

第二屆和平利用原子能國際會議文獻

同位素在医学及 生物学上的应用

3

中国科学院原子核科学委员会編輯委员会編輯
科学出版社出版

第三版 2008年11月第1次印刷 2008年11月第1次印刷

两位素在医学及 生物学上的应用

3

中国科学院数学研究所 中国科学院数学研究所
中国科学院数学研究所 中国科学院数学研究所
中国科学院数学研究所 中国科学院数学研究所

同位素在医学及生物学上的应用(3)

中国科学院原子核科学委员会編輯委员会編

※

科学出版社出版 (北京朝阳門大街 117 号)

北京市书刊出版业营业許可証出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总經售

※

1960 年 3 月第 一 版

书号: 2120 字数: 86,000

1960 年 3 月第一次印刷

开本: 787×1092 1/16

(京) 0001—6,000

印张: 3 1/8 插图: 4

定价: 0.50 元

目 录

P/976	借放射性磷及紙层分析法研究心肌有机磷酸酯的代謝.....	1
P/979	关于帶有氘标记的胰島素的实验.....	8
P/990	鉀与鈉对酵母菌蛋氨酸代謝的影响 (用 S^{35} 研究).....	14
P/1345	利用 P^{32} 标记結核杆菌进行結核杆菌毒力研究.....	17
P/1494	利用标记的放射性磷 (P^{32}) 从事植物綫虫病的病理生理学研究.....	25
P/1500	应用同位素 ($^{45}Ca, ^{32}P, ^{35}S$) 在骨折愈合过程中对骨基质代謝的研究.....	29
P/1502	在胃腸手术后用放射性同位素研究消化和吸收(特別着重于胃手术病例).....	37
P/2119	中枢神經系統內蛋氨酸的代謝以及蛋白質代謝与中枢神經系統机能間 的关系.....	45
P/1490	放射性碘治疗甲状腺毒症的经验.....	54

借放射性磷及紙层分析法研究心肌有机磷酸酯的代謝*

A. Fleckenstein Johanna Janke

(德国: Freiburg 大学)

虽然心肌是最显著的有收縮性的組織,但过去关于心肌的高能磷酸化合物代謝的示踪实验发表的却很少。因此有必要作一些新的尝试,即利用近代技术测定心肌的主要有机磷酸酯部分的浓度以及各部分的轉化率。

方 法

我們多数的实验是利用麻醉的猫、大鼠及豚鼠的心脏,在人工呼吸下剖开胸腔;或用离体的兔心房,在 37°C 下置于改进的 Locke 溶液中 30 分钟。此溶液用氧气饱和,它含有 NaCl 9.0 克; KCl 0.42 克; CaCl_2 0.24 克; NaHCO_3 0.5 克; 葡萄糖 1.0 克; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.1432 克; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0156 克及蒸馏水 1000 毫升。通过不同途径给予以 P^{32} 标记的正磷酸盐:借静脉注射给予非离体的心脏,或加入溶液中给予离体的心房。在实验后将切除的心脏以及从溶液中取出的心房迅速放在液体氮气中冰冻。在有些实验直接将液体氮气注入剖开的胸腔,或将整个动物浸入液体氮气。

为了测定磷酸盐部分,将冰冻的組織在冷的乳鉢中研磨,向冰冻的肌粉中加入 2 毫升 5% 三氯乙酸或 0.3N 过氯酸,使混合物在 0°C 下融化并离心。取上清液测定酸溶性磷的总量及磷酸肌酸含量。另取 100 微升样品若干份,每份按照新改进的 Fleckenstein 及 Janke (1953) 方法在滤紙上进行测定。此改进的方法特别适用于放射性磷化合物(見 Fleckenstein, Janke, Davis, 1956; Gerlach, Fleckenstein, Gross, 1958),能分离下列部分:三磷酸腺苷,二磷酸腺苷,一磷酸腺苷,三磷酸鳥嘌呤核苷,二磷酸鳥嘌呤核苷,磷酸肌酸,6-磷酸葡萄糖,磷酸丙酮,2,3-二磷酸甘油酸,1,6-二磷酸果糖及正磷酸盐。

按照 Berenblum 及 Chain (1938) 的方法作磷酸盐的化学测定后,将磷鉍酸溶液放在流体計量管(M6 型,20 世紀电子工厂)中测定其比活性。用此法得到的三磷酸腺苷部分的計量数代表三磷酸腺苷分子上三个磷酸基活性度之总和。为了得到单独的数据,要进行每个磷酸基的 P^{32} 納入量的测定,为此取提取液的一个样品在室温下放置 48 小时,以使三磷酸腺苷部分水解变为二磷酸腺苷。再按常法作紙上层析以分离二磷酸腺苷,从而計量其活性度。二磷酸腺苷的計量数代表三磷酸腺苷- P^a 及三磷酸腺苷- P^b 比活性的总和。利用提取液的第三个样品,由三磷酸腺苷制备一磷酸腺苷。在紙上层析后一磷酸腺苷产生三磷酸腺苷 P^a 的比活性。由此得到的数据极易計算三磷酸腺苷分子上三个磷原子的单独比活性。三磷酸鳥嘌呤核苷分子上的三个磷酸基的比活性用同样方法测出(另测定了一例三磷酸二氧嘧啶核苷)。

* “第二届和平利用原子能国际会議文獻”編号 A/CONF. 15/P/976, 德意志联邦共和国,原文为英文。

利用紙层分析法除了能使用微量放射性磷化合物的便利条件外,还能借紫外綫来控制三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、一磷酸腺苷、三磷酸鳥便嘌呤核苷,二磷酸鳥便嘌呤核苷以及其它核苷酸的每一步的分离过程。此外在层析图谱中腺嘌呤核苷及鳥便嘌呤核苷的相对量可以在 260 毫微米光波下由紫外綫吸收光强度得到約略的測定。因此,由于心脏代謝紊乱而产生的三磷酸腺苷/二磷酸腺苷或三磷酸鳥便嘌呤核苷/二磷酸鳥便嘌呤核苷比值的显著改变极易观察,为此可将紙(指层析图谱)暴露在紫外綫照射下,或按照 Markham 及 Smith (1949)的照象技术法进行。

