DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.01.014

发育中大鼠肾和空肠γ-谷氨酰转肽酶的变化

——组织化学和生物化学的观察

杨淑珍 王德青 徐克成* 金晓林

（训 练 部）

提 要

应用组织化学和生物化学的方法观察出生前、后发育中大鼠肾和空肠γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)的变化。肾γ-GT活性随着大鼠年龄的增长而逐渐升高。胎鼠后肾γ-GT主要位于肾小管腔面，生后大鼠肾γ-GT除了位于近曲小管上皮刷状缘和髓袢上皮之外，还发现在近曲小管上皮的基底部，肾皮质和髓质中微血管壁也有γ-GT活性。而且在肾皮质深层γ-GT活性明显高于皮质浅层。

胎鼠空肠仅仅在小肠绒毛形成之后，上皮细胞才有较明显的γ-GT活性。胎龄21天活性最高，出生后下降。

γ-谷氨酰转肽酶（γ-Glutamyltranspeptidase，γ-GT。EC、2、3、2、2）是一种质膜结合糖蛋白。此酶催化γ-谷氨酰化合物的γ-谷氨酰基转移至γ-谷氨酰基受体，即氨基酸或二肽[1]。γ-GT广泛分布于哺乳动物的组织内。γ-GT的功能尚未肯定，根据该酶分布于小肠上皮纹状缘及肾的近曲小管上皮细胞的刷状缘，推测与组织的氨基酸和肽的分泌、吸收和转运有关[2]。

以往用组织化学和生物化学方法对大鼠肾γ-GT的研究中，肾内微血管管壁及近曲小管基底膜是否有γ-GT活性尚未定论[3][4][5][6]；而对空肠γ-GT发育的研究只是用生化方法[7]。

我们应用组织化学染色和生物化学活性测定方法对正常发育的大鼠肾和空肠γ-GT的活性变化进行了观察，为研究该酶的功能提供形态学证据，为今后进行实验动物的研究提供资料。

材料与方法

胎龄按阴栓日计算取13天、17天、19天、21天，生后1天、3天、6天和150天大鼠八个不同年龄组各7—10只，断头致死后立即取材，分别做组织化学染色和生物化学活性测定。

一、组织化学方法

取新鲜肾和空肠放入液氮骤冷，10分钟后取出，用Karyomant冷冻切片机切片10μm(－25℃)，(早期胎鼠做整体切片)自然干燥后根据Albert[2]方法做组化染色及对照染色。

大鼠肾碱性磷酸酶和兔肾γ-GT染色做为对照。

用光镜观察组化染色反应的分级标准：（－）染成均匀淡黄色；（＋）反应物为深黄色；（卄）反应物呈棕黄色；（卅）反应物呈棕红色；（卌）反应物呈棕褐色。

二、生物化学活性测定方法

取肾和空肠组织，用含0.5% Tritonx100，pH 7.4的Tris-HCl缓冲液制成匀浆，离心（3000转/分）10分钟，取上清液按照Szasz方法[8]测定γ-GT活性。用721型分光光度计，波长410nm比色测定光密度。空白管除不加基质外与测定管相同。计算每ml样品中γ-GT的毫国际单位，以每分钟释放1毫摩尔对硝基苯胺为1个毫国际单位。

*兽医大学进修生。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛋白质测定按Lowry[8]方法，用Folin酚试剂显色，用721型分光光度计，波长660nm，比色测定每ml样品中蛋白质量。

γ-GT活性均以每毫克组织蛋白的毫国际单位表示（mIU/mg·pr）。

结　果

一、组织化学

1. 肾　在胎龄13天时，肾组织未见γ-GT活性反应物（－）；17天肾小管腔面已出现阳性物质染成棕黄色（+），随着个体发育，肾组织结构不断完善，γ-GT染色反应逐渐增强。21天近曲小管和髓袢的上皮均有较强的染色反应呈棕红色（卅）。在髓质中见有微血管呈阳性反应（廾）。生后3天肾γ-GT染色反应以及定位近趋成年大鼠。

