

抑制素的制备与测定

喻晶华 屈智超

(四川省计划生育科研所,成都)

提 要

抑制素是性腺产生的一种糖蛋白,主要存在于睾丸及卵巢内,它与生育调节的关系日益受到人们的重视。本文比较详细地介绍了近年来抑制素的制备和生物测定方法的进展。

抑制素(Inhibin)既可能是一种天然的避孕物质,又可能与不孕不育有一定联系,预计今后几年内它在生育调节中的应用会取得重大进展。从 30 年代就有人提出了这种物质存在的可能,但直到 70 年代以后才引起人们的广泛兴趣。现已初步建立了分离纯化及测定方法。目前国内还未见这方面的报道。本文就近年来抑制素的制备及其生物学测定方法作一介绍,为进行这方面工作的同行提供一些信息。

抑制素的来源及制备

抑制素主要来源于雄性或雌性的性腺组织,但由于所用组织的不同,其制备方法也略有差异,并且活性也各异。

一、雄性(来源)抑制素的制备

(一) 从睾丸组织提取^[1]

从睾丸组织提取抑制素是最早建立的方法。McCullagh 在睾丸组织提取物中首先发现了抑制素。从睾丸组织提取抑制素的主要步骤是:取新鲜或 -20°C 冷藏的睾丸,用缓冲液制成匀浆,再用粗布过滤去渣,将滤液在 30000g 离心约 30 分钟,上清液再用乙醚提取。提取后保留水溶性提取物,在 4°C 下用分子筛(XM-100)过滤,超滤液即为抑制素制剂。该制剂保存于 -20°C 或制成冻干粉备用。睾丸组织制备的抑制素为粗制品,因而获取量大。以牛的睾丸

提取为例,其产量可达:8 克冻干粉/公斤睾丸。

(二) 从睾丸液制备^[2]

来源于睾丸液的抑制素是活性最强的。用睾丸液制备抑制素的步骤是:从动物睾丸内抽吸出睾丸液,然后加入活性碳混合,离心沉淀,取上清液。这一步骤的目的是除去甾体类物质。然后用凝胶过滤或微孔膜(如 XM-100 等)过滤,分管收集滤过液,取活性较大的部分,冷藏或制成冻干粉备用。

(三) 从睾丸支持细胞制备^[3]

近年来的研究已证实,睾丸抑制素主要是由睾丸支持细胞(Sertoli Cell)产生的,因此用培养的睾丸支持细胞制备抑制素较为理想。其主要过程如下:

1. 分离睾丸支持细胞:取下睾丸后,去掉附睾再将睾丸组织剪成小块,然后与胶原酶液一起放入震荡孵育箱内, 37°C 孵育。弃去胶原酶液,洗涤组织块,加入缓冲液,用巴氏吸管机械分散,即可得到聚集的睾丸支持细胞小块,其中夹杂少量精子细胞,还可用胰蛋白酶或 RNA 酶进一步消化,除去精子细胞。

2. 睾丸支持细胞的培养:分离出的睾丸支持细胞用 EME 或其他培养液在塑料长颈瓶中培养 2—3 天,然后收集基质液,保存于 -20°C 。

(四) 从精浆制备^[4]

用精浆制备抑制素可从大动物如羊、猪、牛

等以及人获得精液标本。目前建立的抑制素放免分析法很多都是从精浆中分离纯化的标准抑制素抗原。其制备过程如下：取新鲜精液，自然凝固后离心分离出精细胞及其他细胞，将精浆保存在低温下备用。这种抑制素制品可进一步用乙醇沉淀，再用凝胶过滤等方法加以纯化。

(五) 从辜淋巴液制备^[5]

辜淋巴液内也含有抑制素样物质，但其活性较低，有些研究者常把它作为标准参照，定出其他样品的活性强度。其制备过程是：在辜淋巴管内插管收集辜淋巴液，然后用活性炭除去其中的甾体类物质即可使用。

(六) 从生精管制备^[6]

生精管培养后其基质液中含有抑制素样物质。实际上生精管培养时抑制素也主要来自辜丸支持细胞，但一般很少报道作为常规的抑制素来源。

(七) 从精子提取^[7]

