

量 SDS 分子的问题,因此实验比较稳定,不管在 pH 的那一端,都有好的聚焦带。虽然经 SDS 和脲处理的图谱(图 4A、B)上,带的位置十分相似,但还有一些差异,如图 4B 上的一些带(1—8)比较集中,而 SDS 的带分布比较均匀,这可能反映出它们对蛋白质变性的不同强度和性质。

去氧胆酸钠的抽提效果显然不如前两者,但仍能看到一些聚焦带,它们的位置几乎和图

4B 相同,但是在图 4B 上有很多带在图 4C 上没有或含量极低,尤其是 3、4、5、6、8 五条带,这些蛋白很可能是深埋在脂双层中或是一些蛋白质的亚基。尽管去氧胆酸钠的回收量较低,但由于它有脲和 SDS 无法比拟的优点,很可能成为研究膜上一些酶性质的一种有力手段。

参 考 文 献

- [1] Ames, G. F-L.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 634, 1974.
- [2] Schnaitman, C. A.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **157**, 541, 1973.
- [3] Gabridge, M. G. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 271, 1976.
- [4] 黄芬等:《畜牧兽医学报》,1980年,11期,209页。
- [5] Merz, O. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 84, 1972.
- [6] 陈建文等:《生物化学与生物物理进展》,1981年,5期,35页。
- [7] Ames, G. F-L.: *Biochemistry*, **15**, 616, 1976.
- [8] Jamieson, G. A. et al.: *Anal. Biochem.*, **43**, 259, 1971.
- [9] Nakae, T.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **71**, 877, 1976.
- [10] Archer, D. B. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **513**, 268, 1978.
- [11] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680, 1970.
- [12] 陈建文等:《生物化学与生物物理进展》,1980年,第6期,第62页。
- [13] Néeman, Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 54, 1975.

[本文于1981年11月20日收到]

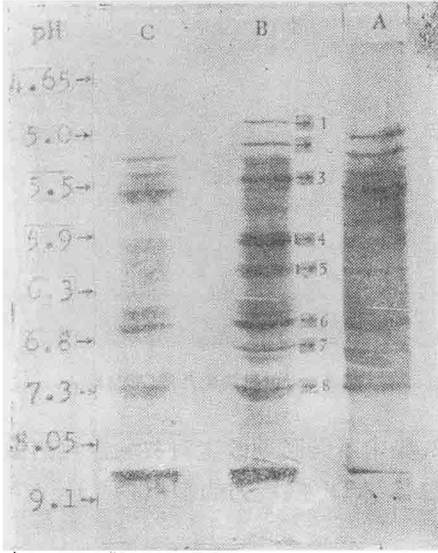


图 4 不同去污剂抽提莱氏衣原体 A1H 189 以后的薄层凝胶等电聚焦图
A. 2% SDS B. 8M 脲 C. 2% 去氧胆酸钠

实验性矽肺发病的生物化学变化研究

殷 玲 豫

(山东省医学科学院基础部)

本文介绍在矽尘对肺细胞超微结构和功能影响的研究^[1]基础上对大白鼠实验性矽肺发病过程中肺线粒体 ATP 酶与肺匀浆中糖、乳酸、核酸的生物化学变化进行了比较研究。

一、实验材料和方法

(一) 实验材料

1. 大白鼠系本所繁殖的 Wistar 品系。取

体重约 300 克雄性大白鼠染尘,每只用 50 毫克/毫升一次气管注入。分别于染尘后一、二、四、八周处死;部分作病理检查,部分制成肺匀浆,部分分离肺线粒体;以未染尘正常大白鼠肺组织作对照。

