

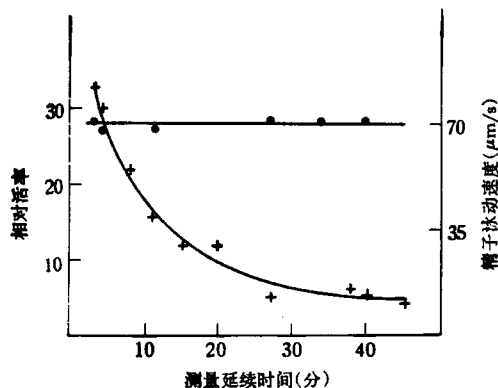


图3 精子的相对活率和泳动速率随时间变化
● 为未加甲酸棉酚 + 为加甲酸棉酚

五、结果分析

1. 未加甲酸棉酚时, 精子的泳动速率在 45 分钟内基本不改变, 说明生命力强的精子其泳动速率保持不变。

2. 在 45 分钟的实验时间内相对活率下降

约 90%, 如果不加甲酸棉酚, 精子在 45 分钟内相对活率下降小于 10%, 可见甲酸棉酚使精子致死能力极强。

3. 在实验过程中用显微镜观察到, 精子只要与甲酸棉酚颗粒接触, 即停止运动死亡。

以上实验初步可以认为甲酸棉酚能直接使精子致死, 且杀伤力极强。但它如何作用于精子, 其杀伤机理, 还需进一步探讨。

本工作是中国科学院生物物理所沈淑敏教授指导下进行的。特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Nossal, R.: *Opt. Commun.*, 4, 35, 1971.
- [2] Berne, B. J. et al.: *Biophys. J.*, 14, 865, 1974.
- [3] Shimizu, H. et al.: *Bio-med. Eng.*, 24, 153, 1977.
- [4] Jouannet, P. et al.: *Prog. reproduc. Biol.*, 1, 28—35, 1976.
- [5] Herpigny, B. et al.: *J. Phys.*, 40, 1085, 1979.
- [6] Hallett, F. R.: *Biophys. J.*, 21, 203, 1978.
- [7] Shimizu, H. et al.: *Biophys. J.*, 29, 167, 1980.

[本文于1984年12月5日收到]

正常细胞和肿瘤细胞纤维蛋白溶酶原 激活物活性的比较

刘朵花 张贺忠 何健 李崇熙 叶蕴华

(中国科学院生物物理研究所, 北京) (北京大学化学系)

PA 是一类蛋白水解酶, 它可以把血液中的纤维蛋白溶酶原 (PGN) 激活成纤维蛋白溶酶 (PN). PN 也是一种蛋白水解酶, 它可以把纤维蛋白凝块水解成可溶性的产物, 它对由赖氨酸或精氨酸的羧基形成的肽键有专一性。

正常细胞用化学致癌物。肿瘤病毒等转化之后, 纤维蛋白溶酶原激活物 (PA) 的活性可以提高几十倍, 甚至上百倍^[1-4]。

Philip, L. Carl 等^[2]根据肿瘤细胞 PA 活性较高这一特点, 正在研制一种选择性杀伤肿瘤细胞的新型抗癌药。即把具有一般杀伤作用但

无选择性的且含有氨基的抗癌药, 接上一个含有赖氨酸或精氨酸的三肽, 成为对正常细胞和肿瘤细胞杀伤作用都很低的“抗癌药前体”。在体内, 当它运行到 PA 活性高的肿瘤组织时, 其三肽可被 PN 切下来, 使原来的抗癌药恢复强大的杀伤作用; 而在 PA 活性低的正常组织中, 抗癌药前体不变, 无毒性或毒性很低。

我们的实验是根据纤维蛋白原在凝血酶的作用下, 形成不透明的纤维蛋白凝块, 而在纤维蛋白原中杂有的 PGN 被 PA 激活成 PN. PN 可把纤维蛋白切成小肽, 使凝块溶解成透明状。我们用此法测定 PA 的活性, 并比较它们在正

常细胞和肿瘤细胞内的水平,为抗癌药前体的应用提供一定的依据。

一、材料和方法

1. 试剂 纤维蛋白原 (f)(Sigma), 凝血酶 (T)(Sigma), 琼脂糖(上海东海制药厂), 尿激酶 (uk, 卫生部药品生物制品检定所), “772”培养基(上海东风试剂厂)。

