

酶细胞化学在电子显微镜术中的应用

韩玉升 陈玉英 吴竞梅 郭寿廷 陈瑞珍 陈秀丽

(上海第二医学院基础医学部)

电子显微镜术和细胞化学方法相结合,用来研究细胞内酶的分布,还是近十几年来的事情。由于细胞内酶定位和超微结构形态两者密切结合,可以用来观察在生理和病理情况中细胞内酶的分布及演变^[1,2,3],也可用这些酶作为标记物(marker)^[4]来研究细胞膜及细胞器。这项技术在生物医学领域内目前受到很大的重视,迄今在细胞超微结构上能够定位的酶大约有40余种^[5,6]。尽管这一技术目前还局限在定性阶段,但是酶和底物的特异反应在超微结构上的精确定位在生物学及医学上都是很有意义的。

原理和方法

酶的电镜组织化学技术的原理大多数来自光学显微镜的一些经典方法,通常包括组织预固定,切成薄片,配制温育液等。温育液中含有特殊的底物如磷酸酯,它被酶水解释放磷酸根。同时溶液内还有一些可用作为捕获剂的重金属(铅、钡、铜),它们能够和酶水解作用的产物在反应的部位及时形成一种不溶解的沉淀物,例如,磷酸铅。此种沉淀物要求在以后的脱水包埋过程中不受其他因素影响;颗粒要细,不能有大的晶体;定位要准确,并且沉淀物电子密度要高。其他还有氧化还原酶等,也有相应的底物及捕获剂形成特有的沉淀物。因此为了达到上述目的,就要严格对待需要注意的事项。

我们为了研究有关细胞的生理和病理情况(例如巨噬细胞、血细胞、肿瘤等等),根据一些作者^[5,6]的介绍,对以下几种酶电镜定位作了一些试验,结果较为满意。

1. 碱性磷酸酶

这个方法是由Gomori(1939)最先提出,

开创了现代组织化学的技术,用甘油磷酸钠作为底物,钙离子作为捕获剂, pH约9。由于形成的磷酸钙不是高电子密度沉淀物,因而在电镜术中不能使用,后由Reale和Luciano^[7]加以改进,在温育之后放在2%硝酸铅溶液由铅取代钙,形成高电子密度的磷酸铅。

具体方法如下:

(1) 组织用2%戊二醛二甲砷酸钠缓冲液固定2小时,然后用二甲砷酸钠缓冲剂pH7.4洗涤,组织块经冰冻切片切成不超过40微米的薄片。

(2) 配制温育液: 0.2M氯化钙20毫升, 0.1M巴比妥钠20毫升, 0.1Mβ-甘油磷酸钠5毫升, 0.05M氯化镁5毫升。如果液体有混浊,在使用之前应该过滤。

(3) 组织薄片置温育液中在室温或者4℃约60分钟。

(4) 用蒸馏水充分洗涤(约数分钟),然后放在冷的0.05M硝酸铅溶液中2分钟。

(5) 洗涤组织薄片,在1%四氧化锇中后固定2小时,618环氧树脂包埋。

结果:大白鼠肾脏的近曲小管刷状缘处见到有大量电子密度高的沉淀物,此处是碱性磷酸酶分布较集中的部位。在人的胃粘膜下毛细血管壁内皮细胞周围有沉淀物,甚至血管腔内红细胞膜也见到有反应物存在(图1, 2)。

2. 酸性磷酸酶

采用Gomori的方法,温育液pH5。具体方法如下:

(1) 组织置2%戊二醛二甲砷酸钠缓冲液中在4℃冰箱内固定12—24小时。

(2) 在二甲砷酸钠缓冲液中洗涤,或再浸入10%二甲亚砷12小时。

(3) 冰冻切片 20—30 微米。

(4) 配制温育液: 0.05M 醋酸—醋酸钠缓冲液(pH5)50 毫升, 硝酸铅 0.12 克, 3% β -甘油磷酸钠 10 毫升。组织切片放此温育液在 37°C 中温育或在室温下 10—60 分钟。

(5) 温育后用 0.1M 二甲砷酸钠缓冲液洗涤。

(6) 用 1% 四氧化锇后固定 2 小时, 酒精脱水, 618 环氧树脂包埋。

结果: 目前酸性磷酸酶是鉴定溶酶体的标志^[3,8]。在小鼠肝脏枯氏细胞胞浆内见到有电子密度高的沉淀物, 形态不一。我们对人骨巨细胞瘤的三种细胞成分如多核巨细胞, I 型基质细胞及 II 型基质细胞进行酶的分析, 发现在多核巨细胞胞浆内有较多的沉淀物(图 3、4)。多核巨细胞内有如此丰富的酸性磷酸酶与骨巨细胞瘤的破骨活动是相一致的。

