

传代内皮细胞在相差显微镜下的形态学改变及图象分析技术和蛋白质分泌功能的变化,探讨了传代内皮细胞形态和功能变化的关系。结果显示,传代内皮细胞存在着形态和功能相对稳定的阶段,在此阶段的几代细胞是作为实验选材的理想对象。而非稳定阶段的各代细胞间形态和功能都存有显著性差异,不应作为实验选材。

参 考 文 献

- [1] Maciag T. et al., 1982, *J Cell Biol.*, 94: 511—513.
 [2] Martin G. M. et al., 1977, In *growth, nutrition, and metabolism of cells in culture*. ed. by Rotblat. G. H., et al, New York Academic pp. B—27.
 [3] 魏少敏等, 1987, 中国病理生理杂志, 3(3): 188—191.
 [4] 董玉兰等, 1989, 中国医科大学学报, 18(2): 81—85.
 [5] 卢耀增等, 1982, 中华病理学杂志, 11(3): 176—179.
 [6] 王毅等, 1991, 细胞生物学杂志, 13(1):

47.

- [7] 鲁子贤, 1989, 蛋白质与酶学研究方法, 山东科技出版社, 5—7页。
 [8] 盛民立等, 1987, 上海医科大学学报, 14(1): 71—73.
 [9] Meyrick B. et al., 1989, *J Cell Physiol.*, 138(1): 165—174.
 [10] Meyrick B. et al., 1987, *Fed Proc.*, 46(8): 2516—2520.
 [11] Block E. R. et al., 1985, *J Cell Physiol.*, 122(2): 240—248.
 [12] Hamill R. J. et al., 1986, *Infect Immun.*, 54: 833—836.
 [13] 饶花平等, 1989, 湖南医科大学学报, 14: 115—118.
 [14] Meyrick B. et al., 1986, *Am J Pathol.*, 122: 140—151.
 [15] 汪建等, 1988, 中国病理生理杂志, 4(1): 31—34.
 [16] Harlan J. M. et al., 1983, *Lab Invest.*, 48(3): 269—274.
 [17] Kenneth L. et al., 1987, *J Appl Physiol.*, 63(2): 840—850.
 [18] Gerrity R. C. et al., 1975, *Experimental and Molecular Pathology*, 23: 379—385.
 [19] Shasby D. M. et al., 1987, *Experimental Lung Research*, 15(3): 345—357.

运用包埋后免疫细胞化学方法研究视网膜神经细胞的多递质共存*

吕建利 王厚华

(中国科学院上海生理研究所 200031)

包埋后免疫细胞化学方法 (Postembedding immunocytochemical technique) 是一种组织先用树脂包埋、切片后再进行免疫细胞化学反应的方法^[1-4]。与通常冰冻切片的免疫细胞化学方法相比,其最大优点是可以按照实验的不同要求,制备连续的超薄切片(500—1000 Å)和半薄切片(0.5—2 μm),再进行免疫细胞化学反应。

在视网膜神经递质及其共存的研究中,由于无长突细胞包含的递质、调质和其他神经活

性物质特别多^[5],在视信息调控中具有特别重要的作用,因此引起了人们极大的关注。但是这种细胞的胞体较小,若要检测一个细胞同时包含2种以上递质和调质,最好的方法是采用树脂包埋后半薄切片的光镜免疫细胞化学方法。该方法在应用中有两大困难:1. 如何使浸蚀得当,既要使组织抗原决定簇从被封闭状态中解脱出来,恢复自由态,又不影响其免疫

本所电镜室曲富金、尹眉协助切片,特此致谢。

* 国家自然科学基金项目。

活性^[4]；2. 如何从大量标记细胞中鉴别递质共存细胞。在反复实践中，我们调整了浸蚀过程中有关参数的关系，并通过显微描绘仪描下细胞之后，在阅片机上重叠细胞，从而观察到在无长突细胞中甘氨酸、 γ -氨基丁酸和神经紧张素的双递质或多递质共存。

材料和方法

1. 取材 出生后90天小猫经戊巴比妥钠麻醉后心脏灌流固定。固定液为4%多聚甲醛和0.2%戊二醛混合液(含在0.1 mol/L PBS中, pH 7.4), 灌流量为700 ml。20分钟后摘取眼球切视杯。