2. 癌细胞 EAT (从中国科学院遗传所引种), H_{22} (腹水肝癌), u_{14} (腹水型子宫颈癌), S_{180} (腹水型肉瘤) 分别从中国医学科学院基础所、药物所、中医研究院中药所和北京市肿瘤所引种。

小鼠腹水肿瘤细胞: 腹水取出后, 离心。上清液和细胞分别留作点样用。

正常细胞: 小白鼠断头放血, 取出所要的组织, 按组织重量 (mg): 制胶液体积 (ml) = 1:1 匀浆; 制胶液的组成为“772”: 磷酸盐缓冲液 (0.1M, pH7.4) = 17:1, 离心, 取沉淀留作点样用。

3. 制胶 根据文献[5—7]的方法, 稍作修改。将 0.50g 琼脂糖放入 25ml 的制胶液中, 加热融化后, 冷至 65℃, 将它与 25ml 0.4% 的人纤维蛋白原 (杂有 PGN) 混合, 再加入 50 单位凝血酶, 倒入灭菌的培养皿中, 置室温下形成 5mm 厚的凝胶, 即成“标准平板”。把此平板置于 85℃ 温箱中加热 30 分钟, 使 PGN 失活, 就成“加热平板”。在制好的平板上, 打 5—6 排直径约 3mm、间隔 20mm 的小孔。其中一排点不同单位数的标准样品, 用做标准曲线, 其余各孔点待测定的样品 30—50 μ l。将平板置于 37℃ 温箱中保温 6 小时, 然后放在室温过夜, 次日晨放入温箱, 待溶圈明显后照相, 并量出溶圈的直径。以最大直径 (D_1) 和最小直径 (D_2) 的乘积表示纤维蛋白溶解活性的大小。以 UK 的浓度为横坐标, 各点的直径乘积为纵坐标, 在双对数纸上作出 UK 的标准曲线。根据所测样品溶圈的直径乘积 (纵坐标) 在标准曲线上找出相应的 UK 浓度 (横坐标), 从而得知各样品的 PA 水平。

二、结果与讨论

1. 肿瘤细胞的 PA 活性

小白鼠的四种腹水型肿瘤细胞均不同程度地具有 PA 活性 (见图 1A 和 B)。其活性强弱依次为 $H_{22} > S_{180} > EAT > U_{14}$ 。

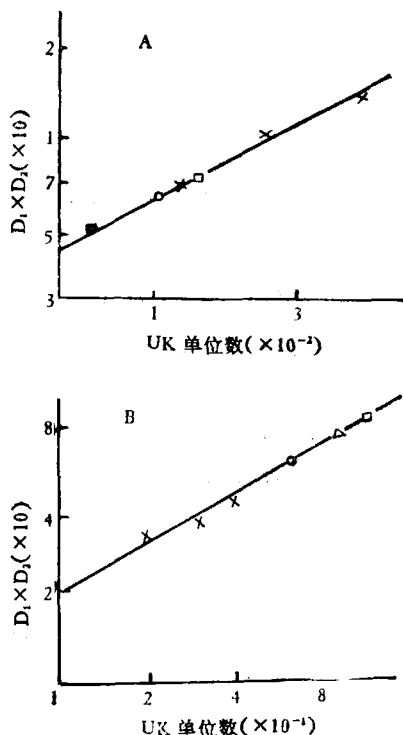


图 1 肿瘤细胞 PA 活性的比较

各种癌细胞都点 30 μ l, X: UK 各点溶圈 $D_1 \times D_2$ 的值。
□: H_{22} 细胞; ■: U_{14} 细胞; △: S_{180} 细胞; ○: EAT 细胞。

新鲜的腹水离心后, 分别将其上清液和细胞点于标准平板上。在点细胞的平板周围出现很大的溶圈, 而点上清液处产生的溶圈很小, 这说明 PA 活性主要在腹水的肿瘤细胞部分。

PA 是一种类似于尿激酶的蛋白水解酶, 它间接水解纤维蛋白时依赖于 PGN 的存在。PGN 在 85℃ 保温 30 分钟后, 完全失活^[8]。我们把癌细胞点在加热平板上, 未见有溶解纤维蛋白的活性, 这表明标准平板上的溶解活性确实是 PA 的作用, 不是其他不需 PGN 的蛋白水解酶的作用 (图 3)。