Frachini 等报道精子提取物也具有抑制素活性，但其活性较低，而且也未能与精子本身的结构区别开，故一般不作为常规来源。

二、雌性(来源)抑制素的制备

(一) 从卵泡液制备

雌性抑制素的存在是 70 年代末才提出来的，最初是在猪、羊等大动物的卵泡液内发现的，称为“卵泡抑制素”。现已证明，不同种类动物及人的卵泡都显示很强的抑制素活性^[8]。卵泡抑制素制备的主要步骤是：从活体动物或人的卵泡(直径 3—5 毫米)或死后 2—3 小时的尸体卵泡中抽吸出卵泡液，离心去除沉淀的颗粒细胞等，将上清液保持于 -20℃。将多次收集的卵泡液一起加入活性炭，4℃过夜，再离心分离去除甾体类物质，处理后的卵泡液低温保存备用^[9]。

(二) 从卵泡颗粒细胞制备

近年来已经证实，卵巢内产生抑制素的细胞主要是卵泡颗粒细胞。因此，可用这类细胞的离体培养制备抑制素。其过程主要分为以下两个步骤^[10]：

1. 卵泡颗粒细胞的分离：从排卵的卵泡中

抽吸出颗粒-黄体细胞，然后用单位重力沉淀或离心分开卵泡液与细胞聚集物，后者与透明质酸酶一起培育，再用吸管机械分散成单个细胞。

2. 颗粒-黄体细胞的培养：分离出的颗粒-黄体细胞按常规方法在培养板中培养，并加入少量促性腺激素。每 2—4 天收集一次培养液，并更换新的培养液，最长可培养 12 天。收集的培养液冷藏备用。

三、抑制素的其他来源

除了上述抑制素的主要来源外，近年来已在性腺外器官发现了抑制素的存在，如人的胎盘、前列腺、以及胃液等^[11]。最近已有报道^[12]用基因工程的方法用大肠杆菌(*E. Coli*)生产抑制素。还有报道^[13]用合成肽碎片模拟猪卵泡液抑制素 α -亚单位 N 末端的 134 个氨基酸序列，也具有抑制素活性，这些都给抑制素的来源提供了广阔的前景。

抑制素的活性分析及测定方法

一种特异性生物活性物质应有相应的特异性分析系统和测定方法，以能定量描述该物质的活性变化。然而，就抑制素来说，目前还没有一个统一的测定系统或定量单位标准^[11]。现在只能基于抑制素在体内或体外对垂体细胞卵泡刺激素分泌的抑制作用及其程度来进行鉴定。

一、抑制素活性单位的确定^[11,14]

抑制素的活性单位，一般是以实验者自己指定的参照物的活性为标准。例如，用牛辜淋巴液作标准参照时，则指定每毫升辜淋巴液或每毫克辜淋巴蛋白的抑制素活性为 1 个活性单位，定出所研究的其他抑制素样品的活性单位。参照物也可用其他抑制素制品。用放免分析法时，则以纯化的抑制素抗原作标准的浓度曲线，定出待测样品中抑制素蛋白的相应量。

二、抑制素的生物分析法

(一) 在体分析法

1. 测定人类绒毛膜促性腺激素诱导的卵巢或子宫重量变化^[1,11]

这种方法的基本原理是：人类绒毛膜促性腺激素(hCG)注射雌性动物后，能刺激内源性

卵泡刺激素 (FSH) 分泌增加,从而引起子宫或卵巢的重量反应性增加;抑制素能抑制 hCG 引起的 FSH 分泌增加,因此减轻了动物子宫或卵巢重量的增加。因而动物子宫或卵巢增重抑制程度反映了抑制素的活性强弱。这种方法通常称作“改良斯蒂尔曼-波莱生物测定法”(Modified Steelman-Pohleg Bioassay)或“逆斯蒂尔曼-波莱分析法”(Reversed Steelman-Pohley Assay)。

测定子宫或卵巢重量的方法具有简便的优点,但可重复性差,特别是抑制素活性较低时就不灵敏。另外,由于该法最终的变化参数是子宫或卵巢的重量变化,而不是直接测定 FSH 的变化,因此对卵泡抑制素来说,由于卵泡液内还含有其他一些因子,如有些能与 FSH 和黄体生成素 (LH) 结合并阻止它们发挥作用的物质,也能抑制卵巢或子宫的重量增加,这就影响了抑制素活性分析的特异性。

