

- [21] Kiichi Miyashita and Takeo KaKunaga,  
1975, *Cell* 5: 131--135.  
[22] Naka, P. M., 1975, *Brit. J. Cancer* 31:

338—347.

- [23] Naka, P. M., 1982, *Cancer Biol. Rev.* 3:  
63—95.

## 血纤维蛋白溶酶原激活剂的研究进展

陈振国\*

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

血纤维蛋白溶酶原激活剂(Plasminogen Activator, 简称 PA)由于与许多基本的细胞生理现象有关,如细胞分裂、细胞伸展、肿瘤浸润和转移灶的生长等,因而引起了人们的注意。近年来对它的研究日益增多和深入。本文就有关 PA 的一些性质、检测方法以及在细胞生理及病理过程中某些有关功能作一简述。

### 一、PA 的性质

PA 是一种广泛存在于动物组织和体液里的丝氨酸蛋白酶,因分子量和亚单位不同而有不同的种类。早先按其来源分为外源性及内源性二类<sup>[1]</sup>。存在于血液、体液、尿、组织及分泌物中的称为内源性 PA,而外源性 PA 主要是指一些细菌产物,如链激酶(Streptokinase)。随着研究的深入,现在又通常把 PA 分为四类:循环 PA(血液),组织 PA,尿 PA(尿激酶)和培养细胞 PA。目前尚不知这些 PA 分子是否属于不同基因的产物<sup>[2]</sup>。

最为大家所知的 PA 功能,是把没有活性的血纤维蛋白溶酶原催化为有活性的血纤维蛋白溶酶(Plasmin)。完成这个反应是通过水解酶原分子中的第 560—561 位置上精氨酸—缬氨酸肽键。血纤维蛋白溶酶有广泛的底物专一性,可破坏各种蛋白中的赖氨酸—赖氨酸键<sup>[3]</sup>。血纤维蛋白是 PA 最重要的间接的天然底物之一,因此在临床上循环 PA 的主要作用是溶解血栓。

1966 年 White 等从人尿中提纯了尿激酶,

这是迄今内源性 PA 中唯一获得纯品的物质,分子量为 53,000,电泳位置在  $\beta$  球蛋白区。通过 SDS 凝胶电泳分析,尿激酶至少是由二个亚单位组成的。

癌细胞中的 PA 又分为尿激酶型和非尿激酶型,这个区分是以对尿激酶抗体的不同反应为基础的。大多数肿瘤合成的是尿激酶型,例如在人肺肿瘤中 90% 以上 PA 是尿激酶型,而在正常肺组织中还不到 50%。与此类似,在人乳腺癌中约 80% 属尿激酶型,而正常乳腺组织仅占 62%。卵巢癌和胰腺癌也主要产生尿激酶型,而脑瘤却合成非尿激酶型。为什么尿型 PA 在肿瘤中占比例高而相应正常组织却比例较低的原因还不清楚,但把肿瘤 PA 区分为这两类仍过于简单。有人发现培养的 MCF-7 乳腺癌细胞分泌 6 种分子量从 25,000 到 65,000 不同的 PA,但其中仅一种分子量为 59,000 的有与尿激酶相同的抗原性<sup>[4]</sup>。还有报道肺癌细胞株培养液中含有一种分子量为  $1-2 \times 10^6$  道尔顿的尿激酶型 PA,但这种高分子量的酶却不能象尿激酶那样被 SDS 或 8 M 尿素解离成亚单位,表明尚不能用简单的免疫反应来定性<sup>[5]</sup>。

### 二、PA 的检测方法

PA 的检测通常是用以纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白作底物的间接方法。在这类测定中,PA 把纤维蛋白溶酶原转变为纤维蛋白溶酶,后者再把血纤维蛋白降解。其中最灵敏的是用<sup>125</sup>I