2. 矽尘的配制: 水晶矽尘(北京医学院劳动卫生教研组提供)经 700℃ 烧灼 20 分钟后,用浓 HCl 处理,洗呈中性 (pH~7.0),平均含

SiO₂ 98%，颗粒 3 微米左右，总矽量 99% 以上。

称水晶矽尘 2.5 克稀释于 50 毫升 Hank's 液中，高压 10 磅 15 分钟灭菌。用前加青霉素 25 万单位。

3. 肺匀浆制备：取一定量肺组织用 1SSC (0.15M NaCl + 0.015M 柠檬酸钠) 4℃洗去血液，匀浆，再用 1SSC 4℃ 10 倍稀释，纱布过滤，-20℃保存备用。

4. 肺线粒体制备：按酶学方法^[2]用线粒体缓冲液 (0.25M 蔗糖+0.002M EDTA+0.01M Tris-SO₄ 用 7.5N H₂SO₄ 调 pH = 7.4) 制备肺线粒体。经洗涤 2 次后沉淀贮于 -20℃保存备用。

5. 核酸提取：按改良的 Schneider 法^[3]。

(二) 测定：

1. 蛋白浓度测定：小牛清蛋白做标准，用紫外分光光度法测定肺匀浆蛋白和线粒体膜蛋白。

2. 糖及乳酸含量测定，同文献[1]。

3. RNA 测定：以酵母 RNA 为标准；用二羟基甲苯法^[4]测定。

4. DNA 测定：以小牛胸腺 DNA 为标准；用二苯胺法^[4]测定。

5. ATP 酶活力测定：反应总体积为 0.5 毫升，含 Tris-HCl 30 微克分子 (pH = 8.0) MgCl₂ 3 微克分子，ATP 2.5 微克分子，反应溶液在 30℃ 水浴中保温 3—4 分钟立即加入制备的线粒体 (蛋白浓度在 0.5 毫克/毫升以下) 0.1 毫升，反应时间 2 分钟，加 0.5 毫升 10% 三氯乙酸 (TCA) 终止反应。按 Sumner (1944) 方法测定释放的无机磷^[5]。

二、实验结果

1. 病理改变
染尘一周者多为 I 级结节；并有高度充血。染尘二周者 I、II 级结节常见，少数结节为 III 级；肺有高度充血外，有个别融合病变 (图 1)。染尘四周者多数为 III 级结节，染尘八周者 III、IV 级结节为主；弥漫性纤维化明显 (图 2)。



图 1 大白鼠染尘二周 (10×8)

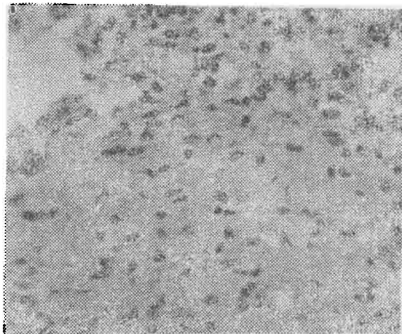


图 2 大白鼠染尘八周 (40×8)

2. 染尘不同时期矽尘对实验性大白鼠肺细胞线粒体 ATP 酶活力的影响。

表 1 实验性矽肺发展不同阶段肺线粒体 ATP 酶活力测定

线粒体来源	动物数	实验次数	ATP 酶比活 (微克分子无机磷/分/毫克蛋白质)	
			范 围	平 均
正 常	5	4	0.2—0.24	0.22
染尘一周	5	5	0.06—0.1	0.08
染尘二周	5	5	0.05—0.01	0.03
染尘四周	5	5	0.05—0.12	0.09
染尘八周	5	5	0.05—0.06	0.06

从表可见，染尘各组 ATP 酶活力均显著低于对照，其中染尘二周为最低。染尘四到八周肺组织逐步纤维化。

3. 实验性矽肺发病过程中肺组织糖合成情况。

从表 2 说明在染尘 1—2 周肺组织糖含量比正常组高，3—4 周低于正常组。

表 2 发病过程中肺组织糖含量

肺组织匀浆	动物数	实验次数	肺组织糖含量微克/ 10 毫克蛋白质
正常大白鼠	5	3	311
染尘一周	5	3	835
染尘二周	5	3	1400
染尘四周	5	3	142
染尘八周	5	3	209

