

离体骨骼肌蛋白质代谢速率测定方法

黄涛生 董燕麟

(第三军医大学生化教研室, 重庆)

提 要

本文分别以酪氨酸掺入、酪氨酸释放和净释放作为大鼠比目鱼肌蛋白质合成、分解和净耗的指标,建立了测定离体骨骼肌蛋白质代谢速率的方法,结果表明,在2小时的保温时间内,比目鱼肌细胞内游离酪氨酸及 ^3H -酪氨酸比放射性基本恒定,蛋白质合成与分解速率基本不变。测定正常大鼠比目鱼肌酪氨酸掺入,释放和净释放,结果稳定,重现性好。此外,我们还观察了介质中亮氨酸、胰岛素的影响。

骨骼肌蛋白质代谢的研究方法有活体和离体两种。由于活体水平骨骼肌蛋白质代谢的研究可由于标记氨基酸的体内代谢、稀释和分布等体内过程发生改变而造成一定误差。因此,近年来,不少作者^[1-3]用离体保温的方法,直接观察骨骼肌蛋白质代谢情况,并广泛用于烧伤^[3]、手术及各种营养物的研究^[4]。本文根据Tischler^[5]的方法,结合本实验室条件进行改进,建立了观察离体骨骼肌蛋白质代谢速率的方法。

材 料 和 方 法

一、实验动物 Wistar 雄性大白鼠,体重150—200克。

二、主要试剂 亚硝基萘酚(上海试剂三厂); ^3H -菊糖, 27Ci/mmol, (中国原子能研究院); ^3H -酪氨酸, 27Ci/mmol (中国原子核研究所); L-氨基酸(日本味之素公司); 胰岛素, 40U/ml, (四川医学院药厂); 放线菌酮(瑞士Fluka公司)。

三、主要仪器 浙西机械厂 ZS-83-1 型内切式组织匀浆器; 瑞典 LKB-Rack-Beta-1217 液体闪烁计数仪; 日本日立 MPF-4 型荧光分光光度计; 改装恒温水浴振荡器。

四、实验步骤 将动物断头处死,迅速分离其比目鱼肌,并从肌腱部位,迅速把比目鱼肌制成50—80mg/块的肌束,取新鲜组织400—500mg,置于3.0ml含除酪氨酸外其余19种正常大鼠血浆浓度氨基酸^[6,7]、10mM葡萄糖的Krebs-Ringer氏碳酸氢钠缓冲液中^[8],用 $\text{O}_2:\text{CO}_2$ 为95:5的混合气体连续通气,37℃水浴振荡40分钟后,将肌肉组织转至3.0ml新鲜介质中,其中含 ^3H -酪氨酸0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$,在相同条件下继续保温2小时,保温完毕,取出肌肉组织、吸干、剪碎,在2.0ml含0.1mM EDTA的三氯醋酸介质(10%)匀浆,3,000rpm离心10分钟,沉淀部分用2.0ml三氯醋酸介质洗涤两次。将所有上清液混合,用微量酪氨酸荧光分光光度法^[9]测定酪氨酸含量;取一定量上清液加入闪烁液(1000ml含: ppo4g popop 200mg,甲苯700ml,乙二醇乙醚300ml)以外标准源作淬灭校正,测定其放射性。沉淀部分用乙醇: 乙醚(1:1)萃取20分钟,去除乙醇、乙醚后,加入70%过氯酸0.7ml、30%过氧化氢1.3ml,70℃消化2小时,取消化液200 μl ,以8N NaOH中和其酸性后,测定其放射性和酪氨酸含量。

取一定量比目鱼肌,以0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -菊糖代替上述过程中 ^3H -酪氨酸,进行保温,保温完

毕,取出肌肉组织、吸干、剪碎,直接用过氯酸和过氧化氢消化,用 8NNaOH 中和其酸性后测放射性。

五、计算:

葡萄糖间隙 (ml/克肌肉)

$$= \frac{\text{保温后肌肉组织 } ^3\text{H-葡萄糖放射性 (DPM/克肌肉)}}{\text{介质中 } ^3\text{H-葡萄糖放射性 (DPM/ml)}}$$

比目鱼肌细胞内³H-酪氨酸比放射性 (DPM/nmol)

$$= \frac{\text{上清液中放射性 (DPM/克肌肉)} - \text{葡萄糖间隙(ml/克肌肉)} \times \text{介质中放射性(DPM/ml)}}{\text{上清液中酪氨酸含量 (nmol/克肌肉)} - \text{葡萄糖间隙(ml/肌肉)} \times \text{介质中酪氨酸含量(nmol/ml)}}$$

掺入比目鱼肌酪氨酸含量 (nmol/克组织/2h)

$$= \frac{\text{掺入蛋白质 } ^3\text{H-酪氨酸放射性 (DPM/克组织/2h)}}{\text{肌肉细胞内 } ^3\text{H-酪氨酸比放射性 (DPM/nmol)}}$$