两块平板点相同的上述样品, 在标准平板

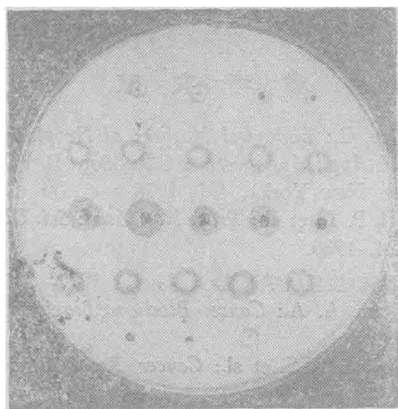


图2 肿瘤腹水上清液和细胞的 PA 活性比较

H₂₂ 腹水离心 (2500 转/分) 5 分钟后, 第 1 排每孔点其上清液 40μl; 第 2 排点 H₂₂ 细胞 40μl; 第 3 排是 UK, 点样量依次为 0.250、0.500、0.750、2.000、1.250 单位, 第 4 排点 U₁₄ 细胞, 每孔 40μl; 第 5 排点 U₁₄ 腹水上清液, 每孔 40μl. 37℃ 保温 6 小时, 放置室温过夜 (14 小时), 再放在 37℃ 保温 2 小时, 取出照相。

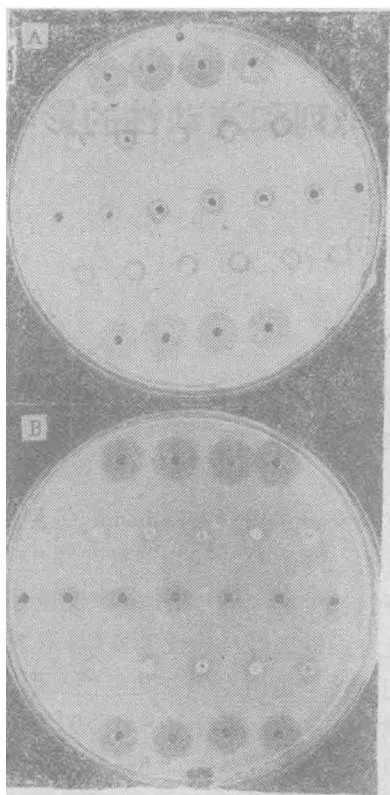


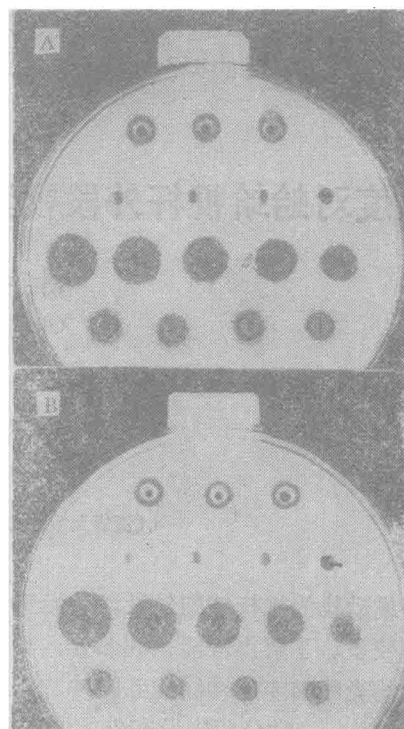
图3 平板加热或不加热与溶解活性

第 1、第 5 排每孔点胰蛋白酶 10μg; 第 2 排点 H₂₂ 细胞 20μl; 第 3 排点 UK 0.05、0.100、0.150、0.200、0.150、0.100、0.050 单位; 第 4 排点 FAC 腹水细胞 20μl。

上均表现出溶解活性, 但在加热平板上只有胰蛋白酶有明显的溶圈。

2. 正常细胞的 PA 活性

在我们的实验条件下, 测出肝癌细胞中的 PA 活性很高, 而正常肝组织则测不出 PA 的活性; 正常血液、骨髓、肌肉也都测不出 PA 的活性。血液必须经过酸化处理之后才能测出 PA 的活性^[9]。有些正常组织如肾、肺、脑等也有较高的 PA 活性, 但它们受激素等调节。有人报道^[10], 生理浓度的糖皮质激素就可以完全抑制正常细胞的 PA 活性, 而癌细胞中的 PA 活性不受糖皮质激素影响。这类起调节作用的物质将来有可能成为新型抗癌药的佐剂, 用它扩大正常细胞和肿瘤细胞在 PA 活性方面的差别, 以便提高抗癌药的选择性杀伤癌细胞的功效。



