

HARBIN
MEDICAL
UNIVERSITY

哈爾濱醫科大學

建校四十周年專輯



哈尔滨医科大学

校庆40周年论文选编和40周年
以来发表于国家级杂志及
国外杂志的论文题录
(1949~1989)

序

大学科研水平的高低，作为一种明显的治学能力已被愈来愈多的教育工作者所接受。建校40年来，我校始终不渝地做到教学、科研同时并举，以密集的人才优势、门类齐全的学科、精良的设备和丰富的图书资料保证了科研成果不断涌现。因此促进了我校教学和医疗水平的不断提高。当校庆四十周年之际，科研处将建校以来全校在国家级杂志和国外杂志上发表的论文题目及反映学校特色和优势的11个领域的16篇论文搜集成册，提供给广大师生，确实是一件好事。希望它能成为我校科研工作步入新高度的前导，起到普及、应用和推广的作用。这也是我校的一笔财富，希望能博得多数人的保存和传播，实现科学劳动的“再生产”和科研水平的再提高。衷心祝愿我校科研花簇争奇斗妍、竞相开放。

隋永起

1989.8.30

目 次

氨基酸调控hCG致孕酮生成	程治平 (1)
心肌缺血/再灌注损伤及心肌保护的研究 (I)	王孝铭 (8)
人类肺癌的细胞遗传学研究	李 璞 (21)
IgE及其介导的免疫反应在流行性出血热发病机理中的作用	王文余 (28)
核医学仪器的研制和展望	刘 骥 (34)
LAK疗法新途径的探讨	巴德年 (38)
人癌细胞转移的模型和转移性癌细胞的生物学特性	王吾如 (44)
大鼠心肌线粒体各组份中辅酶 Q 含量的高效液相色谱法分析	于维汉等 (50)
维生素D在白血病治疗中的应用	洪宝源 (54)
急性心肌梗塞 (AMI) 治疗的回顾和展望	傅世英 (64)
脑血管病防治的回顾与展望	戴钦舜 (70)
大肠癌的治疗	丁立等 (76)
女性临床计划生育技术进展	韩向阳 (83)
异氟醚、安氟醚、氟烷、甲氧氟烷全紧闭程序麻醉	郑 方 (90)
大骨节病病因和阻断措施研究	杨健伯 (97)
流行病学教研室科学研究四十年回顾	刘瑞璋 (107)

CONTENTS

The modulation of hCG induced progesteron production by amino acids.....	Cheng Zhiping (1)
The investigation on the mechanism of myocardial ischemia/reperfusion injury and the protection for myocardium (I)	Wang Xiaoming (8)
Cytogenetic studies of human lung cancer	Li Pu (21)
Effect of IgE-mediated immunologic reactions on the pathogenesis of epidemic hemorrhagic fever	Wang Wenyu (28)
The development and prospect of nuclear medical instrument	Liu Ji (34)
New approach to LAK therapy	Ba Denian (38)
Metastasis models of human carcinoma cells and biological properties of metastatic tumor cells	Wang Wuru (44)
The content of coenzyme Q in mitochondrial substructure of the myocardium with the wistar rats by highperformance liquid chromatography	Yu Weihan, et al (50)
The treatment of leukemia with vitamin D	Hong Baoyuan, et al (54)
Retrospect and prospect of treatment for acute myocardial ischemia	Fu Shiyong (64)
Prevention and treatment of cerebrovascular diseases : retrospect and prospect	Dai Qingshun (70)
The treatment of carcinoma of colon and rectum	Ding Li, et al (76)
The advances of female family planning clinical technique	Han Xiangyang (83)
Closed programmed anesthesia with isoflurane, enflurane, halothane and methoxyflurane	Zheng Fang (90)
Study of cause and intervention measure on Kaschin-Beck disease	Yang Jianbo (97)
Review 40 year's scientific researches of the epidemiology department	Liu Ruizhang (107)

氨基酸调控 hCG 致孕酮生成

基础部生殖内分泌研究室 程治平

近年来,某些氨基酸在神经系统和内分泌系统的研究中越来越引起科学界的注意与兴趣。迄今为止,尚无人报道氨基酸调控孕酮生成的系统资料。

选题思路与背景

1976年在十年动乱之后,国家委托上海生理所在上海召开了生物科学研究的规划会议,由于我室在十年动乱前做过有关脑垂体激素,ACTH的代谢的研究,考虑到人员与设备情况,大会建议我们承担一项长远研究的重点课题——下丘脑、垂体与性腺轴活动规律的研究。这项研究的理论性很强,涉及面广。我们经过分析与研究后,决定先抓这个轴的最低环节——性腺,性腺之中先抓雌性腺,在雌性腺各种功能调节中重点抓黄体功能。三“抓”集中到一点就是抓与生殖直接关联的功能调节,可达到集中力量,逐步扩展的目的。

氨基酸对黄体功能的调节作用是一个新问题,我们先选择了酪氨酸是基于以下两点设想:一.酪氨酸是两个重要激素,儿茶酚胺激素与甲状腺激素的前身物质,而后两类激素对生殖功能均有明显的影响;二.酪氨酸、苏氨酸、丝氨酸是肽分子发生磷酸化重要能量反应的三个残基,在生殖过程中,酪氨酸可能对生殖激素的生成产生影响。

预备试验

为了探索酪氨酸(L型)对黄体功能的作用,我们作了两项预备试验,初探所提设想有无发展前途:

(一)兔卵巢移植眼前房实验:将我室2公斤左右白兔的自身卵巢的一小片移植于

其眼前房,三周后,移植块生长良好。利用透明的角膜作为“窗口”可以很方便而清晰地直接观察移植卵巢块。卵泡呈葡萄状,在人绒毛膜促性腺激素(hCG)的作用下,卵泡破裂出血,发生“排卵反应”,此时,血中孕酮含量增高。如在注射hCG前先注射酪氨酸则hCG所致孕酮生成作用被抑制,酪氨酸剂量大时可达完全抑制。从初步实验所得的启示是,研究酪氨酸对hCG致孕酮生成作用的影响这一课题是有前途的。同时也说明这样一个异位卵巢动物模型可以作为筛选药物,直接观察卵巢反应的工具。

我们曾用近代内分泌学方法对每种动物的下丘脑-垂体-异位卵巢轴的激素调节规律,作了全面的测试,证明其激素调节功能正常,并可维持3~4个月之久。在1980年的国际生育调节会议上,我曾以此为主要内容之一,代表我国生殖生理工作者作了特邀报告(详见