酪氨酸净释放量 (nmol/克组织/2h)

$$= \text{释入介质酪氨酸总量 (nmol/2h)} \div \text{肌肉组织重量(克)}$$

酪氨酸释放量 (nmol/克组织/2h)

$$= \text{掺入蛋白质酪氨酸含量 (nmol/克组织/2h)} + \text{酪氨酸净释放量 (nmol/克组织/2h)}$$

结 果

一、微量酪氨酸荧光分光法测定 图 1 为激发光波长为 468nm, 发射光为 555nm 处, 酪氨酸浓度与其荧光强度之间的关系曲线。从图中可见酪氨酸浓度在 0—200pmol/ml 范围内与荧光强度之间具有良好的线性关系。

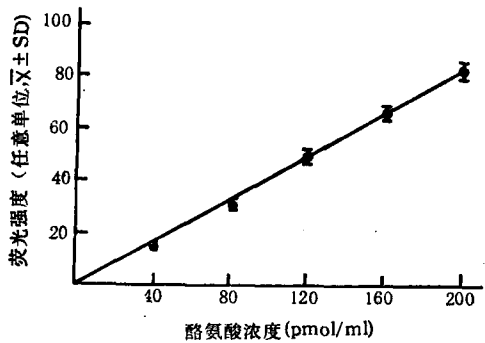


图 1 酪氨酸标准曲线
 $\lambda_{ex} = 468\text{nm}$, $\lambda_{em} = 555\text{nm}$ ($n = 6$)

二、保温时间对比目鱼肌细胞内酪氨酸含量与比放射性的影响 (表 1) 如表 1 所示在 3 小时的保温时间内,肌细胞内酪氨酸含量和³H-酪氨酸比放射性无显著差异。

三、保温时间对比目鱼肌蛋白质合成与分

表 1 不同保温时间肌细胞内酪氨酸含量及其比放射性 ($\bar{x} \pm \text{SE}$)

	1 小时	2 小时	3 小时
酪氨酸含量 (nmol/克肌肉)	42.6±2.79 (8)*	46.5±1.48 (8)	42.3±1.77 (8)
酪氨酸比放射性 (DPM/nmol) ×10 ³	5.97±0.35 (8)	5.82±0.15 (8)	6.25±0.18 (8)

* 括号内为实验动物数,下同。

解速率的影响及放线菌酮对其蛋白质合成的抑制效应 图 2 为保温时间与比目鱼肌蛋白质合成与分解的关系曲线,在 2 小时的保温时间内,酪氨酸掺入速率呈现良好线性关系。但酪氨酸的释放与净释放的速率,在 3 小时保温时间内几乎不变。0.5 mM 的放线菌酮可以使酪氨酸的掺入减少 95% (掺入率为 4.4±1.3nmol 酪氨酸/克肌肉/2h),这时释入介质的酪氨酸含量为无放线菌酮时,释入介质酪氨酸含量和掺入蛋白质中酪氨酸含量之和。

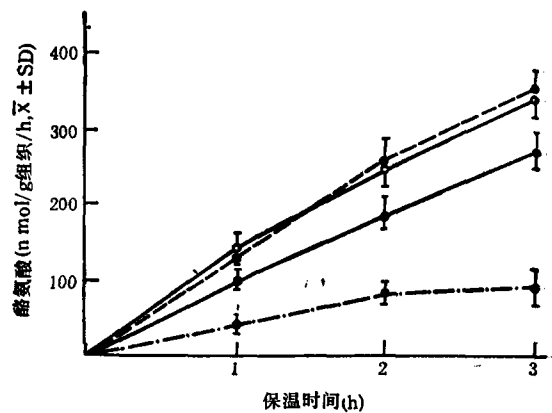


图 2 保温时间对比目鱼肌蛋白质代谢的影响
●---●抑制蛋白质合成后酪氨酸净释放, ○——○酪氨酸释放, ●——●酪氨酸净释放, ●---●酪氨酸掺入

四、正常大鼠比目鱼肌酪氨酸掺入与释放速率及亮氨酸、胰岛素的影响 (表 2) 本实验结果,正常大鼠比目鱼肌酪氨酸掺入率为 76.7±4.7nmol 酪氨酸/克组织/2h,与文献报道相近^[20],增加介质中亮氨酸浓度到五倍大鼠血浆浓度,酪氨酸掺入率无明显改变。但每毫升介质加入 0.1U 胰岛素后,酪氨酸掺入率增加。

