1969, *Cancer Res.*, 29: 1527-1534.
- [17] Staroselsky A. et al., 1986, *Cell Biol.*, 10: 121-129.
- [18] Devirgilus L. C. et al., 1980, *Mal. Biol.*, 26: 533-540.

## 鸡血清极低密度脂蛋白对鸡颗粒细胞孕酮合成的影响

吴翠贞

(南京医学院病理生理教研室)

1981年 Krumins 等<sup>[1]</sup>报道了极低密度脂蛋白(VLDL)与低密度脂蛋白(LDL)与鸡的卵母细胞膜的 VLDL 和 LDL 受体有专一的竞争结合。有人指出<sup>[2,3]</sup>携带胆固醇和其他脂质的 VLDL 能从鸡的血液直接转移到鸡卵母细胞,并通过免疫化学、电泳和氨基酸的分析,证明鸡血清中的 VLDL 和蛋黄中的 VLDL 是相同的。据此,我们用鸡的滤泡颗粒细胞(granulosa cells, G. C.)加鸡血清 VLDL, 37℃, 振荡保温,然后用放射免疫方法测定孕酮量。发现孕酮生成量非常显著地增多。此项研究国内尚未见报道,故将此实验方法和结果报告如下。

### 材料和方法

#### 一、材料

##### 1. 试剂

绵羊促黄体生成素(OLH)与 199 培养液分别由美国 National pituitary agency Grand Island Biological 公司提供。胶原酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、肝素和牛血清白蛋白(BSA)从 Sigma 公司购买。测定孕酮药箱是 F. Hertelendy 实验室制备。

##### 2. 实验动物

采用 Leghorn 母鸡(8—12个月),在产卵前 1—3 小时,用颈椎脱臼法杀死,剖腹,取卵巢上最大滤泡,立即放入 4℃, 0.01 mol/L, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中备用。

#### 二、方法

##### 1. 制备鸡的最大滤泡颗粒细胞

基本采用 Hammond 等<sup>[4]</sup>方法,将滤泡作一长 1.5 厘米的切口,在 80—90% 蛋黄流出后,取出滤泡膜和颗粒层,用上述磷酸盐缓冲液洗 3 次,去掉滤泡膜,小心分离颗粒层,并将其移到 199 培养液中(pH 7.4, 内含 10 mmol/L HEPES, 0.1% BSA)。用此培养液洗 3 次后,加 2 ml 内含胶原酶 2.7 mg 和少量大豆胰蛋白酶抑制剂的培养液,放入 37℃ 水浴中振荡 7 分钟,则颗粒层分散为 G. C.。此细胞再用 199 培养液洗 3 次,用台盼蓝检测细胞存活率,一般都在 90% 以上。将前述细胞密度稀释至  $10^5$  细胞/ml, 放冰浴中备用。

2. 鸡血清脂蛋白分离按照序列超速离心法<sup>[5]</sup>进行。

3. G. C. 保温参照 Sgarlata 等方法进行<sup>[6]</sup>, G. C. ( $10^5$ /ml)加 VLDL(最终浓度 400 μg/ml), 37℃, 水浴振荡 1 小时,再加不同量的 OLH(浓度范围 1—50 ng/ml), 37℃, 水浴振荡 3 小时,取出立即放入冰浴中,终止反应。离心 1000 g, 10 分钟(4℃),取上清用放射免疫方法测定生成的孕酮量。此为 VLDL 组。

4. 方法同上,但 G. C. 培养液只加 OLH 而不加 VLDL。此为 OLH 组。

5. 方法仍同上,但培养液中不加 VLDL 和 OLH, 作为对照组。

本工作在美国圣路易斯大学医学院 F. Hertelendy 实验室进行,工作中得到 Hertelendy 教授的指导和帮助,特此致谢。

表 VLDL组、OLH组和对照组孕酮检测结果\*

OLH(ng/ml)	0	1	2.5	25	50
对照组	5.90±0.53				
OLH组		6.34±0.11	11.4±0.8	31.59±2.85	90.57±4.05
VLDL组	11.38±1.51	13.49±0.32	23.78±0.37	155±9.24	165.15±6.56
检测次数	6	6	6	6	6
(n)					
t	4.91	21.06	15.86	7.86	21.56
p	<0.01	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

\*  $\bar{x} \pm SE$  ng/ $1 \times 10^5$  细胞

## 结果和讨论

从表可知, OLH能促进鸡的G·C·合成孕酮, 而且随着OLH量的增高而递增, 尤其OLH在2.5 ng/ml到25 ng/ml之间更为明显。VLDL组亦然, 并比OLH组更为明显; 两组各浓度之间均有非常显著的差异( $p < 0.001$ )。VLDL组即使未加OLH, 与对照组之间也有显著差异( $p < 0.01$ )。这可能是G·C·在没有OLH作用下, 也能利用VLDL携带胆固醇合成孕酮。

已知OLH能促进鸡的G·C·孕酮的合成, 这是由于OLH刺激了G·C·, 使得孕酮生成增多。鸡血清VLDL促进鸡的孕酮合成, 可能是由于G·C·膜上VLDL受体与VLDL相结合, G·C·利用VLDL所携带的胆固醇合成孕酮, 以致使孕酮生成量增加。

从图可见, 用3次实验结果合并计算VLDL组和OLH组孕酮生成量( $\bar{X}$ )相当于对照组孕酮生成量( $\bar{X}$ )的百分数, 不论OLH量多少, VLDL组相当于对照组的百分数, 均高于OLH组。这说明本文实验方法是稳定、可靠的, 并进一步证明VLDL对鸡的G·C·孕酮的生成有影响。