Recent Advances in Fertility Regulation, ATAR S.A. Geneva, 1981)。

在报告中展望一段,我曾指出开展氨基酸对生殖功能调节研究的重要性。随后,我们异位卵巢模型的实验作为科研成果获省二等奖,卫生部乙等奖。酪氨酸用这种动物模型筛选出来,是异位卵巢模型用于实际收到成效的一次尝试。

(二)在进行上述预备实验的前后,我们还试探了酪氨酸能否影响离体卵泡产生孕酮的可能性。给30天龄未成熟雌鼠皮下注射PMSG100单位/只,48小时后,取出卵巢,分离出排卵前卵泡中的颗粒细胞,制成细胞悬浮液。按预定要求,在悬浮液管中加入各种成份。培养4小时,测定各管孕酮、雌激素与cAMP含量。

结果显示：hCG和酪氨酸均可使孕酮生成增加。在另一类似实验，不用排卵前卵泡而用黄体化卵泡，由于卵泡黄体化后，其甾体激素合成代谢转向以形成孕酮为主，所得结果是酪氨酸具有明显的抗hCG致孕酮生成的作用，与异位卵巢的实验结果一致。

一步一个脚印稳步前进

在获得酪氨酸可能调控 hCG 致孕酮生成过程的初步资料之后，考虑到 hCG 与孕酮是妊娠期间的两项重要激素，与发展和维持妊娠密切相关，我们认为深入探讨酪氨酸在调控 hCG 与孕酮生成过程的作用将是既有理论意义，又有应用前程的课题。

于是，一系列问号产生了：①酪氨酸的作用能在其他实验模型得到证实吗？②在众多的氨基酸中唯独酪氨酸有此作用吗？酪氨酸在分子水平作用机理是什么？④分子的结构与功能的关系如何？⑤酪氨酸的摄取、分布、储存与释放是怎样的？⑥黄体细胞内有无酪氨酸？其含量是否随卵巢功能变化而变化？其变化的调控机理如何？⑦黄体细胞上是否存在与酪氨酸结合的位点？⑧酪氨酸及其类似物有无抗生育的作用？这八个问号是我们从1980年直到目前希望这个解答的问题。

问题就是方向，研究室的老师们和博、硕士研究生分工合作，为寻找答案一步一个脚印地工作。

一、在其他实验模型证实酪氨酸对 hCG 的致孕酮生成过程的抑制作用

（一）兔整体实验（原位卵巢）：对照组动物8只，实验日8点每只皮下与静脉各注10毫升生理盐水，20分钟后静脉注射 hCG 50 单位/公斤体重。实验组（酪氨酸）动物8只，在注射 hCG 前20分钟，由皮下与静脉各注酪氨酸 25 毫克/公斤体重，在注射 hCG 之前及其后的 1/3，2，4，48，96，144 小时分别从耳缘静脉取血，进行孕酮测定（RIA）。

结果见图1：对照组与注射酪氨酸组血清孕酮含量在注射 hCG 之前无差异（ $P > 0.05$ ）

在注射 hCG 后，酪氨酸对抗 hCG 所致孕酮的作用十分明显。可见，在整体条件下，酪氨酸抑制 hCG 对孕酮生成的作用与预备实验结果一致。

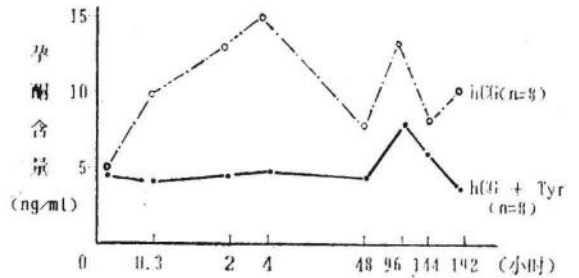


图 1

酪氨酸对兔原位卵巢 hCG 致孕酮生成的影响

（二）兔卵巢原位灌流：为了排除整体动物的许多复杂因素，并大大减少酪氨酸用量，而又保持卵巢在体，进行了兔卵巢原位灌流实验，卵巢动脉与静脉全部被结扎，用 H-M 液灌流原位卵巢。结果表明，单纯用 H-M 灌注时，流出液孕酮含量较低而恒定；灌注液中加 hCG 1 单位/毫升时孕酮含量在 60 分钟时急剧增加达 20 倍左右，并维持在此水平达 180 分钟；如在加 hCG 的同时又加酪氨酸 22 微克/毫升则 hCG 所诱发的孕酮生成几乎完全受到抑制，见图 2。

（三）小鼠原位卵巢的实验与兔一致。

（四）莱亨鸡实验：在 118 只 1~1.5 公

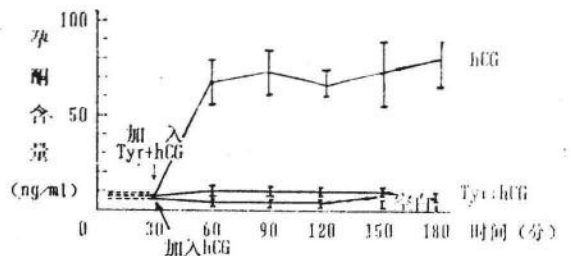


图 2

hCG 与酪氨酸对兔卵巢灌流时孕酮含量的变化

斤鸡所做实验表明，喂含 10~30 毫克酪氨酸丸 2~5 周，对鸡血清孕酮含量无明显影响，波动于 60~70 pg/毫升；给小鸡皮下注射 hCG 50 IU/只，可使血清孕酮增加 4 倍多；喂药丸 3 小时后再注 hCG 则

hCG 的作用完全被抵消。说明酪氨酸不但在哺乳类、啮齿类有抗hCG致孕酮生成的作用,对家禽类莱亨鸡也有同样作用。

二、酪氨酸作用的部位和机理

(一) 关于部位

酪氨酸的抗hCG致孕酮生成的作用可以在离体黄体细胞与原位卵巢灌流的条件下表现出来,这一事实说明酪氨酸的作用可以发生在卵巢水平。但是,在整体情况下,酪氨酸是否还通过垂体从而间接影响卵巢孕酮的形成?为此我们做了四种实验:

1. 酪氨酸对男子垂体促性腺功能的影响实验:给成年男子($n=5$)口服酪氨酸300毫克/日,共6天,第四天肌注LHRH-A/50 μg /人,用RIA法测定其血清LH与FSH浓度,酪氨酸对LH和FSH的基础分泌水平和LRH-A诱发的LH峰和FSH峰均未产生明显影响。结果提示酪氨酸不直接影响垂体的促性腺功能。

2. 垂体内直接注射微量酪氨酸实验:向未成熟的2公斤重雌兔垂体直接注入30 μg /只的酪氨酸,10分钟后再由静脉注射10 μg 的LHRH-A,以激发LH和孕酮的分泌,酪氨酸并不拮抗LHRH-A所致LH与孕酮的分泌,支持在男子身上所提出的观点。