4. 实验性矽肺发病过程中肺组织乳酸生成的情况,见表 3。

表 3 发病过程中肺组织乳酸生成量

肺组织匀浆	动物数	实验次数	肺组织乳酸含量微克/ 10 毫克蛋白质
正 常	5	3	33.3
染尘一周	5	3	64.3
染尘二周	5	3	35
染尘四周	5	3	53.2
染尘八周	5	3	49

从表 3 可见,染尘各组肺组织乳酸生成量均比正常组高,说明在整个发病过程中肺组织糖酵解增强。

5. 实验性矽肺发病过程中肺组织 RNA、DNA 合成情况。

表 4 发病过程中肺组织 RNA、DNA 含量变化

肺组织匀浆	动物数	实验次数	肺组织 RNA 含量微克/10 毫克蛋白质	DNA 含 量微克/ 10毫克蛋 白质
正 常	20	3	286	462
染尘一周	10	3	609	634
染尘二周	10	3	167	486
染尘四周	10	3	237	439
染尘八周	10	3	442	620

从表 4 可见染尘一周肺 RNA 含量比正常组高出一倍多, DNA 含量亦比正常组高;染尘 2—4 周 RNA 含量比正常组稍低, DNA 含量和正常组相近;染尘八周 RNA 和 DNA 含量均比正常组高。

三、讨 论

ATP 酶是生物膜的能量转换单位,它在线粒体膜氧化磷酸化作用的能量偶联反应中起着中心作用,并在生物膜进行需能的离子转运,和 DNA 复制^[7]的能量偶联反应中起重要作用。而在研究矽肺发病机制的过程中,发现肺细胞线粒体对矽尘最敏感^[1],因此有必要在实验性矽肺发病的不同阶段分离肺细胞线粒体,并测定其 ATP 酶活力与其它生化指标,加以比较分析。

实验发现实验性矽肺发病后,线粒体 ATP 酶活力明显降低。其结果是肺上皮细胞由于矽尘作用供能不足,于是肺上皮细胞死亡,原有的成纤维细胞大量增生。增生的成纤维细胞丧失上皮细胞进行气体交换的功能。刘树森等(1976 年)报道^[6]正常大鼠肝 ATP 酶活力为 0.49—1.07 微克分子/分/毫克蛋白,而人的肝硬变组织约为 0.025 微克分子/分/毫克蛋白,也看出纤维化对酶活力的影响。

染尘 1—2 周肺组织糖含量比正常组高 2—4 倍。这可能是因为此时肺明显充血出血,出现炎症,大量白血球、吞噬细胞集聚,于是表现为肺组织含糖量增高,而并非是糖合成能力增强的结果。染尘 4—8 周为肺纤维化阶段,故糖含量下降。

从实验性矽肺发病过程中肺组织乳酸生成情况表明,染尘 1—8 周乳酸生成量均较正常组明显增高,说明实验性矽肺肺组织糖合成能力下降,糖酵解能力增强。

染尘第一周 RNA、DNA 含量和糖含量均比正常组增高,这可能与白血球及吞噬细胞大量增生有关。染尘 2—4 周 RNA 下降,尤以第二周最明显;ATP 酶活力亦以第二周最低。这可能是由于染尘引起肺上皮细胞线粒体破坏,ATP 酶活力下降,肺上皮细胞供能不足。至于染尘第八周 RNA 和 DNA 含量比正常组有所增高,则可能与此阶段成纤维细胞大量增生有关,而并不反映肺上皮细胞 RNA 和 DNA 的合成能力的提高。(下转第 64 页)

