

L REEDA 丛书

家畜生殖内分泌学

研究方法 及 原理

张家骅 编著



天厨出版社

家畜生殖内分泌学

研究方法及原理

(LREEDA 丛书)

张 家 骅

一九九三年

天 则 出 版 社

家畜生殖内分泌学研究方法及原理

张家驹 编著

天则出版社出版发行

(陕西·杨陵)

陕西省新华书店发行

西北农业大学印刷厂印刷

开本：850×1168mm 1/32 印张6 字数：150千字

1993年6月第1版 1993年6月第1次印刷

印数 001—700 册

ISBN 7—80559—174—1/S·82 定价：8.95元

序 言

这是一本系统汇集和论述家畜生殖内分泌学研究方法及原理的专著，暂定名为《家畜生殖内分泌学研究方法及原理》。

内分泌学研究应该说最早起源于人们对摘除性腺的认识。经典的内分泌学研究方法除了对内分泌器官进行大体描述外，还通过对内分泌器官摘除、植入或注射被摘除器官的提取物来对某种器官的功能进行研究。以后，由于越来越多先进仪器的应用，影响代谢和激素作用药物的出现，处理动物、采集样品和测定方法的改进，已经使内分泌研究从器官组织水平发展到细胞分子水平，使对激素的定性研究发展成为定量研究，从而使内分泌学在医学中发展成为一门相当精确的学科。

生殖内分泌学在整个内分泌学中一直占有很大的比重，除了大鼠、小鼠、家兔和犬等小动物外，家畜（特别是绵羊）一直是生殖内分泌研究中经常使用的实验动物。由于人们几乎可以不受限制地对家畜进行各种处理，或者使用任何内分泌器官的组织、细胞进行体外培养，因此，在某些研究领域，比如环境和季节变化对生殖功能的影响，黄体不同细胞的结构和功能，黄体分泌催产素的作用，卵巢和子宫的相互关系以及黄体溶解机理等，人们对家畜的了解比对人的了解还多。家畜生殖内分泌学已经为兽医学产科学和家畜繁殖学提供了重要的基础理论，并成为解决诊断、治疗问题和提高繁殖生产力的重要手段。

研究方法的改进是内分泌研究迅速发展的基础。目前所采用的各种方法至少涉及到生理学、药理学、病理学、免疫学、免疫化学、生物学、生物化学、发育生物学、分子生物学、外科手术

学、物理学、统计学和数学（特别是计算机技术）的知识。本书试图在动物处理、样品采集和测定，以及数据处理等方面，系统地讲述当前国内外，特别是本实验室常用的家畜生殖内分泌研究方法及其原理。主要内容涉及到组织细胞学、药理学、体外培养、激素免疫、激素和受体测定以及数据处理方法等知识。由此可见，生殖内分泌学研究方法涉及现代交叉学科知识，它一方面可以体现家畜生殖内分泌学发展水平；另一方面又广泛渗透于其它学科领域，反映了家畜生殖内分泌学的研究方法随着其它科学技术的发展日益提高。本书主要服务对象是研究动物生殖生理和生殖内分泌的科研人员、大专院校师生、研究生以及从事动物繁殖和疫病防治的基层畜牧兽医工作者。

家畜生殖内分泌研究方法的发展迅速、涉及范围广。在本书中尚未包括一些正在兴起的先进技术和一些属于其它学科的专门技术，比如重组DNA、基因工程、层析、电泳、单克隆抗体等技术。本书曾作为讲义在小范围内发行，得到同行专家的鼓励并提出宝贵意见，现已改编成书，希望能对动物生殖内分泌学研究和应用生殖内分泌学知识提高动物繁殖力有所帮助。

西北农业大学

农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放性实验室

(LREEEDA)

