

值得推广的。

切片未经染色。

×10800

摘要

本文介绍了一种新捕捉剂铈在磷酸酶电镜细胞化学中的应用。与铅法相比,以铈为捕捉剂的电镜细胞化学方法有细胞化学反应稳定、非特异性反应少、反应产物细而均匀、能增加生物膜反差等优点,是一种值得推广的方法。

图版说明

- 图1 睾丸间质细胞的CMP酶细胞化学反应,多泡体(箭头)和次级溶酶体(Ly)呈阳性反应。 ×42500
- 图2 睾丸间质细胞的CMP酶细胞化学反应,自体吞噬泡(箭头)和次级溶酶体(Ly)呈阳性反应。 ×42500
- 图3 睾丸间质细胞的G-6-P酶细胞化学反应,内质网和核膜呈阳性反应,超薄

参考文献

- [1] Robinson, JM and Karnovsky, MJ 1983, *J. Histochem. Cytochem.* 31: 1190-1196.
- [2] 汤雪明, 1983, 电子显微学报, 2: 28-31.
- [3] 汤雪明, 1985, 细胞生物学杂志, 7(增): 3-14.
- [4] 汤雪明, 1988, 实验生物学报, 21: 119-129.
- [5] Briggs, RT et al., 1975, *J. Cell Biol.* 67: 566-586.
- [6] Robinson, JM et al., 1978, *J. Cell Biol.* 77: 59-71.
- [7] Fujimoto, T et al., 1982, *Histochem. J.* 14: 87-98.
- [8] Hulstaert, CD et al., 1983, *Histochemistry* 78: 71-79.
- [9] Angermuller, S and Fahimi, H 1984, *Histochemistry* 80: 107-111.

包埋后电镜细胞化学技术在细胞研究中的应用

唐欣

(上海第二医科大学)

电镜细胞化学(包括免疫电镜细胞化学)是一种在超微结构水平上对细胞内各种大分子物质(如抗原、受体、大分子糖和核酸等)进行定位研究的方法,借助电子致密物质标记某些与待测大分子具有特殊亲和力的物质(如抗体、激素、凝集素和酶等),在电子显微镜下使大分子物质的存在位置得以显示。结合生物化学等研究资料,可对细胞内某些成分的结构和功能之间的关系作更深入的探索^[1]。

电镜细胞化学研究的标本制作方法与普通电镜标本基本上一样,都需要经过固定剂固定,逐级酒精脱水,环氧树脂包埋和超薄切片等过程,所不同的是细胞化学研究还需要增加一个孵育步骤,即具有特殊亲和力的物质(如抗原与抗体、受体与激素、大分子糖与凝集

素、酶与底物等)之间产生结合反应的步骤。如果孵育步骤的实施是在组织被固定之后,环氧树脂包埋之前进行,则称为包埋前技术(**pre-embedding technique**);如果孵育步骤是在环氧树脂包埋后的超薄切片上进行,则称为包埋后技术(**post-embedding technique**)。包埋前技术已在电镜细胞化学中广泛应用,但在实践中还存在一些问题,其中最主要的是反应物(抗体、标记物等)难以透过细胞膜进入细胞内。采用冷冻融解(Marger等,1961年)、溶媒或除垢剂(Bohn,1978年)等手段预先处理细胞,或用振动式切片机将固定后的组织切成薄片(Pickel,1975年)虽可部分解决细胞膜通透性

本文经汤雪明教授审校,特此致谢。

问题,但遗憾的是采用这些措施都会改变细胞的精细结构,并会出现反应物透入细胞不均一现象^[2]。包埋后技术的出现解决了包埋前技术中这一难题,由于采用的是在超薄切片上进行细胞化学反应,不存在抗体等能否透入细胞内的问题。此外,包埋后技术还有其突出的优点:可对同一组织块的超薄切片同时进行多种细胞化学反应,还可在同一切片上进行几种大分子物质的多重定位。由于超薄切片上的环氧树脂等包埋剂对孵育反应有一定的阻碍作用,故在进行包埋后实验前一般先要以 H_2O_2 或饱和过碘酸钠对超薄切片作蚀刻,使组织表面暴露出来,以利于随后的结合反应。此外,在孵育步骤前还要以正常血清或卵清蛋白对组织进行封闭,以消除孵育反应中出现的抗体等试剂与组织及包埋剂产生的非特异性吸附现象。自从 1963 年 Singer 等在电镜中首先应用铁蛋白标记抗体进行包埋后细胞化学反应^[3]以来,包埋后技术已越来越广泛地应用于细胞超微结构研究领域,取得了许多成果。

