

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。

中发现卵子透明带具有抗原性,用透明带免疫同种或异种动物可产生抗透明带抗体,在体内可产生抗生育作用,在体外可抑制精卵的结合。这为人类应用免疫避孕提供了一条有希望的途径。为此,国外学者对透明带的研究极为重视,并取得了一定的进展。

### 一、透明带的表面结构

八十年代初,用扫描电镜观察田鼠卵透明带结构时发现<sup>[6]</sup>,它由内外二层组成,其特点是:(1)外表面多层次,呈窗格状(图1)。内表面有分布不规则的颗粒(图2)。(2)用荧光标记的凝集素与透明带结合后不均匀地分布在

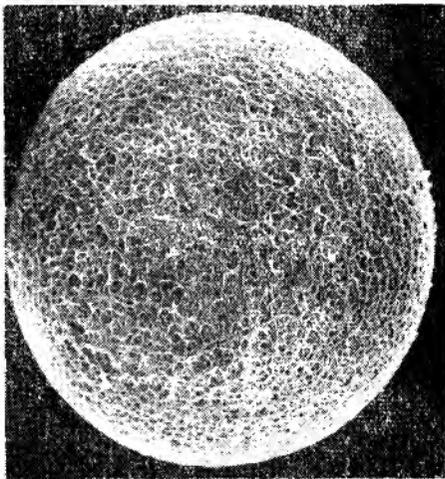


图1 田鼠透明带外表面多层次,呈窗格状×1500

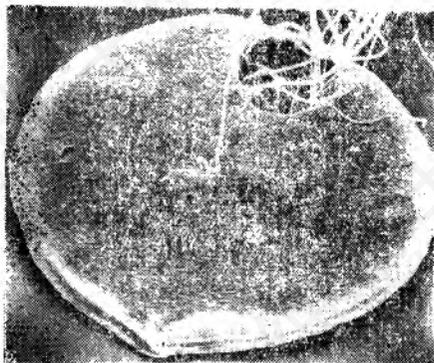


图2 受精后将卵子从透明带中剥出,然后将透明带内表面外翻,可见精子尾部从外翻透明带的孔中突出<sup>[6]</sup>×1800

透明带表面<sup>[7]</sup>,呈不对称型分布。这表明碳水化合物有些局限在内表面,有些局限在外表面。

由于透明带内外表面结构的不均一性引起了对精子亲和力的差异性。Philips等<sup>[6]</sup>取同种体外获能精液观察透明带的功能时发现:许多精子与透明带外表面接触,但很少与内表面接触甚至不接触。如果所用的精液中约有40%的精子已经发生了顶体反应,另有40%的精子具有完整顶体,结果粘附于透明带的是具有完整或部分完整顶体的精子,而发生了顶体反应的精子都未与透明带接触。这表明顶体反应需在精子与卵子透明带接触后才会发生在透明带表面发生。

### 二、透明带的组成和生化特征

#### 1. 化学组成

目前认为,透明带由内外二层构成,外层为中性或弱酸性粘多糖蛋白,内层主要为强酸性粘多糖蛋白。糖和蛋白的比例在不同种属动物之间差异很大,如猪的糖和蛋白比例为19%和71%<sup>[8]</sup>;小鼠为70%和30%<sup>[9]</sup>。应用蛋白酶、变性剂等的可以证实透明带内含有蛋白。通过组织化学染色、外源性凝集素结合以及放射标记糖的测定等方法可以证实透明带内含有各种碳水化合物<sup>[9]</sup>。

以猪卵透明带为例,它有四条多肽链以二硫键的形式连接成单个蛋白结构,多个蛋白结构以非共价键形式连接成超分子的复合物,这就构成了蛋白质的四级空间结构。这表明二硫键在维持透明带的结构完整性中起着十分重要的作用。

#### 2. 分子结构

目前对许多动物透明带的分子结构尚不清楚,但对小鼠、猪和牛的透明带分子量以及组成等已有报道。

在成熟小鼠的卵子中<sup>[10]</sup>,每个透明带含有蛋白约4.8 ng,占透明带重量的80%以上,用重氮化<sup>[100I]</sup>碘酸盐标记的蛋白中可见三种被标记的糖蛋白,即ZP<sub>1</sub>、ZP<sub>2</sub>和ZP<sub>3</sub>,其分子量

