

梅花鹿茸组织中性激素受体的 等电聚焦电泳测定*

李春义 赵世臻 宋建华 高云 于肇英 谷秀彬 王洪涛

(中国农科院特产研究所)

(白求恩医科大学神经生化研究室)

茸角是雄性梅花鹿 (*Cervus nippon hortulorum*) 的第二性征, 具有脱落和再生的特征。这种现象在哺乳动物纲中是绝无仅有的^[5,9]。

茸角虽为第二性征, 但其生长发育与性激素的关系似乎存在矛盾现象。因此, 威斯洛克 (Wislocki) 提出茸角生长发育不受睾酮控制, 而是腺垂体分泌的某种激素所调节的假说^[8]。但这种假说迄今未被证实。

1983年巴勃尼克 (Bubenik) 基于大量实验结果, 解释了睾酮含量变化与生茸周期的关系, 得出了鹿茸角生长发育主要受睾酮及其衍生物

的调节和控制的结论^[3]。所根据的事实之一是用免疫组织化学的方法, 在鹿茸的生发层定位出了睾酮。但这种睾酮是处于游离状态, 还是鹿茸中存在特异受体, 而睾酮与这种受体结合在一起存在呢? 如果能在茸组织中测定出睾酮等性激素的受体, 就可以肯定鹿茸是这些激素的靶器官。这对于揭示生茸机制、人工控制生茸具有重要意义。但这一工作尚未见报道。本文采用等电聚焦电泳法对鹿茸进行了睾酮和雌

* 本文在写作过程中, 曾得到张洁先生的指导和审阅, 在此表示感谢。

二醇受体的测定。

材料与方 法

1. 药品 ^3H -睾酮 35 居里/毫摩尔 (ci/mmole)、 ^3H -雌二醇 30 居里/毫摩尔, 购于中国北京原子能所; 睾酮、雌二醇、活性碳和 2-巯基乙醇购于西格玛 (Sigma) 公司; 两性电解质 (ampholine) 购于瑞典 LKB 公司; 胰蛋白酶购于莫克·达姆斯特德 (Merck. Darmstadt); 葡聚糖 T 500 购于瑞典法姆西亚 (Pharmacia) 公司; 凝胶板购于瑞典 LKB 公司。

2. 仪器 瑞典 LKB 公司产 2117 型多用涂电泳仪; 1215 型液体闪烁计数器 (LKB Wallac)。

3. 组织取样 将生长到 35 天的 6 岁龄雄性东北梅花鹿的茸尖部 (最嫩组织) 1—1.2 厘米长, 用利刀割下、立即放入液氮中, 实验室存放待用。

4. 胞浆液的制备 制备过程在 0—4℃ 的冷室中进行。首先将供测茸茸皮剥下, 用剪刀将茸皮及皮下组织 (生发层组织) 分别剪成碎块。用 FS-2 型组织分散器 (金坛县环保仪器厂) 分散三次, 每次 10 秒钟, 每次完毕后, 在冰浴里放置 1 分钟, 再进行下一次。分散完的组

织, 再用 Potter Elvehjem 玻璃匀浆器匀浆。然后在 4℃ 下 175, 000 g 离心 40 分钟。取上清液, 即为胞液。

匀浆在试验中为关键的一步。程度不够, 细胞膜多不能破碎, 而匀浆过度则易产生过多的热使受体失活。

5. 胞液孵育 睾酮受体测定取 300 微升胞液, 标记睾酮浓度为 5—8 毫微摩尔, 分 9 个管, 各加对照管, 每对照管加 500 倍的非标记睾酮。

雌二醇受体测定取 100 微升胞液, 标记雌二醇浓度为 1—40 毫微摩尔, 分 8 个管, 各加对照管, 每个对照管加 500 倍的非标记雌二醇。

以上反应体系在 0℃ 孵育 2 小时。

6. 胞液蛋白的测定、胰蛋白酶对反应体系的部分消化、D.C.C 处理、等电聚焦电泳、液体闪烁计数及结果换算均参考有关文献^[1,2]。

结 果

1. 在鹿茸生发层的组织中, 含有睾酮的受体。该受体的解离常数 (Kd) 为 9.7 nM; 最大结合 (B_{\max}) 为 40 毫微微摩尔/毫克胞浆蛋白 (见图 1、2)。

2. 在鹿茸的生发层组织中, 所测得的雌二

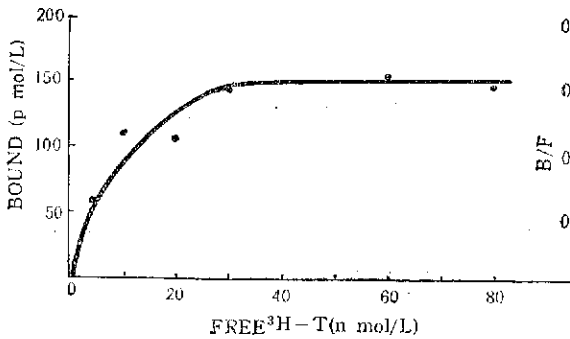


图 1 睾酮受体测定饱和曲线 BOUND (Pmol/L)——结合 (微微摩尔每升), FREE ^3H -T (n mol/L)——游离的氟标睾酮 (毫微微摩尔每升)