一、过氧化物酶-抗过氧化物酶技术 (peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique)

过氧化物酶-抗过氧化物酶技术是由 Sternberger 1970 年创立的。其方法是:以辣根过氧化物酶(HRP)与抗 HRP 抗体(如兔抗体)结成一可溶性的环状复合物,即 PAP,通过另一起中间联结作用的羊抗兔抗体,与结合在待测样品抗原上的特异兔抗体相联结(见图 1),随后应用过氧化物酶的细胞化学技术(DAB 反应)产生电子致密物质在电镜下作抗原的定位观察。PAP 方法特异性高,背底染色低,目前在免疫电镜细胞化学的研究中,PAP 方法的应用极为广泛。

将 PAP 方法引入电镜细胞化学包埋后技术中是 1972 年由 Morlarty 等开始进行的,他们将大鼠垂体前叶组织的超薄切片以 H_2O_2 蚀刻并以正常血清作封闭处理后,应用 PAP 方

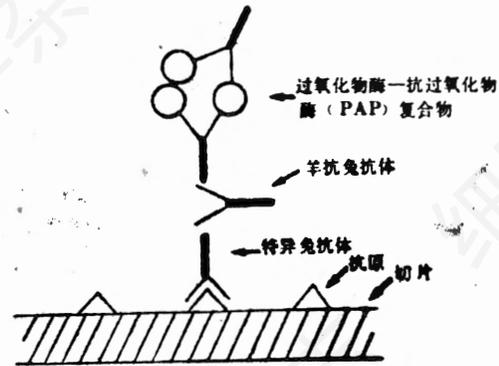


图 1 过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)技术示意图

法通过抗促肾上腺皮质激素(ACTH)抗体对 ACTH 细胞进行定位,电镜下可见反应出现于粗面内质网、高尔基体和分泌颗粒中。在此以前,ACTH 究竟由垂体前叶何种细胞产生还不明确,光镜下只知属于垂体嫌色细胞类,普通电镜下也很难与分泌促甲状腺素(TSH)和促性腺激素(FSH,LH)的细胞区别。Morlarty 等还以同样方法对 ACTH 细胞作了动态观察,在肾上腺摘除一天后的大鼠标本上,ACTH 细胞内有明显的脱分泌颗粒现象;如果给予大量的考的松,则可见 ACTH 细胞内聚集有大量 PAP 反应极强的分泌颗粒^[4]。充分证明了肾上腺素与垂体促激素之间的反馈调节作用。在垂体其它一些激素,如 TSH、FSH、LH 生长激素、脑啡肽、神经降压素等分泌细胞的定位研究方面,包埋后电镜细胞化学 PAP 技术也获得了很多有意义的发现^[5,6]。

激肽释放酶是一种存在于肾脏和几种外分泌腺中的酯蛋白酶,其功能过去一直不清,猜想可能与钠离子的转运有关。Simson 等采用包埋后的 PAP 方法发现此酶大多数存在于颌下腺颗粒曲管细胞和条纹状导管细胞内的顶端颗粒中,动态研究的结果表明激肽释放酶最先出现于细胞表面的微绒毛上,闰管上皮细胞膜上也有显示。由此可见激肽释放酶确实与分泌液中的钠离子重吸收有关^[7]。

PAP 方法与免疫电镜细胞化学包埋后技

术相结合,具有定位准确、适应性广、特异性高等优点,是一种检测细胞内外各种抗原物质的有效手段。

二、葡萄球菌蛋白 A-金技术 (staphylococcus protein A-gold(PAG) technique)