成年大鼠肾近曲小管上皮刷状缘和管腔以及髓袢上皮均染成棕褐色，γ-GT呈强阳性（卅），在近曲小管上皮的基底面染成棕黄色γ-GT呈阳性反应（廾）（图2），在肾皮质和髓质中微血管管壁也有γ-GT阳性物质（廾）。此外，发现在肾皮质内γ-GT的反应强弱有区域性变化，皮质深层的γ-GT活性明显高于皮质浅层（图1）。

2. 空肠　胎鼠17天时，小肠绒毛尚未形成，肠管上皮为复层，γ-GT阴性（－）；19天小肠绒毛已形成，γ-GT呈阳性反应（廾），21天最高（卅），γ-GT活性主要位于绒毛上皮细胞的游离端（图3）。

成年大鼠空肠γ-GT活性主要分布在肠绒毛顶端上皮细胞的纹状缘，从绒毛顶端到绒毛基部活性逐渐下降，至小肠绒毛根部转为阴性（图4）。

二、生物化学

出生前、后大鼠肾γ-GT活性均随个体发育的过程而逐渐上升，到成年达最高值。（见表1和表2）

胎龄17天时空肠γ-GT活性很低，21天达最高值，出生后有所下降（详见表1和表2）。

表1　出生前、后大鼠肾和空肠γ-GT活性

发育阶段		胎龄（天）				出生后（天）			成年（天）
		13	17	19	21	1	3	6	150
肾γ-GT活性	平均值（mIU/mg.pr）±标准差			56.2 ±10.8	75.7 ±13.9	84.91 ±19.53	102.6 ±27.9	122.3 ±21.04	340.33 ±84.75
	组化反应	（－）	（+）	（廾）	（卅）	（卅）	（卅～卅）	（卅）	（卅）
空肠γ-GT活性	平均值（mIU/mg.pr）±标准差		3.3 ±0.8	47.3 ±10.9	55.6 ±16.06	31.09 ±5.3	17.96 ±2.71	24.63 ±4.02	18.66 ±4.44
	组化反应	（－）	（－）	（廾）	（卅）	（廾）	（廾）～（廾～+）		（廾～+）

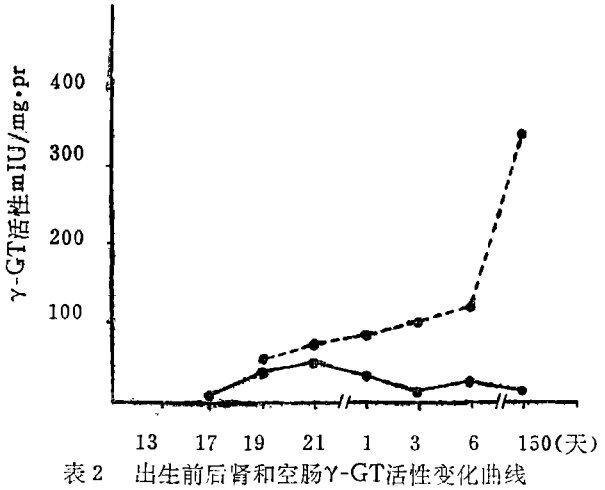


表2　出生前后肾和空肠γ-GT活性变化曲线

•——•表示空肠γ-GT的变化　　•·····•示表肾γ-GT的变化

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

讨　论

通过组织化学和生物化学方法的观察，显示了大鼠个体发育中肾γ-GT活性随着年龄的增长而逐渐升高，到成年达最高值。在近曲小管上皮细胞的刷状缘和髓袢的腔面有很高的γ-GT活性。此结果与以往的报导一致[2][5][10]。我们观察到在出生前17天后肾的肾小管腔面已有γ-GT活性，随着结构和功能的发育，γ-GT活性增高，其定位也趋向特异性分布。Dass等人[6]在成年大鼠应用γ-谷酰胺-β-萘胺血管灌注，用重氮盐染色，表明近曲小管基底部有γ-GT活性，但他们认为此酶不是位于近曲小管基底膜而是位于与近曲小管相伴随的微血管壁上。Glenner等人实验显示在髓质血管束γ-GT活性呈中等反应[11]；而近曲小管细胞的基底面缺乏γ-GT活性。我们实验的结果，该酶在近曲小管的刷状缘γ-GT呈强阳性反应（卅），在基底面和皮质及髓质内微血管壁也有γ-GT活性物（艹）。我们推测基底面的阳性物质是存在于近曲小管的基底纵纹上。这从形态学上提示γ-GT可能参与了物质从肾小体滤液中经肾小管上皮细胞的刷状缘，基底纵纹到毛细血管这一完整的物质转运和重吸收过程。