結 果

有机磷酸酯的浓度 我們实验中得到的主要有机磷酸酯部分的数据見于表 1。可以看出,三磷酸腺苷是心肌的最突出的含磷化合物,因为在猫及大鼠的心室中酸溶性磷的 32—38%,亦即相当于每克心組織含磷量的 30—40 微克分子,是来自三磷酸腺苷的,而在大多数的实验中磷酸肌酸含量不超过 20—25%。其它腺嘌呤核苷酸及鳥便嘌呤核苷酸,象二磷酸腺苷(4—5%),一磷酸腺苷(0.5—2%)及三磷酸鳥便嘌呤核苷(1—2%)含量要少得多。因此在整个的心室中,三磷酸腺苷及二磷酸腺苷的克分子比值頗高(4.5到8)。用豚鼠心室得到相似的结果。一些次要的有机磷酸酯部分(不包括在表 1 中)亦能被我們常规的方法所分离和測定,例如葡萄糖 6 磷酸酯(1—2%),磷酸丙糖(1—2%)及二磷酸果糖(小于1%),都在层析图谱中被鑑定为心肌中酸溶性磷的正常組成成分。此外,2,3二磷酸甘油酸(1—3%)在提取液中被发现,但此种含磷化合物可能来自心脏血管的紅血球殘余物而不是来自心脏組織本身,因为在大鼠的紅血球中2,3二磷酸甘油酸占酸溶性磷的50%(見 Fleckenstein, Gerlach, 1953; Gerlach, Fleckenstein, Gross, 1958)。

表 1 心肌中酸溶性含磷化合物的浓度
数据以微克分子/克湿重及酸溶性磷总量的%表示

	实验号碼	三磷酸腺苷		二磷酸腺苷		一磷酸腺苷		磷酸肌酸		无机磷		
		微克分子/克	%	微克分子/克	%	微克分子/克	%	微克分子/克	%	微克分子/克	%	
猫 心 室	1	3.18	31.7	0.60	4.0	0.23	0.7	5.87	19.8	5.83	19.0	非 离 体 的 心 脏
	2	3.51	35.6	0.80	5.4	0.15	0.5	4.52	15.1	5.58	19.1	
	3*	3.47	37.2	0.68	4.8	—	—	8.58	27.3	1.48	18.6	
大 鼠 心 室	4	4.56	34.2	0.98	4.9	—	—	9.62	24.1	2.84	7.1	非 离 体 的 心 脏
	5	4.20	37.6	0.72	4.3	0.38	1.1	5.75	17.2	4.28	12.8	
	6	3.68	37.0	0.65	4.3	0.63	2.1	5.07	17.0	4.24	14.2	
	7	4.03	37.9	0.47	3.9	0.58	1.8	6.75	20.4	3.94	12.3	
兔 心 房	8	1.56	23.4	0.23	2.3	0.31	1.6	2.66	13.2	5.72	28.4	离 体 的 心 房
	9**	1.69	26.7	0.21	2.3	0.28	1.5	2.37	12.5	4.28	22.6	
	10	1.57	23.7	0.26	2.6	0.24	1.2	2.57	13.0	5.36	27.1	
	11**	2.29	32.8	0.22	2.1	0.19	0.9	3.39	16.2	3.33	15.4	

* 在放入液体氮气中的 10 秒前借靜脉注射 100 微克乙酰胆碱/公斤体重以制止心室的活动。

** 向溶液中加入乙酰胆碱(7×10^{-5} 克分子/升)以停止心房的活动。

离体的兔心房中存在的有机磷酸酯与非离体的猫和大鼠心室中的含磷化合物沒有很大的差别。但在离体的兔心房中三磷酸腺苷和二磷酸腺苷比心室組織中的含量稍低(見

表1)。此种差别是由于心房的生理状态,或是由于心房离体后又处于人工溶液中 30 分钟而造成的,则还不完全清楚。无论如何还没有看到有組織损伤的迹象,因为所有心房表现有规律的自发性活动,給出 170—210/分钟的頻率。

在两个实验中,于 15 分钟后,向溶液中加入乙酰胆硷以停止心房的活动,使之再处于静止状态 15 分钟(見表 1 中实验 9 及 11)。值得特别注意的是这两个心房比活动的心房显示較大量的三磷酸腺苷或磷酸肌酸,以及較小量的无机磷酸盐。在一个类似的实验中,猫的心室在液体氮气中冰冻前 10 秒钟借靜脉注射乙酰胆硷以抑制其活动(見表 1 中实验 3),此时,高能磷酸鍵与无机磷的比值显然亦高于正常。这些結果与我們实验室 Hochrein 及 Döring (1958) 二氏用豚鼠的心-肺制品所改变的符合。著者们发现心脏循环的輸出量与心室組織中无机磷含量呈簡單正比的关系。

放射性磷的納入 关于心脏有机磷酸酯代謝的最好綫索来自 P^{32} 标记正磷酸盐的实验。心肌和其它組織相似可以在几分钟內将可測量的放射性磷由細胞外移入細胞內,构成有机磷的部分。为了測定 P^{32} 納入的途径,在与放射活性媒介接触了不同的時間后,将心脏組織在液体氮中冰冻并分析各个磷部分取得的活性度。在非离体的大鼠心室,利用此种技术发现在三磷酸腺苷的末端磷酸基 ($ATP-P^r$) 的 P^{32} 納入的速度最大。但与 $ATP-P^b$ 及磷酸肌酸的 P^{32} 的交換亦証明很快。从表 2 的数据可以看出,在靜脉注射放射性磷酸盐 20 分钟后,大鼠心室內 $ATP-P^r$ 的比活性达到血浆无机磷比活性的 10—15% (平均 13%)。显然 $ATP-P^b$ 及磷酸肌酸的比活性与 $ATP-P^r$ 的数值差別并不显著。此外三磷酸鳥嘌呤核苷(GTP)分子中不稳定的磷酸基的更新,特别是 $GTP-P^r$,与 ATP 分子中相对的磷酸基更新的速度近似。另方面,稳定的 $ATP-P^a$ 的納入量不超过进入 $ATP-P^r$ 活性度的 1/200,但葡萄糖-6-磷酸酯的轉化似乎相当快。三磷酸二氧嘧啶核苷(UTP)的变化与 ATP 相似(一次观察)。