葡萄球菌蛋白 A(简称 pA)由金葡菌属所产生,其特性是具有与哺乳动物中许多种系的免疫球蛋白(IgG)分子相结合的能力,某些 IgA 和 IgM 也能与 PA 起结合反应^[2,8]。由于 PA 所结合的是 IgG 分子上非免疫活性的 Fc 区域,因而两者结合不影响抗体与抗原的亲合能力^[9]。一个 PA 分子上有四个高度同源的 Fc 结合位点,能同时结合 2~4 个 IgG 分子。

胶体金(colloidal gold)是 70 年代初由 Faulk 引入电镜细胞化学领域的一种新型标记物^[10],在实际应用中,胶体金已被证明相对 HRP 和铁蛋白来说有着极大的优越性。金的原子序数高,在电镜下具有很高的电子密度,同时金是一种优良的二次电子发射体,能很好地应用在扫描电镜的研究中,为透射电镜和扫描电镜能同一张切片上观察提供了可能^[11]。由于胶体金呈分散的颗粒状,因而分辨力高,并可作相对定量分析研究。应用不同颗粒直径的胶体金结合不同的抗体,可在同一标本切片上进行多重定位。胶体金是一种无机物质,不会同包埋介质起反应,也无过氧化物酶的内源性干扰之虑。胶体金的制备方法有多种,以氯金酸(HAuCl₄)与适当的还原剂作用后还原是最常用的方法。可供使用的还原剂有磷和柠檬酸钠等,根据还原剂的种类和加入量的不同可制备出颗粒大小不同的胶体金^[2,12]。胶体金是一种表面带负电荷的疏水溶胶,在水溶液中胶体的稳定性由静电斥力维持。电解质会消除颗粒表面电荷,使胶体凝聚。在胶体中加入带电的蛋白质等可防止电解质引起的凝聚^[1]。能与胶体金结合的大分子有抗体、PA、凝集素和酶等。大分子能同金颗粒结合的机理还不清楚,静电范德华力是可能的因素之一^[11]。金颗粒与

大分子结合后不影响其生物学活性,两者的结合是不可逆的,复合物极为稳定,在无菌条件下可长期保存。

1977 年 Romano 首先将 PA 与胶体金结合成 PAG 复合物在电镜下成功地定位了多种血细胞表面的抗原^[13]。1978 年 Roth 又将 PAG 引入电镜细胞化学包埋后技术中。在应用中,PA 取代了普通免疫间接法中的第二抗体(见图 2),在一定范围内可作为一种“万能”试剂。下面对目前此项技术的应用作一简介。

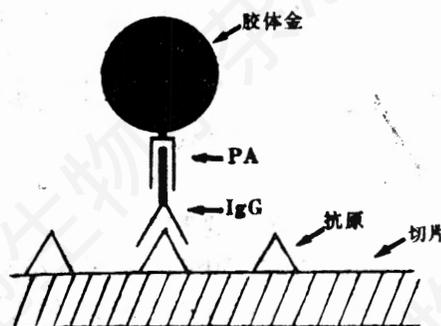


图 2 PAG 技术示意图

(一) 在分泌蛋白质方面的研究

Roth 1978 年采用 PAG 技术在胰腺的超薄切片上通过淀粉酶抗体、糜蛋白酶抗体和胰脂酶抗体对此三种酶作细胞内定位。在电镜下可见圆形的金颗粒按所结合的抗体不同分别出现于腺泡细胞内的粗面内质网和不同的酶原颗粒上^[14]。1980 年至 1984 年, Bendayan 又对胰腺内的淀粉酶等 10 种外分泌酶进行定位研究,发现金颗粒在粗面内质网、高尔基体和酶原颗粒三者之间的分布密度呈递增性上升,充分证实了这些蛋白酶类在合成、转运、成熟过程中的浓缩现象^[9]。Bendayan 还在同一张超薄切片上分别以两种不同的抗体结合颗粒直径不同的两种 PAG 成功地作了双标记^[15]。某些多肽类激素也以同样的方法在相应的细胞内得以定位,如胰岛素、高血糖素和血管舒缓素等^[16,17]。