26.3% ($P < 0.05$)。正常大鼠酪氨酸净释放率 $185.1 \pm 6.4 \text{ nmol/克组织/2h}$ 较文献报道低,增加介质中亮氨酸含量,酪氨酸净释放速率也无显著改变,每毫升介质加入 0.1 U 胰岛素后其净释放量减少 24%,由于酪氨酸的总释放量无显著改变,因此,胰岛素主要是通过增加酪氨酸的掺入,而达到减少酪氨酸净释放的。

表 2 正常大鼠比目鱼肌蛋白质代谢速率及亮氨酸、胰岛素的作用 (nmol 酪氨酸/克湿组织/2h, $\pm \text{SE}$)

	酪氨酸掺入	酪氨酸净释放	酪氨酸释放
基础介质	76.7 ± 4.7 (20)	185.1 ± 6.1 (20)	261.8 ± 8.3 (20)
+亮氨酸	77.1 ± 3.9 (10)	165.5 ± 7.3 (10)	242.6 ± 13.0 (10)
+胰岛素	$96.0 \pm 4.7^{\Delta}$ (10)	$148.9 \pm 7.2^{\Delta\Delta}$ (10)	245.0 ± 12.7 (10)

Δ 和基础介质比 $p < 0.05$

$\Delta\Delta$ 和基础介质比 $p < 0.01$

讨 论

骨骼肌组织既不能合成也不能分解酪氨酸^[1],因此,本实验选用³H-酪氨酸为示踪剂,以掺入蛋白质中酪氨酸的毫微克分子数作为蛋白质合成的指标,以其释放酪氨酸作为其蛋白质分解指标,由于蛋白质分解产生的酪氨酸除了释入介质外,其中一部分可重新掺入到蛋白质中,因此,包括掺入蛋白质和释入介质两个部分^[5]。

放射性同位素标记的氨基酸 (³H-酪氨酸) 的掺入量除了与其蛋白质合成的速率有关外,还与细胞内³H-酪氨酸的比放射性有关,多种因素都可影响细胞内³H-酪氨酸的比放射性。因此,不能单以掺入蛋白质中³H-酪氨酸放射性作蛋白质合成的指标。本实验以不透入细胞的³H-菊糖,测定其细胞外液的含量,以细胞内酪氨酸作为蛋白质合成的前体,以估计酪氨酸的掺入

量,以排除细胞内比放射性不同引起的误差。有人报道^[12],把同一动物膈肌剪成四块,分别置于具有相同含量³H-亮氨酸和不同含量¹⁴C-酪氨酸的介质中保温,结果发现,四块膈肌³H-亮氨酸的掺入相同,即具有相同的蛋白质合成速率,但¹⁴C-酪氨酸的掺入量与介质中¹⁴C-酪氨酸含量成正比,当把掺入蛋白质的¹⁴C-酪氨酸除以细胞内¹⁴C-酪氨酸比放射性时,所得掺入四块膈肌酪氨酸毫微克分子数相同。本实验测得离体保温 2 小时后,比目鱼肌菊糖间隙为 $0.54 \pm 0.04 \text{ ml/克肌肉}$ ($n = 12$),比膈肌菊糖间隙大些,这可能是与完整膈肌表面的浆膜对减轻保温过程中的水肿有一定的作用有关。

为了排除蛋白质合成对蛋白质分解速率估计的干扰,在介质中加入 0.5 mM 放线菌酮,以抑制蛋白质的合成。结果表明,这种浓度的放线菌酮可以使其酪氨酸的掺入减少 95%,与文献报道一致^[3],这时释入介质中酪氨酸含量基本上为无放线菌酮时掺入蛋白质中酪氨酸与释入介质中酪氨酸含量之和,进一步说明这种方法观察骨骼肌蛋白质代谢速率的可靠性。

参 考 文 献

- [1] Odessey, R. et al.: *Metabolism*, 1982, 31(1), 32.
- [2] Shangraw, R. E. et al.: *J. Surg. Res.*, 1982, 33, 345.
- [3] Tischler M. E. et al.: *Metabolism*, 1983, 32(9), 853.
- [4] Li, J. B. et al.: *Am J. Physiol.*, 1976, 231 (2) 441.
- [5] Tischler, M. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 1613.
- [6] 顾景范等:《营养学报》, 1984, 6(1), 3.
- [7] 施新猷等:《医用动物实验方法》, 人民卫生出版社, 北京, 1979, 124.
- [8] Umbreit, W. W.: *Manometric and Biochemical Techniques*, (5th ed), Burgess Publishing Co. Minn., 1972, 148.
- [9] 蔡祝辉等:《生物化学与生物物理进展》, 1979, (5), 49.
- [10] Li, J. B. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 544, 351.
- [11] Fulk, R. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1975, 250(1), 290.
- [12] Li, J. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1973, 248 (20), 7272.
- [13] Newman, J. J. et al.: *J. Surg. Res.*, 1984, 36, 177.

【本文于 1987 年 3 月 10 日收到】