

妊娠小鼠 $\Delta^5-3\beta$ 羟甾脱氢酶活性的测定*

郑玉群** 徐黻本

(南京药学院药理教研室)

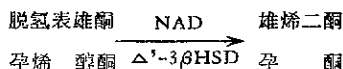
生物体内具有激素活性的所有甾体的合成,都涉及到将 $\Delta^5-3\beta$ 羟基氧化为 Δ^4-3 酮基的步骤,催化这一氧化过程的酶就是 $\Delta^5-3\beta$ 羟甾脱氢酶($\Delta^5-3\beta$ HSD)。维持妊娠必需的孕酮和雌二醇的合成也有赖于此酶的催化作用。早在六十年代初就已用生化和组织化学的方法^[5-7]证明了该酶的存在,而且只存在于甾体激素产生的组织内。在一定生理状况下, $\Delta^5-3\beta$ HSD 活性的变化是调控甾体合成速度的重要机制。最近高德伟等人报告了应用利血平及 LH-RH

类似物对动物卵巢 $\Delta^5-3\beta$ HSD 活性的影响,发现药物可改变卵巢 $\Delta^5-3\beta$ HSD 的活性,这在计划生育药物作用机制分析中具有一定的意义。小鼠是抗生育药物研究的常用动物,而妊娠早期小鼠卵巢 $\Delta^5-3\beta$ HSD 活性尚未见报告。因此,对小鼠妊娠早期卵巢 $\Delta^5-3\beta$ HSD 活性的变化进行了测定,结果报道如下。

* 本工作蒙北京师范学院高德伟老师的指点和帮助,特此致谢。

** 原该校研究生,现在上海医药工业研究院工作。

(一) 测定原理 卵巢 $\Delta^5-3\beta\text{HSD}$ 在离体孵育条件下,用辅酶 I(NAD) 作氢传递体,可将脱氢表雄酮转化为雄烯二酮,或将孕烯醇酮转化为孕酮。因此可用一定条件下雄烯二酮或孕酮生成的多少衡量酶活性的大小。 α 、 β 不饱和酮结构在 238—240 毫微米处有强吸收,可予以定量。



(二) 材料和方法

1. 药品与试剂 脱氢表雄酮 (DHP) 由本院有机室赵明合成; NAD 由上海酵母厂生产; 雄烯二酮标准品系北京师范大学高德伟老师赠; 0.1M 磷酸缓冲液 (PBS), pH7.4。

2. 动物 本院动物房提供昆明种杂交小鼠,雌、雄按 2:1 合笼,每日晨检查阴栓,以发现阴栓为妊娠第一天。

3. 方法

(1) 卵巢 $\Delta^5-3\beta\text{HSD}$ 液制备 将小鼠急性处死,迅速取出卵巢,修剪,吸去血液,精确称重后投入盛有 1 毫升 PBS 的玻璃匀浆器中,在冰浴中制成匀浆。立即测定或 -40°C 低温冷藏。

(2) 加样与温育 在 20 毫升带塞磨口试管中,加入 0.5 毫升酶液 (1—3 毫克蛋白质), 0.2 毫升 NAD (3—6 毫克), 50 微升 DHP (500 微克),用 PBS 调终体积至 1.9 毫升。每样本作实验管和空白管两管,空白管中不加入 DHP。然后在 37°C 水浴孵育 20 分钟,孵育完毕立即投入冰浴中并加入 0.2 毫升冰醋酸以终止反应。

(3) 提取与测定 每管中加入乙醚:醋酸乙酯 (1:1V/V) 混合液 5 毫升,剧烈震荡 60 次,用干冰骤冷法分离出有机层,自然挥发至干。残渣加入 5 毫升无水乙醇,在旋涡仪上旋摇 1 分钟,240 毫微米处测光密度值 (OD),以实验管减去空白管得净光密度值,从标准曲线上查出雄烯二酮的生成量。结果表示为:雄烯二酮微克/分/毫克/毫克蛋白质。

(4) 蛋白质含量测定 按哈特里 (Hartree)