张家骅

一九九三年二月

目 录

序 言

- 第一章 组织细胞学研究和体外培养**..... (1)
 - 第一节 组织细胞学方法..... (1)
 - 第二节 放射性自显影术和放射性同位素示踪法..... (2)
 - 第三节 药理学方法..... (9)
 - 第四节 组织和细胞的体外培养..... (13)
- 第二章 家畜生殖内分泌研究的常用手术方法**..... (20)
 - 第一节 内分泌器官的摘除和损伤..... (20)
 - 第二节 内分泌器官的移植和血管吻合..... (25)
 - 第三节 血管和器官导管应用..... (31)
- 第三章 激素免疫**..... (37)
 - 第一节 激素抗血清的制备..... (37)
 - 第二节 激素主动免疫和被动免疫在家畜生殖内分泌研究中的应用..... (42)
- 第四章 家畜生殖激素测定**..... (46)
 - 第一节 配基结合测定和放射免疫测定..... (46)
 - 第二节 放射性同位素的选择及液体闪烁计数器的计数原理..... (58)
 - 第三节 放射免疫测定所需试剂及配制方法..... (64)
 - 第四节 标准曲线的制作和样品含量的计算..... (86)
 - 第五节 放射免疫测定的质量控制..... (99)
 - 第六节 样品的采集、处理和保存..... (109)
 - 第七节 血中类固醇激素的放射免疫测定..... (116)

第八节	乳中类固醇激素的放射免疫测定	(125)
第九节	多肽和蛋白类激素的放射免疫测定	(130)
第十节	影响放射免疫测定结果的主要因素	(138)
第十一节	生殖激素的酶免疫测定(EIA)和荧光免疫测定(FIA)	(141)
第十二节	生殖激素的生物学测定法	(148)
第五章	放射受体测定	(154)
第一节	供受体测定用样品的制备	(155)
第二节	受体测定步骤	(156)
第六章	峰值、分泌率和代谢清除率的计算	(166)
第一节	峰值、频率和基础水平的计算	(166)
第二节	分泌率和代谢清除率	(174)

附 录

一、	各种物质在体内循环水平	(177)
二、	^3H 衰变表	(179)
三、	十进位数量词首及符号	(180)

参考文献

第一章 组织细胞学研究和体外培养

最早的内分泌学研究仅涉及器官的大体解剖和形态描述。随着光学显微镜、扫描电镜和电子显微镜的问世、放射性自显影等技术的出现以及各种药理学方法和体外培养技术的发展，使人们对内分泌器官中各种类型细胞的起源、定位、形态、结构和功能有了比较清楚的认识。

第一节 组织细胞学方法

对器官的大体观察只能对器官的解剖位置、大小、血管和神经的分布以及腺体大小的异常变化进行描述。光学显微镜问世后，德国、意大利和欧州其它许多国家的细胞学家首先对内分泌器官的细微结构进行了研究。染色方法逐渐改进，为细胞学的研究提供了更加完美的手段。比如，苏木精可以使细胞内嗜硷性物质（如DNA和RNA的磷酸盐）着兰色，而伊红是酸性染料，它可以使细胞内嗜酸性物质着色。同时使用这两种染料，细胞核常显兰色，而细胞质显粉红色。采用一系列特殊染色法，比如选用一些对不同糖蛋白有特殊亲合力的染料，还可以区分垂体中不同类型的细胞。在对内分泌器官的细胞结构研究中也发现了一些一般性的规律，即分泌蛋白和多肽激素的细胞大多具有大量粗面内质网和不可提取的类脂滴；而分泌类固醇激素的细胞内滑面内质网多，而粗面内质网较少，并存在可提取的类脂滴。细胞功能亢进的细胞，内质网和高尔基复合体增加；功能低下的细胞含有大量浓缩的细胞质，缺乏合成功能。

对羊、猪、牛等家畜和灵长目动物猴以及人黄体内两类黄体细胞（大、小黄体细胞）结构和功能的研究成果，是80年代生殖内分泌学研究领域中的重大进展。虽然早在1919年，Corner就记述了猪黄体细胞在大小和形态上存在差异，但对两类黄体细胞的结构和功能进行系统研究仍然是近年极受重视的课题。尽管目前对一些问题尚未完全了解，但普遍认为，反刍动物大黄体细胞源于卵泡的颗粒细胞；小黄体细胞源于卵泡的内膜细胞。在形态上，大黄体细胞体积大（大约 $13-15\mu\text{m}^3 \times 10^{-3}$ ），呈多面体，核呈圆形或卵圆形，细胞核/质比 $\cong 1:27$ ；小黄体细胞体积小（大约 $2.1\mu\text{m}^3 \times 10^{-3}$ ），直径仅为大黄体细胞的 $1/2$ （分别为 16 和 $30\mu\text{m}$ ），呈长形或纺锤形，细胞核/质比 $\cong 1:8$ 。在结构上，大黄体细胞具有分泌蛋白和多肽类激素细胞的典型结构，而小黄体细胞则具有分泌类固醇细胞的典型结构。大黄体细胞产生大量催产素；大、小黄体细胞分泌孕酮的机理和在黄体溶解时所起的作用不同，这些发现都与大、小黄体细胞所具有的 $\text{PCF}_2\alpha$ 、 E_2 和 LH 受体数量不同相一致。对黄体细胞的深入研究，已经极大地促进了对黄体溶解机理的了解。

