

自記放射法에 의한 白鼠舌下腺細胞의 蛋白合成과 移動

서울대학교 齒科大學 口腔解剖學教室

(指導 劉 鍾 德 教授)

趙 鏞 明

SYNTHESIS AND MIGRATION OF PROTEINS IN THE SUBLINGUAL GLAND OF MICE BY RADIOAUTOGRAPHY

Yong Myong Cho, D. D. S.

*Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry,
Seoul National University*

<Director : Chong Duck Yoo, D. D. S., Ph. D.>

.....»Abstract«.....

Twenty-nine male mice weighing approximately 20 grams were utilized in this study. They were received a single intraperitoneal injection of leucine- H^3 . The dose was defined by a radioactivity content of $2.5\mu c$ for each gram of body weight.

This procedure was carried out 10 minutes after injection in the first group. Whereas the animals of the remaining 5 groups, were sacrificed 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 6 hours and 24 hours after injection respectively.

The sublingual gland was fixed for 3 hours in paraformaldehyde and routinely processed the histology.

Sections 6μ thick were stained with toluidine blue 0 and radioautographed by the dipping technique. The autoradiographs were exposed for 15 days.

The present study was undertaken to determine the turnover time for the synthesis and migration of proteins in the sublingual gland of mice.

The results permitted the following conclusions;

1. Thirty minutes after leucine- H^3 injection, silver grains were located in the ergas-toplasm.
2. One hour after leucine- H^3 injection, the silver grains were observed in the proximal zymogen region. The distal zymogen region were reached maximum specific activity 6 hours after leucine- H^3 injection
3. Six hours after leucine- H^3 injection, labeled proteins were shown in the excretory

ducts.

- The synthesis and migration of proteins of the sublingual acinar cells were slower than that of the pancreatic acinar cells.

I. 緒 論

同位元素를 붙인 아미노酸을 動物에 注射하면 細胞內에는 새로이 合成된 蛋白質이 Label되는 것으로 믿고 있는데, 이를 立證하기 爲하여 그동안 自己放射法에 依한 研究가 많이 나왔다. Labeled Amino Acid를 動物에 注射하면 한 細胞內에서도 蛋白質合成하는 部位에 먼저 label되고, 새로이 合成된 蛋白質은 時間의 經過에 따라서 他部位로 移動하게 된다. 그리하여 臟器의 種類에 따라서 Ergastoplasm에서 蛋白質合成하는 時間과 合成된 蛋白質이 排泄管의 管腔內로 排出할 때까지의 時間이 各各 相異하므로, 蛋白質合成關係 實驗에는 Turnover Time이 매우 重要하다.

지금까지 腺組織에 있어서 Turnover Time 에 關하여 研究한 것은 Warshawsky外 2人(1963)¹⁾, Leblond(1957)²⁾, Zilversmit(1943)³⁾, Hansson(1959)⁷⁾, Borsook(1950)⁸⁾ Warshawsky 外 1人(1962)¹¹⁾, Warshawsky(1961)¹⁸⁾ 및 Warshawsky(1961)²⁰⁾ 등이 있다.

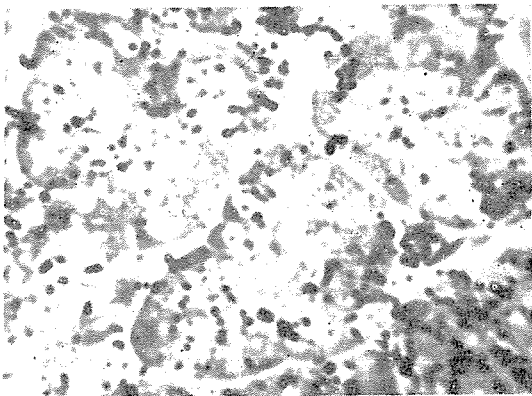


Fig. 1. Sublingual acinus of the mouse stained Toluidine Blue O. This acinus is distinctly separated from surrounding acini. The basophilic(darker appearing) ergastoplasm is seen to form a ring which almost completely encloses a central region of acidophilic(lighter appearing) zymogen granules.

腺細胞의 蛋白質合成과 이들의 移動에 關한 報告는 있으나, 三大唾液腺의 하나인 舌下腺의 蛋白質合成과 移動에 關한 研究는 없었고; 그동안 이에 關하여 研究한 바 있어서 이에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

實驗材料는 20grams內外의 雄性白鼠 29頭를 使用하였고, Leucine-H³을 動物에 注射한後 犧牲時間에 따라서 10分에는 4頭를, 나머지(30分, 1時間, 2時間, 6時間 및 24時間)는 各各 5頭式配定하였다.

