

放射性同位素在組織学上的应用——放射自显术

呂 家 鴻

(中国科学院实验生物研究所)

我們要研究生物体内的組織代謝和組織机能，首先就需要了解組成組織的原子、分子或化合物，在組織內的分布与轉移。在未用示踪元素以前，組成組織的物質或代謝物質在組織內轉移的情况，是很难認識的。等到示踪元素广泛地被应用到生命科学上以后，由于元素的放射性或稳定性同位素的百分超，才認識到生命物質是經常处于动态平衡的状态中。構成細胞或組織的原子、分子或化合物經常在轉移更新；新的物質不断的参与进来，老的物質不断的更替而去。生命就由这种推陈出新的办法来繼續維持，失去了推陈出新的能力，也就失去了生命。

將一种帶有放射性的代謝物質，如 C^{14} —醋酸、 P^{32} —磷脂、 S^{35} —蛋氨酸或 I^{131} —碘化

物，飼給动物或注射于动物体内，在很短時間內，就可观察到这类標記物質出入于动物組織以及各类型細胞，它們存在各組織細胞內時間的久暫，則根据各組織內該种代謝物的更新速度与更新时间而定。在某种組織內分子中的原子团或原子，可能迅速的轉移到他种組織內另一种分子中的原子团或原子，也可能經過分解氧化，变为廢物而排出体外。所以，組成組織的物質或代謝物質在生物体内轉變的命运，是可以用来追求它們的踪迹的。例如圖 1. 所示，將 I^{131} 的碘化物注射到鼠体内，碘就为甲状腺所吸收，以甲状腺球蛋白的形式，先是出現于甲状腺濾泡細胞內，随后就轉移到分泌的膠体内。

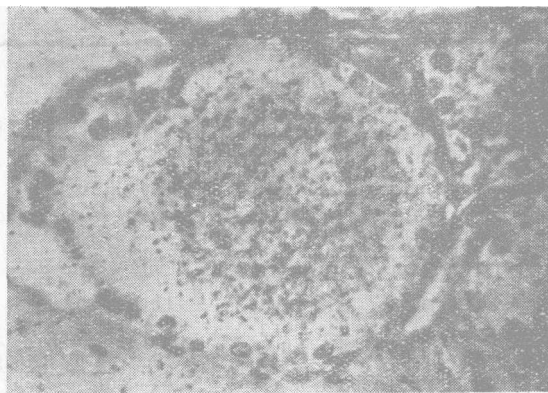
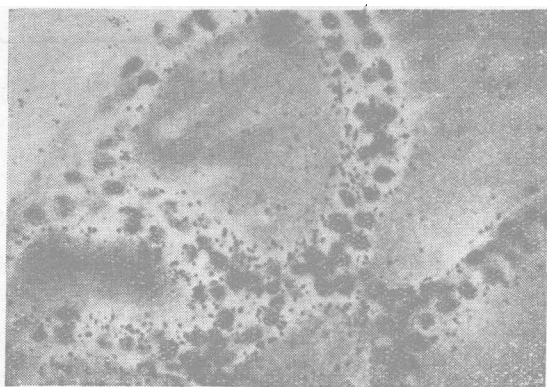


圖 1.

Leblond 和 Gross 他們曾經用放射自显术进一步作了分析。(Endocrinology 43, 206, '48)他們將放射性碘注入動物体内后于 1 小時后与 24 小時后分批解剖，經過組織固定和切片手續，并清除組織內的无机碘，依据这样的处理，在組織切片上所余留之放射性碘都是以甲状腺球蛋白的形式存在。它得出在放射性碘进入体内 1 小時后，放射性物質都集中在甲状腺濾泡細胞內(見圖 1, 左)，而在 24 小時后，放射性物質就轉移到分泌的膠狀質內(見圖 1, 右)。

示踪元素如果是放射性的，我們可以用各種不同的計數器，測定組織內有無放射性，而確定標記物質的存在與否；自然，放射性的強弱就直接表明標記物質存在量的多寡。我們也可將組織做成切片，再將這種切片在暗室內與照相底片密切相接觸。如果組織切片內有放射性物質的分布，那末，由這種放射性物質放射出來的粒子，就會打擊照相底片上的乳膠銀鹽，使銀鹽還原而變黑。因此照相底片感光的部分，就是與底片緊接的組織處有放射性物質分布的部分，感光的深淺，就表示放射性物質存在的多少。這種不用照相機的照相，我們稱之為放射自顯影，而這種方法就稱為放射自顯術。因為這種方法在組織化學與組織代謝的研究上，非常有用，所以我們就將這種方法簡單的介紹如下：