3. 酪氨酸在去垂大鼠的抗hCG致孕酮生成作用:欲排除垂体的作用最好的方法是在去垂体动物观察酪氨酸的作用。去垂体大鼠实验表明酪氨酸的作用不需垂体的参与也能发生。

4. 大白鼠下丘脑-垂体-黄体细胞三级水平表面灌流系统实验:为了研究酪氨酸对下丘脑、垂体与黄体细胞轴的作用,而又欲排除在体许多复杂因素的干扰,我们建立了以上三级水平的灌流系统,进行体外研究实验。下丘脑小块、垂体小块或黄体细胞与预膨胀好的Bio-Gel按一定比例混合后,放置灌流小室,小室放置在37℃的恒温水浴中,灌流液流速为0.15ml/分,预灌流60分钟,以达到灌流系统的条件保持稳定,然后每10分钟收集样品一次(分步收集器),液体样本经真空干燥保

存,备RIA测定激素之用。

垂体小块在培灌系统中对LHRH($10^{-9}\sim 10^{-7}\text{M}$)的反应正常,可释放LH,20分钟左右达峰值,酪氨酸(0.0025mM、0.025mM、0.25mM)对LH基础分泌及LHRH-A所诱发的LH分泌均无影响。若以这三种剂量酪氨酸(作用60分钟)的LH总释放量进行比较,也无统计学意义($P<0.05$)。两次说明垂体在酪氨酸抑制hCG诱发孕酮生成中不起作用。

(二) 关于机理

酪氨酸对兔离体卵泡cAMP、蛋白质及RNA合成的影响:鉴于hCG可通过cAMP第二信使系统,导致新的蛋白质与RNA的合成,从而影响孕酮的合成,我们利用 ^3H -亮氨酸和 ^3H -尿嘧啶参入兔离体卵泡的方法,观察了酪氨酸对cAMP、蛋白质与RNA合成的影响。结果显示:酪氨酸明显抑制cAMP的形成。空白试剂对照组cAMP生成量为 97.91 ± 8.62 pmol/L/毫克蛋白质,在培养液中加入hCG后,cAMP生成量达 419.64 ± 17.79 pmol/L/毫克蛋白质($P<0.01$),但在加入hCG时又加酪氨酸(50 μg /管),则cAMP仅为 161.13 ± 9.38 pmol/L/毫克蛋白质,与单独加hCG组相比,差异显著($P<0.05$),而同剂量的放射菌酮或放线菌素D对hCG诱发的cAMP生成均无影响($P>0.05$)。

酪氨酸除抑制cAMP形成外,还减少蛋白质与RNA的生成。对照组 ^3H -亮氨酸和 ^3H -尿嘧啶参入兔离体卵泡的量分别为 76.50 ± 2.22 DPM/ μg 蛋白质和 96.94 ± 6.43 DPM/ μg RNA。在培养液中加入hCG,参入量均增加约一倍($P<0.01$),若在加hCG时又加酪氨酸则增加受到抑制($P<0.05$)。另有实验证明,由cAMP引起的蛋白质与RNA形成以及孕酮生成也可受到酪氨酸抑制。

最近,还观察了酪氨酸对孕酮生成过程中的关键酶—— 3β -羟脱氢酶和对子宫雌与孕激素受体数量的影响,初步资料显示:酪氨酸有抑制 3β -羟脱氢酶和降低子宫雌、孕激素受体含量的作用。

看来,酪氨酸对hCG诱发的孕酮生成过程可在多个环节产生抑制作用,这些环节包括cAMP、蛋白质与RNA合成;3 β -羟脱氢酶活性与受体含量。此抑制效应不需垂体参与。

三、酪氨酸分子结构与功能的关系

在上述实验结果的基础上,深入了解酪氨酸分子结构与其功能的关系将是很有意义的:

- ①可以从分子水平从理论上搞清作用的机理;
- ②可为发展酪氨酸类似物提供药化学与药理学的参考资料,扩大酪氨酸类似物的研究。

利用大鼠黄体细胞培养方法,根据类似物抗hCG致孕酮生成的作用大小作为指标,比较了17种酪氨酸的作用强度,发现酪氨酸分子的 α 氨基与酚羟基是抑制hCG致孕酮生成的必需功能基团,缺失或被其他基团掩盖时,即失去抑制效应,另外,酪氨酸的羧基在保持空间结构方面可能起一定作用,但非绝对需要的基团DL型酪、丝、苏氨酸与L型不同,也没有抗hCG致孕酮生成的作用。在筛选中还发现酪氨酰肼与甘酰酪氨酸两个类似物的作用较酪氨酸分子本身大约2~3倍。相反,碘化或溴化酪氨酸有加强hCG致孕酮生成的作用,酪氨酸衍生物——儿茶酚胺类激素也和碘或溴化类似物一样,加强而不是抑制hCG引起的孕酮生成。

四、二十一种氨基酸抗hCG致孕酮生成作用的比较

在二十一种常见氨基酸中,除酪氨酸外,其他氨基酸是否也有抗hCG致孕酮生成的作用,是一个确定酪氨酸作用有无特异性的问题。为此仍采用大鼠黄体细胞培养方法,比较了二十一种氨基酸。对照培养管加100mIU/ml的hCG100 μ l;其他培养管分别加二十一种氨基酸(L型),各种氨基酸用0.02、0.20、与2.0mM/L三种浓度。结果表明,二十一种氨基酸中只有酪氨酸、苏氨酸和丝氨酸三种在分子结构均具有羟基的氨基酸有抗hCG致孕酮生成的作用,有意义的是这三种氨基酸是蛋白质磷酸化的残基,因此推测,酪、苏、丝三种氨基酸抗hCG致孕酮生成作用

可能与干扰蛋白质磷酸化有关。看来,酪、苏、丝氨基酸通过影响磷酸化过程而调控所有甾体激素生物合成的可能性,值得深入研究。

五、酪氨酸的摄取、储存、与释放

用同位素示踪法观察了小鼠卵巢对 3 H-酪氨酸的摄取,用SDS薄层层析检测兔卵巢灌流液中酪氨酸释放情况。

1. 小鼠由尾静脉注入 3 H-酪氨酸5分钟后,在各组织的分布量,肝肾最多,卵巢居第三位其他依次为:子宫、垂体、肾上腺、肌肉、下丘脑、大脑。但在hCG诱发排卵后,卵巢中 3 H-酪氨酸跃居首位,而且在黄体的机能旺盛期,孕酮分泌最多时期,摄取量达高峰。与酪氨酸在化学结构上只多一个 β 羟基少一个羧基的 3 H-多巴胺则无此现象。表明卵巢对酪氨酸的摄取与机能状态有密切关系。特别有趣的结果是,如果预先给小鼠注射酪氨酸,则在上述同样条件下,卵巢对 3 H-酪氨酸的摄取显著降低,提示卵巢内对酪氨酸摄取有一定的“容量”(“储池”?)。

