

前列腺是雄激素的靶器官,但是,雄激素的分泌和作用尚受到其他一些激素的调控,雌激素是一重要因素。在一定条件下,雌激素能增强垂体细胞对LH-RH的敏感性,以致使雄激素分泌增加^[11]。催乳素则能增加雄激素靶细胞中雄激素受体的含量^[12],有利于雄激素效应的发挥,而雌激素又是催乳素释放的促进剂^[13]。近年来,前列腺中雌激素受体的发现证明雌激素尚能直接作用于前列腺^[4]。这些均表明雌激素在维持前列腺的结构与功能中起着积极的作用,从而提示在前列腺增殖或肿瘤的内分泌治疗中,通过拮抗雌激素效应,间接地抑制雄激素和催乳素的作用,以及抑制雌激素、对前列腺的直接作用可能可以作为阻碍前列腺生长的一种途径。我们推测Tamoxifen由于在不同水平与雌激素竞争受体而抑制雌激素的作用,可能既产生去势样作用(减少雄激素分泌),也产生切除垂体样效果(抑制催乳素分泌),并直接作用于前列腺,从而造成大鼠腹前列腺的损害。本实验仅在这方面做了一些初步观察,尚有待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Parkes, AS. Zuckerman, S., 1935, *Lancet*

1: 925.

- [2] Grayhack, JT., 1963, *Invest. Urol.* 1: 121.
- [3] Walsh, PC. Wilson, JD, 1976, *J. Clin. Invest.* 57: 1093.
- [4] Hawkins, EF. et al., 1975, *Steroids* 26: 458.
- [5] Jordan, VC. et al., 1980, *Cancer Treat. Res.* 64(6-7): 745.
- [6] Wakeling, AE. Slater SR, 1980, *Cancer Treat. Res.* 64 (6-7): 741.
- [7] Funke P-J et al., 1982, *Acta Endocrinologica* 100: 462.
- [8] Noviloff, AB. Goldischer S, 1961, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47: 802.
- [9] Brands, D. 1974, In "Male Accessory Sex Organs-Structure and Function in Mammals" P 184 ed D Brands, New York.
- [10] Kjaerhein, A., et al., 1974, *Lab Invest.* 31: 391.
- [11] Steinberger, E. 1977, P 1 ed ATK Cockett, N. Y.
- [12] 严培荣, 1981, 国外医学 泌尿分册, 1(3): 29.
- [13] Webber, MM, 1981, In "The Prostate Cell, Part B" P 63 eds G. P. Murphy et al., New York.

环腺苷酸磷酸二酯酶的电镜细胞化学

黄春发 汪德耀

(厦门大学细胞生物学研究室)

应云书

(中国科学院生物物理所)

3', 5'-环腺苷酸磷酸二酯酶[EC 3. 1. 4; 17, cAMP-PDE] 是 Sutherland 和 Rall (1958)^[1]首次从牛心匀浆液中作为一种能水解 3', 5'-cAMP 为 5'-AMP 的酶而发现的。Drummond 和 Perrot-Yee (1961)^[2], Cheung (1967)^[3]指出该酶在不同组织中含量不同, 脑组织活性最高。Thompson 和 Appleman

(1971)^[4]在研究鼠脑组织时, 发现该酶有两种不同的形式, 其中之一可能是 cGMP-PDE。近年来, 有人^[5]用 DEAE-纤维素阴离子交换层析法, 不连续蔗糖梯度离心法, 聚丙烯酰胺凝胶电泳等, 将该酶分为可溶相酶和膜结合酶两大类。用组织化学最早研究 cAMP-PDE 的是 Shanta 等 (1966)^[6], 其过程基本上类似于

Butcher 和 Sutherland(1962)的磷酸二酯酶,但采用了 Gomori 铅盐技术。Florendo 等(1971)^[7]作些修改,把两步法引用到电镜细胞化学上。Kalderon 和 Ravanshenas(1974)^[8]改用一步法也显示活性。由于 cAMP-PDE 是 cAMP 代谢的主要酶之一,其通过水解 cAMP 来调节细胞内 cAMP 的浓度,而 cAMP 在细胞生命活动过程中所起的重要作用早已为人们所熟知,所以用电镜细胞化学定位 cAMP-PDE 一直为国外许多学者所关注,方法上也逐步完善(Ariano, 1977^[9], Robb, 1974^[10]; Duma, 1960^[11]; Law, 1982^[12])。国内只有光镜细胞化学的定位报道^[14]。本实验用碱性磷酸酶和粗蛇毒(富含 5'-核苷酸酶)作平行试验,同时确定 cAMP-PDE 电镜细胞化学的最适条件,建立一种比较完善、药品易得、切实可行的新方法。