其實，遠在 1895 年，法國物理學家貝克勒耳就觀察到鈾礦石的放射性射綫，使照相底片上的乳膠感光，首次用生物材料做放射自顯影的是在蛙皮上塗以鐳化合物，隨後置于感光底片上而獲得的。見圖 2。後來又發現人工的放射性同位素，放射出來的粒子或射綫，也一樣可使照相底片感光。放射性同位素放射出來的粒子不外乎 α —粒子與 β —粒子，而放射出來的射綫主要是 γ —射綫。 α —粒子是電離很密的粒子，射程很短，可以得到很明顯的影象，可惜放射 α —粒子的元素，都是原子量很大的元素。雖然，這些元素在原子能工業及軍事上，有它們的重要性，但對於組織代謝的研究，不是太重要，在組織化學方面最重要的放射性元素，是放射 β —粒子及放射 γ —射綫的元素。因為 β —粒子比 α —粒子要小，也比較輕，故放射 β —粒子的射程，都較 α —粒子的射程為大，放射能量也較高。但影象的清晰度則隨能量加大、射程增遠而降低。例如用 S^{35} 做放射自顯影就比較用 P^{32} 者要顯得清楚。這是因為 P^{32} 放射 β —粒子的能量較之 S^{35} 要高出十六倍以上，而放射的能力愈大，射程就愈遠，放射出來的 β —粒子就愈不容易為照相底片上

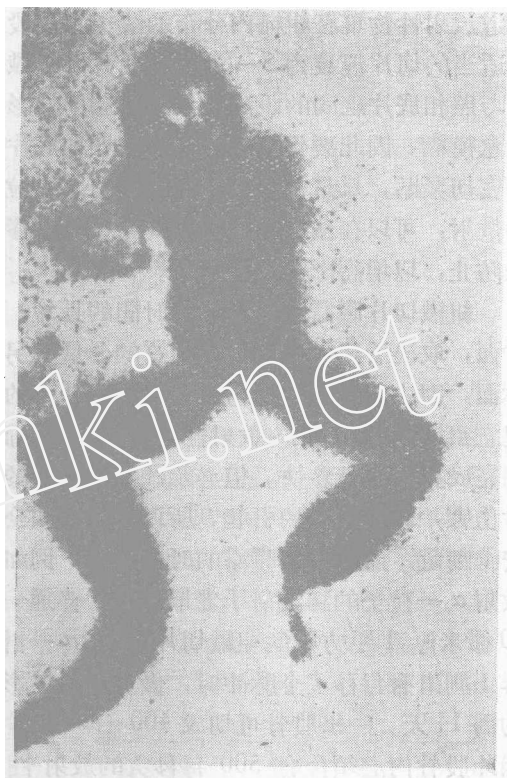


圖 2.

的乳膠所吸收，這樣，乳膠上的銀鹽也就難于被還原，如 γ —射綫有很大的射程，而電離度則非常有限，大部分的射綫都不影響乳膠。故若用 γ —射綫來獲得放射自顯影，就需要 10—100 倍多的 α 或 β 的放射性。在文獻上尚未見到純粹以 γ —射綫做出放射自顯影的資料。

由放射自顯影得出的影象，其清晰程度，除放射的粒子性能外，還要取決於放射性物質與照相底片接觸時間的長短，組織切片的厚薄，組織切片和照相底片之間的距離以及高能量 β —粒子的散射等等。對於 α —粒子來說，因其射程很短，只有組織切片表面放射的 α —粒子，才能影響照相底片，而由組織片深層放射的，則被上層的大量吸收。對於 β —粒子來說，如果切片的厚度大於 15 微米，所得到的影象就比較模糊，這是由於射綫的散射以及放射性物質與乳膠間的距離太遠的緣故。而且組織切片有多層細胞時，打擊在乳膠上的 β —粒子，就無法分辨來自何層細胞。從組織學上講，也很難