第二节 放射性自显影术和 放射性同位素示踪法

利用放射性核素产生的核射线能使乳胶感光的特性，使放射性核素处理的动物标本在乳胶中显出影像，以显示放射性物质的分布，定位和定量的方法，称为放射性自显影术。利用放射性同位素及其化合物与其相应的非放射性元素及其化合物具有相同的化学性质和生物学性质以及不同的核物理学性质这一特点，用放射性同位素及其化合物替代相应的非放射性物质处理动物后，采

用不同的放射性探测仪器，追踪放射性标记物质在体内或体外的位置、数量及其转运方式的方法，称为放射性同位素示踪法。

一、放射性自显影术

在内分泌学研究中，主要是利用放射自显影术检测定位性和灵敏度高的特点，精确地确定放射性物质在特殊器官、细胞及细胞器中的存在及分布。这一方法目前已经普遍地应用于研究丘脑下部、垂体和性腺分泌激素对靶器官的作用，激素对丘脑下部和垂体的反馈作用或丘脑下部特殊核团的定位等研究。

(一) 放射性标记化合物的选择

适用于生物学放射自显影的核素种类较多，如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等。一般说来，放射低能 β 粒子的核素如 ^3H 、 ^{14}C 等更适于光学显微放射自显影和电子显微放射自显影的应用。在对生物内有机物的合成、分布和代谢研究中，要注意选择标记前体。如研究下列物质常用的前体有：

DNA：多用 ^3H —胸腺嘧啶核苷或 ^{125}I —脱氧尿嘧啶核苷；

RNA：用 ^3H 或 ^{14}C —胞嘧啶核苷；

蛋白质：用 ^3H 或 ^{14}C —精氨酸或赖氨酸标记硷性蛋白质，用色氨酸、缬氨酸或 ^{35}S —蛋氨酸标记酸性蛋白质；

多糖：用 ^3H —D—葡萄糖、 ^{14}C —6—D—葡萄糖；

脂类：用 ^3H 、 ^{14}C 标记的多种脂肪酸、甘油及类固醇。

需要注意的是，在使用电子显微放射自显影术时，由于电镜切片太薄，要求标记物具有较高的比强度。

(二) 制备放射自显影的基本方法

制备自显影的方法较多、主要有接触法、液体乳胶法和脱基乳胶法。前两种方法简单、有效、应用广泛。高分辨率的电镜自显影术要求制备单层乳胶膜，使银粒紧密接近而不重叠，以便当射线穿透溴化银结晶时只使其银粒曝光，而不致使影像弥漫泛化。

1、接触法 此法是在暗室中将含有放射性的整体或扁平器官标本与乳胶表面紧密接触，使乳胶接受标本中放射出的放射性粒子（曝光）。曝光后将胶片与标本分开，经显影、定影处理后直接用肉眼或放大镜观察。这种方法多用于整体宏观自显影。具有简单、迅速、标本予处理少和放射性损失不大等优点；但其分辨率差，且不易将标本与自显影影像重合。

2. 液体乳胶法 将液状核子乳胶以浸蘸或滴涂方式，涂布在切片或不规则的标本（如骨骼）上。干燥后经曝光、显影、定影处理、制成永久附着在标本上的自显影像。

（1）浸蘸法，将装有切片并经脱腊处理的载片浸入液状乳胶中，提起后待多余乳胶滴去，用湿毛巾将载片背面乳胶擦去，晾干后装入暗盒曝光。

（2）滴涂法，用滴管将液化乳胶滴到脱腊载片的面，用玻棒将乳胶铺匀，晾干后装入暗盒曝光。

液体乳胶法使乳胶和标本充分接触，分辨率高、操作简便，缺点是乳胶厚度可能不匀。

（三）放射自显影术的种类

根据计划制作的标本和要求达到的分辨率的不同，可将放射自显影术分为宏观、光学显微、电子显微放射自显影术三种。

1. 宏观放射自显影术 这种方法主要用于对整体动物或个别器官进行自显影，即在一张自显影片上显示整体或器官中的放射性分布。这种方法一般采用X光胶片，按接触法进行自显影。其分辨率不高，一般只能达到毫米水平，在内分泌学研究中不常用。

