

[6] Schneiderman, M. H. et al., 1972, *Exp. Cell Res.* 74:430—433.

[7] Leeper, D. B. et al., 1972, *Radiat. Res.* 50: 401—404.

## 大鼠卵巢颗粒细胞纤溶酶原激活因子的测定\*

张仕明 许河生

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

人们从多种途径来研究排卵过程中滤泡壁的变化。多年来,随着研究方法的发展,认识不断深入,并提出了许多假设和理论。早在1916年, Schochet(1916)用试管内渗透的方法提出了蛋白水解酶能降解滤泡壁的假设;此后, Espey 等人用空斑法试验了包括酶与非酶类的多种物质,证明蛋白水解酶能溶解滤泡壁的结缔组织,减弱了滤泡壁强度(Espey 1970)。他们又将浓缩的牛胰蛋白酶直接注射到兔子的滤泡内,看到这一做法能造成滤泡壁与排卵时相同的变化(Espey, 1974, Rondell, 1974)。Unkless(1973)建立了蛋白水解酶的同位素测定法,借此, Beers 等人进一步证明在滤泡液中含有纤溶酶原(plasminogen, 简称Pg)及纤溶酶原激活因子(plasminogen Activator, 简称PA)。同时发现, PA在动情周期的不同时期有量的变化,与排卵活动紧密相关,在排卵前的瞬间出现高峰。由于PA的催化, Pg转变为纤溶酶(plasmin, 简称P), P能引起滤泡壁结缔组织纤维的降解以致破裂(Beers et al., 1975)。这些工作既说明PA是对排卵活动产生重要作用的一个激活酶,其量的变化是研究排卵机制的有意义的指标;同时也表明蛋白水解酶同位素测定法在此项研究中的实用意义。本文旨在介绍该方法及其测定排卵前滤泡颗粒细胞在体外培养条件下所产生的PA值,作为研究排卵机制的基本手段。

### 材 料 和 方 法

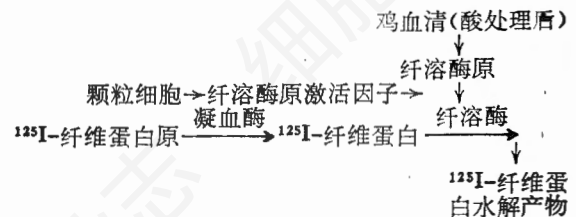
#### 一、材料

纤维蛋白原, 凝血酶, 两者均系Sigma公司产

品。McCoy's 5A 培液, 购自GIBCO实验室。孕马血清(PMSG), 长春生物制品厂出品, 1000国际单位/支。人绒毛膜促性腺激素(HCG), 购自上海生化制药厂, 1000国际单位/支。十六孔板购自天津有机玻璃厂, 孔径16毫米。雌、Wistar大鼠, 年龄26天。

#### 二、方法

方法的原理 在十六孔板的小孔中铺上<sup>125</sup>I-纤维蛋白原(<sup>125</sup>I-Fg), 用凝血酶使<sup>125</sup>I-Fg转化为纤维蛋白<sup>125</sup>I-F。然后把卵巢中成熟滤泡的颗粒细胞接种于铺有<sup>125</sup>I-F的小孔中, 用无血清培液培养, 并补充鸡血清, 作为Pg的来源。颗粒细胞产生PA, 使Pg转化为P, P水解<sup>125</sup>I-F, <sup>125</sup>I-F水解后释放出同位素, 测定培液中的放射性即能间接反应PA的值。方法的原理用图解式表示:



具体操作按下列程序进行:

1. 纯化纤维蛋白原 参考并改良了 Sidney Strickland('76)的方法, 主要目的是去除其中可能存在的Pg。将Fg溶解于0.3 M NaCl, 并对0.3 M NaCl液透析平衡。10000转离心10分钟, 取上清液使蛋白浓度为10毫克/毫升, 加入0.1 M 赖氨酸液, 使赖氨酸的最终浓度为0.09 M, 0℃放置半小时后, 加入冷的95%酒精, 使酒精的最终浓度为7%, 4℃以下放置30分钟, 离心10000转×10分钟。取沉淀溶于pH 7.0

\* 本工作得到世界卫生组织(W. H. O.)小额资助, 特此致谢。

Acknowledgment-We are grateful to W.H.O. for the support of the small Supplies Programme,

的磷酸缓冲液( $\text{NaCl}/\text{PO}_4$ :每升中含 8000 毫克  $\text{NaCl}$ , 200 毫克  $\text{KCl}$ , 1150 毫克  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 及 200 毫克  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )中, 再对 pH 7.0 的  $\text{NaCl}/\text{PO}_4$  透析, 离心, 得上清液, 冰冻干燥保存。