测分子量时,由于小肽难以购置,故用胰岛素进行拆分^[5]和降解^[4]。多次拆分效果较好。A 链洗脱体积平均为 137.4 毫升, B 链为 156.9 毫升,而胰岛素本身恰好在 V_0 处出现。我们按顾嘉琨等法^[4]降解胰岛素,得到三个峰,洗脱体积分别为: A 峰 136.7 毫升, B 峰 167.6 毫升, C 峰在 V_i 处出现,相似于他们的 I、II、V 峰,分别应为 30 肽、16 肽和 5 肽。由此得到的标准曲线,可查出抑制剂的分子量。

在抑制剂的化学组成方面,纯化样和粗样比较, Gly 和 4 种含氨基物质的含量增高,其他氨基酸的含量降低,只含痕迹量,可能是杂质。正是由于这些微量氨基酸,特别是酪氨酸和苯丙氨酸含量的悬殊,导致了粗样和纯化样紫外吸收的微弱差异。

根据以上结果,初步认为,纤维素酶具紫外

吸收的这一内源抑制剂,可能是一组理化性质极其相似、含多聚 Gly 的结合肽。

参 考 文 献

- [1] L. Lorond: *Methods in Enzymol.*, XIV, part B. Academic press, 678, 1976.
- [2] A. M. Безбородов: *Прикладная Биохим. микроб.*, 14(1), 5, 1978.
- [3] 齐义鹏:《纤维素酶及其应用》,四川人民出版社,1980.
- [4] 鲁子贤:《生物化学与生物物理学进展》,1974 年,1 期,42 页。
- [5] LKB: *SDS and Conventional Polyacrylamide Gel Electrophoresis with LKB 2117 Multiphor Application Note* 306, 1976.
- [6] 顾嘉琨,鲁子贤等:《生物化学与生物物理学报》,1964 年,11 卷,365 页。
- [7] 莽克强:《聚丙烯酰胺凝胶电泳》,科学出版社,1975.
- [8] LKB: *Preparation Electrofocusing in Density Gradients, Application Note*, 219, Review, 1979.

[本文于 1982 年 3 月 29 日收到]

(上接第 45 页)

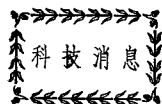
本文认为是由于矽尘使肺上皮细胞线粒体破坏, ATP 酶丢失或不能装配到膜上,使肺上皮细胞供能不足,导致上皮细胞死亡,成纤维细胞增生。因此在矽肺发病过程中,生物膜能量偶联问题,值得重视。

参 考 文 献

- [1] 殷玲豫:《生物化学与生物物理进展》,1982 年,1 期,44—47 页。

- [2] Gregg, C. T.: *Methods in Enzymology*, Vol. 10, 181, Estabrook, R. W. (ed)). Academic Press New York, 1967.
- [3] Schneider, W. E.: *J. Biol. Chem.*, 161, 193, 1945.
- [4] P. 康德拉:《分子生物学方法》(李申德译),科学出版社出版,1977 年,92—96 页。
- [5] Summer, J. B.: *Nature*, 100, 413, 1944.
- [6] 刘树森等:《生物化学与生物物理学报》,1976 年,8(4) 卷,313 页。
- [7] Mevel-Ninio, M. T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 376, 485, 1976.

[本文于 1981 年 3 月 30 日收到]



科技消息

欧洲分子生物学实验室领先建立核苷酸序列数据库

海德堡欧洲分子生物学实验室 (EMBL) 领先宣布建立核苷酸序列数据库,要求各期刊以便于计算机阅读的统一格式向 EMBL 数据库提供序列分析数据。EMBL 规定的统一格式与期刊报道中常用格式有所不同,期刊中一般强调序列与转译成氨基酸时读码格式的对应性。而 EMBL 则要求输入数据库的序列数据

以 10 个或 15 个核苷酸分段的格式书写,以减少计数可能引起的失误和便于计算机检索。目前分子生物学杂志已同意 EMBL 的建议。核酸研究杂志表示基本同意,但需讨论细节,自然杂志正在研究此建议。

“Nature” 296, 596. (情)

1982-4-15.