\* 现在地址:上海市胸科医院胸部肿瘤研究室。

标记纤维蛋白原,经凝血酶作用转变为纤维蛋白,经干燥后, $^{125}\text{I}$ 纤维蛋白便紧贴于培养皿上作为底物。在不同时间收集由溶酶降解的可溶性 $^{125}\text{I}$ 纤维蛋白产物,测定它们的放射性。因此在含有PA、溶酶原和溶酶的反应混合物中能定量测出PA的活力<sup>[6]</sup>。另外,纤维蛋白-琼脂测定法也较常用。将来自血清的血纤维蛋白溶酶原,纤维蛋白原、凝血酶混合在薄层琼脂中,由于血纤维蛋白是不溶性的,凝胶的透明度又不高,当琼脂层下面的受测细胞分泌PA至琼脂中时,会在其周围形成一个由纤维蛋白溶酶介导的中心透明区域,表明血纤维蛋白已被降解成可溶性多肽。以测量透明区域的直径来判断PA活性的强弱。这一方法既可用于测定单个培养细胞的PA活力<sup>[7,8]</sup>,又可用于活组织切片的测定。同样,由于PA在经SDS电泳后仍能保持其活力,所以利用纤维蛋白-琼脂测定法还可以分析PA在聚丙烯酰胺凝胶带上的位置。聚丙烯酰胺凝胶先用非离子去垢剂平衡后再放在纤维蛋白-琼脂凝胶上,PA从聚丙烯酰胺凝胶扩散到琼脂里,因而在PA带下面形成一个血纤维蛋白溶解的透明区带<sup>[9]</sup>。

PA也能用直接法测定。通常是把合成的多肽例如甘氨酸精氨酸(glycylarginine)连接到显色或荧光分子上作为底物。由于完整的和裂解的底物具有不同的吸收光谱,因而可以从测定裂解底物的吸收峰而取得酶活力的定量数据<sup>[10]</sup>。最近,Obrénovitch等<sup>[11]</sup>利用荧光底物CBZ-Gly-pro-Arg-AEC建立了一种敏感的荧光光度法,把从多肽衍生物中释放的游离AEC(3-氨基-9-乙基咪唑)抽提到乙酸乙酯中,然后用荧光分光光度计检测。该方法既能测定细胞裂解产物中的PA,又能测定活细胞释放至培液里的PA活力。

### 三、PA的生理功能

#### 1. PA参与细胞的正常迁移和浸润活动

PA是把酶原转变为活化形式的一种酶。循环PA的一种天然底物就是血纤维蛋白溶酶原。因此对富于血液供应和具有复杂管道的器

官能维持其通畅也是与蛋白酶降解了纤维蛋白和其他易凝结蛋白这一特点有关。血纤维蛋白溶酶不仅能水解各种蛋白底物还能激活补体第三成分,后者又引起血管通透性的增加和多形核白细胞及单核细胞的迁移。这些连锁反应在炎症和伤口修复过程都是至关重要的。

多年来已经知道细胞浸润与蛋白酶(尤其是PA、胶原酶和组织蛋白酶)的产生之间存在着一定的关系。肿瘤细胞能分泌(或者诱导分泌)这些蛋白酶来降解阻止其通过的屏障(如胶原、蛋白多糖、弹性蛋白和其他糖蛋白等),从而发生浸润。许多资料表明,不单是肿瘤细胞的浸润常伴有PA的产生,在正常细胞的浸润活动如激活的巨噬细胞和滋养细胞的浸润中也有PA产生。某些组织(例如动脉和软骨)因富含蛋白酶抑制剂而能抵御肿瘤细胞的侵犯,使PA与细胞浸润的关系得到进一步的证实。有关PA在细胞浸润中的作用可详见Mullins和Rohrlich的综述<sup>[12]</sup>。

#### 2. PA在组织器官中的分布和其它生理功能

与血液中的情况不同,PA在组织或体液中含量很少。血浆中PA含量可达0.1毫克/毫升,但孕猪卵巢虽含有比迄今研究的任何种类器官都高的组织PA,其最大值只为30—50毫克/公斤组织。培养的人胚肾细胞和SV<sub>40</sub>病毒转化的田鼠胚胎细胞在合适的培养条件下每 $10^8$ 个细胞只能产生毫克量的PA。由于天然来源的PA量少,给分离提纯带来困难,也不易搞清各类PA的来源和PA分子本身的结构和功能。尿激酶虽已被纯化,但其全部功能尚未清楚。