法^[4]测定酶液的蛋白质含量。

(三) 实验结果 分别测定妊娠不同天数小鼠卵巢 $\Delta^5-3\beta\text{HSD}$ 活性,测得雄烯二酮的生成量 (微克/分/毫克蛋白) 分别为妊 0 天 0.307 ± 0.017 , 妊 3 天 0.620 ± 0.033 , 妊 5 天 0.451 ± 0.020 , 妊 7 天 0.540 ± 0.020 , 妊 9 天 1.080 ± 0.087 ($n=8, \bar{X} \pm \text{SD}$) (见图 1)。

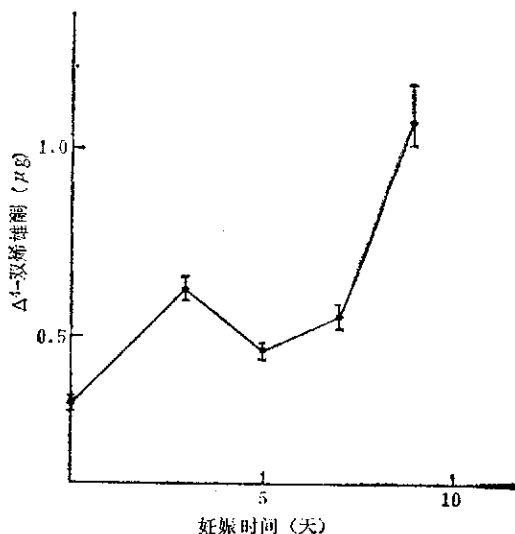


图 1 早期妊娠小鼠卵巢 $\Delta^5-3\beta$ 羟甾脱氢酶的活性 $n=8 \bar{X} \pm \text{SD}$

(四) 讨论 生化测定 $\Delta^5-3\beta\text{HSD}$ 活性,除了采用分光光度法外,还可采用气相色谱法和双标记同位素稀释法。但后两种方法条件较为苛刻,受仪器设备及放射性标记物的限制,而分光光度法就显得快速简便,适用于普通实验室的应用。工作效率也较高,一般两名工作人员一天可测 50—60 样品。

组织匀浆的制备是本实验关键的一步。卵巢一旦取出后,就应立即匀浆测定或 -40°C 保存。匀浆过程必须在冰浴中进行,低温冷藏不得超过两周,否则都会使酶活性大大降低。

过去的文献^[2-4]报告,每测定管都加入 6 毫克 NAD,本实验结果表明即使用 3 毫克同样可进行较好的测定。提取双烯雄酮采用了乙醚:乙酸乙酯 (1:1 V/V) 混合液,并使用 5 毫升,较原来减少一半,这样既可省时间,又可减轻大量有机溶媒挥发时对空气的污染,而其测定结果又不受影响。分离有机层采用了干冰骤冷冻结

水层,然后倾出有机层,很是方便。

一般认为妊娠期间血浆孕酮含量随妊娠期的增加而不断上升^[3]。我们测出的酶活力在妊5、7天有所下降,可能由于妊娠开始时,酶活力增加较甚,孕酮合成加快,导致卵巢中一时性酶反应产物积聚过多,从而反馈抑制了酶活力,尔后随着孕酮分泌的增加及机体需要量提高,抑制解除,酶活性继续增加,妊9天达最高。酶活性的大小与血浆孕酮水平并不完全平行也说明了血浆孕酮水平受卵巢合成与分泌的双重调节。

参 考 文 献

[1] 冯蓓等 1984 早孕妇女血清孕酮、雌二醇水平和蜕

膜组织孕酮受体的变化及其在早孕维持中的作用。生殖与避孕 4(2): 40—45。

[2] 李伟雄等 1980 LH-RH 类似物抗早孕机理分析 动物学报 26(4): 317—322。

[3] 高德伟等 1981 利血平对大剂量 LH-RH 类似物终止妊娠的拮抗作用 生殖与避孕 1(3): 30—33。

[4] Hartree, E. F. 1972 A modification of Lowly method, *Annu Rev Biol Chem* 48: 422—430.

[5] Pearlman, W. H. 1954 The conversion of Δ^5 -pregnan-3 β -ol-20-one to progesterone by homogenates of human placental tissue. *J Biol Chem* 208: 231—239.

[6] Rubin, B. L. et al. 1963 Changes in Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the ovaries of maturing rats. *Endocrinology* 72: 924—930.

[7] Samuels, L. T. et al. 1951 An enzyme in endocrine tissues which oxidizes Δ^5 -3 β -hydroxysteroids to unsaturated ketones. *Science* 113: 490—491.