

表1 不同保存条件对精液(斑)中PDE I活性的影响

保存方式	温度范围(℃)	保存时间	酶活性/(U/mg)	相对酶活性/%
新鲜精液	20	4h	59.1	100
冰冻保存	-10	40d	75.1	127.1
低温保存	4—6	40d	93.3	157.9
低温保存	4—6	450d	117.7	199.1
自然室温	10—28	40d	141.2	238.9
自然室温	10—28	450d	42.7	72.2
精斑(棉布)	10—28	160d	125.3	212.0
精斑(化纤)	10—28	160d	257.3	435.4

参 考 文 献

- 1 韩刚毅. 酶与司法鉴定. 解放军医学情报, 1990; 4: 183
- 2 贾静涛. 法医血型血清学. 沈阳: 辽宁科技出版社, 1988; 258
- 3 韩刚毅. 三种苯基膦酯化合物的合成. 化学试剂, 1990; 12(1): 42
- 4 韩刚毅, 王实. 人尿中PDE I的研究. 中国临床医学理论与实践, 1992; (1): 357
- 5 韩刚毅, 唐德复, 唐超等. 血清5'-NPD同工酶荧光酶谱测定法及其临床应用. 中华医学检验杂志, 1988; (1): 8
- 6 Lowry O H, Rowebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265

aFGF对神经元中蛋白质合成及cAMP含量的影响

邵宁生 王会信 周廷冲 柳 川 魏 文

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

关键词 aFGF, 蛋白质, 合成, cAMP, 神经元

酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)是近年来发现的一种新的神经营养因子,它在体外能促进多种神经元的存活及突起生长^[1,2],体内也能促进受损伤神经元的修复与再生^[3].最近我们的研究也表明,aFGF能促进体外培养的海马神经元形态上分化成熟^[4].目前,有关aFGF神经营养作用的研究多为形态学上的观察,对aFGF神经营养作用的机制了解的还不多,本文就aFGF对体外培养的海马神经元蛋白质合成及cAMP含量的影响做了进一步探讨.

1 材料与方法

1.1 材料 人aFGF,本室基因工程表达产品,电泳纯;牛胰岛素、牛转铁蛋白、牛血清白蛋白、多聚赖

氨酸(Mr: 20 000—30 000)及胰蛋白酶均为Sigma公司产品;马血清,本院二所产品;³H-Lue (1mCi/ml)、cAMP分析试剂盒:中国科学院原子能研究所产品;闪烁液,PPO(Sigma) 2g,POPOP(上海试剂一厂) 0.05g,溶于500ml二甲苯中;新生大鼠,本院动物中心提供.

1.2 神经元原代培养 无菌取新生大鼠海马组织,剥去脑膜和血管,用0.25%胰酶消化及机械吹打法制成单细胞悬液.调整细胞计数为 1×10^6 细胞/ml左右,接种于细胞培养板内(多聚赖氨酸处理过),用含10%马血清的DMEM培养液,在37℃,5%CO₂条件下培养20h,然后更换无血清培养液1L DMEM培养液内加15mol HEPES,33.3mmol葡萄糖,5mg胰岛素,5mg

转铁蛋白, 0.2g 牛血清白蛋白及青霉素, 链霉素) 后待用。

1.3 ^3H -Leu 参入法测定神经元蛋白质的合成

神经元无血清培养 48h 后, 加生长因子, 同时加 ^3H -Leu ($1\mu\text{Ci}/\text{ml}$), 继续培养 24h, 液闪测定。

1.4 流式细胞术测定神经元总蛋白

神经元无血清培养 48h, 加生长因子, 继续作用 24h。将细胞用 0.25% 胰酶消化下来, 离心, 细胞沉淀用 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 洗一遍, 留 0.5ml 细胞液。将细胞悬液迅速注入 4℃ 预冷的 70% 乙醇中, 4℃ 固定 48h。离心去乙醇, 再用磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 洗一次, 弃上清。细胞用 0.5ml ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) 异硫氰酸荧光素 (FITC) 悬浮, 室温避光 30min。样品过 400 目尼龙网后, 在流式细胞仪上测定。