(二) 细胞内酶蛋白的研究

成熟嗜酸性粒细胞中具有晶状体样核心的

特殊颗粒究竟属于溶酶体还是过氧化小体一直有争议。Yokota 等采用 PAG 技术, 通过四种不同的抗体: 葡萄糖苷酸酶抗体、组织蛋白酶 D 抗体、过氧化氢酶抗体和乙酰辅酶 A 抗体, 前两者为溶酶体特异酶, 后两者为过氧化小体特异酶, 在大鼠嗜酸性粒细胞的超薄切片上作定位研究时发现这四种酶在特殊颗粒中都存在, 双重标记也得出同样结果。由此 Yokota 认为: 嗜酸性粒细胞中的特殊颗粒是一种具有溶酶体和过氧化小体双重性质的细胞器^[18]。能在同一细胞内定位多种抗原只有采用包埋后技术才可能实现。

在高尔基体和线粒体等细胞器中某些酶的研究方面, 也有人采用 PAG 技术作了有意义的超微结构探索^[19~21]。

(三) 细胞质蛋白的研究

钙离子结合蛋白(CaBP)存在于肾小管上皮和小肠上皮细胞中, 历来被认为与钙离子重吸收有关, 但对其确切的细胞内定位和详细功能还不清楚。Roth 采用 PAG 技术在人肾脏的超薄切片上进行研究, 发现 CaBP 标记主要出现于肾远曲小管上皮细胞的核染色质和细胞质中, 细胞膜上标记很少, 近曲小管和肾小球细胞内均无标记出现。因此 Roth 认为: 远曲小管是调节体内钙离子浓度的场所, CaBP 的主要功能是在调节细胞内钙离子的转运代谢方面, 其结果间接地影响了细胞膜对钙离子的重吸收^[22,23]。

(四) 血管通透性研究

Bendayan 先将牛血清白蛋白作为示踪剂灌注动物血管, 经固定包埋后, 应用 PAG 结合白蛋白抗体在超薄切片上进行检测, 发现白蛋白转运出毛细血管主要是在血管内皮细胞的囊泡状结构处进行的^[9]。这种以示踪分子作动态观察的方式使 PAG 技术的应用更为灵活多样。

从以上这些介绍可以看出, 细胞化学包埋后, 技术方法简便, 具有很高的特异性和可靠性, 电镜下标记显示清晰, 分辨力高, 应用范

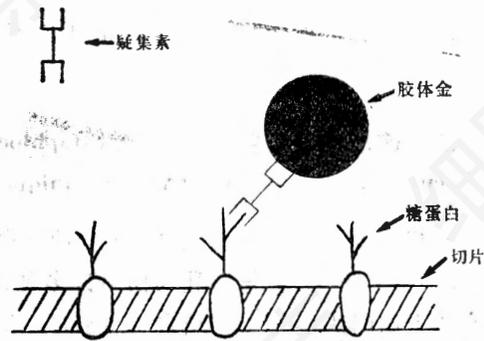


图 3-1 一步法 LG 技术示意图

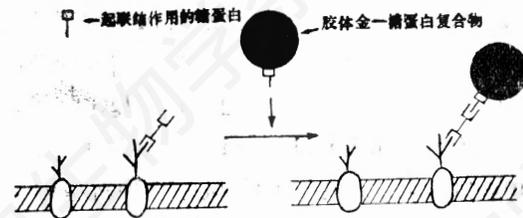


图 3-2 两步法 LG 技术示意图

围极为广泛。

三、凝集素-金技术 (lectin-gold (LG) technique)

凝集素(lectin)是一类糖蛋白, 存在于多种植物和动物体的组分中, 能特异地与细胞糖蛋白和糖脂上的糖基结合。一种 lectin 只能特异地结合 1~2 种寡糖分子, 如刀豆球蛋白 A(conA)特异于甘露糖, 麦芽凝集素(WGA)特异于 β -D 半乳糖等。每个 lectin 分子上有数个结合位点, 可以同时结合多个寡糖分子。lectin 的这种特性对研究细胞多糖结构提供了极为便利有效的手段。lectin 本身无电子密度和颜色, 需连接某些电子致密物质或显色基团方能在显微镜下观察。1982 年 Roth 将 LG 引入电镜细胞化学包埋后技术以研究多糖成分在细胞内的分布。他在应用中采用了两种方式: 一步法和两步法。一步法即把胶体金直接同 lectin 相连后与超薄切片上的特异糖基结合(见图 3-1); 两步法是先先将胶体金同某一糖蛋白结合, 然后通过糖蛋白与结合在切片特异糖基上的 lectin