Leucine-H³을 體重 gram當 2.5 μ c(Specific Activity 5~10 C/mM)를 腹腔內注射하고, Ether로 麻醉後한 舌下腺을 떼어 냈다.

組織標本製作 및 自記放射法:

組織標本製作은 메어넨 舌下腺을 2% Paraformaldehyde in cacodylate Buffer에 3時間 固定하고, 이를 通法에 依하여 Paraffin에 包埋하고, 6 μ 의 切片을 만들었다.

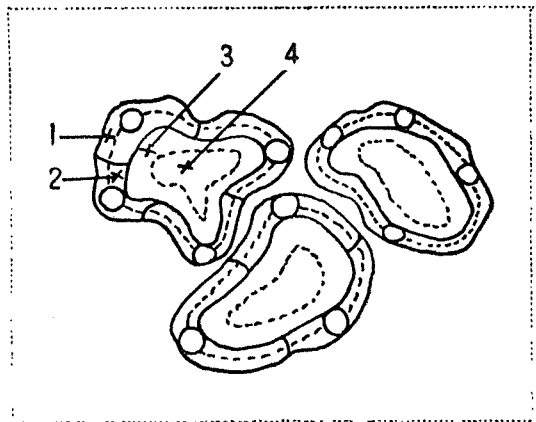


Fig. 2 Outline drawing of the acinus in Fig. 1. to illustrate the preparation of the drawings used for the quantitative estimation of the number of silver grains and of the areas of each acinar region.

- Proximal Ergastoplasm
- Distal Ergastoplasm
- Proximal Zymogen Region
- Distal Zymogen Region



Fig. 3 Sublingual Acinus 30 minutes after leucin- H^3 injection. The silver grains are located over the darker staining ergastoplasm. The distal zymogen region shows no reaction, x 450

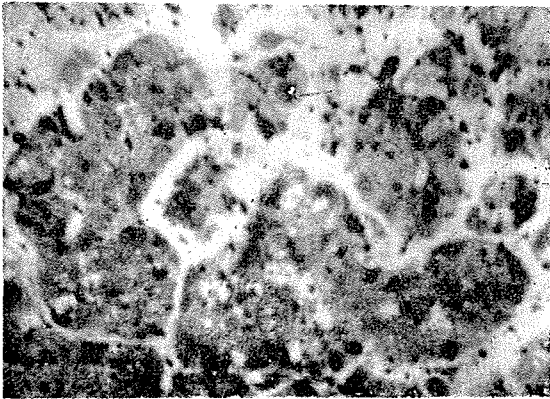


Fig. 4 Sublingual Acinus 1 hour after leucine- H^3 injection. The ergastoplasm shows some reaction, but more grains are now located over the proximal zymogen region, where the grains may be arranged into clusters. Again, the distal zymogen region shows no reaction, x 450

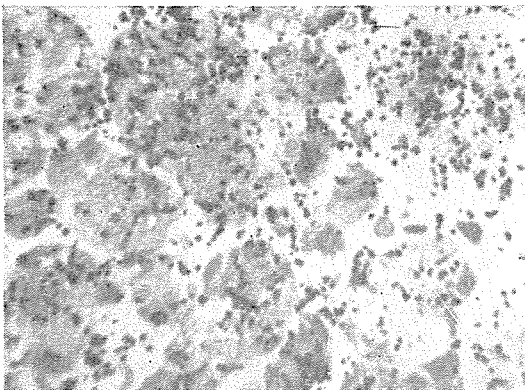


Fig. 5 Sublingual Acinus 6 hours after leucine- H^3 injection. While some reactions persist over the ergastoplasm, most reactions are distributed over the proximal and distal zymogen regions. x 450

Table 1 Concentration of Radioactivity in Each Acinar Region of Sublingual Gland after Intraperitoneal Injection of Leucine-H³ in the Mice.