1.5 cAMP 测定

神经元无血清培养 48h 后, 加生长因子, 对照组加等量培养液, 37℃, 5% CO_2 孵育 30min。然后立即加入 1mol/L HClO_4 固定, 用硬橡皮将细胞刮下, 加 2mol/L KOH 中和, 1000r/min 离心 5min, 上清冷冻干燥后重溶于 0.05mol/L Tris-0.004mol/ml EDTA 缓冲溶液 (pH7.5), 待测 cAMP。cAMP 测定及计算按分析药盒说明书进行。为测定准确性, 需先制作标准曲线。

2 结 果

2.1 对 ^3H -Leu 参入神经元蛋白质合成的影响

如图 1 所示, aFGF 能明显促进 ^3H -Leu 参入新生大鼠海马神经元的蛋白质。量效关系表明, 低剂量 (10ng/ml) aFGF 即有作用, 较高剂量 (50nm/ml) 时作用已非常显著 ($P < 0.01$)。在很高剂量 (2 000 ng/ml) 时, 也未出现抑制作用。aFGF 作用随剂量增大而趋于饱和。

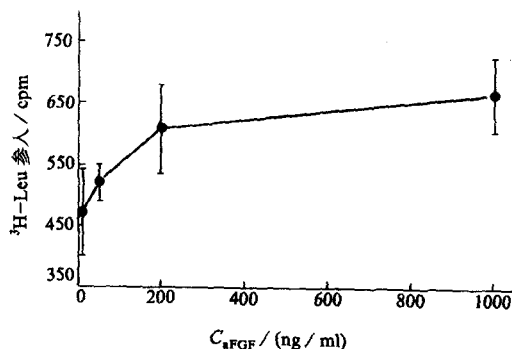


图 1 aFGF 对 ^3H -Leu 参入新生大鼠 (1—2d) 海马神经元蛋白质合成的影响

2.2 流式细胞术测定神经元蛋白总量

流式细胞术测定神经元蛋白质总量结果也表明, aFGF 能明显促进新生大鼠海马神经元蛋白质的合成。如图 2 所示, 加入 aFGF ($1\ 000\text{ng}/\text{ml}$) 组神经元的平均荧光强度由对照的 92.46 增加到 101.01, 整个峰形右移, 说明蛋白质含量多的神经元数目所占比例增加。

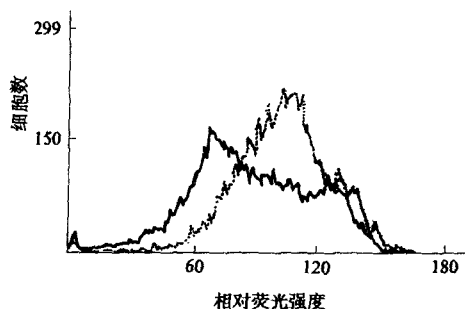


图 2 流式细胞光度术测定体外培养新生大鼠 (1—2d) 海马神经元蛋白质总量的变化
—— 对照; aFGF ($1000\text{ng}/\text{ml}$)

2.3 对神经元内 cAMP 含量的影响

利用 cAMP 与特异性蛋白激酶结合时, 标记 $^3\text{-cAMP}$ 及非标记 cAMP 竞争抑制的原理, 测定神经元内 cAMP 含量。首先以不同浓度标准 cAMP ($40\mu\text{l}$ 溶液中分别含有 0.25, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0pmol cAMP) 制作标准曲线 (如图 3)。将样品测定与标准曲线比较, 结果发现, aFGF 作用 30min 能明显提高体外培养新生大鼠海马神经元胞体内 cAMP 含量 (表 1)。