A. 不加抑制剂 B. 加抑制剂

图4 糖皮质激素对癌细胞和正常组织(肾)的 PA 活性的抑制作用

A、B 是两块相同的标准平板, 点样品也相同, 只是 B 板的制胶液中含有 1mg/L 氟美松。两板第 1 排每孔点 H₂₂ 细胞 30μl; 第 2 排是空白; 第 3 排点 UK, 依次为 0.625、0.500、0.375、0.250、0.125 单位; 第 4 排点肾匀浆液 30μl。从图 A 和 B 中可以看出, 氟美松对癌细胞的 PA 活性影响不大, 而对正常组织(肾)的 PA 活性有明显的抑制作用。

3. 我们的实验结果证明, 四种肿瘤细胞都有较高的 PA 活性, 肝癌细胞中尤其高, 而正常肝组织则测不出。几种正常细胞如血液、骨髓、肌肉等 PA 活性甚低或者没有。这就为用“抗癌药前体”选择性杀伤癌细胞的设想提供了依据。某些正常细胞例如肾、肺、脑等也有较高的 PA 活性, 但一些激素类物质对正常细胞的 PA 具有选择性的抑制作用^[10], 从图 4A 和 B 中可以看出, 氟美松对癌细胞的 PA 活性影响不大, 而对正常组织(肾)的 PA 活性呈明显的抑制($X_1 = 48.48 \pm 1.05$; $X_2 = 31.24 \pm 1.86$; $P < 0.01$)。这有助于加强该药的选择性。我们的结果表明骨髓和血液中 PA 活性很低, “抗癌药前体”在这里不会被激活, 无毒性, 这就可以避免一般抗癌药常有的对造血系统的毒害作用。

总起来看, 用“抗癌药前体”选择性杀伤肿瘤细胞的设想有一定的实验根据, 在一定范围

内, 有较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Reich, E.: *Biological Markers of Neoplasia: Basic And Applied Aspects* (ed Ruddon R. W. Elsevier. New York), 491, 1978.
- [2] Carl, P. L. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 77, 2224, 1980.
- [3] 周爱如《生理科学进展》, 11, 41, 1980。
- [4] Hakim, A. A.: *Cancer Biochem. Biophys.*, 5, 63, 1980.
- [5] Tucker, W. S. et al.: *Cancer Research*, 38, 297, 1978.
- [6] 叶智彰等:《动物学研究》, 2, 33, 1981。
- [7] 徐康森等:《药检工作通讯》, 9, 241, 1979。
- [8] Lassen, M.: *Acta Physiol. Scand.*, 27, 371, 1953.
- [9] Liliana Ossowski, et al.: *J. Biol. Chem.*, 249, 4312, 1974.
- [10] Roblin, R.: *Biological Markers of Neoplasia: Basic And Applied* (ed. Ruddon R. W. Elsevier) New York, 421, 1978.

【本文于1983年11月21日收到】

温度对蛤蚧视杆外段视紫红质分子的排列和流动性的影响

胡 坤 生 孙 其 坚

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

赵 东 坡

(山东省中医药研究所, 济南)

赵 南 明

(清华大学近代生物学及生物医学工程研究所, 北京)

脊椎动物的视杆细胞外段, 是光感受器中研究得较多、了解得较清楚的部分, 其功能是把吸收的光线转变成神经的电脉冲。脊椎动物的视杆细胞, 通常分成内段和外段两部分。外段中, 大约有 90% 的细胞膜区域是由许多盘膜堆积而成的。因种类的不同, 盘膜的数量在 500—2000 个之间。盘膜中类脂和视紫红质分子的排列较规则。Schmidt^[1] 和 Liebman^[2] 等测定视杆外段视紫红质分子的双折射时, 发现在正常条件下, 暗适应视杆细胞外段正的本质双折射大于负的形状双折射, 也就是说总双折

射是正值。Schmidt^[1] 和 Denton^[3] 等测量细胞视杆外段的二向色性, 证明视紫红质生色团垂直于视杆的长轴排列; Liebman^[4] 测量了青蛙视杆细胞外段的二向色性比为 6 (与双折射一样, 二向色性也是由本质二向色性及形状二向色性组成); Cone^[5] 观察到由偏振闪光诱导的蛙网膜中的瞬间二向色性。Brocon^[6] 观察到蛙网膜用戊二醛固定时轴二向色性的诱导, 从而表明视红质分子在盘膜中存在着自由旋转运动。随后 Poo^[7], Liebman^[8] 和 Edidin^[9] 等又发现了视紫红质分子在盘膜中的侧向扩散运