

放射自显影术对机体不同组织的 蛋白质代谢研究

朱寿彭 乐尚成*
(苏州医学院)

用放射自显影术在预先注入体内蛋白质标记前身物 ^{35}S -蛋氨酸后, 研究在不同脏器和细胞水平上蛋白质的生物合成部位和合成的相对程度, 从定位、定量的角度分析在体内各脏器组织中蛋白质生物合成能力的差异。研究结果发现, 以肝组织中的蛋白质生物合成能力最高, 其次为肾脏、脾脏、大脑以及骨髓的幼稚细胞。而一些脏器组织如心脏、肺脏和骨骼肌等虽具有重要的生理活性, 但其体内的蛋白质的生物合成却并不旺盛。

关键词: 放射自显影 ^{35}S -蛋氨酸 掺入 生物合成 组织蛋白

由于医用同位素示踪技术的不断发展, 标记蛋白质的专一生理性前身物有所增多^[1,2]。为了探索机体内脏器和细胞水平的蛋白质生物合成过程, 我们运用放射自显影术^[3], 用 ^{35}S 标记蛋氨酸, 将这种蛋白质专一前身物引入体内, 观察其在血液、骨髓细胞以及不同脏器和细胞水平蛋白质的生物合成部位和程度^[4], 从定位、定量角度来比较体内不同器官组织中的蛋白质生物合成能力的差别。

一、实验方法

1. 静脉注入 ^{35}S -蛋氨酸后的脏器和细胞水平放射自显影

选用体重为 $140 \pm 5\text{g}$ 的 Wistar 纯品系雄性大白鼠 15 只, 用 ^{35}S -蛋氨酸作示踪剂, 其放射性活度为 18.5kBq/g , 由尾静脉注入, 其容量为 $1\text{ml}/100\text{g}$ 。实验各组分别在摄入 ^{35}S -蛋氨酸后 3、24 和 72h 的不同间隔时进行观察, 由颈动脉放血处死, 进行下列操作。(1) 取血液作血涂片, 在常温下干燥后, 放入无水甲醇液容器中固定 5min, 然后浸入盛有 5% 的火棉胶保护层液中, 立即迅速取出, 插入立式载玻片架上使之干燥, 然后将标本移入暗室中, 取出核 4 型液体乳胶, 置于 40°C 电热恒温水浴装置容器上熔化后, 随即加入 10% 液体核乳胶量的稳定剂 6-硝基苯咪唑液后, 再用重蒸馏水作 1:1 稀释, 轻轻搅匀备用。涂敷液体乳胶时, 先用定量滴管抽取 $15\mu\text{l}$ 已稀释的液体乳胶, 置于标本片的一端, 随即用玻棒均匀滑动涂匀, 在 25°C 恒温下阴干后, 收片装入曝光盒中, 在 -4°C 干燥条件下进行曝光处理 30d, 即可取出标本片作显影、停显、定影、水洗和甘油保护液浸泡处理, 随即进行改良 H.E 复染^[5]后即可镜检分析放射自显影象。(2) 迅速解剖。分离出肝、肾、脾、骨、骨骼肌、心肌和肺、脑等脏器的组织块, 用戊二醛缓冲液进行固定, 然后流水充分冲洗, 再依次经 70% 至 100% 的乙醇脱水, 作透明处理, 用石蜡包埋切片: (a) 脏器水平放射自显影操作, 切片厚度可取 $20\mu\text{m}$, 并将各组织切片脱蜡处理后, 放置紧夹在具有火棉胶薄保护层的同一乳胶膜上^[6], 置 -4°C 干燥条件下作曝光处理; (b) 细胞水平放射自显影操作, 切片厚度为 $6\mu\text{m}$, 经脱蜡手续和涂敷火棉胶薄保护膜后, 移至暗室条件下仍用玻棒均匀涂敷液体乳胶层^[7], 在 25°C 恒温