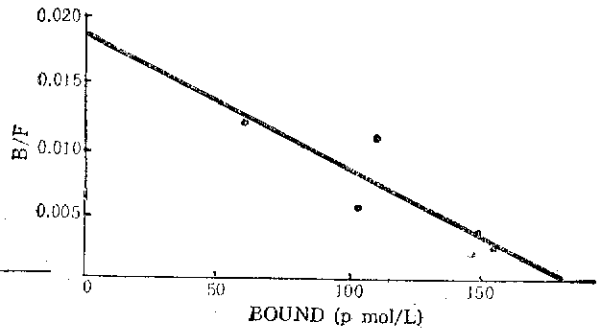


图 2 睾酮受体 (斯盖查德) Scatchard 作图 B/F——结合/游离

醇受体, 其最大结合不到 10 毫微微摩尔/毫克胞浆蛋白。所以不能结论该组织中含有雌二醇受体。

3. 在茸皮组织中, 均未测出睾酮和雌二醇受体。

讨 论

斯诺柯克 (Snochowski) 等用三种不同的配基: 睾酮、二氢睾酮和三甲基诺龙 R1881 (Methyltrienolone, R1881) 对前列腺睾酮受体进行了

比较测定。结果二氢睾酮最不适合作睾酮受体的配基,因其与血中睾酮结合蛋白的亲合力非常高,所以在测定中易造成含假受体的现象。以三甲基诺龙 R 1881 作配基最适合,因其几乎不与血中的睾酮结合蛋白相结合,而且与睾酮受体的亲合力非常高,Kd 值则很小,仅为 1.48 毫微摩尔。以睾酮作配基居中,其与受体结合的 Kd 值很高,为 8.65 毫微摩尔^[7]。本试验以睾酮作配基,所得 Kd 值为 9.7 毫微摩尔,高于斯诺柯克等的 8.65 毫微摩尔。这可能与茸组织的匀浆有关。

本试验的结果表明,在鹿茸生发层组织中存在有睾酮受体。这一结果从受体水平上证明鹿茸是雄激素作用的靶器官。巴勃尼克等用免疫组织化学的方法证明鹿茸生发层组织中存在睾酮^[4]。巴勃尼克等认为睾酮主要以合成代谢的介质参与茸骨基质的合成。

本试验中,在鹿茸生发层组织中所测得的雌二醇受体的 B_{max} 很低,所以无法结论该组织中雌二醇受体的有无。而巴勃尼克等亦未能在该组织中测定出雌二醇^[4]。本试验取茸时间稍早于巴勃尼克等,而此时供试鹿外周血中雌二醇含量最低。根据靶组织中雌二醇受体的量受环境中雌二醇量调节,呈正相关关系这一特点,如果鹿茸亦是雌二醇的靶器官,因此时外周血中的雌二醇含量低,所以雌二醇受体的含量亦必然很低,甚至难以测出。

本试验未从茸皮中测出睾酮和雌二醇的受体,这与巴勃尼克等的激素测定结果^[4] 不尽相同。他们虽未能在茸皮中发现雌二醇,但却测出了睾酮。本试验的结果似乎与茸组织的移植试验结果^[6] 相符。因为只有移植的额骨骨膜、角柄骨膜和鹿茸骨膜才能发育成鹿茸,而且这异位鹿茸的生长发育,亦受鹿体内分泌的调节,且与正常鹿茸相同步。而移植的茸皮则不能发育成鹿茸,尽管其始终维持茸皮的特点,而且在

正常茸皮脱落后,移植的茸皮仍继续生存。

本试验未对生发层以下部位的组织进行睾酮和雌二醇受体的测定,主要是因为这些组织均已骨化,硬度很大,难于匀浆。另外,巴勃尼克等亦未在这些组织中发现睾酮和雌二醇^[4]。

鹿茸生发层中存在睾酮受体的确定,在理论上为从分子水平揭示鹿茸生长发育机制奠定了基础。因为睾酮受体的发现,可使我们进一步对睾酮-受体复合物的性质、复合物与启动基因特定接纳点的结合以及 DNA 的复制、RNA 转录和特异蛋白的合成进行研究。在应用上可以在确定鹿茸的生长发育主要受性激素的调节和控制后,对生茸鹿进行外源性激素干扰,人为控制鹿茸生长,以达到提高鹿茸产量之目的。

参 考 文 献

- [1] 于肇英 1983 应用等电聚焦电泳测定类固醇激素受体 中华核医学杂志 63(3): 42—44。
- [2] 于肇英等 1984 颅内疾患的糖皮质激素受体研究 中华核医学杂志 64(6): 372—374。
- [3] Bubenik, G. A. et al. 1974 Immunohistochemical Localization testosterone in the growing antler of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), *Calc. Tiss.* 14: 121—130.
- [4] Bubenik, G. A. et al. 1983 Studies on growth of deer antler cycle in: R. D. Brown, ed., *Antler Development in Cervidae*. Caesar Kleberg Wildlife Research Institute, Kingsville, Texas.
- [5] Chapman, D. I., 1975 Antlers-bones of contention. *Mammal. Review*, 5(4): 121—164.
- [6] Goss, R. J., 1972 Wound healing and antler regeneration in "Epidermal Wound Healing" (H. I. Maibach and D. T. Rovee, eds). 291—298. *Year Book, Publ. Chicago*.
- [7] Snochowski, M. et al. 1977 Characterization and measurement of the androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism*, 45(5): 920—930.
- [8] Wislocki, G. B. 1943 Studies on growth of deer antlers. 631—653 in: *Essays in Biology Univ. Calif. Press*.
- [9] Wislocki, G. B., et al. 1947 The effects of gonadectomy and the administration of testosterone propionate on the growth of antler in male and female deer. *Endocrinology*, 40: 202—224.