

为更深入了解卵巢功能的调控机制有着重要的意义。

摘 要

本文观察了 GABA 对大鼠分散颗粒细胞生孕酮的影响。结果表明:当 GABA 浓度为 10^{-6} mol/L 时明显促进颗粒细胞基础孕酮分泌 ($p < 0.05$) 及促进 HCG 刺激孕酮的生成 ($p < 0.05$)。但更高浓度 (10^{-5} mol/L) 时则表现抑制 HCG 刺激孕酮生成的效应 ($p < 0.02$)。提示颗粒细胞的激素分泌功能可能受到 GABA 的调控。

参 考 文 献

- [1] Delrio, R. M. and Cablleno, A. L., 1980, *J. Neurochem.*, 34: 1584—1586.
[2] Erdő, S. L. et al., 1982, *J. Neurochem.*,

38: 1174—1176.

- [3] Erdő, S. L., 1984, *Life Sci.*, 34: 1879—1884.
[4] Louzan, P. et al., 1986, *J. Reprod Fertil.*, 77: 499—524.
[5] Schaeffer, J. M. et al., 1982, *Life Sci.*, 30: 1599—1604.
[6] Ritta, M. N et al., 1987, *Life Sci.*, 40: 791—798.
[7] 高尔威等, 1982, *生理学报*, 34: 441—447.
[8] Rohinsou, J. E. et al., 1991, *I. Neurocrinol.*, 3: 393—399.
[9] Erdő, S. L., 1985, *Trends pharmacol Sci.*, 6: 205—208.
[10] 罗履广等, 1991, *生理学报*, 3: 205—208.
[11] Verburg-Van Kemenade, B. M. L. et al., 1987, *Life Sci.*, 40: 1859—1867.

电镜酶细胞化学样品微波制备技术

黄 立 王 玲

(南京医科大学电镜室 210029)

近年来, 超快微波制样技术在电镜生物样品固定中已得到较多的应用^[1-3], 但用于电镜细胞化学方面的报告还比较少^[4,6]。我们设计了一套实验程序, 将微波照射应用于电镜酶细胞化学过程中的几个主要阶段(固定、温育和包埋聚合), 获得了较好的结果。

材 料 和 方 法

本实验使用的微波炉是南京三乐牌家用微波炉(型号: WL 500 p-1), 频率为 2450 MHz, 输出功率为 500 瓦, 功率设定分三档: 烹调、解冻及保温档。烹调档为连续微波照射, 解冻及保温档均为间歇微波照射。微波炉每开启 30 秒, 在解冻档和保温档微波照射时间分别为 17 秒和 5 秒, 间歇期分别为 13 秒和 25 秒。

取 ICR 小鼠肝及小肠切成 1 mm^3 小块, 放在含有 3 ml 二甲胍酸钠缓冲的 1% 戊二醛 (pH 7.2) 小玻璃瓶中。小瓶放在直径为 15 cm 的盛有冰水的培养皿中。

我们做了三种酶的细胞化学染色, 即 ACP 酶和 G-6-P 酶(肝脏); ALP 酶(小肠)。实验步骤如下:

1. 预固定 将盛有样品小瓶和冰水的培养皿放在炉内圆盘中央, 在圆盘边缘处放置盛有 900 ml 水的烧杯, 用作水负载, 吸收多余的微波能量。开启保温档 60 秒(微波照射时间实际上仅为 10 秒), 照射后样品仍留在原液中继续固定 30 分钟。

2. 厚切片 将样品放入 0.1 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液中, 用振荡切片机制成 60 μm 厚的切片; 再用 0.1 mol/L Tris-Maleate 缓冲液洗 3 次。