材料和方 法

材料为成体的厦门文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri* Gray) 神经管。根据 Florendo 等(1971)^[7]两步法原理,以 Duma(1980)^[11]的方法为基础稍作修改。用 1% 重蒸馏的戊二醛(0.1 M, pH 7.4 的二甲胍酸盐缓冲液配制),在 0~4℃ 固定 30~45 分钟,后用同种缓冲液洗涤三次,入前反应液,在 37℃ 温育 30 分钟(前反应液: 80 mM Tris-顺丁烯二酸缓冲液, pH 7.5; 0.01 M MgCl₂; 蔗糖 1mg/ml; 粗蛇毒*3.5mg/ml 或碱性磷酸酶**2 mg/ml), 继入后反应液, 37℃ 再温育 30 分钟(后反应液: 80 mM Tris-顺丁烯二酸缓冲液, pH 7.5; 1.5 mM cAMP***; 粗蛇毒 3.5mg/ml 或碱性磷酸酶 2 mg/ml; 2 mM Pb(NO₃)₂)。温育后用 4.5 ml TMS(即无蛇毒或碱性磷酸酶的前反应液)和 5.5 ml 重蒸水混合液洗涤 10 分钟,再用 1% OsO₄(0.1 M, pH 7.4 的二甲胍酸盐缓冲液配制),在 0~4℃ 后固定 1~2 小时,系列酒精脱水(在 70% 酒精配制的 4% 醋酸双氧铀中过夜),Epon 812 包埋, LKB 超薄切片机切片,不染色,用 JEM-7 和 JEM-100 cx II 电镜观察。常规对照: a. 加 50 mM 茶碱; b. 无 cAMP; c. 无蛇毒或碱性磷酸酶; d. 无 cAMP 和蛇毒或碱性磷酸酶。

此外,为了确定 cAMP-PDE 细胞化学的最适条件,另设五大实验组: ① 用 10, 30~45 和 60~90 分钟三个不同固定时间组; ② 选介质 pH 为 7.0, 7.5

和 8.5 三个不同组; ③ 选 1.0 mM, 2.0 mM 和 5.0 mM 三个不同 Pb⁺⁺ 浓度组; ④ 用 0.3, 0.75, 1.5 和 3.0 mM cAMP 四个不同底物浓度组; ⑤ 用 0.5, 1.0, 2.0 和 4.0 mg/ml 四个不同碱性磷酸酶浓度组。

结 果

一、粗蛇毒和碱性磷酸酶组的定位比较

cAMP-PDE 水解 3', 5'-cAMP 为 5'-AMP, 5'-AMP 继而富含 5'-核苷酸酶的粗蛇毒或碱性磷酸酶水解为腺苷和无机磷酸。在电镜下,根据无机磷酸被 Pb⁺⁺ 捕捉而以高电子密度的细微颗粒出现而确定酶的位置。结果是粗蛇毒和碱性磷酸酶两个反应组均看到高电子密度的反应产物沉淀(图版图 1, 2)。粗蛇毒组的颗粒非常细小又较弥散; 碱性磷酸酶组的沉淀为明显的点状分布。从我们的结果看,用碱性磷酸酶作为第二步反应酶的结果优于粗蛇毒的结果。在加茶碱,无底物,无蛇毒或碱性磷酸酶以及无底物和蛇毒或碱性磷酸酶的对照实验中,均没有观察到高电子密度的沉淀产物(图版图 3a, 3b)。

二、底物浓度和碱性磷酸酶浓度的选择

我们各用四组,用倍增浓度法,来确定 cAMP-PDE 细胞化学的最适底物浓度和第二步反应的酶浓度。底物浓度的四个组观察结果如下: 1.5 和 3.0 mM cAMP 两个组,阳性反应很强,反应产物分布的密度基本一致(图版图 2, 4), 0.75 mM cAMP 组,反应产物明显减少(图版图 5), 0.3 mM cAMP 组,阳性反应很弱,沉淀产物的“可见性”极差(图版图 6)。碱性磷酸酶浓度不同的四个组,结果与上述相近, 2.0 和 4.0 mg/ml 组,阳性反应强; 1.0 和 0.5 mg/ml 组,阳性反应弱,沉淀产物“可见性”差。