2. 测定血清 FSH 抑制值^[15]

测定血清 FSH 抑制值的方法就是将抑制素制剂单次或多次注射动物后,连续取血样测定血清 FSH 值。这种方法是直接测定抑制素对垂体 FSH 释放的抑制程度,定出抑制素的活性。如果用去势动物,则更为敏感,因为动物去势后,去除了性甾体激素对垂体的反馈抑制,垂体细胞呈高分泌状态,血清 FSH 值很高,因此更容易对比观察抑制素的作用。

(二) 离体分析法

1. 垂体组织培养分析法^[16]

垂体或半垂体在体外培养时可释放 FSH 到培养基质中,特别是在促性腺激素释放激素 (GnRH) 刺激后,FSH 分泌更加明显,因而通过观察抑制素制剂对培养垂体组织 FSH 的刺激性分泌的抑制作用,定出抑制素的活性。这种方法比体内分析法特异性高,重复性好,实验条件易于控制。但是垂体组织培养技术本身也有缺点,主要是培养时间过长,会出现垂体组织中心坏死;培养液内的物质不易弥散到垂体组织内等等。

2. 垂体细胞培养分析法^[17]

用酶分散的垂体细胞单层培养分析抑制素的活性,是近年来才建立的新方法,它的基本原理与垂体组织培养相同。垂体细胞培养分析法敏感性高(比其它方法敏感 100—1000 倍),特异性强,剂量效应曲线好;在一次培养时有很多培养孔,因此可分析多个样品,特别适合于大规模筛选抑制素活性碎片。但是垂体细胞的分离培养技术复杂,细胞的单层培养一般要 72 小时以上才能进行试验。此外,细胞在培养液中易受非特异性毒物影响其活性;细胞产生的代谢产物也会影响自身的分泌活动。具体的测定方法又分为如下几种:

(1) 测定刺激性 FSH 分泌^[11,17]: 将垂体细胞单层培养 72 小时后,再与抑制素一起培养 3 天,然后用 GnRH 刺激 6 小时;或用性甾体激素类作为 FSH 的刺激物,最后抽吸出培养基液,测定其中的 FSH 含量。

(2) 测定基础 FSH 分泌^[18,19]: 这种方法是在垂体细胞与抑制素一起培养后,直接抽吸出培养基液,测定 FSH 的含量。由于垂体细胞在未加外源性刺激物时分泌水平低,影响灵敏度。因而, Henderson 等^[19]提出了将垂体细胞溶解,测定细胞内 FSH 含量变化以及同时测定培养基内 FSH 的基础含量和细胞内 FSH 基础含量的方法。由于细胞内 FSH 含量高,因此,提高了灵敏度。

三、抑制素的放免分析法^[20]

近年来,已有许多报道应用放免分析法测定抑制素的含量,通常称作“抑制素样物质的放免分析法”(RIA of ILM)。这种方法测定的是抑制素样蛋白的含量,而不是抑制素的活性。标准抗原常用从人类精浆(也有从卵泡液)中分离纯化出的高纯度抑制素 (HSP-I);第一抗体为兔抗 HSP-I;以羊或猴抗兔的 γ 球蛋白作为第二抗体。HSP-I 用¹²⁵碘标记。放免分析过程与 FSH 等肽类激素相同:先加入¹²⁵碘标记的 HSP-I、第一抗体、标准 HSP-I 或待测样品,4℃ 培育 3 天,然后加入第二抗体,再离心将与抗体结合的¹²⁵碘记 HSP-I 与未结合的¹²⁵碘标 HSP-I

(下转第 414 页)

病毒 β 蛋白的合成,而 γ 蛋白的合成相对增高,认为 β 蛋白的合成减少可能与抑制病毒DNA多聚酶活性有关^[19]。亦有资料表明EBV,CMV的DNA多聚酶对这些三磷酸核苷化合物存在较高的敏感性^[20]。

与dTK一样,病毒DNA多聚酶的活性位点突变亦可导致其对一种或多种核苷类抗病毒化合物的耐药,这可能是耐ACV-TP的HSV-1 DNA多聚酶对DHPG-TP仍然敏感的部分原因。

总之,选择性抗疱疹病毒的核苷类化合物主要是通过病毒编码的dTK,细胞或病毒的dTMPK,细胞NDPK,最终干扰病毒DNA多聚酶活性,从而阻止病毒DNA合成而发挥作用的(如图2↑所示)。

参 考 文 献

- [1] De Clercq, E.: *Biochem. J.*, 1982, **205**, 1.
- [2] De Clercq, E.: *Biochem. Pharmac.*, 1984, **33**, 2159.
- [3] Wagner, M. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 1441.