分别为 200,000、120,000 和 83,000 道尔顿, 分别占透明带总蛋白的 36%、47% 和 17%。

猪卵透明带在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现三条蛋白带<sup>[11]</sup>, 估计分子量分别为 82,000~118,000、58,000~96,000 和 40,000~74,000, 占透明带总蛋白的比例为 50.3%、23.7% 和 6%。

组成猪卵透明带蛋白的氨基酸有 18 种(表 1)<sup>[8]</sup>。其中极性氨基酸与非极性氨基酸的比例是 1:1。

表 1 透明带中蛋白质的氨基酸组成成分(猪)

氨基酸	M (mol)%	M/10 <sup>5</sup> 蛋白质
Ala 丙氨酸	6.0	48
Arg 精氨酸	4.8	39
Asp 天冬氨酸	8.5	68
Cys 半胱氨酸	3.2	26
Clu 谷氨酸	9.5	76
Gly 甘氨酸	7.7	61
His 组氨酸	3.6	29
Ile 异亮氨酸	3.1	25
Leu 亮氨酸	9.1	73
Lys 赖氨酸	3.9	31
Met 甲硫氨酸	1.4	12
Phe 苯丙氨酸	3.2	26
Pro 脯氨酸	7.9	63
Ser 丝氨酸	7.4	59
Thr 苏氨酸	9.3	74
Trp 色氨酸	1.7	13
Tyr 酪氨酸	1.8	14
Val 缬氨酸	7.8	63

透明带的碳水化合物比较复杂, 各种动物的差异性很大。在水解猪卵透明带的碳水化合物时发现<sup>[8]</sup>, 典型的单糖成分有岩藻糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、乙酰葡萄糖胺、乙酰半乳糖胺以及唾液酸七种, 其中乙酰葡萄糖胺及半乳糖含量较大, 约占全部单糖量的三分之二, 这些成分以糖苷键、硫酸酯和磷酸酯等形式存在。

透明带中糖和蛋白占 90~93%<sup>[8]</sup>, 其它成分主要为脂肪酸, 它们以游离酸和酯类二种形式存在。

### 3. 等电点<sup>[12]</sup>

透明带的等电点较低, 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离得到的小鼠透明带的三种成分中, ZP<sub>2</sub> 等电点为 4.7, ZP<sub>3</sub> 为 3.7, 但对 ZP<sub>1</sub> 却未见有关报道。

### 4. 温度对透明带溶解度的影响<sup>[13]</sup>

不同种类卵子透明带的溶解温度不同, 受精与未受精卵透明带的溶解温度也略有不同。如小鼠卵子透明带的溶解温度为 70°C~72°C, 但受精后为 68°C~70°C。

### 5. pH 与透明带溶解度的关系<sup>[14]</sup>

透明带糖蛋白在酸性介质中较易溶解, 在 pH 2.0~4.5 的溶液中可以完全溶解; pH 6.0~9.0 时部分溶解; pH 10.0~11.0 则不受影响。Gwatkin 在实验中发现, 不同动物透明带溶解的 pH 不同, 大鼠为 4.5~5.0, 小鼠为 4.1, 家兔为 3.0。

### 6. 对酶的反应<sup>[14]</sup>

蛋白溶解酶具有明显溶解透明带的作用, 它可直接破坏形成蛋白质一级结构的肽键。如胰酶及  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶可使田鼠、小鼠、兔、猪和牛等动物的透明带溶解。

### 7. 对变性剂的反应<sup>[9,15]</sup>

加热煮沸、强酸强碱或有机溶剂等处理均可破坏透明带的结构使之变性。如巯基乙醇、尿素可直接破坏蛋白质非共价的三级结构。过碘酸盐可分裂  $\alpha$ -乙二醇的 C-C 键, 通过改变透明带碳水化合物的成分而影响透明带结构。

### 8. 对外源性凝集素的反应<sup>[7,16]</sup>

外源性凝集素能与卵子透明带表面的凝集素受体结合, 用荧光标记可发现不同的凝集素能与不同的糖基发生特异性结合。例如: BCA 能特异地与  $\beta$ -半乳糖结合, WGA 能与  $\beta$ -1,4 葡萄糖酰胺结合, 这种特异性结合可以因加入适当的单糖而受到抑制。Dunbar<sup>[8]</sup> 用荧光标记的七种凝集素对猪和牛透明带反应, 结果发现四种凝集素与二种透明带结合, 分布方式见表 2。