2. 用H-M液灌注在位兔卵巢(经hCG预处理)时,流出液中酪氨酸含量逐渐增加,于25小时达到最大值。提示,卵巢可以“释放”内源酪氨酸

六、卵巢与黄体细胞内酪氨酸含量及其动态变化

兔原位灌流实验提示卵巢内存在内源酪氨酸,而且在hCG的作用下可以“释放”出来。为了深入一步搞清内源酪氨酸的生理意义,我们进行了两个方面的实验:

(一)雌性小鼠不同生理状态下卵巢内酪氨酸含量变化:采用薄层层析与荧光光密度法测定酪氨酸(双波段薄层扫描仪,日)。敏感度达ng级。结果发现:①小鼠未成熟前卵巢内酪氨酸含量按 μ g/g干重计算只有痕迹量,而成熟后可达 $5.13 \pm 0.40 \mu$ g/g组织)说明小鼠卵巢摄取与合成酪氨酸的功能到成熟时才开始完善,动物未成熟前性功能尚不发达,卵巢内酪氨酸含量甚少对酪氨酸调控孕酮生成的观点是一重要支持。

②更有实际意义的是卵巢内酪氨酸含量随着卵巢功能状态变化而变化；成年小鼠性周期中情后期的酪氨酸含量明显高于其他各期，达3倍之多，为 $21.94 \pm 0.81 \mu\text{g/g}$ 干重；如用PMSG与hCG诱发未成年小鼠排卵，6小时后开始出现酪氨酸含量增加，为 $12.12 \pm 0.81 \mu\text{g/g}$ 干重，21小时达高峰，为 $36.64 \pm 1.79 \mu\text{g/g}$ 干重，约为排卵前的5倍；成年小鼠自然排卵后酪氨酸含量也可增加2倍多；与酪氨酸化学结构近似的苯丙氨酸与色氨酸在排卵前后的含量未显出变化；另外，酪氨酸含量在小鼠妊娠期间也表现出明显的变化，妊娠第3天孕卵转运期酪氨酸量为 $7.31 \pm 0.81 \mu\text{g/g}$ 干重，第7天着床完成时增加3倍；妊娠第14天酪氨酸含量明显回降，接近第3天时的水平，至第21天即将分娩时降至痕迹量。 ^3H -酪氨酸量的摄取实验曾证明，小鼠排卵后的摄取量居所测九种组织的首位，此时血中孕酮含量出现高峰。因此卵巢内酪氨酸含量在排卵后明显增加可能看作是由于摄取量增加所致，并提示卵巢内酪氨酸含量增加与孕酮代谢有密切的联系。

(二) 黄体细胞内酪氨酸含量的变化：在上述实验的基础上，我们进一步研究了黄体细胞内源酪氨酸含量的动态变化。实验发现，在培育之前，黄体细胞只含痕迹量的酪氨酸，培育1小时后增至 $1.41 \pm 0.24 \text{ nM}/10^6$ 细胞，2小时后继续增加至 $2.64 \pm 0.59 \text{ nM}/10^6$ 细胞，4小时内一直维持在此水平。

分别测定细胞内与细胞外培养液中的酪氨酸含量，发现酪氨酸主要存在于培养液中，细胞内数量为细胞内量+细胞外培养液内量总数的 $1/5$ (4小时温培)，酪氨酸在培养条件下可从细胞进入“释放”入培养液中。这项观察从细胞水平证实了前述兔卵巢原位灌注实验关于酪氨酸可从卵巢“释放”出来的观点。

实验还显示：hCG ($10 \sim 100 \text{ mIU/ml}$)、cAMP ($2.5, 5.0, 10.0 \text{ mM}$) 及孕酮 ($0.10, 0.30, 1.30 \text{ nM}$) 均能使黄体细胞内酪氨酸含量

明显增加1~2倍，即“释放”量有所增加。

结合酪氨酸有抗hCG致孕酮生成的作用与实验结果一并考虑，可以设想：在hCG使cAMP增加而致孕酮的同时，或在hCG、cAMP与孕酮的浓度达到一定程度时，它们便促进黄体细胞内酪氨酸“储池”“释放”酪氨酸，从而反馈地调控hCG致孕酮的过程，在多环节上产生抑制作用，使孕酮的生成维持在适度的水平之上。

在生理活动中，当一个信息诱发一连串反应时，这一信息将引起反应产生信息反馈地调控自己，这是一般规律，看来，上述设想与实验结果是符合这一规律的。所以，几年来它作为我们“工作的假说”，引导我们一步一步地工作。当然“工作假说”只是假设，需不断补充内容。

七、黄体细胞上结合位点(“受体”)的研究

这是上述“工作假说”中急待补充的一个内容。因为人们要问：酪氨酸是如何进入黄体细胞的？我们用受体分析方法与放射同位技术研究了大鼠黄体细胞膜制备物是否存在与酪氨酸结合的位点。这是一项前人尚未解决的课题。Scatchard分析表明，用PMSG和hCG处理未成年大鼠所得黄体细胞的膜制备物存在两类酪氨酸结合位点，一类具有高亲和力、低容量特点，另一类为低亲和力、高容量，两类结合位点的结合都是可逆的，并表现特异性，高亲和力位点的特异性远远高于低亲和力位点。进一步根据一些因素(温度、pH、离子、对胰蛋白酶与对神经氨酸苷的反应)对两种位点的影响的研究、高亲和力位点基本符合受体的要求，而低亲和力位点可能是一种含糖基的物质，也许是运载酪氨酸，使之通过共黄体细胞膜的运载工具。