2.  $^{125}\text{I}$  标记纤维蛋白原 用氯胺 T 标记法(Harder 1960)。纯化的 Fg 溶于  $\text{NaCl}/\text{PO}_4$  中, 配成 2 毫克/毫升, 取 0.5 毫升置于标记管内, 加入 50 微升  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (1 毫居里), 混匀, 再吸 0.1 毫升的氯胺 T 溶液 (100 r) 快速喷入, 混匀, 反应 5 分钟, 再用 0.1 毫升 (200 r) 偏重亚硫酸钠溶液终止反应。用 Sephadex G 25 柱子分离游离碘。用  $\text{NaCl}/\text{PO}_4$  将未标记的 Fg 配成蛋白含量为 0.2 毫克/毫升, 并加入标记的 Fg 原液, 使溶液最终含 400000 cpm/毫升, 该溶液为标记工作液。

3. 铺底 取标记 Fg 工作液 0.2 毫升加入到 16 孔板的每个小孔中, 将板轻轻晃动, 使孔内液体均匀铺平,  $37^\circ\text{C}$  24 小时, 烘干。然后保存于室温。使用前在每个小孔中加入 0.3 毫升凝血酶 (0.3 单位), 配在  $\text{NaCl}/\text{PO}_4$  中,  $37^\circ\text{C}$  作用 8—10 小时, 使  $^{125}\text{I}$ -Fg 转化为  $^{125}\text{I}$ -F。转化后吸出 0.2 毫升液体, 用于测定, 其余液体弃去, 再用 Hank's 洗三次, 待用。

4. 酸处理鸡血清 鸡血清在本实验中主要是提供 Fg, 经过酸处理可以去掉血液内对蛋白酶有抑制作用的一些因子(Unkeless J. C. et al, 1974)。取新鲜鸡血, 分离出血清, 用 1N HCl 将血清的 pH 调至 3.2, 冰箱放置 2 小时, 10000 转离心 20 分钟, 再用 1N NaOH 将 pH 调回 7.0, 冰箱放置 30 分钟, 再离心, 取上清液。将酸处理过的鸡血清配入 McCOY's 5 A 培养液, 无菌过滤,  $4^\circ\text{C}$  保存, 待用。

5. 制备卵巢颗粒细胞 出生 26 天的雌性大白鼠, 皮下注射 PMSG 10 个国际单位, 48 小时后, 同样途径注射 HCG 25 国际单位, 8—10 小时后杀死动物, 无菌条件下取出双侧卵巢, 并置于 McCOY's 5 A 培养液中, 剥去卵巢外膜及卵巢的脂肪组织, 洗涤三次, 用 4 号针头刺破滤泡, 轻轻地使滤泡的颗粒细胞挤压入 McCOY's 5 A 培养液中, 用培养液洗三次, 离心收集, 而后进行细胞计数, 再用 McCOY's 5 A 培养液将细胞配成所需要的浓度。

6. 纤溶活性的同位素测定 将颗粒细胞按实验要求加入各个涂有  $^{125}\text{I}$ -F 的小孔中, 补充 McCOY's 5 A 培养液至 1 毫升, 在  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  条件下培养。4 小时后细胞已贴壁, 移去原有培养液, 然后加入配有酸处理过的鸡血清的 McCOY's 5 A 培养液 1 毫升, 含鸡血

清的比例因实验要求而定。此后, 继续在  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  条件下培养。从换上新培养液时起算, 在不同时间收集各孔内的培养液, 测定溶液中所释放的同位素。

## 结果和讨论

### (一) 颗粒细胞产生的纤溶活性与时间的关系

将 1 毫升  $2 \times 10^5$  的大鼠卵巢颗粒细胞种入直径为 16 毫米的已涂有  $^{125}\text{I}$ -F 的塑料小孔中。细胞贴壁后, 移去旧培养液, 换成条件培养液 (含 10% 鸡血清的 McCOY's 5 A 培养液)。自改成条件培养液后起, 分别在第 1、2、3、4 及此后每隔 3 个小时取培养液, 测定溶液中纤维蛋白降解产物的放射性, 借以了解颗粒细胞产生 PA 的量与反应时间的关系。图 1 表示,  $^{125}\text{I}$ -F 在培养液中的降解度和反应时间成正比。纤溶活性似乎从细胞贴壁后不久就开始了, 从 1—19 小时所测得的培养液中的同位素释放值表明, 此间的纤溶活性几乎呈线性关系递增, 以后曲线出现平台状态。即使将取样时间延至 37 小时, 活性也不再上升。该结果提示, 颗粒细胞产生的 PA 量, 在培养液中引起的纤溶活性有明显的时间依赖关系。