2. 固定 视杯于原固定液中继续固定1.5小时, 然后剥离视网膜, 剔除玻璃体, 并把视网膜展平在Millipore滤纸上, 此后用4%多聚甲醛固定液(含在0.1 mol/L PBS中, pH 7.4)冲洗三次, 每次15分钟, 然后换入pH 10.4的4%多聚甲醛固定液(碳酸缓冲液配制)于4℃过夜, 次日用0.1 mol/L PBS冲洗三次。再浸入1% NaBH₄中, 30分钟后用PBS冲洗, 直至气泡消失^[6]。

3. 脱水和包埋 按制备电镜标本常规操作, 将视网膜小条进行脱水和EPON包埋。

4. 切片 用LKB超薄切片机切连续的半薄切片(1 μ m或2 μ m厚), 用铜网捞取单个切片并反扣在涂有明胶的载玻片上, 载玻片按实验要求每4张排成一组, 每个片子上用小注射针头滴一排木刺, 将连续切片按秩序排列于载玻片水滴上(如第一张载玻片上排列的切片为No. 1、5、9、13、17, 则第二张载玻片上的切片顺序为No. 2、6、10、14、18; 依次类推), 置50℃热盘上数分钟, 待切片烘干后用镊子轻敲载玻片使铜网脱落。上述载玻片置切片盒内于45℃烘箱中再烘2小时以确保切片牢贴于玻片上。

5. 浸蚀 EPON包埋后的切片在进行免疫细胞化学反应前必须先经浸蚀剂将EPON脱去。浸蚀得当与否是细胞能否进行良好免疫反应的关键。在实践中, 我们对有关参数作了适当的调整, 具体步骤如下:

(1) 浸蚀剂 在无水乙醇中加入过量NaOH片剂制备过饱和的乙醇钠溶液, 室温下约3天后呈棕色时即可吸取其上清液作为浸蚀剂使用。

(2) 浸蚀 在盖盖的染色缸中进行。将载有切片组织的载玻片浸入浸蚀剂中于室温下(20—22℃)浸蚀15分钟或35分钟(表1), 之后取出玻片并吸干切片周围的溶液, 再置入另一盛有无水乙醇的染色缸中洗涤2次, 每次2分钟, (玻璃片在染色缸间转移时要迅速, 以免乙醇蒸发而使NaOH晶体沉淀在组织片上, 并因此在后边的冲洗中裹走组织片^[11])。此后, 依次经递减乙醇液, 直至蒸馏水, 再经3% H₂O₂^[11]处理2分钟以进一步去除内源性过氧化物酶并充分暴露要标记的组织抗原, 尔后用PBS冲洗。浸蚀过程中, 切片厚度、浸蚀剂浓度、浸蚀时间以及温度等各项参数间存在着一定关系, 只有掌握得当才能既脱去EPON, 又不破坏组织良好结构和良好免疫反应性。我们将上述各参数关系列出一表(表1), 对于1 μ m的切片, 20—22℃下浸蚀15分钟最佳, 所用浸蚀剂若是制备后3—4天宜用原液, 制备5—7天则应稀释1倍; 若用2 μ m切片, 除浸蚀时间延长至35分钟外, 其他相同。

6. 免疫细胞化学反应和显色 浸蚀后的切片经各自特异的第一级抗体孵育后, 按常规的ABC免疫细胞化学方法^[8]对不同的细胞分别进行标记。使用的第一级抗体有兔抗酪氨酸羟化酶(TH)抗体(1:500, 美国ETI公司出产), 兔抗甘氨酸(Gly)抗体(1:500, 美国Kolb实验室转送), 兔抗 γ -氨基丁酸(GABA)抗体(1:1000, 脑研究所出产), 兔抗神经紧张素(NT)抗

表1 浸蚀过程中各种参数的关系

浸蚀时间 (分钟)	浸蚀剂贮存天数				
	乙醇加入份数	3—4	5—7	8—10	11—14
乙醇(份)	0	1	2	3	
1 μ m 切片		15'	15'	15'	15'
2 μ m 切片		35'	35'	35'	35'