知道放射性物質在組織內分布的情況。一般比較適當的切片厚度為 5—8 微米，此外，組織切片與照相底片之間的距離愈大時，顯出的影象就愈模糊。因此要保持組織切片和照相底片兩者密切緊貼，盡量使距離縮短。還有 β -粒子的散射，可以在感光片的背後，塗刷一層膠層來防止，以增高影象的清晰度。

組織切片曝露于感光片的時間的長短：一方面，取決于組織內放射性物質的含量；另一方面，則決定于放射性物質在組織內分布的情況。很明顯的，組織內放射性物質的含量愈高，則完成顯影也就愈快。但必須注意高劑量的輻射傷害，以免病症的引起。所以時時要顧全到安全劑量，而寧願將曝露的時間延長。例如將放射 α -粒子的鈾注射于老鼠體內，普通一片 10 微米厚，1 平方厘米的組織切片，如在 α -計數器上測出有每秒 1 個脈沖時，做放射自顯影就約需 14 天。一根股骨可切成 400—500 切片，因此股骨內必須含有 500 每秒次的放射性強度，若股骨重 0.7 克，則骨骼內就必須含每克 700 每秒次。如老鼠的全部骨骼重 20 克，骨骼吸取鈾約為劑量的 70%，則所用的劑量就當為 20,000 每秒次，或需要注射 20 微克的鈾。這樣，有 14 天就能得到骨骼切片自顯影。但假使將劑量減半，自顯影就需要 30 天左右。

感光片上每平方厘米必須要受到 500—1,000 萬的 β -粒子的打擊，或受到 100—200 萬 α -粒子的打擊，才足以使乳膠的顆粒變黑。因此，假如放射性物質分布不均勻，而局限于組織切片的一隅，從整個切片來說，放射性的強度，有時會不足夠做放射自顯影的。在實際操作中，使一系列的組織切片曝露于照相底片，在不同的時間分別顯影，來決定最適當的曝露時間。

放射自顯影的清晰度，自然還與感光片的性質密切相關，底片上乳膠的顆粒既不能太多，也不能太粗。太多，則易使背景模糊；太粗，則又使感光速度變慢。對於一般粗糙的顯影，通常可用 X-光膠片，國產七星干板及 35 毫米的阿克發膠卷，而一般精細的顯影則採用安

士可膠卷，較為合適。

制备組織切片時，需要注意組織內放射性物質的散失，特別是可溶性的 P^{32} 化合物。目前都是先將組織冰冻干燥，再將熔融的石蜡在高真空內滲入組織做成石蜡塊，切成 5 微米厚的組織切片。放射自顯影的操作，大概可分為以下數種方法：

一、接觸法：將組織切片與感光片的乳膠面密切接觸，其上復以一頁透析膜與一片濾紙，隨後用夾子夾緊，置于低温密封的匣子內。經相當曝露時間後，從匣內取出，將夾緊的一套置于潮濕的海綿上，于是水分即經濾紙、透析膜，滲入到乳膠面上。此時，將夾子松开，除去濾紙與透析膜，用 P_2O_5 在真空中干燥 15 分鐘（參看圖 3）。這樣，組織切片就與乳膠緊合在一起，于是用二甲苯除去石蜡（5 分鐘），而余留微量的二甲苯則用真空干燥除盡（30 分鐘），此時就可用顯影液來顯影，用定影液來定影，俟干燥後即可在顯微鏡下觀察。