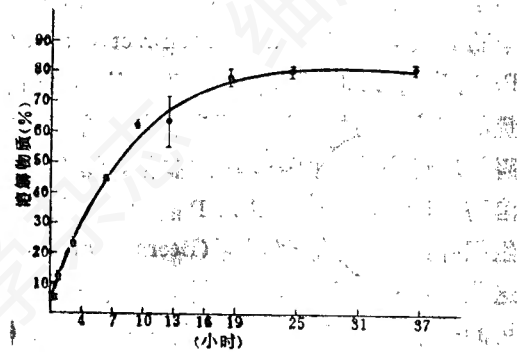


图 1 纤溶活性的时间反应曲线

### (二) 培养液中的血清含量对纤溶活性的影响

将  $2 \times 10^5$  细胞种入各个已涂有  $^{125}\text{I}$ -F 的小孔中, 细胞贴壁后, 弃去旧培养液, 吸入 1 毫升 McCOY's 5 A 培养液, 培养液中含有不同比例的经酸处理的鸡血清(Unkeless, J. C. et al. 1974), 经 6 小时及 24 小时后取样 8 次。见图示。结果

显示,随着培液中鸡血清含量的增高,纤溶活性的水平上升。当培液中的鸡血清含量达8%时,纤溶活性达最高水平;此后,即使培液中的鸡血清含量再增高,纤溶活性水平也并不上升,相反地,表现出规律性的下降。这一现象说明,培液中的鸡血清,作为纤溶酶原的来源,是颗粒细胞的PA引起纤溶活性的必要条件之一,因此,培液中的鸡血清含量越高,为细胞的纤溶作用提供的纤溶酶原就越丰富,产生的纤溶水平就越高。可能在我们所处理的鸡血清中还留有一些蛋白水解酶的抑制物,因此,高浓度的血清对纤溶活性有抑制作用。图2中的两条曲线是在不同时间取样测定的结果。24小时取样的结果显示,各点的纤溶水平明显高于6小时的取样;然而,两条曲线的图形相似。这除了说明纤溶活性的时间效应外,还显示鸡血清的含量在一定浓度(10%)以下时,纤溶活性水平随着鸡血清含量的增高而上升;同时,当血清含量高于10%时,这两个不同时间组的纤溶活性皆表现出一致性的下降。

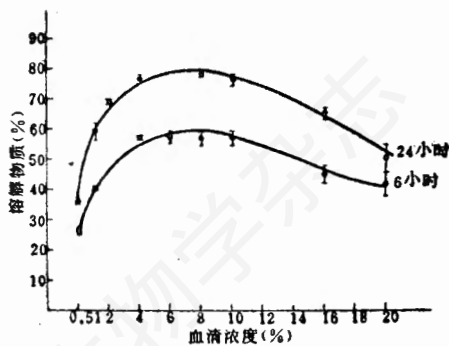


图2 不同鸡血清浓度对纤溶活性的影响

### (三) 细胞数量与纤溶活性的关系

根据实验的要求,在铺有 $^{125}\text{I}$ -纤维蛋白的小井中接种不同数量的细胞,细胞数自 $5 \times 10^4$ 开始,以 $5 \times 10^4$ 的等差级数递增,最大值为 $45 \times 10^4$ 细胞。细胞贴壁后弃旧培液,再加入1毫升10%鸡血清的McCOY's 5A培液,37°C,5%CO<sub>2</sub>的条件下培养。换培液后的6及24小时取培液测定(图3)。6小时组显示,随着细胞数的递增,纤溶活性水平呈线性递增地上升;

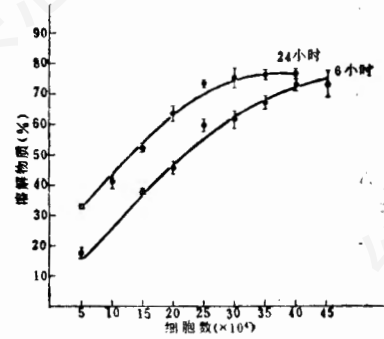


图3 不同细胞数对纤溶活性的影响

当细胞达 $40 \times 10^4$ 时,纤溶活性不再上升。另一条24小时的反应曲线也呈类似现象,但纤溶水平比6小时的为高,当 $30 \times 10^4$ 细胞时,表现出最高的纤溶水平,而6小时的达到与此相当的纤溶水平则需要 $40 \times 10^4$ 细胞。

从上述结果来看,培液中放射性物质的释放与反应时间、培液中的血清含量及细胞数量的变化诸因素紧密相关。已知,随着反应时间的延长,纤溶活性的水平上升,但是,从反应曲线(图1)来看,从0小时起到36小时止,并非都是测定纤溶活性的最适时间。把细胞数限定为 $20 \times 10^4$ ,在10%鸡血清的条件下培养,纤溶活性的最高水平出现在18小时左右,此后,再延长反应时间,并不出现更高水平的纤溶活性。假如此时增加细胞数量,纤溶水平会因此而相应提高,但是只能是有限的提高。当细胞数达 $30 \times 10^4$ 时,反应就达饱和,不再上升。显然,纤溶活性的变化同时受时间和细胞数这两个变量的影响,测定纤溶活性的最适点,就时间和细胞量这两项来讲,似乎 $20 \times 10^4$ 细胞在16小时时的反应比较灵敏。