近年来为了对透明带进行更深入细致的研

表 2 植物凝集素与透明带反应(猪、牛)

凝集素	特异性	结合	集中部位
ConA 刀豆球蛋白	$\alpha$ -甘露糖 > $\alpha$ -葡萄糖 > $\alpha$ -葡萄糖酰胺	+	一致
SBA 大豆凝集素	$\alpha$ -半乳糖酰胺 > $\beta$ -半乳糖酰胺 > $\alpha$ -葡萄糖	+	内区
BCA 蓖麻凝集素	$\beta$ -葡萄糖	+	外区
WGA 麦芽凝集素	[B-(1,4)-葡萄糖酰胺] <sub>2</sub>	+	内区
PNA 花生凝集素	半乳糖- $\beta$ -(1,3)-半乳糖酰胺 > 半乳糖 酰胺 = $\alpha$ -半乳糖		
DBA 扁豆凝集素	$\alpha$ -半乳糖酰胺		
UEA 荆豆凝集素	$\alpha$ -L-岩藻糖		

究,应用层析法、免疫电泳法<sup>[17]</sup>和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法<sup>[18]</sup>进行猪卵透明带成分的分。这为今后在分子水平阐明猪卵透明带抗原决定簇的分子结构以及人工合成透明带的有效成分提供了有利条件。

### 三、透明带的生理特征

Shivers 等提出透明带具有以下生理功能<sup>[19]</sup>:

#### 1. 机械性保护作用

保护或缓冲各种外环境因素对卵子的影响。

#### 2. 通透作用

透明带表面有许多小孔,这使透明带具有半透膜的性质,对于某些物质有着选择性的通透作用。例如:兔和大鼠卵子透明带对于分子量小于 1,200 的物质可以任意通过,但分子量 16,000 的肝素却不能通过。

#### 3. 参与阻止多精入卵

Aitken 等在田鼠、大鼠等动物实验中证实<sup>[20]</sup>,当精子穿透透明带后,精子头部后顶体膜与卵子卵黄膜之间发生融合,皮质颗粒即释放入卵周间隙,颗粒内容物蛋白酶等物质的释放引起了透明带反应,使透明带结构发生改变,精子无法识别透明带表面的精子受体,进而阻止了其它精子穿入卵子。

#### 4. 与精子特异性结合

Aitken 认为<sup>[20]</sup>,在受精开始阶段,精子必须首先识别卵子透明带表面的精子受体,然后才能实现精卵结合,这种特异性识别是同种精

卵结合与受精的关键。

(1) 精子受体 细胞的识别是生物体的重要活动之一。细胞糖蛋白中的糖萼是细胞识别机能的主要结构基础<sup>[21]</sup>,细胞的相互辨认就是由于识别糖萼中的不同分子结构的结果。精子受体就是这种识别糖蛋白中的一种。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离得到的小鼠透明带三种蛋白成分在体外作精子竞争性测定时发现,ZP<sub>3</sub>具有精子受体活性,此部位对蛋白酶非常敏感,二者一旦接触,精子受体活性就完全丧失。加热可使蛋白变性,因而可破坏受体活性。Bleil<sup>[12]</sup>提纯了小鼠受精后的 ZP<sub>3</sub>,发现受体活性消失,这可能由于顶体反应后透明带结构的改变引起了精子受体部位空间构型的变化所致。

(2) 精卵识别机理 目前认为,精卵的识别是精子同卵子表面碳水化合物特异性作用的结果<sup>[22]</sup>。精子头部表面和卵子透明带表面均具有糖基,两者糖基的互补和匹配构成了同种精卵特异性结合的分子基础,如同酶和底物的构型匹配才能发生酶促化学反应一样。生化测定表明<sup>[21]</sup>:透明带表面富有乙酰葡萄糖胺、半乳糖和唾液酸,精子表面具有唾液酸,当同种精卵相遇时,精子表面的唾液酸转移酶可将精子表面的唾液酸转移到卵子透明带表面的乙酰葡萄糖胺上,改变了透明带表面的末端糖基,这样精卵彼此即能识别,进而发生结合和受精。Ahuga<sup>[22]</sup>发现,应用几种与精子表面结构有关的单糖和寡糖,在高浓度情况下体外可竞争性抑制精卵结合。这些糖类有半乳糖、岩藻糖、N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰半乳糖胺等。他还