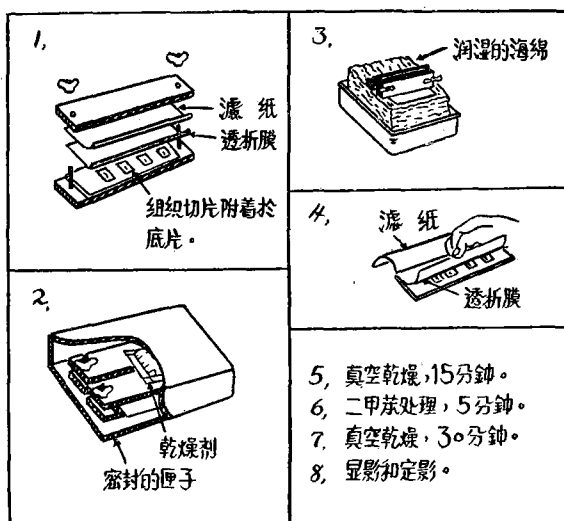


圖 3

此法之優點是迅速簡單，而缺點是不易獲得清晰顯影，並且放射性較低的部分，有不易顯出的危險。

二、鋪展法：將組織的石蜡切片鋪開于 42°C 蒸餾水面上，使水的溫度逐漸冷卻，將感光片或膠卷置于切片下方，使組織片附着于

膠片上，除去多余水分，而后置于低温处使曝露相当時間，随用二甲苯除去石蜡，再洗去多余二甲苯。此时即經显影、定影、染色、去水等手續，用二甲苯清晰。若如下圖（見圖4）同时用一切片做对照，即可比較。此法之优点是可得到相当清楚的显影，因为組織与放射自显影二者相重，用高倍显微镜可以追踪放射的来源。但其缺点是膠質助重染色，而且經显影手續后容易变更染色。如在石蜡除去前即先行显影，有时可以改进染色。

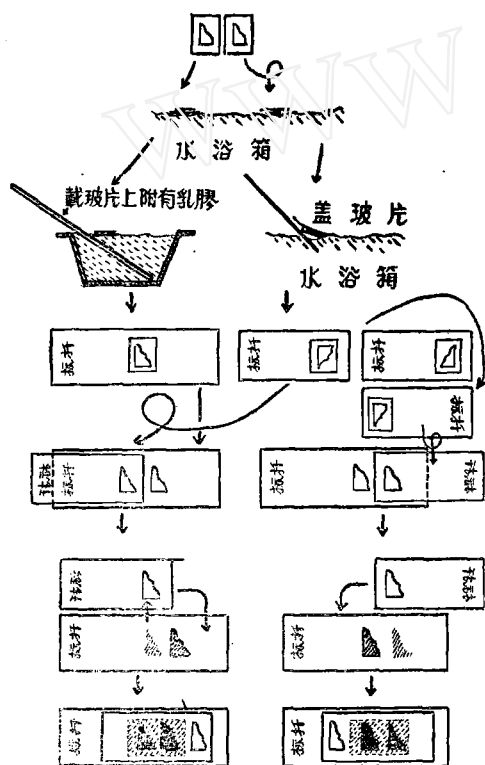


圖 4

三、乳膠法：此法有兩種，一种是將乳膠液溶化滴于切片上，一种是剝落乳膠。

(a) 制备 5 微米厚的組織切片，除去石蜡或火棉膠，再浸于 1% 火棉膠內，形成一薄層以資保护，而后加一滴乳膠液于切片面上，置于冷室經适当曝露時間后，进行染色、显影、定影等操作。由于水分会使膠質变性，故染色步驟需在一定低温下进行。見圖 5。

此法之优点是对于一些放射性較低的样品

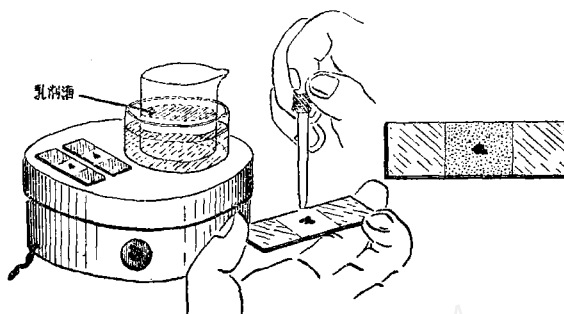


圖 5

可得較好的清晰显影，并且組織与放射自显影二者相重，但其缺点是会增高乳膠模糊的程度，在操作中也难以获得厚度一致样品。

(b) 从感光片上將乳膠剝落，浮置于水面，而后貼附于組織片上，曝露后，經显影、定影、染色等手續，就可在显微镜下观察影象，此法之优点是能获得良好的清晰度，見圖 6。