	Time after Injection					
	10 minutes Mean ± S. D.	30 minutes Mean ± S. D.	1 hour Mean ± S. D.	2 hours Mean ± S. D.	6 hours Mean ± S. D.	24 hours Mean ± S. D.
Proximal Ergastoplasm	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.4	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Distal Ergastoplasm	—	3.0 ± 0.8	3.4 ± 0.4	2.1 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.2
Proximal Zymogen	—	1.2 ± 0.3	5.6 ± 0.5	8.4 ± 1.3	5.8 ± 0.9	2.7 ± 0.1
Distal Zymogen	—	—	3.3 ± 0.2	8.3 ± 1.1	10.4 ± 1.2	2.1 ± 0.1

自記放射法은 標本을 染色그릇에 넣어 完全暗室로 옮기고, Kodak NTB-3 Nuclear Track Emulsion을 45°C의 Oven에 넣어 溶解토록 하고 이를 Oven에서 꺼내 400ml의 Beaker에 넣었다. 이 Beaker를 45°C의 Water Bath에 담고, 標本을 核乳液에 3~4秒間 浸漬시킨 後 約60度 傾斜의 木構板에 꽂아 約 15~30分間 45°C의 Dry Oven에서 完全히 乾燥시킨다. 이를 25枚入 푸라스틱製 標本箱子에 防濕劑인 Drierite를 小量의 Gauge에 넣어 이를 箱子에 붙인 後 標本을 넣었고, Black Electric Tape로 箱子뚜껑과의 틈사이를 감고, 다시 鉛板으로 縱橫二重으로 감쌌다. 다시 은중이로 싸서, 비니루주머니에 넣고, 다시 포장지로 싸후 4°C의 冷藏庫에 15日間 保管하였다.

이를 Dolmi 現像液에 1分間 現像하고, Kodak Rapid Fixer에 固定한後, 標本을 Toluidine Blue 0로 染色하였다.

自記放射法에 의한 定量分析方法 :

이는 舌下腺의 腺胞의 諸部位에 散在되어 있는 銀粒子的 數를 合理的인 方法으로 計算함으로써 Radioautographic Density를 評價하고자 하는 것이다.

第1圖 및 第2圖에서 보는 바와 같이 腺胞와 腺胞와의 境界가 明確하고, 또 Ergastoplasm과 zymogen region (Zymogen Granules가 있는 곳)이 잘 區分된다. Ergastoplasm은 다시 Proximal Ergastoplasm (Basement Membrane에 가까이 있는 것)과 Distal Ergastoplasm (Zymogen Region에 가까이 있는 것)으로 區分하였고, Zymogen Region은 Proximal Zymogen Region과 Distal Zymogen Region으로 區分하였다.

24個의 Acinar Cells을 選擇하고, 各腺胞內의 銀粒子的는 上記한 바와 같이 Proximal Ergastoplasm, Distal Ergastoplasm, Proximal Zymogen Region, Distal Zymogen Region으로 區分되므로 各部位를 別途로 計算하였다. 各群에는 5頭式配定하였으므로 各頭마가 24個의 Acinar Cells를 計算하고, 또한 Acinar

Cells內에는 몇 個의 Acini로 區分되므로 總銀粒子的의 數를 Acini 數로 나누었다.

統計的處理로는 算術平均 (M) 과 標準偏差 (S. D.) 를 算出하였다.

III. 實驗 成績

白鼠舌下腺細胞에 있어서 Ergastoplasm에서 蛋白質이 合成되고, 合成된 蛋白質이 腺胞의 排泄管의 管腔으로 放出될 때까지의 Turnover Time을 보면 第1表에서 보는 바와 같이 Leucine-H³을 注射한 後 10分에 銀粒子的가 Proximal Ergastoplasm에만 出現하고, 30分에 Proximal Ergastoplasm, Distal Ergastoplasm 및 Proximal zymogen Region에, 1時間에 Proximal Zymogen Region과 Distal Zymogen Region에 나타나고, 12時間에 Proximal Zymogen Region과 Distal Zymogen Region에 同等量程度로, 그리고 6時間에 Distal Zymogen Region에 多數出現하였다.

그리하여 Leucine-H³을 白鼠에 注射하였을 때에 舌下腺細胞는 30分에 銀粒子的가 Ergastoplasm에, 1時間에 Proximal Zymogen Region에, 6時間에 Distal Zymogen Region에 이르게 된다. 또 6時間以後에 있어서 排泄管의 管腔內에는 銀粒子的로 充滿되어 있었다.

VI. 總括 및 考察

消化腺細胞에 있어서 蛋白質合成을 研究함에는 무엇보다도 Turnover Time 即 Ergastoplasm에서의 蛋白質合成時間, 또 合成된 蛋白質이 排泄管의 管腔內로 放出할 때까지의 時間이 重要하다.

특히 近來에 와서 癌의 治療目的으로 抗生劑를 動物에 注射하여 蛋白質合成關係를 實驗한 報告들이 많은데, 이런 境遇에 있어서 Turnover Time은 매우 重要하다고 思料된다.