2. 光学显微放射自显影术 这种方法使用显微镜观察切片上包被的乳胶影像，将放射自显影术和光学显微技术相结合，其分辨率可达微米水平。由于它将生物组织切片和核子乳胶显影结合起来观察，因此可以准确地显示放射性物质在组织学水平上的分布，定位和定量。切片按常规的组织切片技术制作，厚度一般

在6—10 μm 之间，乳胶涂布采用浸蘸法或滴涂法，但在涂布乳胶之前，必须彻底脱脂。在光学显微镜下观察银粒数目或径迹数目，在透射光明视野下显微银粒呈黑色圆点；在落射光暗视野下反射为亮点。

3. 电子显微放射自显影术 这种方法利用了电镜的高分辨能力以显示普通光学显微镜不能察知的细微结构与自显影银粒的关系。由于这种方法要求切片（600—800埃）和乳胶层（单层银粒乳胶膜）极薄，因此可能使敏感度下降；如果增加放射性示踪物剂量，又可能损伤机体。

单层银粒乳胶膜应选用颗粒较小的核子乳胶（如国产HW—4乳胶）制作，其方法如下；

（1）环套法，将核子乳胶在40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中融解后，在室温下放置15—20分钟使之成粘胶状；以连在玻棒顶端、用白金、银或镍等金属丝绕成直径约2cm的环浸入乳胶中，轻轻提起，环内形成的乳胶膜即单层银粒乳胶膜，将其小心套在载网切片上即可。

（2）泡盖法，用带吸头的滴管吸取少量液化乳胶，反复挤出多次，直至滴管下端形成一个较薄的泡时，将泡复盖在切片上，使泡自行破裂。

在电镜下观察， ^3H 发射的 β 粒子打到单层银粒上轨迹呈点状。可以选择细胞上一定面积进行单位面积银粒计数。

（四）放射自显影术与其它分析方法结合使用

放射自显影术与薄板层析，纸带层析等方法结合，可以跟踪放射性标记物质的浓度变化和代谢途径。

Granstrom和Kindahl（1982）在比较研究大鼠、兔、豚鼠、牛和羊PGF $_{2\alpha}$ 代谢情况时，用放射性强度为15Ci/mMol的〔 9β — ^3H 〕PGF $_{2\alpha}$ 对这些动物静脉注射，注射剂量分别为：大鼠50 μCi 、兔100 μCi 、豚鼠50 μCi 、牛300 μCi （体重150kg）、羊

250 μ Ci (体重20—22kg)。在注射后1—2、10和20min分别从静脉采集血样，用SEP—PAK提取后进行双向薄板层析，再使用LKB Ultrafilm 3 H乳胶片进行放射自显影(总放射性为150,000—300,000 dpm, 曝光时间7—8周)。其结果表明,在各种动物中最早出现的代谢物是PGFM, 之后各种动物降解产物出现的速

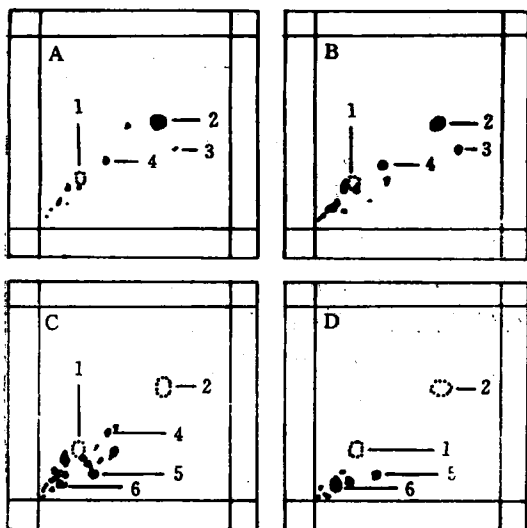


图1—1 兔(A、B、C)和羊(D)静脉注射〔9 β - 3 H〕PGF $_2\alpha$ 后1—2(A)、10(B)和20(C和D)min血浆经SEP—PAK提取、双向薄板层析和放射自显影后获得的自显影影像