*江西医学院进修教师

下阴干后 收片装入曝光盒内曝光一个月,然后取出作显影,制止、定影、水洗和甘油保护液浸泡等一系列处理,染色后,在油镜下观察各标本中的放射自显影象。(3)制备骨髓涂片放射自显影是在各观察时取胸骨骨髓 3 μ l,用生理盐水作 10 倍稀释后制备的。以后的各项操作程序,与血涂片放射自显影的操作步骤相同。

2. 侧脑室注入 ^{35}S -蛋氨酸后的脑脏器和细胞水平放射自显影

实验是在体重为 $201 \pm 4\text{g}$ 的 5 只 Wistar 纯品系雄性大白鼠脑组织中进行观察的,经由侧脑室注入 ^{35}S -蛋氨酸的放射性活度为 $7.4 \times 10^2 \text{ kBq}$,其容积为 20 μ l,用我们特制的平头微量注射器作持续注入,注入侧脑室的时间为 15s,注入深度为 3.5mm。在摄入 ^{35}S -蛋氨酸后 30min 时,断头处死动物,迅速开颅取出脑组织块,用戊二醛缓冲液进行固定,然后流水充分冲洗,再依次经由 70% 至 100% 的乙醇脱水,再作透明处理,用石蜡包埋切片,制备宏观脑脏器水平放射自显影和微观脑细胞水平放射自显影,涂敷保护层后,在暗室中敷液体乳胶层,曝光处理 1 个月,取出作显影、制止、定影、水洗和甘油保护液浸泡,最后染色镜检各标本的放射自显影径迹。

二、实验结果

1. 静脉注入 ^{35}S -蛋氨酸后的脏器和细胞水平的放射自显影

(1) 血和骨髓涂片放射自显影定位 实验观察血涂片放射自显影的标本,发现摄入机体的 ^{35}S -蛋氨酸能迅速而较多地掺入到红细胞的血红蛋白成分中,且随着观察时间的延长,掺入量亦随之增升(图 1 左)。图 1 右为 ^{35}S -蛋氨酸摄入机体 24h 后的骨髓涂片放射自显影象,由图可见 ^{35}S -蛋氨酸首先呈优势选择性定位到幼稚细胞中,而较少摄入到成熟细胞中。

从实验得知,在机体静脉摄入 ^{35}S -蛋氨酸后不同阶段掺入到各组织蛋白中的总趋势是一致的,而其掺入程度则随时间增长而升高。

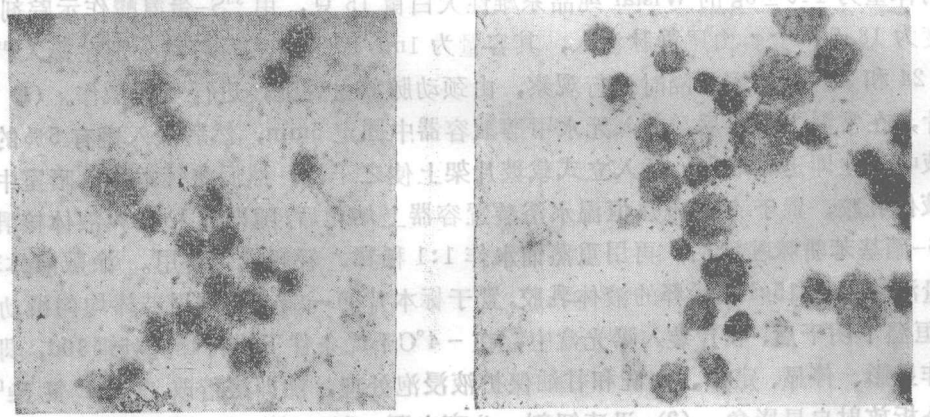


图1 ^{35}S -蛋氨酸静脉摄入机体后 24h 的外周血涂片(左)和骨髓涂片(右)放射自显影象(改良 H.E 复染, 8×100 , 低温干燥曝光 30d)

Fig. 1 Autoradiography of peripheral blood (Left) and bone marrow smear (Right) at 24 h after i.v injection of ^{35}S -methionine (Exposure in low temperature and dry condition for 30d, HE stain, 8×100)