表 2 心肌中細胞外标记 P^{32} 正磷酸盐納入細胞內有机磷酸酯部分
(靜脉注射 0.2 毫居里后 20 分钟分析大鼠的心室。离体的心房置于含 0.4 微克分子正磷酸盐/毫升的放射活性媒介中 15 分钟,并在 37°C 下保温)

	实验号码	比 活 性 (以 細胞 外 P 比 活 性 的 % 表 示)							細胞外**无机磷 計数/分/微克= 100%
		$ATP-P^a$ %	$ATP-P^b$ %	$ATP-P^r$ %	磷酸肌酸 %	$GTP-P^b$ %	$GTP-P^r$ %	葡萄糖- 6-磷酸酯 %	
非离体的 大鼠心室	4	0.04	10.0	10.9	10.1	7.55	11.5	8.6	12554
	6	0.03	12.9	14.4	14.0	7.77	—	12.5	2650
	7	0.04	13.1	13.7	12.7	7.16	11.7	13.1	2292
离体的兔 心 房	8	0.012	1.40	2.45	2.44	—	—	0.57	408000
	9*	0.016	2.33	3.68	3.63	—	—	0.89	342000
	10	0.017	1.80	2.65	2.81	—	—	0.56	356500
	11*	0.015	2.49	3.63	3.44	—	—	1.09	297500
	12***	0.002	0.36	1.31	1.32	—	—	0.48	813000

* 向放射活性媒介中加入乙酰胆硷 (7×10^{-5} 克分子/升)使心房处于静止状态。

** 在大鼠的实验中細胞外无机磷的比活性,指在注射 P^{32} 20 分钟后血浆无机磷的比活性。

*** 心房处于 20°C。

在进一步的实验中研究了离体的兔心房在饱和氧的 Locke 氏溶液中保温 37°C 下 15 分钟, P^{32} 的摄入, 实验結果亦見表 2, 实验結果指出,离体的心房納入标记的細胞外正磷

酸盐比非离体的大鼠心室纳入的速率为慢。再者,象在心室中的一样,在有机磷酸酯部分中,ATP-P^γ及磷酸肌酸中的磷显示出最快的P³²交换。如以放射性磷纳入ATP-P^γ的高速率作为1000,则ATP-P^β的比活性达到650;此外稳定的P^α不超过5(见表3)。值得注意的是实际上在兔心房中ATP-P^γ及磷酸肌酸的比活性几乎没有区别。在ATP-P^γ中放射性磷原子为1000,则磷酸肌酸的放射性磷原子平均为997(在四个实验中测定过)。在这方面离体的心房与离体的蛙肌(腹直肌)不同,后者显示较低的磷酸肌酸-P的比活性(Fleckenstein及Janke,1957)。

表3 在离体的兔心房中细胞外标记P³²正磷酸盐被ATP的P^α、P^β及P^γ,以及磷酸肌酸所摄取的相对速率(实验如表2所示)

ATP-P^γ的比活性按1000计

实验号码	P ^α	A T P P ^β	P ^γ	磷酸肌酸的磷
8	4.9	573	1000	995
9*	4.3	634	1000	986
10	6.4	678	1000	1061
11*	4.1	686	1000	947
平均	5.0	643	1000	997

* 向放射性媒介中加入乙酰胆碱(7×10⁻⁵克分子/升)使心房处于静止状态。

但在以下重要点上,心房及离体蛙肌的结果完全相符:如最早用蛙肌进行的实验所示,由电刺激或向媒介中加入刺激剂后并不发生明显的P³²摄入量的增长(见Fleckenstein, Janke及Davis,1956;Fleckenstein及Janke,1957)。

表4 离体的兔心房将细胞外正磷酸盐纳入到ATP、磷酸肌酸及有机磷总量的绝对量
细胞外正磷酸盐含量为0.4微分子/毫升,37℃,给予的量按克分子/克新鲜组织/分钟计

实验号码	进入ATP×10 ⁻⁹ 克分子	进入磷酸肌酸 ×10 ⁻⁹ 克分子	进入有机磷总量 ×10 ⁻⁹ 克分子	
8	4.029	4.322	11.159	自发的活性度180/分
9	6.784	5.732	16.286	借乙酰胆碱以抑制
10	4.658	4.823	13.015	自发的活性210/分
11	9.364	7.787	22.223	借乙酰胆碱以抑制

即使重复和极度的强直收缩并不增高放射性磷的纳入量,另外借升高温度使静止的代谢增加,引起了放射性磷纳入ATP及磷酸肌酸部分的比例增加。表2所列的实际数据说明关于离体的兔心房的同样原则。这里要再次提出,象在蛙肌一样,每分钟跳动180—210次的活动的心房与被乙酰胆碱抑制的心房相比,在15分钟内有机磷酸酯部分并未到达更高的比活性。显然,与静止的心房相比,在37℃下跳动的离体的心房中放射性磷纳入到ATP、磷酸肌酸及总有机磷的量甚至还少。从计算正磷酸盐转移的绝对量(表4)看来,此事实更为明显。数据指出,两个跳动的心房平均每分钟每克新鲜组织从细胞外摄取约12×10⁻⁹克分子正磷酸盐,并纳入到有机磷部分;反过来两个被抑制的心房每分钟每克新鲜组织却摄取18×10⁻⁹克分子。大约此细胞外正磷酸盐的3/4由ATP及磷酸肌酸所摄取。与此相似在非离体的大鼠心室中,由细胞外正磷酸盐纳入到有机磷的部分,经计算为5至15×10⁻⁸克分子/克新鲜组织/分钟,更准确的数据不可能得到,因为在我們用大鼠作的实验中,在注射P³²的20分钟内,细胞外正磷酸盐比活性的变动较大,在任何情

况下,大鼠的心室比离体的兔心房在細胞内标记正磷酸盐的摄取为快。毫无疑问,截至目前为止,我們所分析的所有可收缩的组织中, P^{32} 纳入到高能磷酸化合物部分的量以心室