3. 预温育 用未加底物的温育液处理 5 分钟, 20°C。

4. 温育 切片放入温育液中(表 1)。将盛有切片及温育液的样品小瓶放在盛有温水(20°C)的培养皿中, 一齐放在微波炉内圆盘中央, 水负载仍为 900 ml。开启保温档 60 秒钟。照射后样品在原液中停留 5 分钟, 然后用 0.1 mol/L Tris-Maleate 和 0.1 mol/L 二甲胍酸钠先后各洗 3 次, 每次 5 分钟。

5. 后固定 将切片放入 1.5% $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -

表 1 温育介质

	β -甘油磷酸钠 (10 mmol/L) ml	Tris-Maleate (0.2 mol/L) ml	$CeCl_3$ (8 mmol/L) ml	TritonX-100 (0.002%) ml	蔗糖 克	双蒸水加至 ml
ACP 酶	1	5(pH 5.0)	2.5	1	0.5	10
ALP 酶	1	5(pH 8.0)	2.5	1	0.5	10
G-6-P 酶	葡萄糖-6-磷酸 三钠(10mmol/L) 1	5(pH 6.7)	2.5	1	0.5	10

表 2 包埋剂浸渍

浸渍液	微波照射		在37℃温箱中停留时间 (min)
	功率档	时间(min)	
包埋剂: 纯丙酮			
1:1	解冻档	2	15
2:1	解冻档	2	15
1:0	解冻档	2	30

1%OsO₄ 混合液中(0.1 mol/L 二甲胍酸钠, pH 7.2)。微波照射条件与 1 相同。开启保温档 60 秒, 照射后样品在原液中停留 5 分钟。

6. 丙酮系列脱水

7. 包埋 包埋剂为 Epon 812, 包埋剂浸渍按表 2 进行。微波照射时水负载为 500 ml¹。

标本放在橡胶包埋平板中包埋。聚合时, 平板放在微波炉圆盘中央, 其边缘放置 500 ml 水负载。在解冻档和烹调档各开启 60 分钟和 30 分钟。

LKB V 型超薄切片机制片, 醋酸铀、柠檬酸铅染色, Philips EM-400 电镜观察。

对照组分两组, 一组用常规方法制备, 不用微波照射, 另一组按微波照射程序进行, 但温育液中不加底物。

结果与讨论

在电镜下观察, 肝细胞和小肠上皮细胞的超微结构均保存得很好。在肝细胞的溶酶体中可明显见到 ACP 酶的反应产物(图 1)。在肝细胞的内质网中可见到 G-6-P 酶的明显的细胞化学反应, 使内质网强烈着色(图 2)。在小肠上皮细胞的微绒毛处和各界膜处可明显见到 ALP 酶的深度染色(图 3)。三种酶的反应部

位与常规对照组一致, 没有底物的对照组均未见相应的反应产物。

微波对生物样品的作用既有热作用又有微波场的作用, 其场作用的机理有多种说法, 至今仍不十分清楚。但从实验结果来看, 在固定和温育阶段, 微波场及其热效应的双重作用加速了固定剂和温育介质对样品的渗透和化学交联作用, 从而使化学固定剂的固定作用和温育介质的染色作用得以加强和加速。由于固定时间短, 酶活性保存比常规方法好。在包埋聚合阶段, 微波场及其热效应加速了包埋剂的渗透及包埋剂中各组分之间的化学反应, 从而使需要 1—2 天的固化过程缩短至 1.5 小时之内完成。

目前国内、外使用的微波样品制备技术所选用的组织块均较大(0.3—1 cm)^[4], 而且多数是用连续微波照射, 照射时间在 10—20 秒之间, 时间短, 不易控制, 常因样品中心温度过高(>45℃)^[5], 造成微波损伤。固定质量不均匀、不稳定。我们选用小标本块(≤1 mm³)和间歇微波照射, 同时加上低温水浴并适当延长样品在固定液中的时间以减少微波损伤, 因之也提高了固定质量。小标本有利于微波在样品