(2) 脏器水平放射自显影定位 使用同一乳胶层,在相同操作条件下所得不同脏器水平

放射自显影的结果见图2。³⁵S-蛋氨酸在掺入到不同脏器组织蛋白中所呈现的放射自显影黑化强度的顺序依次为：肝>肾脏皮质>脾>骨>肾脏髓质>心>肺>骨骼肌>大脑皮层>间脑>中脑>小脑。并发现随着观察时间的延长，³⁵S-蛋氨酸掺入到组织蛋白中的量亦随之增升，但其掺入组织蛋白中的强度顺序不变。

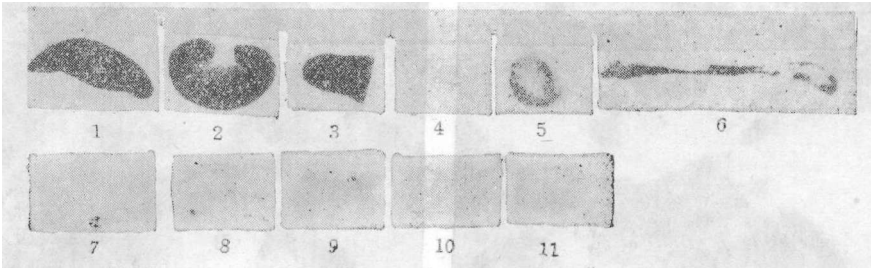


图2 在同一乳胶层上不同的脏器水平放射自显影象(低温干燥曝光30d)

1. 肝 2. 肾 3. 脾 4. 肺 5. 心脏 6. 股骨 7. 骨骼肌 8. 小脑 9. 中脑 10. 间脑 11. 大脑皮层

Fig. 2 Autoradiography of different organs in the same emulsion layer at 24h after i.v in jection of ³⁵S-methionine (Exposure in low temperature and dry condition for 30d, HE stain, 8×100)

1. Liver 2. Kidney 3. Spleen 4. Lung 5. Heart 6. Femur 7. Skeletal muscle 8. Cerebellum 9. Mid brain 10. Diencephalon 11. Cerebral cortex

(3) 细胞水平放射自显影定位 对肝、肾、脾和其他器官细胞的放射自显影结果如下。

1) 肝脏。观察到肝细胞对³⁵S-蛋氨酸的摄取速度很快，在³⁵S-蛋氨酸摄入24h后，在肝细胞内摄取该氨基酸的量即达高峰，此时可见在胞核和胞浆部位都呈现出浓集的径迹颗粒，且在细胞核中的蛋白质生物合成能力要比细胞浆中为高(见图3)。

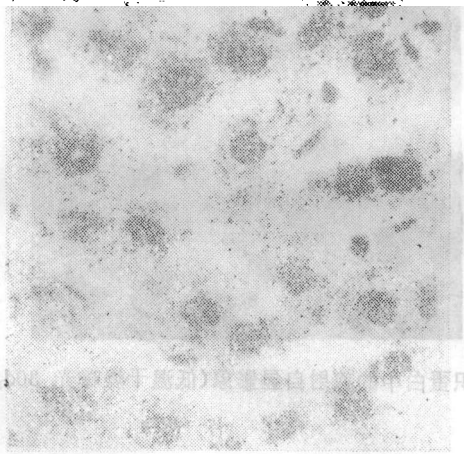


图3 机体摄入³⁵S-蛋氨酸24h阶段，呈高度掺入肝细胞核和胞浆组织蛋白中的放射自显影象(低温干燥曝光30d，改良H.E复染，1×800)

Fig. 3 Autoradiography of liver at 24h after i.v injection of ³⁵S-methionine (Exposure in low temperature and dry condition for 30d, H.E stain, 8×100)

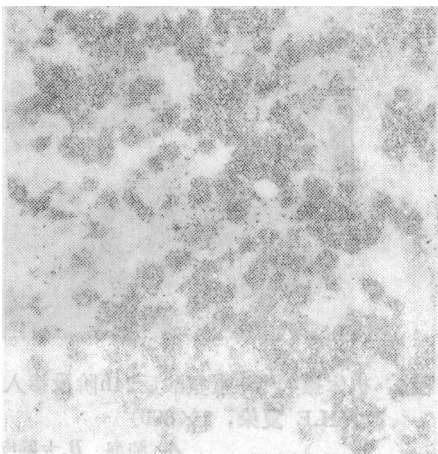


图4 机体摄入³⁵S-蛋氨酸后24h阶段掺入脾组织蛋白中的放射自显影象(低温干燥曝光30d，改良H.E复染，1×800)