这一发现不仅补充了我们工作假说的一项重要内容，而且在已知的几个氨基酸受体中，首次报导 3 酪氨酸受体的存在。

八、酪氨酸与酪氨酰肼抗生育作用的初步实验研究

根据WHO的要求，新的抗生育药必须经

过严细而系统的动物实验,包括小动物、狗及灵长类的实验观察,然后才能谈到I、II、III临床阶段逐步试用于人,往往需要20多年时间,花近百万美元。我们考虑hCG与孕酮均系妊娠的重要激素,酪氨酸既有抗hCG致孕酮生成的作用,在积累了较大量的理论研究资料之后,初步观察酪氨酸特别是作用较酪氨酸大2~3倍的酪氨酸类似物—酪氨酸胍的抗生育作用不无益处。在几百只小鼠与大鼠的抗生育筛选实验中,从妊娠第一天开始,每天注射(或灌胃)不同剂量的酪氨酸,于妊娠第12天剖检。结果表明,给酪氨酸的动物妊娠率与平均胎数,较对照组显著降低,但未达到完全控制生育。在此基础上,我们试用酪氨酸胍。雌性小鼠也从妊娠第1天开始,每天注射0.1mg~5mg酪氨酸胍,每个剂量组动物数为17~20只,0.1mg时妊娠率就比对照组下降15%,剂量增大的效果更明显,有剂效关系,当剂量为3毫克时,妊娠完全被抑制,但也出现食欲不振,消化不良等不良反应,原因尚未查清,拟从改变给药途径,配用其他药物,以及寻找其他酪氨酸新类似物进一步探讨这一问题。

展 望

几年来,我们在四种动物,用11种实验模型发现酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸三种与磷酸化过程相联系的氨基酸具有抗hCG致孕酮生成的作用,并从分子水平深入揭示其作用机理,提出了酪氨酸调控hCG→孕酮这一妊娠中重要反应的作用的工作假说。1988年7月,我在生殖研究前沿国际学术讨论会上,以“The possible modulating effect of tyrosine (L-form) on hCG-induced progesterone secretion by corpus luteal cell”为题,向包括来自八个国家三十余名外国生殖生理学专家教授在内的近二百名代表作了30分钟的邀请报告,这是继以往三次国际学术会议与多次全国性学术会议之后,比较全面而系统地介绍我们的工作的一次报告。会后美国国家卫生研

究院(NIH)将负责编辑会议论文专集,也许将有更多的人能了解到我们的工作。

基础医学理论研究工作属于《面向未来》的工作范畴,是长期而艰巨的任务,不能期望发挥“短、平、快”的效果,但是必须有一部分人不图名利地,甚至有时不顾“浪潮”淹没的危险,坚持干下去。

展望未来,我深深地感到理论研究工作象江河里的水分子,一个紧跟一个,有时以“涡流”形式向前不停息地流向四面八方。现在的工作仅仅是一个开始。值得思考,纳入下一步计划的很多:

一、酪、苏、丝三种氨基酸都有抗hCG致孕酮生成的作用,如将三者合成一个小分子肽,是否仍有作用?作用方式如何?机体内有无存在这种肽或类似物的可能性?基于这种思路,现在我们正与中国医科院药物研究所在进行一项与此有关的科研课题。

二、鉴于酪氨酸类似物酪氨酸胍有明显的抗生育作用(鼠),而且我们已掌握酪氨酸分子结构与其功能的关系,用药化学与生物学筛选相结合的方法合成新的酪氨酸类似物是有前途的。在1986年卫生部与WHO联合主办的国际生育调节新进展学术讨论会我们报告酪氨酸及其类似物构效关系的论文之后,许多药化学与药理学专家对之深感兴趣,希望与我们协作,但大会在作总结报告时指出:酪氨酸类似物的研究应与其他几项重点课题一起得到重视,予以发展。可以看出,虽然我们由于人力不足一时不能从事合成新类似物的工作,我深信终有一天这项研究是会发展的;同时也说明理论研究可以为应用研究开拓思路。

三、另外,在我们的实验过程中还获得主题以外的一些新线索,例如,我们曾发现酪氨酸不仅抗hCG致孕酮生成,也能抗hCG致睾酮生成(鼠);还在一定的条件下表现促排卵或抗排卵作用;另外,酪氨酸对下丘脑(鼠)与卵母细胞(蟾蜍)也有作用。这些观察结果提示酪氨酸、苏氨酸与丝氨酸通过磷酸化过程对机体功能有更广泛的生物学作用。

四、多学科协作进行研究工作是应加强的环节。在科研领导的关怀下,本课题曾组织多学科协作,在一段时期内,组织胚胎教研组在共建下丘脑—垂体—卵巢(眼前房)轴动物模型与用放射自显法追踪 ^3H -酪氨酸在卵巢(鼠)内的分布都获得了有价值的成果;生化教研组在酪氨酸对大鼠子宫与卵巢核酸代谢的研究中也取得了进展。这些协作有分有合,灵活性强,对发展理论科学的研究很有意义。

致 谢

本课题得到国务院自然科学基金会、卫生

部、省科委、省教委、省卫生厅、省计划生育委员会的支持与资助,以及世界人口基金委员会在技术上的支持与指导,谨致以衷心的感谢。

本课题是由马青年教授与各位老师、技术组老师以及历届博士生、硕士生等近二十余人共同完成的。我写这篇文章的时候正值寒假,而且研究生中的大多数均已出国或离校,因此没有同大家商量,凭个人的思路写成,谬误之处在所难免,请领导与读者指正。

祝学校事业繁荣昌盛。

心肌缺血/再灌注损伤及心肌保护的研究(1)

基础部病理生理学教研室

王孝铭

心脏病理生理研究室

关于心肌缺血性损伤机制及其保护的研究,由来已久,但有关“再灌注损伤”问题的提出和探讨,则仅有二十多年的历史。随着缺血性心脏病内外科治疗的进展,冠状动脉成形术、溶栓术等新方法的广泛应用,治疗效果日益提高。但随之而来也出现了一个新的问题,在某些病例,心肌在缺血后,恢复血流,即得到血液的重新灌注后,不仅心功能未得到恢复,反而更加恶化,发生心肌出血,形成出血性梗塞,心肌结构严重破坏的情况。60年代Jennings等报导了对缺血心肌再灌注时,心肌电生理和超微结构改变。心肌细胞发生迅速而严重的水肿,出现广泛收缩带,线粒体钙盐沉积。首次描述了再灌注损伤现象。其后,有关这方面的研究愈来愈受到重视,成为研究缺血性心肌损伤的焦点。特别是近十年来,Hearse及Hayler等^[1,2]进行了大量的实验研究,在确认此现象的同时,确立并推广了“再灌注损伤”(Reperfusion Injury)这一概念。