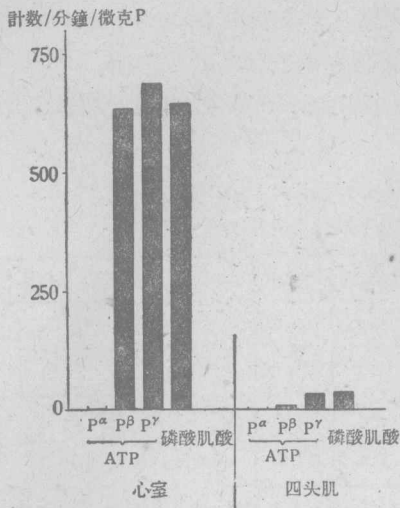


图1 在静脉注射0.2毫居里标记磷的正磷酸盐后大鼠心肌及骨骼肌中 P^{32} 纳入到 ATP 及磷酸肌酸的速率。在注射 P^{32} 后 20 分钟将麻醉的动物放入液体氮中以杀毙之。

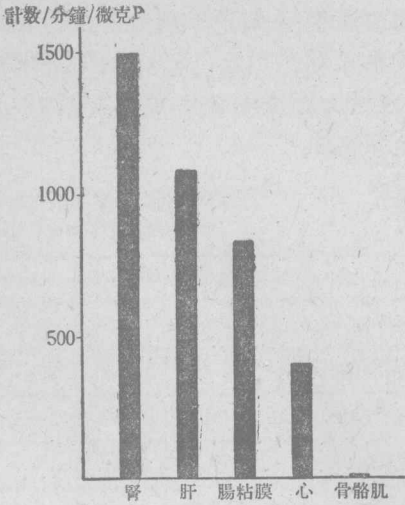


图2 在静脉注射0.2毫居里带标记 P 的正磷酸盐后,大鼠肾、肝、肠粘膜、心、骨骼肌(四头肌)中 P^{32} 纳入到 ATP 部分的速率。在 P^{32} 注射的 20 分钟后将麻醉的动物放入液体氮以杀毙之。放射活性度以计数/分钟/微克 ATP-磷表示。

为最高。例如向完整的大鼠静脉注射放射性磷,则标记磷纳入到心室的 ATP 及磷酸肌酸部分的速度比纳入到静止或活动的骨骼肌快15—20 倍(见图 1)。此种事实似由于粒线体量的较大差别所引起的,因为心肌纤维比骨骼肌纤维含有较多的粒线体(Kisch,1957)。静止心脏组织在氧的摄取量上比静止骨骼肌氧的摄取量也高 10 到 20 倍(Clark 及 White, 1929)。在这方面心肌与具有高的代谢活性的肝及肾脏比与骨骼肌更类似,因之 P^{32} 以特快的速度纳入肾及肝(以及肠粘膜)的 ATP 部分,甚至比纳入到心肌的还快,此种事实当不足为奇(见图 2)。实验启示细胞外标记正磷酸盐移入细胞内的有机磷酸酯部分(特别是 ATP)的作用与氧化磷酸化的过程是密切联

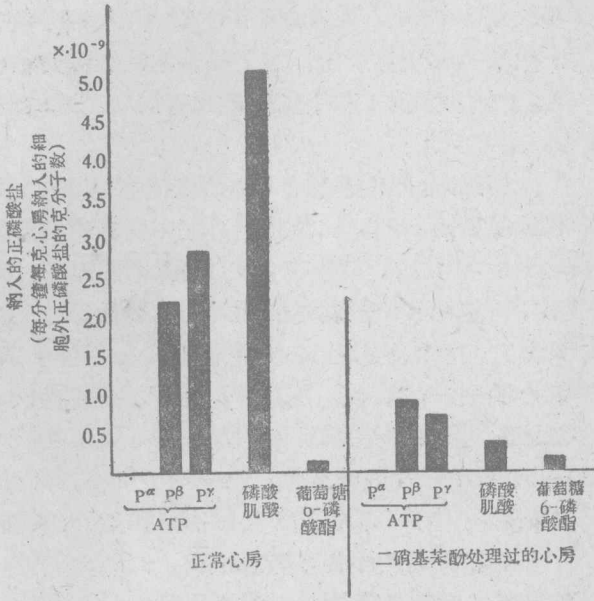


图3 2,4 二硝基苯酚抑制细胞外标记 P^{32} 正磷酸盐的纳入 ATP, 磷酸肌酸及葡萄糖 6-磷酸酯。在 37°C 下将离体的兔心房置于含 0.4 微克分子/毫升标记正磷酸盐及 1×10^{-4} 克分子 2,4 二硝基苯酚的 Locke 溶液中 15 分钟。

系的。如此,具有較高磷酸化能力的器官(如腎及肝)显出最高的 P^{32} 的納入速率。肯定地說,一个迅速的 ATP 轉化不能夠認為是可收縮組織所特有的。

在急性衰竭状态下心肌的有机磷酸酯代謝 在观察了完整心肌組織后,下一步观察由于局部缺血、血氧过少或注射 2,4 二硝基苯酚引起的心肌急性衰竭状态下心肌有机磷酸酯的代謝。結扎猫的冠状动脉或向大鼠靜脉注射适当量的 2,4 二硝基苯酚,常常在 1—2 分鐘內引起心脏的纖維性顫动及停止。一旦这些症状出現,即将心脏放入液体氮中冰冻并作化学分析。

表 5 由于局部缺血、血氧过少及注射 2,4 二硝基苯酚而引起的心肌急性衰竭状态下,心肌中酸溶性磷化合物的浓度数值以酸溶性磷总量的 % 表示

	ATP	ADP	AMP	磷酸肌酸	葡萄糖-6-磷酸酯	无机 P	备 註	
对照的心脏	34.8	4.7	0.6	20.7	—	15.6	三次实验的平均值	猫的左心室
急性局部缺血	10.0	3.9	0.7	6.6	3.2	51.7	結紮双冠状动脉两分鐘后心脏停止	
急性局部缺血	25.1	4.2	0.1	5.2	2.7	33.4	結紮双冠状动脉一分鐘后心脏停止	
对照的心脏	36.7	4.4	1.6	19.7	0.9	11.6	四次实验平均值	大鼠的左心室
血氧过少心力衰竭	28.0	9.4	1.9	6.6	1.8	25.2	用含 4% O_2 的 N_2 人工呼吸 30 分鐘后	
注射 2,4 二硝基苯酚后引起的原纖維性变	24.9	10.4	1.5	5.9	1.5	29.5	按每克体重靜脉注射 10 毫克 2,4 二硝基苯酚 45 秒鐘后	