中产生的热量从中心向表面发散, 散热快。间歇微波照射使照射时在样品中心产生的热量有足够长的间歇期向样品表面传递, 最后被固定液所吸收, 减少了热量在样品中的积累, 从而防止了由于微波照射而使样品升温过高、过快而产生的损伤。固定液温度受低温水浴控制保持恒定, 因此我们使用的固定液仅为 3 ml, 比国外通常使用的 10 ml 少得多, 节省了昂贵的固定剂。

微波照射后不立即取出标本, 适当延长样品在固定液中浸泡的时间(30 分钟), 使组织中不溶蛋白质由初始的 44.3% 升高到 79.6%^[4], 大幅度改善了样品固定质量, 使细胞超微结构得以更好的保存。

摘 要

在电镜酶细胞化学技术中, 我们在样品的

固定、温育、包埋剂浸渍和聚合等主要过程中均使用微波照射, 不仅缩短了制样时间, 而且由于使用了小标本、间歇微波照射、低温水浴及适当延长样品在固定液中的时间等改进技术, 使细胞超微结构和酶的活性都得以更好保存。酶染色清晰, 无扩散, 定位准确。

参 考 文 献

- [1] Mayers, C P., 1970, *J. Clin Pathol.*, 23: 273—275.
- [2] Kayser, K. et al., 1988, *Histochem. J.*, 20: 347—352.
- [3] Login, G R. et al., 1986, *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 381—387.
- [4] Mizuhira, V. et al., 1990, *Acta Histochem. Cytochem.*, 23: 501—523.
- [5] Notoya, M. et al., 1990, *Acta histochem. Cytochem.*, 23: 525—536.

用 Fura-2 测定缺氧时海马细胞内游离钙离子浓度的变化

刘振伟 王福庄 姜 航 丁爱石 黄燕华

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

缺氧时神经元胞内游离 Ca^{2+} 离子浓度升高, 这是缺氧所致神经元及突触传递发生不可逆损伤的重要机制之一^[1,2]。我们以往的工作发现, 缺氧能迅速阻断大鼠海马脑片的突触传递, 而无 Ca^{2+} 及高 Mg^{2+} 液能减轻突触传递的缺氧损伤, 提高复氧后脑片突触功能的恢复率^[3], 间接说明 Ca^{2+} 参与了神经元与突触功能的缺氧损伤。为进一步观察缺氧时神经元胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高的动态变化, 本工作用 Fura-2 荧光测定技术, 连续监测了缺氧时海马细胞胞内游离 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)的变化特征, 并对其变化的可能机制进行了初步分析。

材 料 与 方 法

实验参考 Dildy 及 Leslie 的方法^[4], 用新生 1—

2 天的 Wistar 大鼠, 在解剖显微镜下剥离出双侧海马, 剪碎后置于 37℃、0.125% 的胰蛋白酶溶液中消化 20 min。用含 10% 马血清的 MEM 培养基中止消化, 200 目过筛。滤液 1000 r/min 离心 5 min。沉淀细胞以 10% 马血清的 0.2% BSA-MEM 液配制成 3 ml 细胞悬液。加入 Fura-2/AM(终浓度为 5 μ mol/L), 在 37℃ 水浴中恒温振荡 45 min—50 min, 并不断地通入 95% O_2 + 5% CO_2 混合气体以维持细胞功能^[5]。负载后, 细胞悬液以 1000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 用 8 ml 0.2% BSA-Hank 氏液洗 1—2 次。Hank 氏液成分为 (mmol/L): NaCl 137.0, KCl 5.0, $CaCl_2$ 1.3, $MgSO_4$ 0.8, Na_2HPO_4 0.6, KH_2PO_4 0.4, $NaHCO_3$ 3.0, 葡萄糖 5.0, pH 7.2。沉淀物最后用 0.2% BSA-Hank 氏液配成细胞悬液, 用台盼蓝染色检查细胞存活率达

* 中科院上海生理所低氧生理开放实验室资助项目。