温度为20—22℃。

体(1:250, 第二军医大学出产)。第二级抗体(羊抗兔 IgG)和 ABC 复合物浓度均为 1:100(美国 Vector 公司出产)。在以 4 张连续切片为一组的载玻片中, 除第 1 张为对照外, 其余第 2、3 和第 4 张分别滴加抗 Gly, GABA 和 NT 的抗体, 所得阳性反应细胞即为相应的甘氨酸能、 γ -氨基丁酸能和神经紧张素能无长突细胞。而用抗 TH 抗体标记者则为多巴胺能无长突细胞。

7. 递质共存细胞的鉴别: 用显微描绘仪在白纸上画下切片的轮廓, 切片中可以作为识别标记的结构, 以及抗体标记的细胞, 然后将分别标记有 Gly 能、GABA 能和 NT 能无长突细胞的 3 张纸在阅片机上重叠, 找出二个重叠或三个重叠的细胞, 即为相应 2 种或 3 种神经活性物质共存的细胞。

结果与讨论

用上述包埋后光镜免疫细胞化学方法, 我们分别标记了猫视网膜内含经典神经递质的 Gly 能和 GABA 能无长突细胞, 以及含神经肽的 NT 能无长突细胞。图 A₁ 示 NT 能无长突细胞, 胞体位于内核层 (INL) 的内半部, 但分层不易看清; 图 A₂ 示 GABA 能无长突细胞, 其胞体直径为 8—10 μm , 位于 INL 的内端, 分枝分布于内网状层 (IPL) 的 1、3、4、5 亚层; 图 A₃ 示 Gly 能无长突细胞, 胞体直径为 7—9 μm , 位于 INL 的内端, 分枝分布于 IPL 的 1、2 和 3/4 层。用描记细胞重叠法显示 A₁—A₃ 中箭头指示者为同一细胞。如图 A₂ 和 A₃ 中双箭头标记者即为同时含有 GABA 和 Gly 递质的无长突细胞, 而 A₁、A₂、A₃ 中单箭头指示者即为同时含有 GABA、Gly 和 NT 的多递质共存细胞。

此外, 我们还成功地标记了以大分子酪氨酸羟化酶为抗原的多巴胺 (DA) 能无长突细胞。图 B 示正常位置的 DA 能无长突细胞胞体及其分枝。图 C 示在节细胞层的移位 DA 能无长突细胞。

我们的结果充分表明包埋后光镜免疫细胞化学方法是研究视网膜无长突细胞递质共存的一种很有效的方法, 而该方法的关键是浸蚀得当。早在人们进行免疫组化实验以前就已经有

人报道了移去 EPON 的方法^[9-11], 但那时进行的是常规的组织学染色, 并不存在免疫活性的保护问题, 因此浸蚀的过程不必严格, 但该问题在我们的实验中却是至关重要的。因为其一, 组织一经 EPON 包埋后, 许多抗原的决定簇便与环氧树脂的某些因子结合在一起而造成暂时性的失活; 其二, 乙醇钠浸蚀掉 EPON 的意义就在于使被结合的抗原决定簇恢复到自由状态, 但乙醇钠本身对组织抗原也有损伤, 因此, 若浸蚀条件掌握不好, 则仍然得不到预期的结果^[1,2,4]。我们在本实验中作了以下三方面的改进, 从而得到了较圆满的结果。

1. 浸蚀剂要新鲜, 制备后的使用期限在 2 周之内;

2. 视制备时间长短用 100% 的乙醇对浸蚀剂进行稀释 (详见方法);

3. 浸蚀时间和温度要严格控制;

本实验中我们应用以经典递质 (r-GABA, Gly)、肽类神经活性物质 (NT)、及大分子酪氨酸羟化酶 (TH) 为对应抗原的四种抗体成功地标记了一系列无长突细胞, 充分表明了该方法应用的广泛性。图 A₁ 中的 NT 能细胞的阳性反应较弱, 并非方法问题而是由于该第一级抗体保存时间过长, 抗体质量较差而造成的。

由于抗体和时间的限制, 我们目前仅使用了四种抗体, 看到了神经递质和神经肽中二者或三者的共存。但是我们相信运用该方法可以同时采用多种抗体检测细胞中的递质及其共存, 而对于发育中个体较小、递质变化较复杂的细胞该方法的应用前景则更广。