表 5 的結果表明,在心脏組織的急性衰竭中具有以下特征:与磷酸肌酸部分分解的同时发生 ATP 含量的中等程度降低以及正磷酸盐含量的大量增加。如此在結扎双側冠状动脉两分鐘后,猫的心室中正磷酸盐部分占酸溶性磷的 50% 以上,另方面在正常猫的心脏中平均值为 15%。在以含 4% O_2 的 N_2 人工呼吸 30 分鐘后引起的血氧过少、心力衰竭情况下观察到相似的变化。这些結果和我們实验室中利用豚鼠的心肺制品所得到的結果相一致,它們亦显示了与不完全的发育同时产生的磷酸肌酸含量的大大降低(Hochrein 及 Doring, 1958)。

如所周知,氧化磷酸化的速率能由于血氧过少或注射 2,4 二硝基苯酚而降低。因此如 P^{32} 摄取量所指出的,能預計到心脏中高能磷酸部分的轉化率亦受浓度的影响。在离体的兔心房中, 1×10^{-4} 克分子 2,4 二硝基苯酚对于放射性磷納入到有机磷酸酯的影响如图 3 所示。清楚地看到細胞外标记的正磷酸盐被 ATP 及磷酸肌酸所摄取的絕對量是大大地降低了。与对照的相比,向磷酸肌酸部分轉移的磷酸有 90% 被抑制。向 ATP 及 GTP 轉移的影响則常常較小。另方面 P^{32} 摄入到葡萄糖-6-磷酸酯的量似乎由于酵解反应的促进而加强。大鼠心室在以含 4% O_2 的 N_2 人工呼吸 30 分鐘后引起的血氧过少、心力衰竭状态下,有着十分近似的变化。唯一的区别是,对离体的心房, 1×10^{-4} 克分子二硝基苯酚的影响較大。对于心肌机能不全时有机磷酸酯代謝的紊乱現在正作專門的观察。

在总结我們的报告时愿意指出,利用放射性磷及紙层分析法給心脏学的研究开辟了新的領域。目前所得到的結果可以認為:在实验心脏生理学中这些近代的技术可为进一步闡明心脏代謝,作出不可忽視的貢獻。

参 考 文 献

- [1] Fleckenstein, A., a. J. Janke. Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphor-Verbindungen im kontrahierten und erschlafften Froschmuskel, Pflügers Arch. **258**: 177—199 (1953).
- [2] Fleckenstein, A., J. Janke a. R. E. Davies. Der Austausch von radioaktivem Phosphat mit dem α -, β - und γ -Phosphor von ATP und mit Kreatinphosphat bei der Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin, Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **228**: 596—614 (1956).
- [3] Gerlach, E., A. Fleckenstein a. E. Gross. Der intermediäre Phosphat-Stoffwechsel des Menschen-Erythrocyten, Pflügers Arch. **266**: 528—558 (1958).
- [4] Berenblum, I. a. E. Chain. An improved method for the colorimetric determination of phosphates. Biochemic. J. **32**: 295—298 (1938).
- [5] Markham, R. a. J. D. Smith. Chromatographic studies of nucleic acids. A technique for the identification and estimation of purine and pyrimidine bases, nucleotides and related substances. Biochemic. J. **45**: 294—298 (1949).
- [6] Fleckenstein, A. a. E. Gerlach. Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Taubenerythrocyten verschiedenen K^{+} -Gehalts, Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **219**: 531—548 (1953).
- [7] Gerlach, E., A. Fleckenstein a. E. Gross. Der intermediäre Phosphat-Stoffwechsel des Menschen-Erythrocyten, Pflügers Arch. **266**: 528—558 (1958).
- [8] Hochrein, H. a. H. J. Döring. Unpublished observations.
- [9] Fleckenstein, A. a. J. Janke. Der Austausch von radioaktivem, ^{32}P -markiertem Orthophosphat mit dem P^{α} , P^{β} und P^{γ} von ATP und mit Kreatinphosphat bei Muskelruhe, Temperaturvariation und elektrischer Reizung, Pflügers Arch. **265**: 237—263 (1957).
- [10] Fleckenstein, A., J. Janke a. R. E. Davies. Der Austausch von radioaktivem Phosphat mit dem α -, β - und γ -Phosphor von ATP und mit Kreatinphosphat bei der Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin, Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **228**: 596—614 (1956).
- [11] Kisch, B. Der ultramikroskopische Bau von Herz und Kapillaren, Darmstadt 1957.
- [12] Clark, A. J. a. A. C. White. The oxygen consumption of the auricles of the frog and of the tortoise, J. Physiol. **68**, 406 (1929).

(趙宝初譯)

关于带有氚标记的胰岛素的实验*

C. V. Holt, I. Nolte, L. V. Holt**

技術协助 I. Hallmann, H. Lüth

对于分子量較小的激素如类固醇代謝的研究,借助于带 C^{14} 或氚标记的化合物已取得許多成果,但对于蛋白質激素代謝的知識則还知道得非常有限。其原因在于很难用适合的方法使蛋白質激素带上放射性标记。例如用 C^{14} 标记氨基酸,再用生物合成的方法,将这标记氨基酸并入胰岛素分子中,但所合成者仅为一种特异活性很低的激素^[1,2],因而限制了用这种方法标记蛋白質分子。以后也試驗了用通常胰岛素中所不含有的元素或化学基团的放射性同位素标记在胰岛素上,因而制成了带 S^{35} 标记的胰岛素硫酸酯^[3] 和带有 I^{131} 标记的胰岛素碘化物^[4],特别是后一种制剂已在許多不同的实验中应用^[4]。用小白鼠惊厥試驗法测知 I^{131} -胰岛素并未丧失其生物活性^[5]。但某些学者认为用碘化胰岛素所得实验結果很难进行分析,因为在机体内可能出现分子脱碘而其肽键并不水解的現象^[7]。此外,带有标记的蛋白質分子和不带标记的生物活性物质,其代謝也可能有所不同,因为现在尚无适当的方法可以証实带有标记分子的生物活性的存在与否^[6]。已经有人观察到 I^{131} 标记的白蛋白和生物合成带标记的蛋白質其代謝有所不同^[8]。Wilzbach 曾用简单交换法使氚 (β^- , 0.018 Mev.) 进入低分子量的化合物中,我們试图了解能否将他的操作方法应用于蛋白質激素而不使其丧失生物活性。我們用蛋白質激素之一的胰岛素作了一些实验,茲报告如下。