相连(见图 3-2)^[24]。1983 年 Roth 采用刀豆凝集素、蜗牛凝集素(HP)和牛藤凝集素(LT)与胶体金结合后,在鸡与大鼠的十二指肠和肝肾等组织的超薄切片上作不同寡糖分子在细胞内各部位的分布定位研究。高尔基体在大分子糖的合成和键合过程中起着极为重要的作用, Roth 应用多种 LG 对大鼠小肠和结肠的杯状细胞内的高尔基体进行研究时发现,糖蛋白上核心部分和末端部分多糖分子的键合分别是在高尔基体的形成面和成熟面进行的,而糖蛋白的回流则可能是在高尔基体膜囊的边缘部分^[25]。

Lectin 除了能与胶体金结合外,还能很好地与 HRP 结合,因为 HRP 本身就是一种糖蛋白。1983 年 Komuro 等以 ConA-HRP 复合物在大鼠垂体前叶的超薄切片上进行检测,发现糖分子不仅存在于产生糖蛋白激素 TSH、FSH 等的细胞内,还存在于 ACTH 细胞的分泌颗粒内,由此否定了过去一直认为 ACTH 细胞只能合成简单多肽的看法^[26]。

四、酶-金技术(enzyme-gold (EG) technique)

近年来,在电镜细胞化学包埋后技术中,另一种高亲和力的方法,即酶-金(EG)技术正在兴起,它基于酶与底物之间高度特异性结合的特点,通过将高电子密度的金标记于酶上,在组织超薄切片上揭示相应底物在细胞内外的定位(见图 4)。

1981 年 Bendayan 将胶体金分别标记于 RNA 酶和 DNA 酶上,在胰腺的超薄切片上

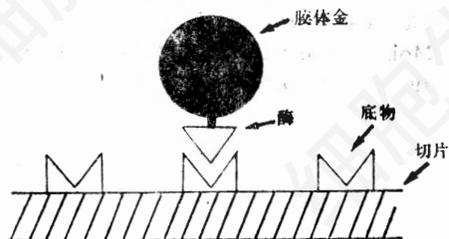


图 4 EG 技术示意图

定位 RNA 和 DNA。经孵育后可见金-RNA 酶强烈地标记于粗面内质网、载有核蛋白体的外层核膜和细胞核内的核仁上;金-DNA 酶的标记则集中出现于细胞核常染色质和线粒体内^[27,28]。在疱疹病毒感染后的细胞内,金-DNA 酶标记除了存在于常染色质等处外,细胞内疱疹病毒的拟核上也有强烈的标记出现^[27]。Bendayan 还以 α -淀粉酶同金结合后成功地定位了肝细胞内的糖原颗粒^[9]。

EG 技术虽起步不久,但从初步结果中可以看出,EG 技术以其独特的高亲和性、高特异性和极低的非特异染色,为电镜细胞化学的研究提供了一种新的手段,对其它包埋后的细胞化学技术是一个很好的补充。在应用时,EG 技术方法简便,不需要制备抗体或应用联结蛋白质。

电镜细胞化学包埋后技术的优越性是十分显著的,但在应用过程中也有其难以掌握之处,主要的难题就是如何保存细胞待测物质的生物学活性。在标本的制备过程中,固定、脱水、包埋等手段都会损害抗原等物质的活性,因而在应用包埋后技术时最常发生的现象是组织的精细结构保存良好而抗原性却丧失大半;或者是保存了抗原活性而组织结构却模糊不清。由于每一种生物大分子物质对固定剂等诸因素影响的耐受性都有所不同,因而难以制定出一个标准的普遍适合的标本制备方法,只能逐个加以摸索,寻找出适合每种待测物质的最佳条件。在当前的电镜细胞化学包埋后技术中,最常用的固定剂仍是戊二醛,铬酸能抑制绝大多数抗原的活性,故一般均不采用,虽然这样会使细胞超微的保存有所损失。为了使形态的保存和细胞化学反应更好地协调,很多人进行了研究尝试,取得了不少结果。如采用低浓度的戊二醛(0.25~1%)或甲醛-戊二醛混合固定液作固定对抗原活性的抑制很小而细胞结构保存仍较好; Bendayan 报道应用过碘酸钠处理切片,可以恢复许多经铬酸固定后的酶和激素的抗原活性,其中包括对铬酸极为敏感的