1. Prostaglandin F $_2\alpha$
2. 13, 14-dihydroxy-15-keto-prostaglandin F $_2\alpha$ (PGFM)
3. 6-lactone of 5 α , 7 α -dihydroxy-11-ketotetranor prostanoic acid
4. 5 α , 7 α -dihydroxy-11-ketotetranor prostanoic acid
5. 5 α , 7 α -dihydroxy-11-ketotetranoprostane-1,16-dioic acid
6. 5 α , 7 α -trihydroxytetranoprostane-1,16-dioic acid

度有区别。在兔和羊很快出现大量极性二羧酸 ($5\alpha, 7\alpha$ -dihydroxy-11-ketotetranoprostanic-1,16-dioic acid 和 $5\alpha, 7\alpha$ -trihydroxytetranoprostanic-1,16-dioic acid (参见图 1-1), 而在牛、大鼠和豚鼠, PGFM 及其配对物 $5\alpha, 7\alpha$ -dihydroxy-11-ketotetranoprostanic acid 在采样期间一直是重要的代谢产物。

二、放射性同位素示踪法

同位素示踪法具有灵敏度高 (可测出 10^{-14} — 10^{-18} 克放射性同位素), 测量方法简便 (直接探测放射性计数) 等优点, 因此可以使用极少量示踪剂, 在不改变动物机体原来的生理、病理条件下进行实验研究。但是, 这种方法也存在局限性, 除了需要昂贵的核探测仪器外, 还需要一定的安全防护设施。有的元素 (如氧和氮) 尚无适当的放射性同位素可供选择, 在一定程度上也限制了这种方法的使用。

(一) 放射性示踪物的选择

根据实验的内容、目的和实验周期的长短, 并考虑放射性示踪物的化学性质、半衰期、比放射性和探测仪器的性能, 选择适当的放射性示踪物。

示踪物的剂量主要从需要进行放射计数的样品考虑, 一般讲应使样品的放射性计数不低于 2 倍本底计数。同时也要考虑到保持每公斤体重平均分得的放射性量不超过安全示踪剂量, 以保证机体代谢不受放射性物质的射线影响。某些放射性同位素的安全示踪剂量如 (表 1-1)。

(二) 放射性示踪剂的引入和实验动物的管理

根据实验目的和示踪剂的物理、化学性质, 可采用灌喂、注射和吸入等方式引入体内。

引入放射性物质的动物必须置于易清污的代谢笼等装置内,

表1—1 某些同位素的安全示踪剂量

同位素	辐射形式	半衰期	安全示踪剂量 ($\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 体重)
^{32}P	β	14.3日	1.19
^{35}S	β	87日	13.25
^{14}C	β	5760年	13.00
^{42}K	$\beta \cdot \gamma$	12.5小时	3.94

不能与非放射性实验动物混养或敞放。进入体内的放射性物质可经粪、尿、呼出的气体、唾液和体表排出体外。排泄物要认真收集，一是为了防止污染物的扩散；在有些专门研究消化、排泄、气体交换的实验中，更是为了避免测定误差。

(三) 样品的放射性测定

对发射弱 β 射线的核素如 ^{14}C 、 ^3H 和 ^{35}S 等用液体闪烁计数器探测，对发射 γ 和强 β 射线的核素可用气体探测器和闪烁探测器探测。标本的处理方法可参阅本书第四章放射免疫测定有关内容。测定结果一般表示为1g(或1mg)组织或1ml体液每分钟脉冲数。

Granstrom和Kindahl(1982)用〔 9β — ^3H 〕 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 注射人、牛、羊、大鼠、兔和豚鼠后测定了血中放射性物质在体内消失的速率(图1—2)。其计量单位以测得的放射性量相当于理论最大值的百分数来表示，理论最大值以注入各种动物体内的总放射量按平均分配到该种动物全部血浆所应达到的浓度来表示。