Fig. 4 Autoradiography of spleen at 24h after i.v injection of ³⁵S-methionine (Exposure in low temperature and dry condition for 30d, H.E stain, 8×100)

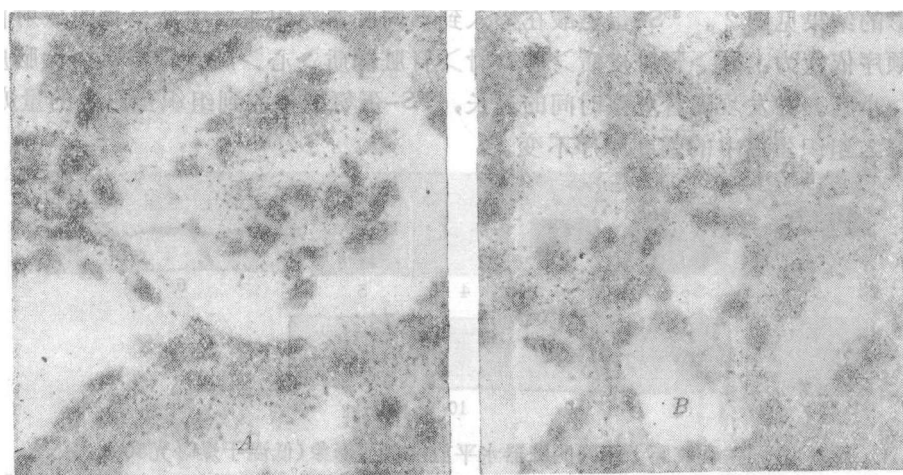


图5 机体摄入 ^{35}S -蛋氨酸后24h阶段掺入肾组织蛋白中的放射自显影象(低温干燥曝光30d, 改良H.E复染, 1×800)

A. 肾小球 B. 肾曲细管

Fig. 5 Autoradiography of kidney at 24h after i.v injection of ^{35}S -methionine (Exposure in low temperature and dry condition for 30d, H.E stain, 8×100)

A. Glomerule B. Tubules

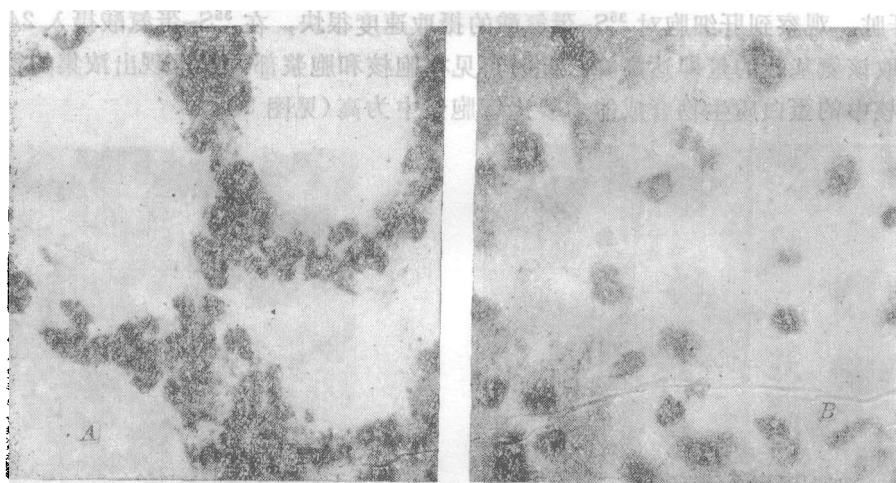


图6 机体摄入 ^{35}S -蛋氨酸后24h阶段掺入肺和脑组织蛋白中的放射自显影象(低温干燥曝光 30d, 改良H.E 复染, 1×800)