α -淀粉酶^[29]。此外,疏水性的环氧树脂包埋介质对细胞化学反应的阻碍作用也是造成实验失败的重要因素,1982年 Roth 引进了一种新型的可在低温下应用的亲水性包埋剂——Lowicryl K₄M, 相对常规的环氧树脂来说,Lowicryl K₄M 可提供更佳的抗原定位反应细胞微细结构,非特异反应也大为减少。另一种新近介入的丙烯酸类树脂 LR White 也对包埋后技术的发展提供了便利。

近年来,单克隆抗体的出现更给包埋后技术增添了有利条件,它能提供较以往高得多的特异性和灵敏度,必将把细胞化学的研究推向更深入、精确的领域。

摘 要

包埋后电镜细胞化学技术是近年来发展起来的一项在超微结构水平上研究细胞内外各种大分子物质定位的新手段,它克服了以往常规包埋前技术中反应试剂难以透过细胞膜的致命弱点,使实验结果更为真实可靠,并能在同一标本上进行数种待测物质的多重定位。虽然包埋后电镜细胞化学技术目前还存着一些缺陷,但由于其方法上的优越性,当前已越来越多地被许多科研工作者采用,其不足之处也在不断得以改进。本文对此项技术及其应用作一简介。

参 考 文 献

- [1] Roth. J., 1982, In 10 th Int Congr Electron Microscopy, Edited by Dt. Ges.
- [2] Roth. J., 1982, *Technique in Immunocytochemistry* Vol 1: 107.
- [3] P. Ordonneau., 1982, *Technique in Immunocytochemistry* Vol 1: 261.
- [4] G. C. Morlarty et al., 1972, *J Histoche Cytoche* 20: 591.
- [5] Glande. Tougard et al., 1980, *J Histoche Cytoche* 28: 101.
- [6] H. D. Coulter and R. P. Elde., 1981, *J Histoche Cytoche* 29: 897.
- [7] J. A. V. Simson et al., 1983, *J Histoche Cytoche* 31: 301.
- [8] «葡萄球菌 A 蛋白», 王益寿编著。
- [9] Moise Bendayan., 1982, In 10 th Int Congr Electron Microscopy.
- [10] Faulk WP., 1971, *Immunochem* 8: 1081.
- [11] J. De Mey., 1983, *Immunocytochemistry* 82.
- [12] Marc Horisberger., 1979, *Biol Cellulaire* 36: 253.
- [13] Romano E. L. et al., 1977, *Immunochemistry* 14: 711.
- [14] Roth. J., 1978, *J Histoche Cytoche* 26: 1074.
- [15] Moise Bendayan., 1982, *J Histoche Cytoche* 30: 81.
- [16] Moise Bendayan., 1982, *J Histoche Cytoche* 30: 58.
- [17] Moise Bendayan and Roth. J., 1980 *J Histoche Cytoche* 28: 149.
- [18] Sasaki Yokota et al., 1984, *J Histoche Cytoche* 32: 267.
- [19] Moise Bendayan., 1982, *J Histoche Cytoche* 30: 139.
- [20] Moise Bendayan et al., 1983 *J Histoche Cytoche* 31: 509.
- [21] Roth. J et al., 1982, *J Cell Biology* 92: 223.
- [22] Roth. J et al., 1982, *Am J Physiology* 243: F243.
- [23] Roth. J., 1981, *Science* 4517: 197.
- [24] Roth. J. 1982, *J Histoche Cytoche* 30: 583.
- [25] Roth. J., 1983, *J Histoche Cytoche* 31: 8.
- [26] K. Kutosumi et al., 1983, *J histoche Cytoche* 31: 259.
- [27] Moise Bendayan., 1981 *Histoche J* 13: 699.
- [28] Moise Bendayan., 1982 In 10 th Int Congr Electron Microscopy.
- [29] Moise Bendayan and Max Zollinger., 1983, *J Histoche Cytoche* 31: 101.