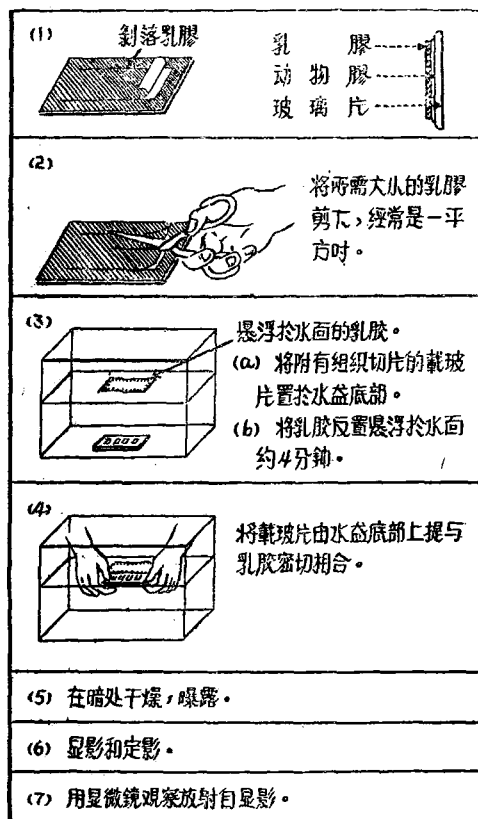


圖 6

以上是放射自显术各种方法的簡單介紹，在实际操作中，究竟采用那一种方法，可視放射性元素，生物材料，切片的厚薄等等因素的不同，而有所選擇。

最近我們用 0.1 毫升的醋酸—1— C^{14} ，相当于 12 微居里的剂量，注射于上簇前三日的蓖麻蚕的血液內，醋酸—1— C^{14} 即在蚕体内参与代謝， C^{14} 乃分布于各种不同的化合物而出

現于絲蛋白，蛹脂等处。以下数圖即用放射性蚕絲、蛹壳、蛾翅及蚕卵依照接觸法使各組織与 X—光底片密切接觸，在 $0^{\circ}C$ 左右經 120 小时曝露，而后經显影、定影所得之放射自显影。由此数圖即可清楚的觀察到 C^{14} 在蚕体内轉移的情况。虽然蚕体經各种变态，而 C^{14} 則由蚕而蛹，由蛹而蛾，并且由雌蛾所产之卵亦有含 C^{14} 。

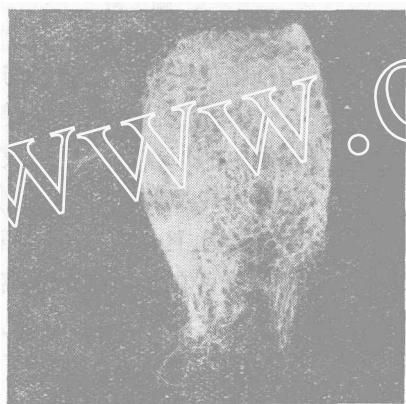


圖 7.

放射性蚕絲的放射自显影將，蚕絲从茧皮剥下，在暗室中平鋪于 X—感光片上，曝露 72 小時。(正片)



圖 8.

將放射性蚕蛹脫落的蛹皮，在暗室中平鋪于 X—感光片上，曝露 120 小時。(正片)

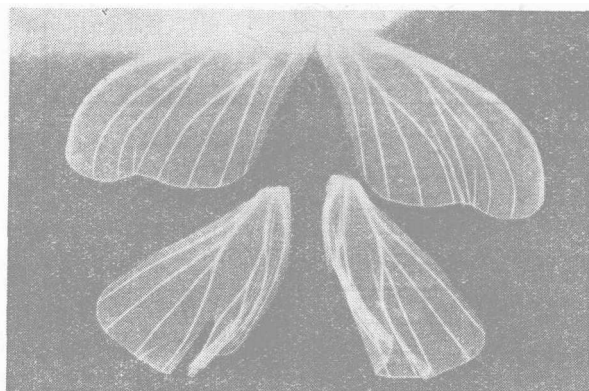


圖 9.

將放射性蚕蛾的四翅剪下，在暗室中平鋪于 X—感光片上，曝露 120 小時。(正片)

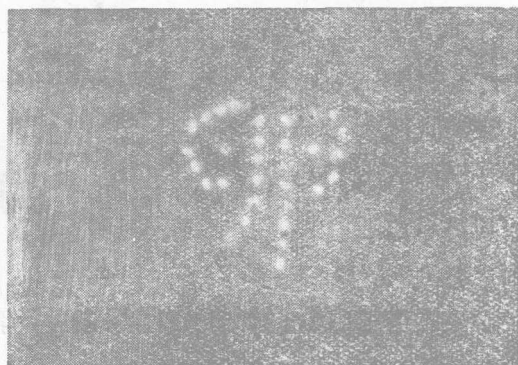


圖 10.

將放射性蚕蛾产下的卵，在暗室中鋪放于 X—感光片上，曝露 150 小時。(正片)