已经发现尿PA除了与细胞浸润活动有关外,还与激素前体的转化、巨噬细胞的迁移、哺乳动物的排卵、早期胚胎发育时胚泡着床、乳腺退化和新生物形成等多种生物学过程有关。

### 四、PA与细胞病理过程

#### 1. PA和细胞转化

许多转化的鸟类和哺乳类细胞株都能产生

PA。Unkeless等<sup>[6]</sup>发现培养的鸡胚纤维母细胞不具有依赖酶原的纤维蛋白水解活力,但在用野生型 Rous 肉瘤病毒(RSV)或用温度敏感病毒突变株在转化温度感染后可看到明显的纤维蛋白溶解活力。相反,用温度敏感 RSV 突变株或其他 RNA 或 DNA 肿瘤病毒温度敏感株在非转化温度感染细胞,却不能看到纤维蛋白的溶解活力。因此,PA 活力的增高明显地是与转化有关而不是与病毒感染或细胞溶解有关。Pollack 等 1975 年发现几个不同的 SV<sub>40</sub> 病毒转化的大鼠胚胎纤维母细胞克隆株生长在甲基纤维素上的能力与 PA 密切相关。Ossowski 等<sup>[13]</sup>研究了几株正常的和转化的哺乳类细胞株的迁移性,发现转化细胞的迁移是对血纤维蛋白溶酶原有依赖性的。

除了与转化细胞的运动有关外,PA 还能影响某些转化表型,特别是影响细胞骨架系统。Pollack 和 Rifkin<sup>[14]</sup>证明血纤维蛋白溶酶能破坏大鼠胚胎细胞的肌动蛋白丝,但这种作用是可逆的,当去除蛋白酶和加入血清后,肌动蛋白丝又会重新形成。此外,还发现产生大量 PA 的、由 SV<sub>40</sub> 病毒转化的大鼠胚胎细胞克隆株所含的肌动蛋白丝排列不整齐,而产生 PA 少的转化细胞却显示较整齐的排列。如果把后者培养在含有狗或猴的血清(内源性蛋白酶抑制物的含量比其它血清要少得多)的培液中会引起肌动蛋白丝的消失。上述实验提供了令人信服的证据,即 PA 直接或间接地参与了某些转化表型的表达。

## 2. PA 与肿瘤原性和肿瘤浸润转移的关系

PA 与肿瘤原性的关系早已为人们所注意。Christman 及其同工作者<sup>[15]</sup>把小鼠 B<sub>1</sub> 黑色素瘤的 B<sub>6</sub>59 克隆株细胞注射到宿主动物的适当部位能引起肿瘤,而如果在培液中加入 5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)培养 2 天,则细胞不仅形态发生了改变而且失去引起肿瘤的能力。Christman 指出 BrdU 未处理的 B<sub>6</sub>59 细胞在培养中产生高水平的 PA,但用 BrdU 处理后,PA

活力伴随着肿瘤原性一起消失。因此,在这些瘤细胞中 PA 的产生显然与肿瘤原性有关。1973 年 Peterson 等已发现在人乳癌中 PA 的高水平与局部浸润和转移有关。Nagy 等人<sup>[16]</sup>测定了原代培养的宫颈癌、乳癌和正常宫颈细胞的 PA 活力,发现肿瘤细胞的 PA 水平很高而正常细胞却相当低。他们在分析宫颈癌、前列腺癌、卵巢癌以及肺癌、黑色素瘤的匀浆也得到类似结果。但正常肺组织却显示相当高的活力,这个发现也被其他研究者所证实。Tucker 等<sup>[17]</sup>从几株不同类型的脑瘤细胞株以及一株脑转移的黑色瘤和一株卵巢癌中测得高 PA 活力而正常脑组织中却未测到。卵巢癌 PA 属于尿激酶型,而脑瘤 PA 显然是组织型的,因为它与尿激酶抗体无交叉反应。Markus 等<sup>[18]</sup>比较了 37 例肺肿瘤与 33 例正常肺组织样品以及 25 例前列腺癌与 29 例良性前列腺肥大组织样品的 PA,发现肺肿瘤的平均 PA 含量是正常肺组织的 2.5 倍,前列腺癌的平均 PA 含量是肥大前列腺的 1.7 倍。在类似的研究中,他们还比较了 23 例人结肠癌与同一个体邻近正常组织的 PA 平均含量,发现肿瘤是正常组织的 4.4 倍。

虽然许多病理类型的恶性肿瘤都含有高于相应良性肿瘤和正常组织的 PA,然而这并不是绝对的。小鼠胚胎性癌细胞(EC)是恶性畸胎瘤的一种未分化和多能的干细胞,但与一般的肿瘤不同,PA 活力很低或检测不到。已有报道,当其在体外分化时(例如通过某些药物的诱导),PA 的分泌增加<sup>[19-21]</sup>。近来 Ogiso 等<sup>[22]</sup>用维生素 A 酸(RA)诱导一株多能 EC 株 311 分化时,发现除了 F9 抗原和 PNA 受体变化外,分泌 PA 的克隆数在诱导后四天比二天时高约 11 倍。所以,PA 也可以作为研究体外畸胎瘤细胞分化的一种表型标志。