在纤溶作用所涉及的许多条件中,由于培养液中的血清是纤溶酶原的来源,因而它的含量是又一个重要因素(Unkeless 1973, Ossowski 1973)。从上述实验可见,随着鸡血清比例的增高,纤溶水平明显升高,表现出纤溶活性对纤溶酶原的依赖性。但是当血清浓度高达10%时,反应曲线下降。这个现象可能是由于血清中除了纤溶酶原外还存在着蛋白酶的抑制物,

后者虽经酸处理后仍有少量存在(Unkeless 1974), 其量随着血清浓度的升高而增加, 到达10%以上的血清浓度时, 就表现出有明显的抑制作用, 因此, 测定纤溶活性时鸡血清的浓度不宜高于10%。

总之, 用上述方法可测得体外培养条件下排卵前的颗粒细胞所产生的PA, 通过PA活性的变化可以了解许多因素对滤泡生长、发育的影响及颗粒细胞对外源激素的反应, 是研究排卵机制的有效手段; 假如扩展该方法的应用范围, 我们期望它可能为临床提供一条掌握排卵规律的途径。

### 参 考 文 献

- [1] Schochet, S.S., 1916, *Anat. Rec.* 10:447—457.
- [2] Espey, L. L., 1970, *Am. J. Physiol.* 219: 230—233.
- [3] Espey, L. L., 1974, *Biol. Reprod.* 10:216—235.
- [4] Rondell, P., 1974, *Boil. Reprod.* 10:199—215.
- [5] Unkeless, J. C., Tobia, A., Ossowski, L., Quigley, J. P. et al., 1973, *J. Exp. Med.* 137:85—111.
- [6] Beers, W. H., Sidney Strickland, and E. Reich, 1975, *Cell* 6:387—394.
- [7] Beers, W. H., 1975, *Cell* 6:379—386.
- [8] Strickland, S., William H. Beers, 1976, *J. Biological Chem.* 251:5694—5702.
- [9] Harder, F. H., C. F. Makhann, 1968, *J. Nat. Can. Inst.* 40:231—241.
- [10] Unkeless, J. C., Saimon Gorden, 1974, *J. Exp. Medicine.* 139:834—850.
- [11] Ossowski, L., J. C. Unkeless, A. Tobia, J. P. Quigley, D. B. Rifkin, and E. Reich, 1973, *J. Exp. Medicine* 137:112—126.
- [12] Lawrence, Theodores 1979, *J. Cell Biol.* 80: 21—36.

## 黄鳝活体内制备 SCD 法和 SCE 频率的测定

虞世嘉

(江西医学院)

藏澧芬

(江西省水产局)

哺乳类活体内制备姊妹染色单体分化染色(Sister Chromatid Differentiation, SCD)法国内外已有不少的报道<sup>[1-6]</sup>, 至于鱼类, 曾有学者报道采用肾细胞培养制备SCD<sup>[7]</sup>。本实验对黄鳝活体内制备SCD法进行了探索, 并对其姊妹染色单体交换(Sister Chromatid Exchange, SCE)频率作了测定。

### 材 料 和 方 法

黄鳝购自市场, 体重30克左右。参照Kanda<sup>[5]</sup>所报道的方法配制活性炭吸附的IUdR溶液, 浓度为100毫克IUdR/40毫克活性炭/毫升。IUdR注射剂量分别为0.3、0.6、1.0、1.5、2.0毫克/克体重。体腔内一次注射, 注射后54小时处死黄鳝。处死前4

小时先体腔注射, 剂量为10微克/克体重的PHA(广州医工所产), 后体腔注射剂量为6微克/克体重的秋水仙素来提高中期分裂相。取材时固着黄鳝, 放血, 打开体腔剪取一块肾组织, 用生理盐水洗去血污, 用细胞匀浆器研碎。静置3—5分钟, 让未被分散的细胞团块自然沉降, 然后吸取上层细胞悬浮液。离心, 弃去上清液, 此后低渗、固定、滴片等操作程序按常规法进行。

染色体标本按李康等<sup>[7]</sup>所报道的方法处理。为了测定显示SCD所需IUdR的适宜剂量, 本实验统计了SCD显现率, 即每种剂量从不同照射的时间中选择出SCD最清晰的标本, 在镜下随机观察50个中期分裂相, 从中统计出显示SCD细胞(部分染色体显示色差的也计算入内)所占的百分数。

选择SCD清晰的染色体计算SCE频率, 每尾检