在生前21天、生后1天和6天大鼠肾皮质的表浅层有一狭窄的γ-GT为阴性的区域。在成年大鼠肾皮质深层明显高于浅层。为此，我们做了大鼠肾碱性磷酸酶和兔肾γ-GT组化染色做对照，其结果皮质浅层和深层均无显著差别。γ-GT在大鼠肾这种特异性分布尚需进一步探讨。

胎龄17天的大鼠，小肠绒毛尚未形成，肠管为复层上皮，上皮细胞合成γ-GT的能力很弱，组化染色为阴性。生化测定其活性很低。第19天小肠绒毛已形成，细胞合成γ-GT的能力迅速增强，21天达最高值，而出生后又明显下降。这种变化与肝γ-GT的发育情况相类似。Adjarov的实验[7]，在妊娠21天、生后3天、10天和成年大鼠小肠γ-GT的活性差异不大。

我们将出生前、后肾和空肠γ-GT的发育情况进行比较（表2）。肾γ-GT活性随着个体发育而上升。而空肠则在生前21天达最高值。成年大鼠虽然生化测定γ-GT活性较低，但组化染色空肠上皮γ-GT活性集中在上皮细胞的纹状缘，支持γ-GT参与物质吸收的功能[12]。然而成年大鼠肾和空肠γ-GT活性相差甚远，肾比空肠高达18.24倍，说明此酶在肾内的功能比空肠要复杂的多。Chasseaud等人[13]提出某些毒物（包括致癌剂）能与谷胱甘肽结合，经一系列反应形成无毒的硫醚氨酸，经尿中排出体外而达到解毒的目的。硫醚氨酸形成过程必须由γ-GT参加，肾内具有这样高的活性可能γ-GT也参与解毒或其它的功能。

参 考 文 献

1. Hanes CS, et al: Synthesis of peptides In enzymic reactions involving glutathione. Nature 1950; 166:288

2. Albert Z, et al: Histochemical demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase. Nature 1961; 191:767

3. Braun JP, et al: Gamma glutamyl transferase animals. Vet Res Commun 1983; 6:77

4. Vanderlaan M and Phares W: γ-Glutamyltranspeptidase: a tumor cell marker with a pharmacological function. Histochem J 1981; 13:865

5. Fleming N, et al: The activity and distribution of gamma-glutamyl transpeptidase (γ-GT) in human fetal organs. Histochemistry 1977; 51:209

6. Dass PD: Renal γ-Glutamyl transpeptidase: in situ antiluminal localization. J Histochem Cytochem 1982; 30:148

7. Adjarov D, et al: Developmental studies on gamma-glutamyl-transferase in rat intestinal mucosa. Enzyme 1979; 24:358

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

8. Szasz G, et al. Reaction-rate method for γ-Glutamyltransferase activity in serum. Clin Chem 1976; 22:2051

9. Lowry OH, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265

10. Marathe GV, et al: Ultrastructural localization of γ-Glutamyl-transpeptidase in rat kidney and jejunum. FEBS Lett 1979; 107:436

11. Glenner GG: Histochemical demonstration of a gamma-glutamyltranspeptidase-like activity. J Histochem Cytochem 1962; 10:481

12. Meister A: On the enzymology of aminoacid transport. Science 1973; 180:33

13. Chasseaud LF, et al: Role of glutation and glutathione-S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrohpiles. Adv Cancer Res 1979; 29:175