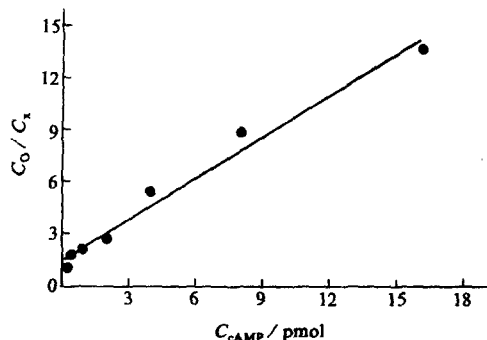


图 3 cAMP 测定标准曲线

横坐标 cAMP 浓度是指 $40\mu\text{l}$ 溶液中的含量。标准曲线为 $C_0/C_x = 1.37 + 0.81x$, $r = 0.992$ ($P < 0.01$)。其中 $C_0/C_x = \frac{\text{不加非标 cAMP 反应管的放射性均值}}{\text{样品管放射的均值}}$

表1 aFGF对新生大鼠海马神经元中cAMP含量的影响

组别	aFGF 剂量/(ng/ml)	$C_{\text{cAMP}}/(\text{pmol}/10^7 \text{ 细胞})$
对照		279.05±65.64
I	50	547.67±51.68 ¹⁾
II	500	731.38±269.40 ¹⁾

n=2.

¹⁾与对照相比 $P < 0.01$.

讨 论

我们已证实, aFGF 能促进新生大鼠海马神经元的体积增大及突起伸长, 这里我们利用³H-Leu 参入神经元中蛋白质合成及流式细胞术测定细胞蛋白质总量的方法, 又进一步证实了 aFGF 能增加神经元中蛋白质的合成, 说明 aFGF 促进神经元中蛋白质的合成可能是其诱导神经元形态上分化的基础. 另外, 我们的结果还表明, aFGF 能使神经元的内 cAMP 的含量增加. 一般认为, 细胞内 cAMP 的升高与细胞分化相一致. aFGF 促进神经元内 cAMP 的合成与它能从形态上诱导神经元

分化的结果相一致, 也提示 aFGF 神经营养作用的信号转导途径中可能有腺苷酸环化酶系统的参与. 上述结果为进一步研究 aFGF 对神经损伤的修复与再生提供了依据.

参 考 文 献

- 1 Walicke P, Cowan W M, Ueno N *et al.* Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; **83**:3012
- 2 Walicke P A. Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. *J Neurosci*, 1988; **8**:2618
- 3 Sievers J, Hausmann B, Unsicker K *et al.* Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci Lett*, 1987; **76**:157
- 4 邵宁生, 王会信, 薛沿宁等. 人酸性成纤维细胞生长因子神经营养作用的初步研究. *中国应用生理学杂志*, 1992; **8**:102

以氟离子选择电极为基础的半乳糖传感器*

纪学锋** 章咏华***

(中国科学院长春应用化学研究所电分析化学开放研究实验室, 长春 130022)

关键词 氟电极, 半乳糖氧化酶, 辣根过氧化物酶, 对氟苯酚, 电位式传感器

D-半乳糖的测定多使用酶法, 近年来用酶电极测定血液中的半乳糖含量的方法已有报道^[1-3], 这些酶电极都有良好的重现性和很短的响应时间, 缺点是测定时干扰严重, 选择性差.

本文描述一种以氟电极为基础电极的电位式半乳糖传感器, 该传感器由氟电极和固定化的酶膜制成, 方法简单、快速, 突出的优点是选择性高, 在最佳 pH 条件下, 抗坏血酸、尿酸、各种氨基酸对测定都不产生干扰, 而这些物质在电流法测定中对半乳糖测定的干扰是相当严重的.

1 实验方法

1.1 仪器

Orion 901 离子计(美国 Orion 公司); Sg-1 磁力搅

拌器(苏州标准计量局实验工厂); pHs-3 型酸度计(上海第二分析仪器厂); CSB-F 氟离子选择电极(长沙半导体材料厂); 双液接参比电极(美国 Orion 公司), 外套充 0.1mol/L 的 Na₂SO₄ 溶液.

1.2 试剂

半乳糖氧化酶(GAO)(E.C.1.1.3.9, 100U/mg, Sigma); 辣根过氧化物酶(HRP)(E.C.1.11.1.7, 250U/mg, 上海), 用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH6.30)配成 1000U/ml 的水溶液; 对氟苯酚

*国家自然科学基金资助课题.

**现在天津石化公司研究所工作.

***通讯联系人.

收稿日期: 1992-07-16 修回日期: 1992-11-14