另外, 我们分别用母鸡血清LDL和公鸡血清高密度脂蛋白(HDL)(最终浓度400 $\mu$ g/ml)加入G·C·悬液中( $1 \times 10^5$  细胞/ml), 37 $^{\circ}$ C, 水浴振荡1小时, 再加OLH(浓度范围1—50 ng/ml), 于37 $^{\circ}$ C水浴振荡3小时。然后用上述方法测定孕酮含量。发现LDL组和HDL组孕

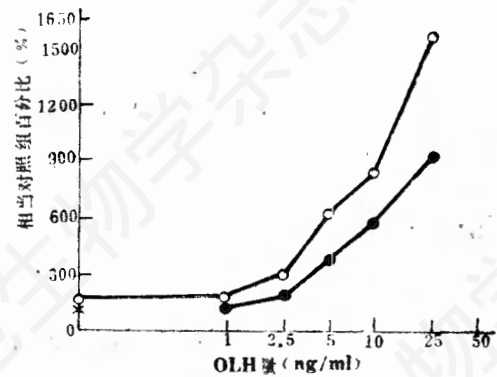


图 VLDL组和OLH组孕酮生成量

○ VLDL组  
● OLH组  
× 对照组

酮生成量均不同程度地高于OLH组的生成量。Khan等<sup>[7]</sup>报道, 妊娠大鼠黄体细胞能利用HDL所携带的胆固醇合成孕酮, 使孕酮生成量增加。因此, 我们推想鸡的G·C·上的LDL和HDL受体与鸡血清LDL和HDL结合并利用了两者所携带的胆固醇合成孕酮, 从而使孕酮量增多。

## 摘要

用鸡的颗粒细胞(granulosa cell, G·C·)进行极低密度脂蛋白(VLDL)对于孕酮合成的研究。按序列超速离心法分离鸡血清脂蛋白。用放射免疫法测定孕酮的量。实验分组: G·C·加绵羊促黄体生成素(OLH), 其浓度范围为1—50 ng/ml, 此为OLH组; G·C·加VLDL(最终浓度400 $\mu$ g/ml)再加OLH, 此为VLDL组; G·C·未加VLDL和OLH则为对照组。

实验结果：(1) OLH 组能促进  $G^{14}C$  孕酮的合成而且孕酮的生成量随着 OLH 量的增加而增加。(2) VLDL 组孕酮生成量较 OLH 组显著增高，两者之间有显著性差异 ( $p < 0.001$ )。(3) 用 3 次实验结果合并计算 VLDL 组和 OLH 组的平均数相当于对照组平均数的百分数，发现 VLDL 组明显高于 OLH 组。

实验结果说明 VLDL 是携带胆固醇的脂蛋白，从而在 OLH 作用下，使颗粒细胞合成孕酮的量增多。

#### 参 考 文 献

[1] Krumins, S. A. et al., 1981, *Biochem.*

*J.*, 196: 481-488.

[2] Schjeide, O. A., 1954, *J. Biol. chem.*, 211: 355-362.

[3] Hillyard, L. A. et al., 1972, *Biochem.*, 11: 511-518.

[4] Hammond, R. W. et al., 1980, *General and Comparative Endocrinology*, 41: 467-476.

[5] 蔡海江等., 1983, 南京医学院学报, 3: 42.

[6] Sgarlata, C. S. et al., 1984, *Endocrinology* 114: 2032-2037.

[7] Khan, I. et al., 1985, *Biol. Reprod.*, 32: 96-104.

### 实验技术

## 应用中空纤维生物反应系统中试 生产人体肝癌单克隆抗体

朱德厚 孙雯钧 李云宝 姚曾序 叶 锋\* 周一雯\* 黄 皖\*

(中国科学院上海细胞生物研究所)

近年来，应用杂交瘤技术研制和生产各种有社会效益和经济效益的单克隆抗体(单抗)已有许多报道，其中不少产品已作为检测试剂或药剂等出售<sup>[1]</sup>。在细胞工程这个新兴领域中，这方面工作的前景是不可限量的。单抗一定规模的生产，首先决定于相应的杂交瘤细胞的大量繁殖，而在后者不仅要满足其高密度生长所需的条件，并且还必须在培养系统中具备能维持细胞长时间健康生存，并持续分泌目标产物的微环境。为了适应大量细胞工程产品的发展需要，新一代的高密度繁殖细胞的系统已陆续问世，如中空纤维系统(Hollow Fiber System)，巨载体-生物反应罐(Macrocarrier + Bioreactor System)等。本文报道应用中空纤维系统 ACUSYST-Jr<sup>TM</sup> 生产人体肝癌单抗的一些结果。

### 材 料 和 方 法

1. 细胞大量繁殖系统 采用美国 Endotronics 公司设计和生产的中空纤维生物反应系统 ACUSYST-Jr<sup>TM</sup> 型，适合中试生产工程细胞的分泌产物。在调试运转正常后，将已通过培养瓶试验所确定的各参数的设定点(set point)即参数数值范围，包括温度、pH 值、溶氧量(DO)、葡萄糖和乳酸浓度，以及每小时培养液和血清的输入量、产物收集量等依次输入微机系统，在自动运转中起监控作用。

2. 杂交瘤株和细胞的大量繁殖条件 分泌人体肝癌单抗(IgG<sub>1</sub>)的小鼠杂交瘤株 Hepama-1 是本所肝癌单抗研究组在 1985 年建立的，其培养条件见谢弘

此项工作得到国家七五科技规划资金和中国科学院七五重大科技项目合同资金资助。

戴信兰、王亚先、刘敏英等同志参加技术工作。

\* 工作单位：中科院上海生物工程实验基地。