三、pH 值和固定时间选择及 Pb⁺⁺ 浓度的影响

配制反应液过程中,最后加入硝酸铅,如

* 粗蛇毒为医科院基础所生化室赠送。

** 碱性磷酸酶为中科院生化所东风试剂厂产品。

*** cAMP 为 Sigma 商品。

表: 三种缓冲液在不同 pH 下加 Pb^{++} 情况

缓冲液	pH 值									
	6.0	6.2	6.5	7.0	7.3	7.5	7.8	8.4	8.7	
1. 80 mM Tris-顺丁烯二酸	乳白色沉淀多		沉淀渐少			沉淀最少			沉淀渐多	
2. 50 mM Tris-HCl	乳白色沉淀少		沉淀渐多			沉淀最多			沉淀渐少	
3. 20 mM 巴比妥钠-HCl	透明		淡浊白色, 渐清			近透明			浊白色渐浓	
备注	pH 用日本产的 Horiba pH 计测定, Pb^{++} 浓度均为 2 mM 沉淀量的多少也静置 10 分钟后, 沉淀部分体积/总体积的值确定									

果加入速度稍快就会出现乳白色沉淀, 这种沉淀现象不仅和加 $Pb(NO_3)_2$ 速度有关, 而且和不同缓冲液及其 pH 值也有密切关系(见表)。

根据生化研究结果: cAMP-PDE 的最适 pH 值为 7.5~8.0^[10], 我们选用 pH 7.0、7.5 和 8.5 三个不同的反应液, 结果以 pH 7.5 组阳性反应最强。

在不同固定时间组的切片中, 10 分钟组组织固定效果较差, 酶定位的准确性受限; 30~45 分钟组的细胞超微结构保持良好, 酶的定位也较理想; 固定时间超过 1 小时, 虽然超微结构更佳, 但酶的活性也明显丧失。

从三组不同 Pb^{++} 浓度所得的结果来看, 以 2 mM Pb^{++} 组酶定位效果最好; 1 mM Pb^{++} 组阳性反应的“可见性”明显减弱; 5 mM Pb^{++} 组虽能显示酶的活性, 但有明显的 Pb^{++} 污染。

讨 论

根据我们以上所得的结果, 蛇毒作为第二步反应酶, 反应产物的沉淀颗粒比较弥散, 这对于 cAMP-PDE 活性较低的组织进行该酶细胞化学定位时, 可能得出不真实的结果; 而用碱性磷酸酶代替, 不仅药品易得, 而且产物的沉淀颗粒较大, 这除了对该酶的准确定位有利外, 对于纤毛, 绒毛, 微绒毛等膜系密集结构还可根据颗粒密度进行半定量计算。以上区别可能与两者的纯度, 分子大小, 结构和水解 5'-AMP 的速率有关。结果同时也证明碱性磷酸酶可用于代替蛇毒作为 cAMP-PDE 电镜细胞化学定位的第二步反应酶。从四组对照试验

来看, 我们采用的这种方法是特异的。其中无蛇毒或碱性磷酸酶组有极少量的反应产物, 说明细胞内含有极少量内源性的 5'-核苷酸酶和碱性磷酸酶存在。

cAMP-PDE 细胞化学的最适底物浓度, 应为 1.5~3.0 mM cAMP, 这和 Arino 等(1977)^[9] 在猫和鼠尾状核以及新大脑皮质和 Singer 等(1981)^[13] 在肺泡细胞中描述的一致。由于细胞化学最终的结果是产生“可见”的沉淀产物。当底物浓度过底时, 酶活性无法得到充分发挥, 产物沉淀的“可见性”较差(图 5, 6)。虽然增加底物浓度会相应增加产物量, 使阳性反应易于观察, 但底物浓度过高, 细胞质内反应背景也相应增高, 且易连成片, 定位的准确性受到影响, 所以确定最适底物浓度是电镜细胞化学定位成功的重要一环。第二步反应酶的最适浓度的确定和底物浓度的确定有异曲同工之妙。