A. 肺泡 B. 大脑皮层灰质

Fig. 6 Autoradiography of lung and brain after i.v injection of ^{35}S -methionine (Exposure in low temperature and dry condition for 30d, H.E stain, 8×100)

A. Pulmonary alveolus B. Gray' matter of cerebral cortex

2) 脾脏。图4为机体摄入 ^{35}S -蛋氨酸后24h阶段的放射自显影象。可见脾脏组织细胞具有较强的摄取 ^{35}S -蛋氨酸的能力。

3) 肾脏。当 ^{35}S -蛋氨酸摄入机体24h时, 可见在肾小球和肾曲细管部位, 都有高度浓集的放射自显影径迹呈现, 如图5所示。

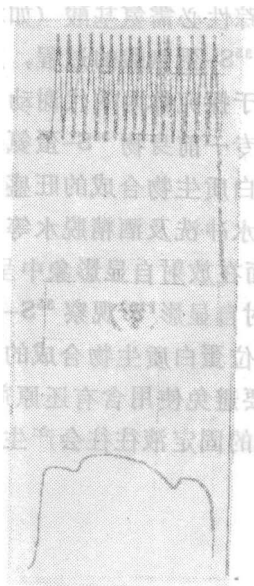


图7 放射自显影观察大脑两半球中 ^{35}S -蛋氨酸的掺入(低温干燥曝光60d)

Fig. 7 Autoradiography of cerebral hemispheres at 30min after lateral ventricle injection of ^{35}S -methionine (Exposure in low temperature and dry condition for 60d)

蛋氨酸掺入的放射自显影径迹。

4) 其它器官。机体在摄入 ^{35}S -蛋氨酸后24h的放射自显影径迹表明,该氨基酸只少量掺入到肺脏和脑组织蛋白中(见图6)。同时观察到在心肌细胞和骨骼肌细胞组织蛋白中,只有微量的 ^{35}S -蛋氨酸掺入。

2. 侧脑室注入 ^{35}S -蛋氨酸的脑脏器水平和细胞水平放射自显影

(1) 脏器水平脑放射自显影定位 通过测微光度计对大脑两半球切片的放射自显影进行定量观察其黑化程度^[8],发现在脑膜和皮层灰质部位、在视丘下部放射自显影象的黑化程度较高,表明在这些部位组织蛋白的生物合成比较旺盛,从而有较多的 ^{35}S -蛋氨酸的掺入(见图7)。

(2) 细胞水平脑放射自显影定位 由图8可见 ^{35}S -蛋氨酸主要掺入到端脑皮层灰质中,而在白质的神经胶质细胞部位则较少。至于在脑干的某些部位,特别是在导水管和周围灰质部位可以见到有较高密度的 ^{35}S -