1985年Heap等人用〔 9 — ^3H 〕 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($14.8\mu\text{Ci}/\text{mMol}$)连续60min灌注羊子宫淋巴管($0.66 \pm 0.15\mu\text{Ci}/\text{min}$ 、 $15.7\text{ng}/\text{min}$)，子宫静脉($0.49 \pm 1.13\mu\text{Ci}/\text{min}$ 、 $1.18\text{ng}/\text{min}$)或子宫腔($10\mu\text{Ci}$)后，连续从子宫淋巴管，子宫卵巢静脉和颈动脉采样，提

取后使用薄层色谱板技术，用Panax薄层放射色谱图扫描仪(Panax thin-layer radiochromatogram scanner)进行色谱分析，刮取宽为1 cm的条带测定放射性活性(dpm/ml)。实验证明， $[9\beta-^3\text{H}] \text{PGF}_{2\alpha}$ 可以经子宫淋巴管转移到同侧卵巢、黄体 and 卵巢静脉。

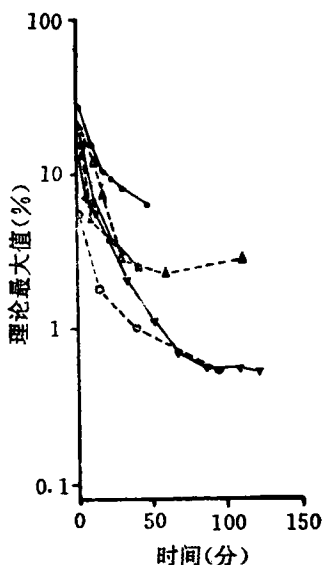


图1—2 人(●)、牛(△)、大鼠(■)、羊(▲)、兔(▼)和豚鼠(○)静脉注射 $[9\beta-^3\text{H}] \text{PGF}_{2\alpha}$ 后，放射性物质在血浆中消失的速率

第三节 药理学方法

许多外源性化学物质可以与细胞分子物质相互作用，改变细胞的生理活性，因此常被用来研究细胞的内在生理活性或者研究化学物质刺激或抑制细胞生理作用的机理。例如，心糖苷如乌木

昔 (Ouabain) 常用于抑制原生质膜上 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵; 乌木昔还可以促进和抑制某些激素的分泌。因此, 激素分泌的机理可能涉及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP酶自主运转系统功能。还有很多化学物质是细胞内酶活性抑制剂, 其中重要的一类是甲基黄嘌呤, 如茶碱和咖啡因, 它们是磷酸二酯酶的抑制剂。这类药物由于能升高细胞内 cAMP和cGMP水平, 因此能模拟不少激素的作用。

还有许多代谢抑制剂, 它们能影响ATP的生成。碘乙酸可以阻断糖元酵解; 二硝基苯酸 (DNP) 抑制氧化磷酸化过程; 寡霉素 (Oligomycin) 抑制腺粒体中ADP磷酸化为ATP; 一种类似葡萄糖的物质 2—脱氧葡萄糖 (2—Deoxyglucose) 可以降低细胞内葡萄糖的利用速度。这些抑制剂都可以用来研究糖酵解或三羧酸循环对细胞功能的影响。

一种植物碱秋水仙素与微管上蛋白亚单位 (微管蛋白, Tubulin) 结合可抑制微管的集合。其它微管抑制剂还有长春花碱 (Vinblastine) 和长春花新碱 (Vincristine)。秋水仙素可以抑制胰岛素的分泌, 说明胰岛素的分泌与微管功能正常有关。细胞松弛素B (Cytochalain B) 是一种真菌的代谢物, 能干扰微丝的功能而对微管的完整性无作用。细胞松弛素B也是不少激素分泌的抑制剂, 说明微丝和微管都与某些激素的分泌有关。

放线菌素D (Actinomycin D) 在细胞核水平上抑制RNA的产生; 嘌呤霉素 (Puromycin) 和放线菌酮 (Cycloheximide) 抑制蛋白质的合成。因此, 放线菌素D对激素作用的抑制是反应了RNA的转录过程受到抑制; 而后两种物质对激素作用的抑制只是干挠了蛋白的合成。

一种特异的有机离子能透过生物膜并将其它离子带入细胞, 这种离子被称为离子载体 (Ionophores)。离子载体A23187是非常特异的 Ca^{++} 离子载体, 因为许多激素激活细胞的过程都涉及 Ca^{++} 离子的转运, 因此A23187常被用于激素在细胞水平上作用