酶细胞化学的结果好坏, 除了显示酶活性外, 还要考虑对细胞超微结果保持的好坏, 否则都无法获得满意的定位效果。不同的酶, 人们^[15,16] 采用不同的固定液或控制不同的固定时间来寻找一种最佳方案。对于 cAMP-PDE, 我们认为固定时间用 30~45 分钟较为合适。介质中的 pH 值高低, 除直接影响酶活性外, 还会与反应介质中的 Pb^{++} 作用形成不同程度的絮状乳白色沉淀, 而相同 pH 值, 不同的缓冲液与 Pb^{++} 作用形成絮状乳白色沉淀差别很大(见表), 这种现象 Shanta 等(1966)^[6] 也有过报道, 所以选择合适的 pH 和缓冲液, 一方

面可提高酶的活性,另一方面可维持反应液中 Pb^{++} 浓度的恒定,减少 Pb^{++} 沉淀而产生的污染。在 pH 7.5 定位 cAMP-PDE,我们建议采用缓冲液(1)和(3)(见表)。 Pb^{++} 是重金属离子,对酶有一定的毒性^[10],同时也会诱导某些底物自解产物污染,然而 Pb^{++} 浓度过低,影响反应产物的“可见度”。我们的结果也证实了这种现象,在 cAMP-PDE 的电镜细胞化学定位中,采用 2 mMPb⁺⁺ 的浓度较为适应。

参 考 文 献

- [1] Sutherland, E. W., T. W. Rall, 1958, *J. Biol. Chem.* 232: 1077.
- [2] Drummoud, G. I., S. Perrott-Yee, 1961, *J. Biol. Chem.* 236: 1126.
- [3] Cheung, W. Y., 1967, *Biochemistry* 6: 1079.
- [4] Thompson, W. J., M. M. Appleman, 1971, *Biochemistry* 10: 311.
- [5] 肖卢媛, 1985, *生物科学动态*, 5: 16.
- [6] Shanta, T. R. et al., 1966, *Histochemie* 7: 177.
- [7] Florendo, N. T. et al., 1971, *Science*, 173: 745.
- [8] Kalderon, A. E., S. F. Ravanshenas, 1974, *Histochemistry* 39: 229.
- [9] Ariano, M. A., A. N. Adinolfi, 1977, *Exp. Neurol.* 55: 84.
- [10] Robb, R. M., 1974, *Invest. Ophthalmol.* 13: 740.
- [11] Duma, A., J. Moraczewski, 1980, *Histochemistry*, 66: 211.
- [12] Law, T. S., R. I. Henkin, 1982, *Res. Common Chem. Pathol. Pharmacol.* 38: 439.
- [13] Sinrer, A., L. M. A. Ariano, 1981, *J. Histochem. Cytochem.* 29: 1372.
- [14] 王代树等, 1983, *解剖学报*, 14: 87.
- [15] 武内忠男, 小川和朗主编 1980, 朱逢春主译 1983, *新酶组织化学*, 人民卫生出版社第一版.
- [16] Hayat, M. A. ed, (1973-1977): In "Electron Microscopy of Enzymes: principles and methods" V 1-5 van Nostrand Reinhold New York.

小鼠颌下腺粗提物中神经生长因子活力的测定*

王天佑

(北京市神经外科研究所)

神经生长因子(Nerve Growth Factor, 简称 NGF)系 1951 年 Levi-Montalcini 发现。大量的体内外实验证明,它对交感神经细胞和感觉神经细胞有促进成熟与分化的作用^[1]。NGF 广泛存在于动物体内,以成年雄性小鼠颌下腺中含量最高,其次是豚鼠前列腺和蛇毒中。它为一蛋白质,分子量 130000,通常称为 7S NGF,由 5 个亚基组成,只有 β 亚基具有促进神经生长的特性。用不同方法提取,可以得到一种 2.5S NGF,大致相当于 β 亚基部分。现在,7S 及 2.5S NGF 均有商品供应,但需进口,价格昂贵,而自行提纯又很烦琐。有

的学者以简易方法获得 NGF 粗制品,同样可以满足实验需要^[2]。本文试图将粗制备方法标准化,并检验它能否用于神经细胞的体外培养。

材 料 和 方 法

一、小鼠颌下腺粗提物:共用 90 只雄性昆明种小白鼠,年龄在两月以上,体重 25—45 克,分 9 批,每批 8—15 只。拉断颈椎处死后取颌下腺,去除血液及脂肪,置液氮中 5—10 分钟,化冻后剪碎,置玻璃

* 王文宁、胡晓梅、葛迎春同志曾参加部分技术工作,特此致谢。