Histobiochemical Investigations on Changes of γ-Glutamyl Transpeptidase Activity in Kidneys & Jejunum of Developmental Rats

Yang Shuzhen et al

(Department of Histology & Embryology,

Third Military Medical College)

Observations were carried out on the changes of γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT) changes in the kidneys and jejunum of the rat fetus and growing rats with histobiochemical methods. In general, the activity of γ-GT in the kidneys increases with the increase of the age of the rats. In the rat fetus, γ-GT is mainly localized on the surface of the metanephros tubular lumen. After the rat is born, γ-GT can be found on the brush border membrane of the proximal convoluted tubules and the epithelium of the Henle's loops as well as on the basement of the epithelium of the proximal convoluted tubules and the capillary walls of the renal cortex and medulla. In addition, the activity of γ-GT is far more prominent in the deep layer than in the superficial layer of the renal cortex.

In the jejunum of the rat fetus, marked activity of γ-GT is only found after the villi of the jejunum are formed: the activity is the highest when the fetus is of 21 days of age and it reduces after the rat is born.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

发育中大鼠肾和空肠γ-谷氨酰转肽酶的变化——组织化学和生物化学的观察

（正文见第61页）

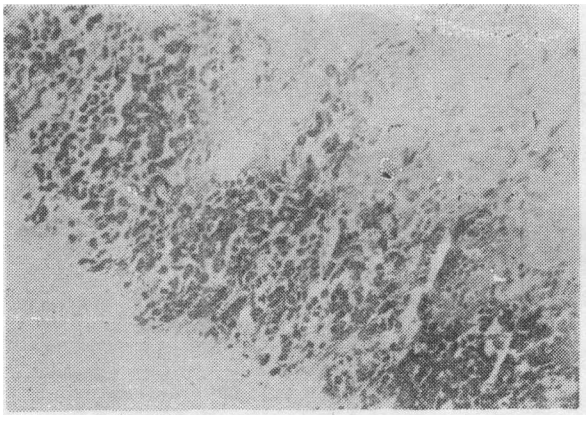


图1　成年大鼠肾冰冻切片，γ-GT组化染色。肾皮质内层γ-GT活性明显高于外层。×40

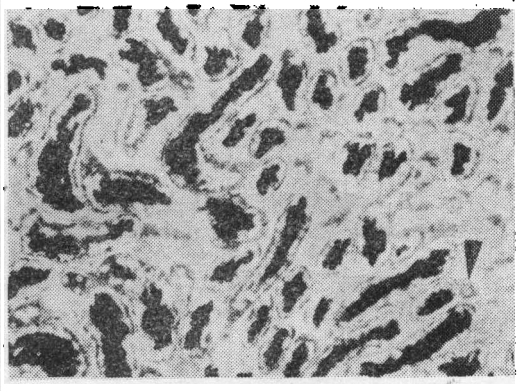


图2　成年大鼠肾皮质、近曲小管上皮刷状缘及管腔有很强的γ-GT活性，基底面和微血管也显示有γ-GT阳性物质。箭头所指微血管。γ-GT组化染色。×100

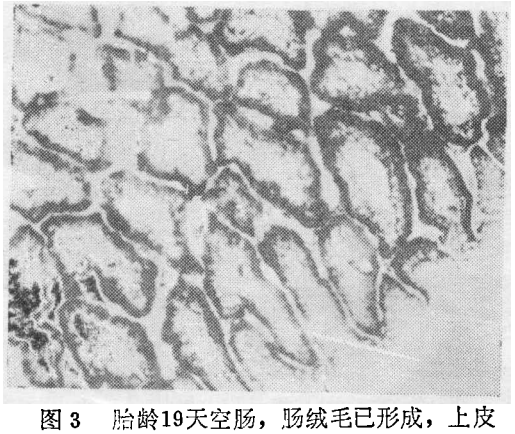


图3　胎龄19天空肠，肠绒毛已形成，上皮细胞游离端有较强的γ-GT阳性反应。γ-GT组化染色。×100



图4　成年大鼠空肠，γ-GT位于在上皮细胞的纹状缘。γ-GT组化染色。×100

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net