本實驗의 成績을 綜合하면 Leucine-H³을 白鼠에 注射한 後 舌下腺細胞內에는 銀粒子가 30分에 Ergastoplasm에 出現하고, 1時間에 Proximal Zymogen Region에 이르고, 6時間에 Distal Zymogen Region에 到達하였다. 또 6時間以後에 있어서 排泄管의 管腔內에는 銀粒子로 채워져 있었다.

Warshawsky 外 2人(1963)²⁾은 Leucine-H³을 白鼠에 注射하여 外分泌腺細胞의 蛋白合成 및 移動에 關하여 研究하였는데 Leucine-H³을 白鼠에 注射한 後 2~5分에 Ergastoplasm에 나타나고, 10分, 30分에는 Ergastoplasm을 넘어 Proximal Zymogen Region에, 4時間에 Distal Zymogen Region까지 간다고 하였고 注射後 7日 以後는 反應이 弱하여 實驗할 수 없는 狀態가 된다고 하였다.

Warshawsky 外 2人의 成績과 著者의 例를 比較하여 보면 舌下腺의 Turnover Time은 腺細胞의 것보다 길다는 것을 알 수 있다.

Desnuelle 外 1人(1961)³⁾은 Ergastoplasm에서 蛋白이 合成되는데, 이를 두종류로 區分하였다. Exportable Protein(腺胞의 排出管으로 곧 放出하는 것)과 Sedentary Protein(다른 蛋白은 放出되도 一部는 Basal과 Intergranular Ergastoplasm에 남아 있는 것)이 있다고 하였다.

Leblond 外 2人(1957)⁴⁾은 Methionine-S³⁵를 動物에 注射하여 腺細胞의 蛋白合成을 調査하였는데, 모든 腺胞에 있어서 蛋白合成이 急速히 이루어져서, 곧 排出管의 管腔으로 放出된다고 하였고, Hansson(1959)⁵⁾은 Labeled Amino Acid를 動物에 注射하면 제일 먼저 Label되는 곳이 蛋白合成이 이루어지는 Ergastoplasm이라 하였고, Borsook 外 4人(1950)⁶⁾은 蛋白은 Ergastoplasm에서 繼續 合成하여, 利用되고 있다고 하였고, Siekevitz 外 1人(1960)¹⁴⁾은 Leucine-C¹⁴을 Guinea Pig에 注射하여 腺細胞의 蛋白合成을 調査하였는데, Label이 Ribosome에 제일 먼저 이루어졌고, 다음에 Zymogen Granules에 出現한다고 하였다.

蛋白合成과 移動에 있어서 지금까지 알려져 있기는 Ergastoplasm의 Ribosome에서 蛋白合成이 되고, 이것이 Endoplasmic Reticulum의 Cisternae를 통하여 Golgi Region에 移動하고, Golgi Region의 Distal End가 떨어져서 Zymogen Granules가 되는 것으로 알고 있다. 그리하여 Golgi Membrane은 Endoplasmic Reticulum의 膜이고, Zymogen Granule의 膜은 Golgi Complex의 膜인 셈이다.

V. 結 論

體重 20grams 內外의 雌性白鼠 29頭를 使用하고, Leucine-H³을 白鼠에 注射한 後 10分, 30分, 1時間, 2時間 및 6時間마다 犧牲시켜 舌下腺細胞의 蛋白合成과 移動에 關하여 自記放射法으로 調査하였고, 其 結果는 다음과 같다.

1. Leucine-H³을 白鼠에 注射한 後 30分에는 銀粒子가 Ergastoplasm에 出現하였다.
2. Leucine-H³을 白鼠에 注射한 後 1時間에는 Proximal Zymogen Region에 이르고, 6時間에는 Distal Zymogen Region에 到達하였다.
3. Leucine-H³을 注射한 後 6時間에 있어서 排泄管의 管腔內에는 銀粒子가 充滿되어 있었다.
4. 白鼠舌下腺細胞에 있어서 蛋白合成 및 移動의 Turnover Time은 腺細胞의 것보다 길었다.