发现,由岩藻糖连接的岩藻多糖可使精子与透明带结合完全受抑制,但由岩藻糖连接的其它几种多糖则无明显抑制作用。结果提示竞争性抑制并不依赖一个或多个糖基,而取决于糖基之间的相互连接,这表明透明带表面的糖基连接对于精卵识别起着重要作用。

### 5. 透明带的免疫原性

1972年 Shivers<sup>[3]</sup>发现卵子透明带具有较强的抗原性,用田鼠透明带免疫家兔后可产生抗透明带抗体,并在体外阻止了田鼠的精卵结合与受精。Gwatkin<sup>[4]</sup>用分离的田鼠卵透明带主动免疫小鼠,使小鼠持续不孕约12周,其它学者在兔<sup>[23]</sup>、狗<sup>[5]</sup>、松猴<sup>[24]</sup>等多种动物实验中也证实了上述作用。

Yanagimachi 报道<sup>[25]</sup>,透明带具有较强的组织特异性,用透明带免疫后产生的抗体与机体其它组织无交叉免疫性,这提示用透明带作为抗原而产生的抗体对机体其它组织无明显不良影响。

近年来不少动物实验表明:不同种类的透明带具有种间交叉免疫反应。例如:小鼠、大鼠和田鼠<sup>[26]</sup>;兔、牛和猴<sup>[23]</sup>;人、猪和松猴<sup>[27]</sup>之间均有交叉反应。Shivers<sup>[28,29]</sup>等发现临床上有些不孕妇女的血清中可以查到抗透明带自身抗体,用这种抗血清处理猪卵后,在猪卵透明带表面有一明显的免疫沉淀环形成,免疫荧光测定呈强阳性,这表明人类抗透明带抗体可能具有抗生育作用,人与猪卵透明带之间具有种间交叉免疫反应,用猪卵透明带作为人类的免疫避孕疫苗是有希望的。近年来用猪卵透明带免疫动物后开展杂交瘤技术已成为一新的研究课题<sup>[30]</sup>,这为将来生物提取高纯度抗原,进而作避孕疫苗打下分子生物学基础。

总之,目前对于卵子透明带的表面结构、生化特征及其生理功能等各方面的研究均取得了较大进展,应用透明带作为抗原用于免疫避孕的前景是广阔的,但是直接应用透明带作为避孕疫苗还存在下列问题:(1)免疫佐剂。透明带抗原需借助佐剂才能诱发机体产生免疫反

应,但是目前应用的矿物油、乳化剂等混合物佐剂局部反应和毒性反应较大,限制了其直接在人类的应用。(2)安全性。抗透明带抗体是否具有毒性及副作用尚需进一步研究,尤其是对于引起自身免疫性疾病的可能性还需作进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] O'Donoghue, C.H. et al., 1912, *Anato. Anzei.* 41:364.
- [2] Harter, B.T. 1948, *Anat. Recor.* 102:349.
- [3] Shivers, C.A. and Fussell, EN. 1972, *Science* 178:1211.
- [4] Gwatkin, R.B.L. et al., 1977, *Fert. Steri.* 28: 871.
- [5] Mahi-Brown, A. et al., 1982, *J. Exp. Zool.* 222:89.
- [6] Philips, D.M. and Shalgi, RM., 1980, *J. Exp. Zool.* 213:1.
- [7] Yanagimachi, R. and Nicolson, GL., 1976, *Exp. Cell Res.* 100:249.
- [8] Dunbar, B.S. et al., 1980, *Biochemistry* 19: 356.
- [9] Menico, A.R. and Wright, RW., 1979, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 160:449.
- [10] Bleil, J.D. and Wassarman, PM., 1980, *Develop. Biol.* 76:185.
- [11] Sacco, A.G. et al., 1981, *Biol. Reprod.* 25: 997.
- [12] Bleil, J.D. et al., 1981, *Develop. Biol.* 86: 189.
- [13] Stewart, J.C. and Massaro, E.J., 1972, *Biol. Reprod.* 7:166.
- [14] Gwatkin, R.B.L., 1964, *J. Reprod. Fert.* 7: 99.
- [15] Inoue, M. and Wolf, DP., 1974, *Biol. Reprod.* 11:558.
- [16] Longo, F.J., 1981, *Biol. Reprod.* 25:399.
- [17] Sacco, A.G. et al., 1983, *J. Reprod. Fert.* 68:21.
- [18] Nada, Y. et al., 1983, *J. Reprod. Immunol.* 5:161.
- [19] Shivers, C.A. and Philip, MS., 1980, In: *Immunological Aspects of Infertility and Fertility Regulation.* P. 173.
- [20] Aitken, R.J. and Richardson, DW., 1980, In: *Immunological Aspects of Reproduction and Fertility Control.* P. 173.
- [21] 王一飞主编. 1982 医学细胞生物学, P. 7~18. 上海第二医学院出版.
- [22] Ahuga, KK., 1981, In, *Human Reproduc-*