“再灌注损伤”,顾名思义,是由再灌注所引起的细胞损伤(或死亡)。它不同于缺血性损伤,但又与缺血性损伤有必然的联系。

对于“再灌注损伤”的看法,基本上可概括为三大派系。

以Hearse, Nayler^[1,2]为首的一派,认为在缺血的基础上进行再灌注,不仅无益反而有害,使原来存活的细胞受损,扩大损伤范围。即再灌注损伤确实存在。

另一派,以Jennings^[3]为首的则认为,所谓“再灌注损伤”,只是再灌注加速了已处于“不可逆损伤状态”,即迟早必死的心肌细

胞的死亡,而对那些存活的甚至处于“可逆损伤”状态的细胞,并无损伤作用。亦即“再灌注损伤”并无实际意义。

Ambrosio^[4]则是处于中间的一派,他们认为缺血区有几类细胞:一类细胞再灌注后可以消除缺血损伤,得以存活,尽管其功能的恢复需要几天甚至几周;另一类细胞,已发生“不可逆”损伤,或遭受部分损伤但仍可恢复的细胞,在再灌注时,由于广泛的细胞水肿及钙超载,而加重缺血性损伤及细胞死亡。

看法的差异在于对“再灌注损伤”意义的估价。最近的研究,在再灌注前给予心肌保护剂(自由基清除剂)使梗塞面积缩小,更加巩固了“再灌注损伤”的概念。但有些问题仍待解决。诸如:在何种条件下产生再灌注损伤?再灌注损伤是怎样产生的?怎样防止再灌注损伤,即如何保护心肌?现仅就我们的实验资料略加阐述。

一、“再灌注损伤”产生的条件

如所周知,“再灌注损伤”产生于缺血的基础上。属于缺血后损伤。一般公认,“再灌注损伤”取决于缺血时间,这说明了问题的一面,而对问题的另一面:在缺血的何种程度基础上,或在一定缺血程度的哪一时间基点上才能出现“再灌注损伤”(就一定种属动物来讲)?尚未得到满意的回答。这一问题的解决不仅可成为研究“再灌注损伤”产生机制的科学基础,而且更有利于心肌保护,避免“再灌注损伤”的产生。

为此,本实验室以结扎家兔(雄性,大耳

白, 体重 $2 \sim 2.5\text{kg}$)冠脉左室支造成急性心肌缺血为模型, 贾玉芝等^[5-6]应用镧电子示踪技术、生物体视学定量分析及电子显微镜等方法, 进行了心肌缺血/再灌注损伤的时相性变化及电子示踪研究。

结果表明, 缺血早期(20分钟)再灌注(20分)即可出现“再灌注损伤”。缺血20分, 肌膜下区水肿, 线粒体轻度肿胀, 部分肌浆管(Sarcoplasmic Reticulum, SR)扩张(图片1, 见113页)。在此基础上恢复血流, 再灌注20分, 超微结构重于单纯缺血20分者, 个别线粒体(Mitochondria, Mt)内出现少数大小不等的不定形致密物, 肌原纤维呈收缩态或伸张态(图片2, 见113页)。

从镧电子示踪来看, 缺血20分, 镧粒子已透过肌膜进入肌浆, 被扩张的SR吸收, 部分SR被镧充填形成高电子密度团块。少数镧粒子在Mt表面呈颗粒状凝集。颗粒直径为 $50\text{nm} \sim 0.4\mu$, 最大可达 0.8μ (图片3、4, 见113页)。再灌注20分后Mt膜表面镧颗粒数目增多, 少数镧粒子开始由外膜进入外室, 进而穿过内膜沉积于基质, Mt附近的肌浆, 特别是肌膜下区和少数肌丝也出现大小不等的镧粒子(图片4、5, 见113页)。说明细胞膜通透性增高, SR、Mt摄镧增加。

我们的实验是从缺血20分钟开始, 递增缺血时间(20、30、40、60分), 再灌注时间均为20分。

超微结构变化及膜对镧粒子通透性的改变均随缺血时间的延长而逐渐加重, 再灌注促使损伤更趋恶化。30分钟缺血, 再灌注后, 肌原纤维舒缩交织, 伸展的肌原纤维有局灶性分解, Mt内不定形致密物及脂滴增加, 肌浆水肿更加严重, 核染色质周边化(图片5), Mt内外镧颗粒数目明显增加, Mt内镧颗粒可多达10个, 而SR内镧沉积减少(图片6, 见113页)。40分钟缺血再灌后变化更趋严重。Mt明显肿胀, 嵴部分或大部消失, 基质透明, 其中不定形致密物增大增多; 肌原纤维呈收缩态及伸展态, 有异常收缩带形成, 肌丝明显破坏; 糖原

颗粒几乎完全丧失; 间盘有局部性扩张, 肌膜有局灶性缺损(图片8, 见114页)。Mt内镧粒子数目剧增($12 \sim 20$ 个)并有融合, 外膜镧颗粒减少。值得提出的是含镧Mt结构基本保存, 而明显肿胀近似空泡变的Mt则镧侵入数目极少(图片7, 见114页)。至缺血60分再灌时, 肌膜广泛破坏, 间盘明显扩张; Mt极度肿胀, 嵴断裂、丧失、外膜断裂或丧失, 甚至完全解体形成空泡, 不定形致密物增多; 肌原纤维呈伸展态, 分解较多; 脂滴增加, 糖原完全丧失。细胞内镧粒子却明显减少, 主要分布于肌浆, 很少进入Mt(图片9, 10, 见114页)。说明心肌细胞, 特别是Mt的结构及功能已进入不可逆状态。因为镧粒子的进入SR及Mt是能量依赖性的。

上述实验结果提示, 再灌注损伤可以发生于缺血早期(20分)再灌注时。其损伤的严重程度, 取决于缺血的严重程度。本实验在结扎冠脉左室支条件下, 随缺血时间延长而加重。我们的实验支持我们将“再灌注损伤”分为可逆性(早期)和不可逆性(晚期)两种。在家兔的实验中, 缺血40分为一分水岭, 即在缺血40分以前(包括40分在内)进行再灌注, 虽然也出现损伤, 但具有可复性, 随再灌注时间延长心脏功能可能得到恢复或改善。而在缺血40分钟以后, 60分时再行灌注, 则心肌不可逆性结构变化严重(间盘明显扩张, 肌膜广泛损伤, Mt嵴断裂、消失、外膜断裂、脱落, Mt中出现大量不定形致密物)Mt也不能摄取镧粒子, SR内镧颗粒也减少, 说明它们的功能大部或全部丧失。因此, 此时的“再灌注损伤”将是不可逆的。

二、缺血/再灌注损伤形成的机制

学说很多(能量代谢的异常, 离子转运的障碍, 自由基的作用^[34], 白细胞或“无复流”的参与等), 迄今仍未得到彻底阐明。在前人研究的基础上, 我们从下列几方面对此进行了探讨。基本的出发点是以心肌细胞膜系(肌膜及细胞器膜)的结构、功能变化为中心。

(一)膜系通透性的变化

镧电子示踪的试验, 在缺血及再灌注早期

即有明显的膜系通透性的变化并具有以下特点:

1、由外及里:先是肌膜通透性增大,镧进入肌浆,大部分积聚于SR,而后是Mt(图片3)。即由肌膜到细胞器膜。对Mt来讲则是先外膜而后内膜。

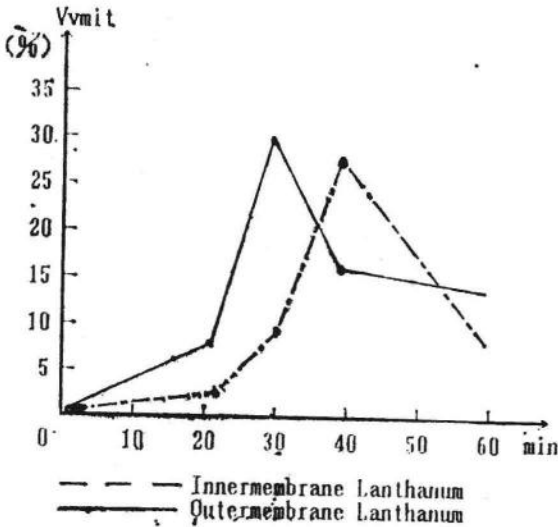


Fig 1

Kinetic curves of mitochondrial innermembrane and outermembrane lanthanum volume density change of ischemia/reperfusion groups

2、具有时间依赖关系:在未发生不可逆性改变之前,随缺血时间延长,通透性愈加增高(图1)

3、再灌注可增加Mt对镧粒子的通透性。

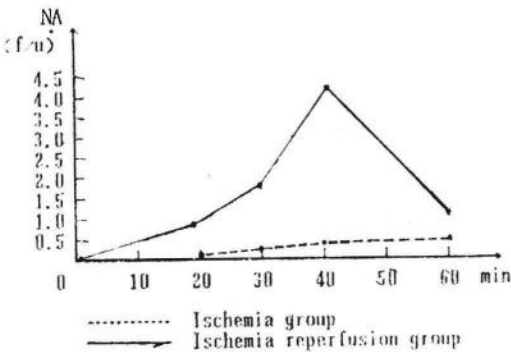


Fig 2(A)

Kinetic curves of surface numerical density of lanthanum particles in mitochondria of ischemia and reperfusion groups

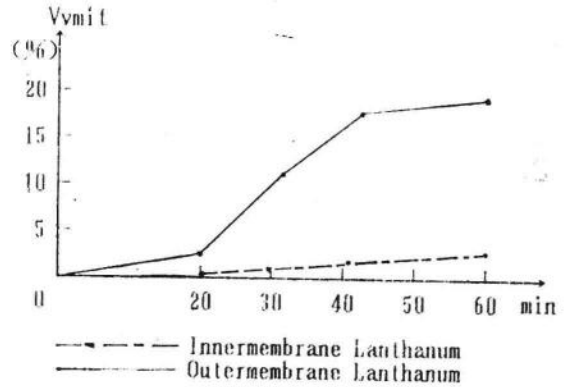


Fig 2(B)

Kinetic curves of mitochondrial innermembrane and outmembrandlanthaum volume density change of ischemia groups

4、细胞对镧的处理与钙相似。即先由肌浆网处理,如肌浆中镧粒子浓度过高,最后进入Mt。这些都是能量依赖性的。Mt功能障碍或丧失,SR及Mt对镧的摄取也将减弱或丧失(图片3、4、10)

(二) 线粒体膜流动性的变化

膜脂质双层和镶嵌的蛋白质一起具有平面流动性。这对细胞内外的物质交换,离子转运,细胞反应等生物学特性,至关重要。

孙丹丹等^[7]利用大鼠离体心脏(Langendorff模型),以DPH(1,6-二苯基-1,3,5-已三烯)为膜脂探针标记膜脂相,通过标记膜的荧光偏振度(P),荧光各向异性(γ),脂区微粘度(η)的计算,测定了缺血(缺氧及无底物)及再灌注时Mt膜流动性的变化。上述各指标值愈大,膜流动性愈低。

结果表明,缺血40分膜流动性未见改变,而在此基础上再灌注60分钟,膜脂区微粘度明显增大($P < 0.05$),即膜流动性下降。(表1,图3)

可以看出,在缺血/再灌注条件下,膜流动性下降。脂区微粘度升高比膜通透性变化出现的晚。尽管在缺血40分时,心肌细胞超微结构已出现明显变化(Mt肿胀,嵴排列紊乱,出现低电子密度絮状物及粗大电子致密颗粒,核染色质周边化)。

Table 1 Fluidity of Mitochondria Membrane of Myocardium

Experiment	n	p	γ	η	P values<
Aerobic Group (60min)	4	0.238 ± 0.013	0.173 ± 0.010	2.182 ± 0.242	
Ischemia Group (40min)	4	0.231 ± 0.025	0.167 ± 0.019	2.157 ± 0.454	N.S.
Ischemia and Reperfusion Group (40min ischemia and 60min reperfusion)	4	0.275 ± 0.008	0.202 ± 0.007	2.924 ± 0.231	0.05
DS201-treated ischemia and reperfusion Group (20mg/l)	4	0.235 ± 0.012	0.171 ± 0.010	2.131 ± 0.229	N.S.

Values are means $\pm$ SE, P values are Comparisons with Aerobic Group N.S. not Significant

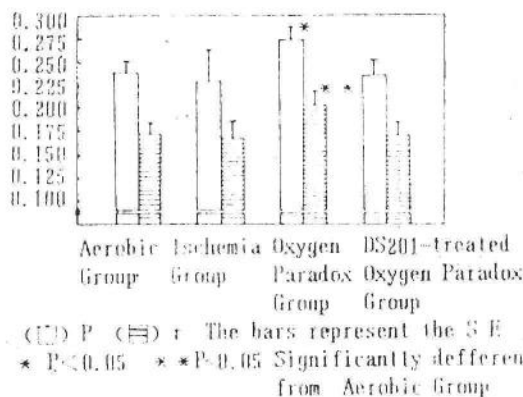


Fig 3

Effect of DS201 20mg/l on the fluidity of Mitochondria membrane in reperfused rat hearts

(3) 膜受体的变化

受体是细胞表面膜蛋白质。它们与专一的配体结合，可以引起细胞的特殊反应。如果膜结构或微环境改变，作为膜蛋白质之一的受体，必然也会相应的改变（外显，内隐或失活）。

我实验室付国辉等^[8,9]以前述兔模型（结扎冠动脉左室支），应用放射配基结合法（ β 受体— ^3H -DHA， α_1 受体— ^3H -Parazozin），观察了心肌缺血及再灌注条件下，心肌细胞膜 β 及 α_1 受体的变化。结果如下：