材料及方法

用对氚的效率为 30.1% 的无窗流动計数器测定放射活性;测定或在无限薄的薄度中进行,或根据自吸收标准曲线将数字对自吸收加以校正。将 1 克結晶胰岛素¹⁾ (23 ± 0.5 国际单位/毫克,含鋅 0.62%) 在 0.39 大气压力 27°C 温度中使与 2.18 居里的氚接触 2 星期²⁾。按 Romans, Scott 及 Fisher^[10] 等氏的方法使氚化胰岛素再結晶。将氚化胰岛素放入含氮的密封試管中,在 105°C 的温度下用 5.7N HCl 使其水解。在真空中除去过多的盐酸;在逐漸上升的 HCl 浓度下^[11] 用阳离子交换剂 Dowex 50 × 8 进行氨基酸的色层分析。按 Troll 和 Cannon 氏法^[12] 测定蒸发部分的 α 氨基氮。

动物实验用雄性 Sprague-Dawley 大白鼠,体重 150—200 克。将大鼠禁食 14 小时,然后靜脉注射氚化胰岛素 0.4 微克/100 克以测定其生物活性。用 Frank 和 Kirberger 氏法测定血糖^[13]。在靜脉注射氚化胰岛素 33 微克/100 克后 2 小时测定它在大鼠各器官中

* “第二屆和平利用原子能国际會議文献”编号 A/CONF. 15/P/979, 德意志联邦共和国,原文为英文。

** 德意志联邦共和国汉堡大学生化系。

1) 我們感謝 H. Mittenzwei (激素-化学,慕尼黑)慷慨地贈送我們胰岛素。

2) 新英格兰核子协会,波斯顿。

的分布。动物在戊巴比妥麻醉下处死，取出器官并将其迅速冰冻。然后各取其一部分用三氯醋酸磨成匀浆，使其最后浓度为 5%。用 Best、Haist 及 Ridout^[14] 氏方法处理不溶于三氯醋酸的物质，提取胰岛素。将乙醚沉淀物溶解和涂片后测定氚的活性，根据自吸收将所得数字加以校正，并计算原始物质的湿重。如此计算的活性叫做“蛋白结合的胰岛素活性”。若用 Haist 氏法分离与蛋白结合的氚活性，则其标准差较大，这是由于方法的困难所致。但是此法所测得的活性较不将三氯醋酸沉淀提纯所测得的放射活性有更大的代表胰岛素或类胰岛素物质的可能性。于 50°C 和真空情况下在 NaOH 上除去三氯醋酸后，测定三氯醋酸可溶部分的放射活性，并校正其结果。

皮下注射生长激素¹⁾ (Armour, Lot M 308) 4 天，剂量为每天 2.5 毫克/100 克。皮下注射考的松²⁾ 10 天，剂量为每天醋酸考的松 4 毫克/100 克。

将饥饿 3 小时的大鼠的膈膜培养在磷酸钾氯化钠的缓冲液中（缓冲液的 pH 为 7.0，通入含有 8% CO₂ 的氧气），温度为 37°C，每分钟振荡 110 次。缓冲液中葡萄糖浓度为 250 毫克%，最后的胰岛素浓度为 8353 微克/毫升。带氚标记及不带标记胰岛素的比例不定。培养 1 小时后，取出膈膜，在标准情况下吸干并称重。测定培养前及培养后在培养液中的放射活性，以其差别作为膈肌对放射能的吸取量。（按每 100 毫克膈肌的吸取量计算。）

结 果

一、氚化胰岛素的特性 胰岛素与氚接触后，在未与溶剂交换前其放射活性为 17.9 微居里/毫克。在氨基酸的溶媒系统中，色层分离法表现出约有 30% 的放射性有相当均匀分布，而其余的放射性均集中于一个宽的地区。

水透析可使粗制剂的放射活性迅速丧失（图 1）。追踪放射活性的降低时，发现在透

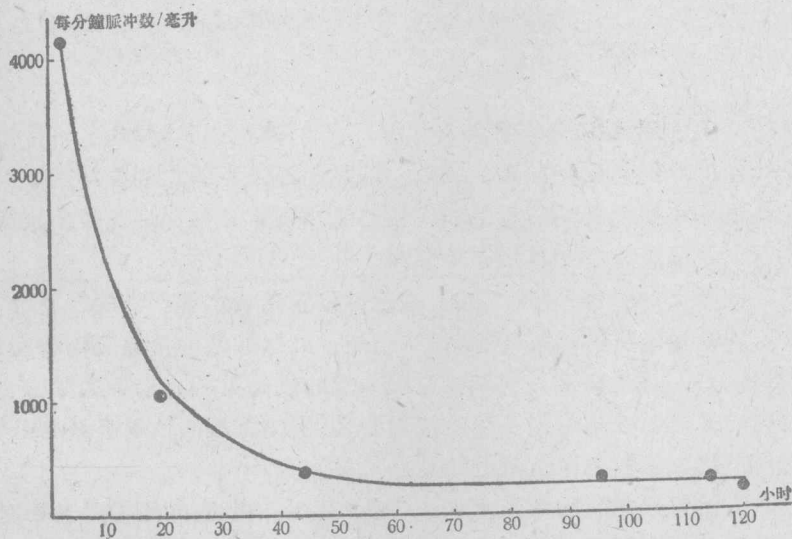


图 1 氚化胰岛素在 4°C 对蒸馏水的透析（每 3 小时换一次）。

—●— = 1 毫升透析物蒸发后测定的冲动率。

1) 生长激素是由芝加哥防护实验室 I. Bunding 博士赠送的。

2) 我们感谢奥斯科学研究室 J. Lens 博士赠送考的松。

析 50—70 小时后,透析液中放射活性的出現速度是相当恆定的。可見透析似乎并非制备恆定特异活性样品的合适方法。透析实验所得結果,可用蛋白分子在透析的稀溶液中发生变性或衰退来解释。

氘化胰島素經過六次再結晶;在第三次再結晶后,其特异活性就沒有改变了。最后产品的特异活性为 4.6 微居里/毫克。在 5 小时的透析期內,透析液中不能測出氘的活性。