- tion. P. 154.
- [23] Gwatkin, R.B.L. and Williams, D.T., 1978, *Gamete Res.* 1:19.
- [24] Sacco, A.G. et al., 1981, *Biol. Reprod.* 25: 997.
- [25] Yanagimachi, R. et al., 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 2405.
- [26] Tsunoda, Y. and Chang, M.C., 1976, *Biol. Reprod.* 14:354.
- [27] Sacco, A.G. et al., 1983, *Fert. Steri.* 39:35.
- [28] Shivers, C.A. et al., 1980, *Selected Papers on Planned Parenthood* 21:283.
- [29] Trounson, A.O. et al., 1980, *Arch. Androl.* 4:29.
- [30] Isojima, S. et al., 1984, *J. Reprod. Immunol.* 6:77.

## 巴豆油对单纯疱疹病毒 诱发小鼠宫颈和/或阴道癌的促进作用\*

满廷高 陈敏海

(湖北医学院病毒研究所细胞生物室, 武汉)

自1966年以来, 许多研究表明, 阴部单纯疱疹Ⅱ型病毒(HSV-2)感染与宫颈和阴道癌的发生密切相关。这些研究包括: 细胞病理学观察<sup>[1~2]</sup>; 血清流行病学调查<sup>[3~4]</sup>; HSV-2感染对体内及体外细胞的转化<sup>[5~10]</sup>; 转化细胞和宫颈癌细胞内 HSV-2 痕迹的检测等<sup>[11~12]</sup>。

为了进一步研究 HSV-2 感染与宫颈和阴道癌发生的关系及进行实验性治疗和预防, 多年来, 有关工作者一直希望能建立一个完善的、由 HSV-2 诱发的宫颈癌动物模型。

本实验的目的旨在确定: 1. 已知促癌剂巴豆油对 HSV-2 的诱癌潜能是否有促进作用, 借以探讨病毒诱癌过程是否也符合“两阶段学说”的规律; 2. 能否借促癌剂的作用提高肿瘤的诱发率, 以建立更为完善的动物模型; 3. HSV-1 与 HSV-2 在诱发小鼠宫颈和阴道癌的作用上是否存在型的区别。

### 材料和方法

#### 1. 病毒

HSV-2(333株), 由美国宾夕法尼亚大学 F. Rapp 教授赠给; HSV-1(SM 44株), 由本所病毒室提供。

实验前, 经溴乙烷脱氧尿核苷(BVDU)敏感实验

及细胞选择实验证实, 病毒的株型及生物学活性均无改变。

将病毒接种于原代培养的兔肾单层细胞中, 待75%以上的细胞出现细胞病变时, 冻融3次, 低速离心(1500转/分)15分钟, 取部分上清液测病毒效价, 其余分装于经高压消毒的小瓶中, -20℃保存。接种动物前将效价为 $10^5$ TCID<sub>50</sub>/毫升的病毒悬液倒入小平皿中, 紫外灯下照射(46尔格/平方毫米/秒)6分钟, 经照射后的病毒悬液按常规方法接种于兔肾单层细胞后, 72小时内不出现细胞病变。

#### 2. 正常细胞悬液

除培养细胞不接种病毒外, 余同病毒悬液的制备。

#### 3. 巴豆油

由本院化学教研室按 Van Duuren<sup>[13]</sup>介绍的方法, 从巴豆种仁中提取并鉴定, 化学纯, 密封避光保存。用前加橄榄油(化学纯)配成2%的溶液。

#### 4. 棉球

医用脱脂药棉捻成绿豆大小的棉球, 高压消毒, 密封保存备用。

#### 5. 动物分组及处理

自本院动物室取得两月龄、昆明种、雌性处女小白鼠330只, 随机分为A~F6个组, A~D组各60只, E与F组各45只, 分组置铁笼中饲养。实验期180

\* 中国科学院科学基金资助的课题。