## 3. PA 测定的临床意义

根据近年来人乳癌 PA 与雌二醇受体间关系的研究,PA 有可能成为乳癌或其它与雌激素相关癌的功能性雌二醇受体的一个标志,增

加了人们对乳癌恶性程度的检测能力。这将比孕酮受体的检测更为方便。Yang等(1983)年利用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析乳癌抽提物PA,根据患者的同工酶谱的不同而分为四组类型,发现这四组患者经手术二年后的复发率分别为0、8.9、36.5和49%,表明要取得有意义的结果必须进一步把PA分型。尿PA也可作为子宫内新生物出现的一个标志,与其它恶性表型指标结合使用,可用于鉴别诊断。从癌患者血中检测PA的报道较少。最近,Colombi等(1983)年用等电点聚焦证明了尿PA在乳癌病人血中比正常人要低或甚至没有,表明将PA用于血清学诊断还要做更深入的工作,近年来血浆尿激酶放射免疫测定的发展将会促进这方面的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 陈文杰、陆道培。1978。血液学进展。科学出版社。P 138。
- [2] Duffy. M. J. and O'Grady. P., 1984, *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 20(5): 577—582.
- [3] Christmen J. K. et al., 1977, In Barrett A. ed. *Protinases in Mammalian Cell and Tissues*. Amsterdam, Elsevier. p 827—839.
- [4] Shyamala, S. et al., 1982, *Biochem Biophys Res Commun* 105: 1597—1603.
- [5] Harvey, S. et al., 1982, *J. Biol Chem* 257: 5645—5651.
- [6] Unkeless, J. C et al., 1973, *J. Exp. Med.* 137: 85—111.
- [7] Goldberg, A. R., 1974, *Cell* 2:95—102.
- [8] Jones, P et al., 1975, *Cell* 5:323—329.
- [9] Granelli-Piperuo, A and Reich. E., 1978, *J. Exp. Med.* 148:223—234.
- [10] Bigbee, W. L et al., 1978, *Anal. Biochem.* 88:114—122.
- [11] Obrenovitch, A et al., 1983, *FEBS Letters* 157(2):265—270.
- [12] Mullins, D. E and Rohrlich, S. T., 1983, *Biochim. Biophys. Acta* 695:177—214.
- [13] Ossowski et al., 1973, *J. Exp. Med.* 138: 1056—1064.
- [14] Pollack, R and Rifkin, D., 1975, *Cell* 6: 495—506.
- [15] Christman, J. K. et al., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72:47—50.
- [16] Nagy. B. et al., 1977, *Int. J. Cancer* 19: 614—620.
- [17] Tucker, W. S et al., 1978, *Cancer Res.* 38: 297—302.
- [18] Markus, G et al., 1980, *Cancer Res.* 40: 841—848.
- [19] Nishimune, Y et al., 1983, *Exp. Cell. Res.* 146:439.
- [20] Oshima, R., 1978, *Differentiation* 11:149—155.
- [21] Strickland, S and Mahdavi, V., 1978, *Cell* 15: 393.
- [22] Ogiso, Y et al., 1982, *Exp. Cell. Res.* 137: 365—372.

## 关于哺乳动物的卵子透明带\*

屈建平

(上海第一医学院妇产科研究所)

透明带是哺乳动物卵子外周的一层特殊结构。1870年Waldeyer最早曾作过有关的描述<sup>[1]</sup>,他认为所有哺乳类动物卵子外周都包有透明带。但当时由于技术方面的限制,有关此方面的研究进展不大。1948年Harter<sup>[2]</sup>用特异的PAS方法显示了透明带主要由蛋白和多糖构成。六十年代随着电镜及化学酶法分离技术

的发展,从组织化学角度对透明带的特征及其功能进行了深入细致的研究,并发现透明带在精卵结合的种属特异性、阻止多精入卵和受精卵运行的保护等方面具有极其重要的生理意义。七十年代以来,许多学者<sup>[3,4,5]</sup>在动物实验

\* 本文承上海第一医学院妇产科研究所李超荆副教授审校。