由于氘化胰島素在紙上吸收甚強,因而很难用紙上层析法及紙上电泳法进行研究。不带标记的胰島素也有相似的吸收性質,但比較弱。

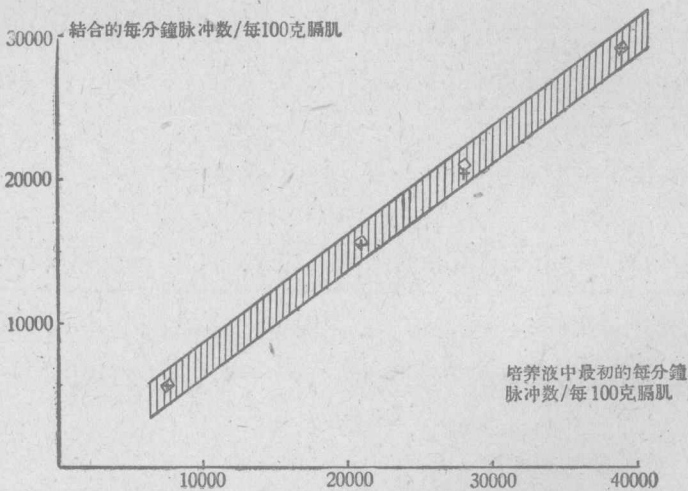


图 2 大鼠腦肌对氘化胰島素的吸取。氘化胰島素和未标记胰島素的量不定,但胰島素的总量一定 (8353 微克/毫升)。
+ = 实验所得的值。 ◇ = 計算的吸取量。 ||| = 平均标准差。

131 标记的胰島素也很強地被吸收在紙上^[15]。与碘化胰島素相似,将紙浸入高浓度不带标记胰島素中能降低氘化胰島素的吸收。但現在还没有滿意的条件用紙上层析法或紙上电泳法来測得氘化胰島素的特性。当再結晶达到恆定特殊异活性时,用放射性紙上层析法不能发现氘化胰島素中有自由氨基酸。

在离子交换剂 Dowex 50×8H⁺ 柱上进行氘化胰島素水解产物的层析时,发现許多氨基酸均带有不同数量的氘(表1)。似乎在与碳結合的氢和氘含量之間无相互关系,而芳香族氨基酸帶氘較多。除了与茚三酮阳反应相一致的氘高峯外,也看到了沒有相应的茚三酮阳性反应部分的放射性高峯。在重复实验中,发现酪氨酸的放射高峯有分裂,这可能是由于不同程度氘化氨基酸的同位素的作用。

表 2 所載为法射氘化胰島素及未标志胰島素后血糖改变的比較。动物对这两种制剂的反应沒有差別。反应虽无差別,但不能排除制剂中有一种放射活性很高而无生物活性的化合物的存在;制剂中的生物活性乃是来自不带标记的部分。

因此我們实验了氘活性是否与胰島素一样能与腦肌結合。根据 Stadie^[3] 的結果,胰島素很特异地能与大鼠腦肌結合。我們发现在氘化胰島素浓度为 8353 微克/毫升时,培养液中总放射性的 75% 与腦肌結合。图 2 为根据这些值所計算的材料。由此可知,腦肌

对氘化胰岛素中的氘活性和未标记的胰岛素有同等的亲和力。

表 1 从氘化胰岛素水解产物中分离的某些氨基酸的特异活性

氨基酸	每分钟脉冲数/每 100 微克氨基酸
天门冬氨酸	4385
丝氨酸	9803
亮氨酸	38329
异亮氨酸	72506
酪氨酸	107175
苯丙氨酸	228587

表 2 静脉注射氘化胰岛素及未标记胰岛素 (0.4 微克/100 克) 15 分钟后大鼠血糖的降低

	血糖下降的平均值 (正常血糖浓度的百分数)	动物数目	差别的显著性
标准胰岛素 25 国际单位/毫克	33.0±9	8	平均值无差别
氘化胰岛素	33.5±13	12	

根据下面的原因,我们认为应用氘化胰岛素做首创性的动物实验是合理的:

- (1) 与氘接触过的胰岛素能再结晶成一种有恒定特异活性的物质,在透析后不丧失其放射活性。
- (2) 它有充分降低血糖的作用。
- (3) 大鼠膈肌对氘和未标记的胰岛素有同等的亲和力,这说明后者具有稀释同位素的作用。

二、氘化胰岛素在体内的实验 本实验是在大鼠静脉注射氘化胰岛素2小时后,研究各个器官对氘的固定作用。表3所载结果指出,在许多器官中,“蛋白结合胰岛素的活性”均被浓缩。垂体、肾上腺及肝脏蛋白对氘化胰岛素具有高度亲和力,而脑组织最低。溶于三氯醋酸的氘活性可能代表各器官分解胰岛素的能力,其分布情况与上述固定的不同。

表 3 注射氘化胰岛素 2 小时后大鼠各器官的“蛋白结合胰岛素的活性”和“可溶于三氯醋酸的氘活性”
(按每分钟脉冲数/每克大鼠器官湿重计算)

器官	蛋白结合胰岛素的活性 (每分钟脉冲数/每克湿重)			可溶于三氯醋酸的氘活性 (每分钟脉冲数/每克湿重)		
	平均值	标准差	动物数目	平均值	标准差	动物数目
垂 体	31822	2540	6	1256	938	4
肾 上 腺	9206	6870	6	756	354	6
肝 脏	5608	2130	2	1416	716	2
脾 脏	1606	1030	7	794	400	7
眼 脏	1594	510	6	300	358	6
心 脏	1327	850	2	613	657	2
肾 脏	1128	606	7	3535	931	7
肌 肉	833	246	2	691	42	2
肺 脏	269	160	6	288	110	6
脑	193	120	7	310	286	7

在肝和腎中,可溶于三氯醋酸的物質最多;在腎上腺及垂体中,若与它們的高度固定能力相比較,則可溶于三氯醋酸的氚活性是很低的。

本实验也在每天給予生长激素 4 天或給予考的松 10 天后,再研究氚化胰島素在体内的不同分布形式。除肝、垂体、腎上腺、眼及肌肉对氚化胰島素的亲和力有改变外,大多数組織的結合能力与未用藥的对照动物相比并无改变(表4)。用考的松处理的动物,其肝脏及眼中“蛋白結合胰島素的活性”显著降低。生长激素使垂体、腎上腺、眼、肌肉的固定能力降低,但对肝脏无影响。若与未用藥的动物相比,可溶于三氯醋酸的物質的分布形式并无差异。