- [4] Cheng, Y. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, 12460.
- [5] Ericson, A. C. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1985, **27**, 753.
- [6] Cheng, Y. C. et al.: *Molec. Pharmac.*, 1981, **20**, 203.
- [7] Ashton, W. T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, **108**, 1716.
- [8] Plotkin, S. A. et al.: *J. Infect. Dis.*, 1985, **152**, 833.
- [9] Chiou, G. f. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1985, **27**, 416.
- [10] Freitas, V. F. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1985, **28**, 148.
- [11] Cold, D. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1987, **31**, 361.
- [12] Field, A. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 4139.
- [13] Chen, M. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, 1325.
- [14] Fyle, J. A.: *Molec. Pharmac.*, 1982, **21**, 432.
- [15] Frank, K. B. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1985, **27**, 445.
- [16] Hutchinson, D. W.: *IRCS. Med. Sci.*, 1986, **14**, 965.
- [17] Allaudeen, H. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 11879.
- [18] Clair, M. S. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1984, **25**, 191.
- [19] Chun, Y. S. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1987, **31**, 349.
- [20] Brion, K. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 2473.

[本文于1987年8月27日收到]

(上接第435页)

分开,分别测定结合和游离的¹²⁵碘标HSP-I的放射性,算出放射比,通过标准管的放射比制作标准曲线,从而定出样本管的抑制素样蛋白量。

近几年来,抑制素的分析测定都倾向于用离体垂体细胞培养分析法,在体分析法和垂体组织培养分析法已很少采用。放免分析法测定的是抑制素样蛋白的量,而不能完全肯定是具有生物活性的抑制素,因此亦有待进一步弄清抑制素的结构与功能活性的关系,以利扩大它的使用范围。

参 考 文 献

- [1] de Kretser, DM et al.: *The Pituitary and Testis* 1983, **25**, 12.
- [2] Setchell, BP et al.: *J. Endocrinol.*, 1974, **62**, 675.
- [3] Ultee-van Gessel, AM et al.: *J. Endocrinol.*, 1987,

113, 103.

- [4] Seidah, NG et al.: *FEBS*, 1984, **167**, 98.
- [5] Hudson, B. et al.: *J. Reprod. Fert.*, 1979, **26**, 17.
- [6] Eddie, LW et al.: *J. Endocrinol.*, 1978, **78**, 217.
- [7] Frachini, G. et al.: *Nature*, 1963, **199**, 195.
- [8] Cornelia, P. et al.: *J. Endocrinol.*, 1985, **351**, 85.
- [9] Marrs, RP et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1984, **58**, 104.
- [10] Tsonis, CG et al.: *J. Endocrinol.*, 1987, **112**, R11.
- [11] Baker, HWG et al.: *Clin. Reprod. Fert.*, 1983, **2**, 61.
- [12] Forage, RG et al.: *J. Endocrinol.*, 1987, **114**, R1—R4.
- [13] Hillier, SG et al.: *J. Endocrinol.*, 1987, **113**, R3.
- [14] Lee, VWK et al.: *Endocrinology*, 1982, **111**, 849.
- [15] de Jong, WJ et al.: *J. Endocrinol.*, 1987, **113**, 449.
- [16] Hudson, B. et al.: *J. Reprod. Fert. (Supple)*, 1979, **26**, 17.
- [17] Lumpkin, MD et al.: *Endocrinology*, 1984, **114**, 201.
- [18] de Jong, FH et al.: *J. Reprod. Fert. (Supple)*, 1979, **26**, 47.
- [19] Scott, RS et al.: *Endocrinology*, 1980, **7**, 389.
- [20] Slambay, SA et al.: *J. Endocrinol.*, 1984, **103**, 389.

[本文于1987年9月23日收到]