摘 要

运用树脂包埋后半薄切片进行光镜免疫细胞化学反应是一种研究视网膜胞体较小的无长突细胞内递质共存的好方法。我们改进了该方法的关键—浸蚀, 并结合标记细胞重叠法, 成功地检测了幼年猫视网膜无长突细胞内甘氨酸, γ -氨基丁酸和神经紧张素的共存。

图版说明

PE: 色素上皮层, ONL: 外核层, INL: 内核层
IPL: 内网状层, GL: 神经节细胞层。

A. 示幼年猫视网膜无长突细胞中的递质共存。
A₁ 示神经紧张素 (NT) 能细胞, A₂ 示 γ -氨基丁酸 (GABA) 能细胞, A₃ 示甘氨酸 (Gly) 能细胞。特征性标记物: 血管 (◆*◆) 和节细胞 (GC)。双箭头示 Gly/GABA 共存细胞。单箭头示 Gly/GABA/NT 共存细胞。×700

B. 示幼年猫正常位置的多巴胺能无长突细胞。
×750

C. 示幼年猫迁移的多巴胺能无长突细胞。×750

参 考 文 献

- [1] Gosselin, E.J. et al., 1986, *Amer. J. Anat.*, 175: 135—160.
[2] Erlandsen, S. L. et al., 1979, *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1286—1289.

- [3] Rodning, C. B. et al., 1980, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 199—205.
[4] Takamiya, H. et al., 1980, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 1041—1049.
[5] Brecha, N. C. et al., 1985, in *Retinal Transmitters and Modulators: Models for the Brain*, Vol. 1, 93—118, CRC Press, Boca Raton, Fla.
[6] Lillie, R. D. et al., 1972, *Stain Technol.*, 47: 13—16.
[7] Basken, D. G. et al., 1979, *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1290—1292.
[8] Wang, H. H. et al., 1990, *Visual Neurosci.*, 4: 159—175.
[9] Mayor, H. D. et al., 1961, *J. Biophys. Biochem.*, 9: 909—910.
[10] Cardno, S. S. et al., 1965, *Am. J. Clin. Path.*, 43: 1.
[11] Lane, B. P. et al., 1965, *J. Histochem. Cytochem.*, 13: 579—582.

新生牛肝脏再生刺激物质的部分纯化及生物学特性

戴 炜* 雷姚攀 彭志刚 林汝洪 骆抗先

(广州, 第一军医大学南方医院传染科 510515)

细胞增殖与分化机制的研究正日益依赖于各种调节因子的寻找与分析。在众多因子中, 组织和细胞特异的调节因子更引起人们的兴趣。本实验室曾报道肝部分切除后大鼠再生肝中的肝刺激物质 (Hepatic Stimulator Substance, HSS), 可使成年原代大鼠肝细胞 DNA 合成增加^[1]。由于再生肝操作复杂, 来源困难, 实际应用受到限制。本文从新生牛肝胞质液中提取出同样具有刺激肝细胞增生的物质, 对其有效成分进行了部分纯化及理化性质的分析, 并用成年原代大鼠肝细胞和肝源性肿瘤细胞初步测定了其生物学活性。

材 料 与 方 法

一、HSS 的制备

新生牛生后 24 hr 内杀死, 无菌取肝, 剪碎并用生理盐水漂洗, 按图 1 方法制备。

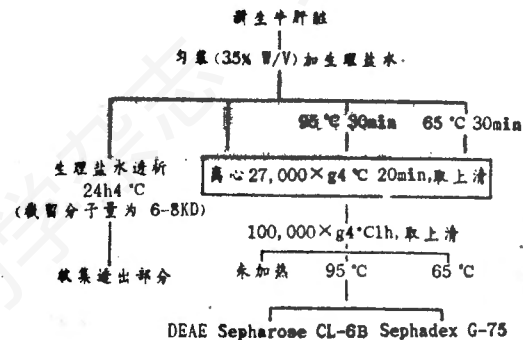


图 1 HSS 的纯化步骤

二、盐析

取 95°C 组样品两份, 分别加等量的生理盐水搅匀, 逐滴加入饱和硫酸铵, 使其终浓度分别达 30% 和 60%, 30 min 后经 12,000 × g 离心 20 min (4°C), 沉淀物用 PBS (pH 7.4) 溶解, 透析除盐后, 恢复至原样品体积。

* 现在北京佑安医院 100054。