表 4. 正常大鼠、注射考的松的大鼠及注射生长激素的大鼠在注射氚化胰島素 2 小时后各器官的“蛋白結合胰島素的活性”(每分钟脉冲数/每克大鼠器官湿重)

器 官	正 常 大 鼠			注射考的松的大鼠			注射生长激素的大鼠		
	正常值	标准差	动物数目	正常值	标准差	动物数目	平均值	标准差	动物数目
肝 脏	5608	2130	2	1241	478	2	5326	4880	4
垂 体	31822	2540	6				8238	671	4
腎上腺	9206	6876	6				2422	866	4
肌 肉	833	246	2	589	428	5	389	328	4
眼	1954	510	6	407	260	6	642	408	4

正常大鼠开始血糖浓度的平均值: 75 ± 10 毫克%。
注射考的松的大鼠开始血糖浓度的平均值: 200 ± 79 毫克%。
注射生长激素的大鼠开始血糖浓度的平均值: 100 ± 33 毫克%。

討 論

垂体及腎上腺蛋白質对氚化胰島素有高度亲和力,这表示胰島素对这两腺体的激素的生物合成可能有一定的作用。值得注意的是,組織对胰島素的結合能力和組織中 6-磷酸葡萄糖进行分路代謝的程度之間似有某些相互关系^[16]。其各种組織中,与蛋白質結合的放射活性可用从胰腺組織提取胰島素的同样方法提取之。它的分布形式与用 I^{131} -胰島素处理的动物的不溶于三氯醋酸的放射活性的分布形式有所不同。但用这两种制剂处理后,脑蛋白均只有很低的活性或沒有活性,可見腦組織对标记胰島素的結合能力很低;这是与腦的代謝对胰島素不敏感相一致的。这两种結合的分布形式的比較是有困难的,因为有关 I^{131} -胰島素分布的实验結果是在应用示踪元素后 15 分钟所获得的,此时分布尚未达到平衡,而氚化胰島素的結合能力是在此時間間隔之后所測定的。

在不同激素的处理情况下,組織对氚化胰島素結合能力有所改变,这和垂体激素、腎上腺激素和胰島素之間的已知相互关系是一致的^[17]。但应考虑到,用考的松处理的大鼠,其肝脏对氚化胰島素固定能力的降低可能是由于同位素稀释作用所致。因为在考的松的影响下,内生性胰島素产量增加,此时細胞中能与外生性氚化胰島素起結合作用的活动部位可能被内生性胰島素所占有。

可溶于三氯醋酸的氚活性可能是組織对胰島素破坏作用的指标。但某些与血液循环速度有关的未知因素可能掩盖各器官的真正結合能力。虽然考虑到这些未知因素,肝和腎仍有高度破坏胰島素的能力,而其他組織一般較低。腎脏的破坏能力較肝脏強約 3 倍,而大大超过其他的組織。

現在还不能說氙化胰島素是一种适宜的生物示踪物；但下列事实証明它是一种很好的示踪物：它具有充分的降低血糖的能力，而且在膈肌固定氙化胰島素时，未标记的胰島素能起一种真正稀释同位素的作用。但是，由于氙的 β 能較弱，因而标记过程的重复性可能受胰島素結晶顆粒大小的影响。关于合适的标记条件和标记蛋白質激素的特性的进一步物理化学研究正在进行中。

結 論

胰島素与氙接触后，能再結晶成为具有4.6微居里/毫克的恒定特异活性的制剂。用水透析不能改变氙化胰島素中氙的含量。氙与胰島素中各种氨基酸有不同程度的結合。

氙化胰島素保持有充分的生物活性。在試管中，它与未标记的胰島素一样能被大鼠膈肌固定。

本实验在靜脉注射氙化胰島素2小时后，根据大鼠各器官三氯醋酸沉淀物中氙的活性測定各器官对它的結合能力。結果証明垂体、腎上腺和肝脏蛋白質对氙化胰島素有高度的亲和力。在腎脏及肝脏中，可溶于三氯醋酸的氙活性較高。考的松的处理可使肝脏及眼对氙化胰島素的亲和力降低，而生长激素则可抑制氙化胰島素和垂体、腎上腺、肌肉及眼組織的結合。在这些情况下，可溶于三氯醋酸的物質的放射性含量沒有改变。

文中就用氙化胰島素作为一种生物示踪物所得的結果及价值进行了討論。

参 考 文 献

- [1] Vaughan, M. and C. B. Anfinsen: J. biol. Chem. **211**, 367 (1954).
- [2] Light, A. and M. V. Simpson: Biochim. Biophys. Acta **20**, 251 (1956).
- [3] Stadie, W. C., N. Haugaard and M. Vaughan: J. biol. Chem. **199**, 729 (1952).
- [4] Lee, N. D.: Ann. New York Acad. Sci. **70**, 94 (1957).
- [5] Elgee, N. J., R. H. Williams and N. D. Lee: J. clin. Invest. **33**, 1252 (1954).
- [6] Berson, S. A. and R. S. Yalow: Ann. New York Acad. Sci. **70**, 56 (1957).
- [7] Margen, S. and H. Tarver: Ann. New York Acad. Sci. **70**, 49 (1957).
- [8] Goldsworthy, P. D. and W. Volwiler: Ann. New York Acad. Sci. **70**, 26 (1957).
- [9] Wilzbach, K. E.: J. amer. Chem. Soc. **79**, 1013 (1957).
- [10] Romans, R. C., D. A. Scott and A. M. Fisher: Ind. Eng. Chem. **32**, 908 (1940).
- [11] Stein, W. H. and S. Moore: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **14**, 179 (1950).
- [12] Troll, W. and R. K. Cannon: J. biol. Chem. **200**, 803 (1953).
- [13] Frank, H. und E. Kirberger: Biochem. Z. **320**, 359 (1949/50).
- [14] Best, C. H., R. E. Haist and J. H. Ridout: J. Physiol. **97**, 107 (1939).
- [15] Berson, S. A., R. S. Yalow, A. Baumann, M. A. Rothschild and K. Newerly: J. clin. Invest. **35**, 170 (1956).
- [16] Glock, G. E. and P. McLean: Biochem. J. **56**, 171 (1954).
- [17] Bornstein, J. and C. R. Park: J. biol. Chem. **205**, 503 (1953).

(傅定一譯 宋漢英校)