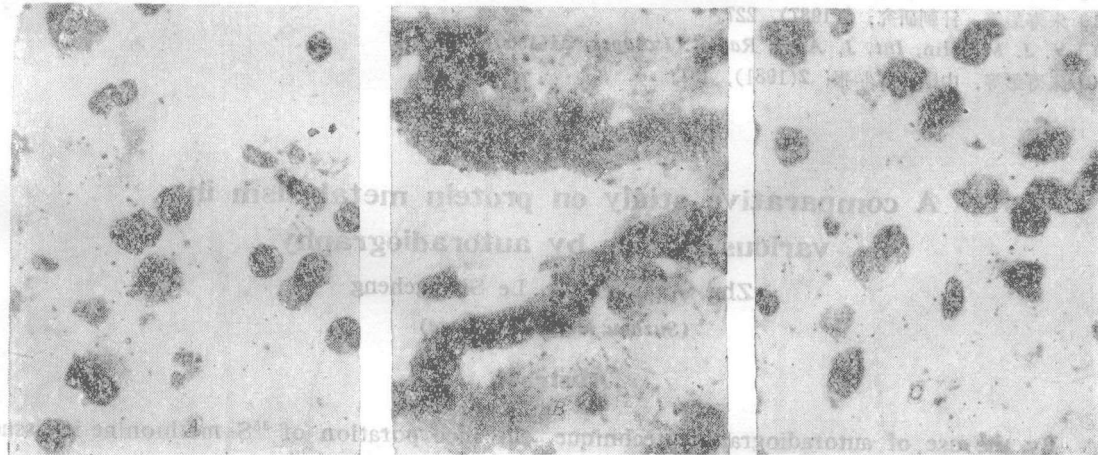


图8 细胞水平放射自显影观察端脑皮层灰质部位(A)、脑干导水管(B)及周围灰质部位(C) ^{35}S -蛋氨酸掺入(低温干燥曝光60d,改良H. E复染, 8×100)

Fig. 8 Autoradiography of gray matter of cerebral cortex (A) mesencephalon aqueduct (B) and periaqueductal gray matter (C) at 30min after lateral ventricle injection of ^{35}S -methionine (Exposure in low temperature and dry condition for 60d, HE stain, 8×100)

三、讨 论

体内蛋白质具有多种特殊功能,分布在各个细胞组分如细胞浆、胞核、胞膜及各种酶和

染色体中^[9]。由于体内蛋白质只有在其生成过程中才吸收示踪性必需氨基酸(如本实验中选用的³⁵S-蛋氨酸),所以在实验中所看到的机体内蛋白质摄取³⁵S-蛋氨酸的过程,反映了蛋白质生物合成的程度。而了解机体内蛋白质生物合成的情况对于探究体内的代谢动态过程极为重要。我们用放射自显影通过预先注入体内蛋白质标记的专一前生物³⁵S-蛋氨酸这个蛋白质生物合成中必要的氨基酸,探究在各个不同器官组织中蛋白质生物合成的旺盛程度。

由于本实验中采用了如纯甲醇或戊二醛作组织固定、流水冲洗及酒精脱水等处理步骤,可以保证在器官组织中的游离态³⁵S-蛋氨酸全部被洗脱。因而在放射自显影象中呈现的径迹,都是掺入到蛋白质中的结合态³⁵S-蛋氨酸。所以,用定量放射自显影^[10]观察³⁵S-蛋氨酸掺入某个器官组织蛋白中量的多少,实际上反映了该器官组织部位蛋白质生物合成的旺盛程度。

为了避免在放射自显影象中出现人工的化学假象,有必要避免使用含有还原剂的固定液,因为它能够使乳胶银盐还原而产生雾点;另外,由于含金属的固定液往往会产生人工本底,含氧化剂的固定液能导致银盐颗粒退色,均应避免使用。

参 考 文 献

- 【1】朱寿彭和张澜生,医用同位素示踪技术,原子能出版社,北京,1989年,第20页。
- 【2】E. A. Rapoport et al., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 30(1979), 143.
- 【3】朱寿彭和张澜生,放射自显影对体内污染放射性物质的代谢研究, CNIC-00233, SMC-0025, 原子能出版社,北京,1988年。
- 【4】朱寿彭,中华放射医学与防护杂志, 7(1987), 5:348.
- 【5】朱寿彭等,中国药理学报, 2(1981), 4:266.
- 【6】朱寿彭等,生理学报, 32(1980), 272.
- 【7】朱寿彭等,放射医学与防护, 3(1980), 37.
- 【8】朱寿彭等,针刺研究, 3(1987), 227.
- 【9】V. J. Mikulin, *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 31(1980), 707.
- 【10】朱寿彭等,中国药理学报, 2(1981), 197.

A comparative study on protein metabolism in various tissues by autoradiography

Zhu Shoupeng Le Shangcheng
(Suzhou Medical College)

Abstract

By the use of autoradiographic technique, the incorporation of ³⁵S-methionine in tissue protein has been utilized as an index of tissue protein synthesis. It was found that ³⁵S-methionine incorporates rapidly in immature cells of bone marrow, liver, kidney and spleen. In spite of their important physiological functions, heart, lung and skeletal muscle have their proteins synthesized at low speed.

Keywords: Autoradiography ³⁵S-methionine Incorporation
Protein biosynthesis

(1990年12月6日收到)