β 受体的变化，缺血15分受体密度无明显变化，40分后明显升高，亲和性不变。再灌注后受体密度剧增，40分缺血再灌注4分钟，受体密度增加为对照的二倍以上；60分缺血再灌注4分后增加更为显著。延长再灌注时间至20

分，受体密度虽有恢复，但仍维持在高水平上。

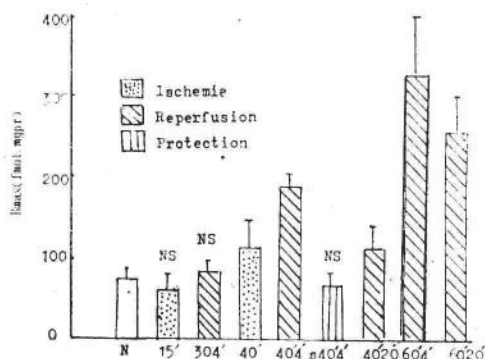


Fig 4

The changes in Bmax of β receptors in Myocardial membrane from rabbits with ischemia and reperfusion

* S40'4'为丹参处理后缺血40分再灌4分

α_1 受体密度亦同，缺血15分钟基本无变化，随缺血时间延长受体数目增加，至40分时几乎增加近正常的2倍，再灌注4分钟仍处于增高地位，但不继续升高，再灌20分后则恢复正常（图5）。

两受体变化相同处在于：缺血（30、40分）时密度均增加而亲和性不变。不同处在于：再灌注早期 β 受体猛增，而 α_1 受体则维持原有高水平（稍有回降但无统计学意义）。

综合以上实验结果，可以看出，在缺血/再灌注损伤时，细胞膜系确实发生了结构和功能的损伤。使细胞难于维持内环境的稳定及细胞与细胞，细胞与外环境间的协调。那么膜系的损伤究竟因何而起，即始动环节为何？目前仍不清楚。多数人认为是氧自由基所引发的膜

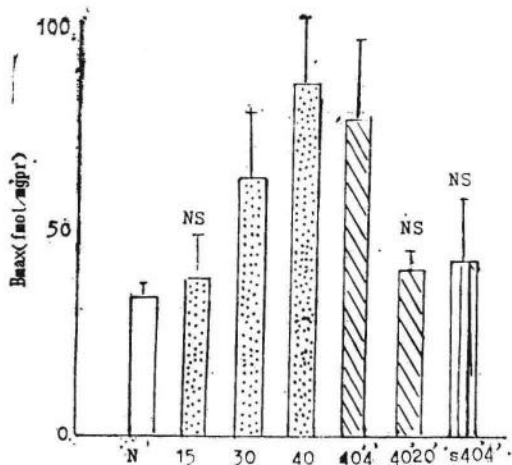


Fig 5

The changes in Bmax of α_1 -receptors in myocardial membrane from rabbits with ischemia and reperfusion

脂过氧化所致^[10], 也有人认为是能量代谢障碍^[11]。为进一步解决这一问题, 我们进行了如下实验:

(四) 缺血/再灌注条件下心肌脂质过氧化物含量的变化

孙丹丹、赵国昌、韩畅等^[7, 12, 13]分别以离体大鼠心灌注和在体兔冠动脉左室支结扎为模型。用TBA(硫代巴比土酸)比色和荧光分光法, 测定了心肌脂质过氧化物的分解产物丙二醛(Malondialdehyd, MDA)。证明缺血, 特别是再灌注时心肌MDA含量均明显升高(表2、3及图6)

由表2、3及图6可以看出, 不论大鼠或兔也不论在体或离体, 心肌脂质过氧化物的增高均比较晚。一般在缺血40分以后, 并随缺血时间的延长而增加, 再灌注后更为显著。

脂质过氧化反应主要发生在膜脂, 特别是磷脂中的多聚不饱和脂肪酸^[10, 34]。它与磷脂酶、脂酶的激活和溶血磷脂、脂肪酸的释放(后两者有去垢作用), 构成所谓“脂质三联体”^[14, 15], 直接破坏膜的脂双层结构, 造成膜损伤。

Table 2 Cardiac Tissue Levels of MDA after 40min Ischaemia and 60min Reperfusion

experiment	MDA (nmol/ n mgProtein) mean±SE	S.D	Pvalues <
Aerobic Group(60min)	7 0.646±0.032	0.085	
Ischemic Group 40min)	7 0.512±0.039	0.104	N.S.
Ischemia and reperfusion 7 Group (40min ischemia and 60min reperfusion)	1 1.770±0.348	0.921	0.001
Drug-treated ischemia and reperfusion Group (40min ischemia and 60min reperfusion)			
Na ₂ SeO ₃ 3×10 ⁻⁴ M	5 0.534±0.036	0.096	N.S.
SD ₁₁₁ 100mg/l	5 0.474±0.066	0.174	N.S.
SD ₁₁₁ 30mg/l	5 0.454±0.034	0.089	N.S.

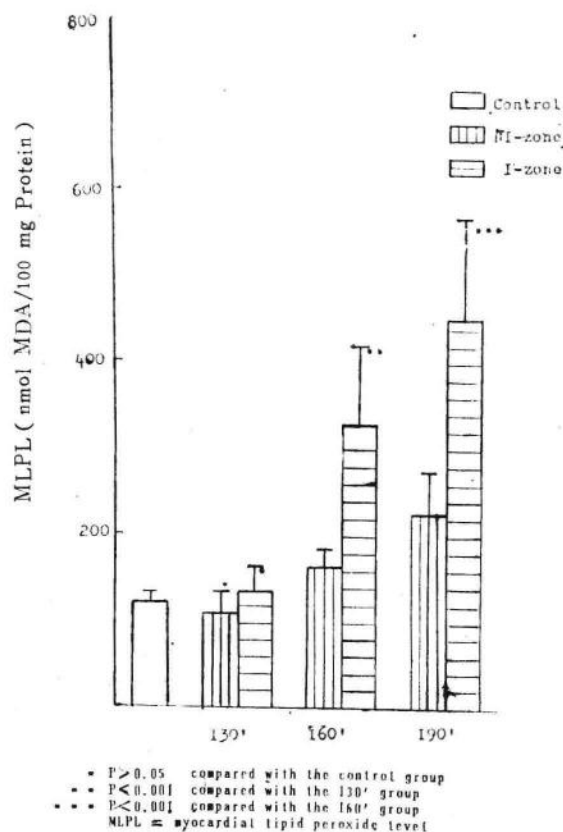


Fig 6

Lipid peroxide level of ischemia rabbit heart at different ischemia times