REFERENCES

- 1) Warshawsky, H., Leblond, C.P. and Droz, B.: Synthesis and Migration of Proteins in the Cells of the Exocrine Pancreas as Revealed by Specific Activity Determination from Radioautographs. *Journal of Cell Biology* 16: 1, 1963.
- 2) Desnuelle, P. and Rovey, M.: The Proteins of the Exocrine Pancreas. *Adv. Protein Chem.* 16: 139, 1961.
- 3) Leblond, C.P., Everett, N.B. and Simmons, B.: Sites of Protein Synthesis as Shown by Radioautography After Administration of S³⁵ Labeled Methionine. *Am. J. Anat.* 101: 225, 1957.
- 4) Leblond, C. P. and Warren, K. B.: The Use of Radioautography in Investigating Protein Synthesis. *Symposia of the International Society for Cell Biology* 4: 330, Academic Press, 1965.
- 5) Zilversmit, O. B., Entenman, C. and Fisher, M. C.: On the Calculation of "Turnover Time" and "Turnover Rate" from Experiments Involving the Use of Labeling Agents. *J. Gen. Physiol.* 26: 325, 1943.
- 6) Belanger, L. F.: Autoradiographic Visualiza-

- tion of the Entry and Transit of S^{35} Methionine and Cystine in the Soft and Hard Tissues of the Growing Rat. *Anat. Rec.* 124: 555, 1956.
- (7) Hansson, E.: The Formation of Pancreatic Juice Proteins Studied with Labelled Amino Acids. *Acta Physiol. Scand.* 46: 161, 1959.
- 8) Borsook, H., Deasy, C. L., Haagen-Smit, A. J., Keighley, G., and Lowy, P. H.: Metabolism of C^{14} -Labelled Glycine, L-Histidine, L-Leucine and L-Lysine. *J. Biol. Chem.* 187: 839, 1950
- 9) Hultin, T. and Decken, A.: Incorporation of Labelled Amino Acids Into Proteins by Ribonucleoprotein Particles from Rat Liver Microsomes in Protein Biosynthesis. (R. J. C. Harris, Editor), New York, Academic Press, Inc. 83, 1961.
- 10) Godin, C.: Amino Acid-Protein Interactions. *Can. J. Biochem. and Physiol.* 38: 805, 1960.
- 11) Warshawsky, H. and Droz, B.: Reliability of the Radioautographic Technique for the Detection of Newly Synthesized Protein. *Anat. Rec. (Proc)*, 112: 289, 1962.
- 12) Babkin, B. P.: *Secretory Mechanism of the Digestive Glands.* 2nd Edition, New York, Paul B. Hoeber. Inc., 1950
- 13) Morris, A. J. and Diekman, S. R.: Biosynthesis of Ribonuclease in Mouse Pancreas. *J. Biol. Chem.* 235: 1404, 1960.
- 14) Siekevitz, P. and Palade, G. E.: A Cytoc-
hemical Study on the Pancreas of the Guinea Pig. V. Incorporation of Leucine- $l-C^{14}$ Into the Chymotrypsinogen of Various Cell Fractions. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* 7: 619, 1960.
- 15) Keller, P. J. and Cohen, E.: Enzymic Composition of Some Cell Fractions of Bovine Pancreas. *J. Biol. Chem.* 236: 1407, 1961.
- 16) Sjostrand, F. S. and Hanzon, U.: Ultrastructure of the Golgi Apparatus of Exocrine Cells of Mouse Pancreas. *Exp. Cell Research* 7: 415, 1954.
- 17) Farquhar, M. G. and Wellings, S. R.: Electron Microscopic Evidence Suggesting Secretory Granule Formation Within the Golgi Apparatus. *J. Biophysic and Biochem. Cytol.* 3: 319, 1957
- 18) Warshawsky, H. and Leblond, C. P.: Steps in the Secretion of Protein Material by the Acinar Cells of the Pancreas as Visualized by Radioautography in Rats and Mice, *Anat. Rec. (Proc)*. 139: 284, 1961.
- 19) Warshawsky, H.: Synthesis and Secretion of Pancreatic Enzymes as Shown by Radioautography using tritiated Amino Acids. Master's Thesis. McGill University, 1961.
- 20) Caro, L. G.: Electron Microscopic Radioautography of Thin Sections. The Golgi Zone as a Site of Protein Concentration in Pancreatic Acinar Cells. *J. Biophysic & Biochem. Cytol*, 10: 37, 1961.
- 21) Schour, I.: *Noyes' Oral Histology and Embryology.* 8th Edit.: 257, Lea & Febiger, 1960.
- 22) Sicher, H.: *Orban's Oral Histology and Embryology.* 6th Edit.: 266, Mosby, 1966.
- 23) Provenza, D. V.: *Oral Histology.* 406, Lippincott, 1964.