3. 三磷酸腺苷酶

取小白鼠腹腔内游离的多种细胞进行温育, 采用 Wachstein 和 Meisel(1957)方法, 以观察 ATP 酶分布。

(1) 先用 2% 戊二醛二甲砷酸钠缓冲液固定 15 分钟, 然后用相同缓冲液洗涤。

(2) 按照下述方法配制温育液, 在 37°C 下温育 1 小时:

10mM 氯化镁, 1mM ATP, 3.6mM 硝酸铅溶解在 0.08M Tris-Maleate 缓冲液、pH 7.2。

(3) 温育后用二甲砷酸钠缓冲液 pH7.2 洗涤组织, 用 2% 戊二醛二甲砷酸钠缓冲液再固定 1 小时, 用相同洗涤液过夜。

(4) 再用 1% 四氧化锇后固定 2 小时, 脱水、618 环氧树脂包埋。

结果: 在巨噬细胞质膜、颗粒性白细胞质膜、红细胞质膜上均能看到有沉淀物(图 5、6)。

4. 硫胺素焦磷酸酶(thiamine pyrophosphatase)

此酶可以作为高尔基体的标志^[8], 采用

Novikoff 及 Goldfischer(1961)方法, 用硫胺素焦磷酸钠作底物。

具体方法:

(1) 小块组织用 2% 戊二醛或 4% 甲醛二甲砷酸钠缓冲液固定 2—6 小时, 然后在相似缓冲液中洗涤, 最好过夜。

(2) 切成 50 微米厚的薄片。

(3) 制备温育液:

0.02M 硝酸铅 2 毫升, 0.05M 氯化锰 1 毫升, 0.2M Tris-maleate (pH7.2) 4 毫升, 硫胺素焦磷酸钠 (TPP) 11.5 毫克, 蒸馏水 3 毫升蔗糖 0.5 克。

薄片在室温的温育液中 1.5 小时。

(4) 然后洗涤, 用四氧化锇后固定 2 小时, 脱水、618 环氧树脂包埋。

结果: 在副睾上皮细胞的高尔基体见到有电子密度高的沉淀物, 往往分布在高尔基体扁平囊泡凹面大约有 1—2 层。另外在肝细胞的毛细胆管表面也有电子密度高的沉淀物(图 7、8)。

5. 葡萄糖-6-磷酸酶

葡萄糖-6-磷酸酶能催化 6-磷酸葡萄糖水解成葡萄糖, 此酶广泛分布在肝脏及肾皮质细胞的内质网中, 我们采用下列^[9]方法:

(1) 通过灌注固定组织, 取小白鼠肝脏, 先用 2% 戊二醛二甲砷酸钠缓冲液灌注约 2 分钟。

(2) 组织切成薄片, 尽量不超过 50 微米, 然后用 Tris-maleate 缓冲液, pH6.5 洗涤组织。

(3) 制备温育液: 0.2M Tris-maleate (pH6.5) 6 毫升, 0.02M 硝酸铅 3 毫升, 蒸馏水 11 毫升, 葡萄糖-6-磷酸二钠盐 30 毫克, 蔗糖 1.5 克。

(4) 薄片在 37°C 温育 30 分钟, 或者室温下 1 小时。

(5) 再用 Tris-maleate 洗涤, 用四氧化锇后固定 2 小时, 环氧树脂包埋。

我们观察到葡萄糖-6-磷酸酶主要在肝细

胞内质网及核膜池内有沉淀物(图9)。

6. 琥珀酸脱氢酶

根据 Ogawa(1968)^[10] 原理, 铁氰化物能够接受线粒体的呼吸链上被脱氢酶水解所释放的电子, 使铁氰化物还原形成亚铁氰化物, 后者和铜结合形成铜亚铁氰化物, 它是一个电子密度高, 不会溶解的沉淀物。因此利用琥珀酸作为底物, 铁氰化物作为电子受体。琥珀酸脱氢酶是线粒体的标志。

具体方法:

(1) 取材: 取新鲜心肌切成小块, 立即切成 25 微米薄片, 也可将新鲜组织用 2% 戊二醛或 4% 甲醛固定数分钟后再切。

(2) 配制温育液及洗涤液: 0.2M 磷酸氢二钠 6.5 毫升, 0.2M 琥珀酸 2 毫升, 0.2M 酒石酸钾钠 0.5 毫升, 蒸馏水 4 毫升, 蔗糖 1.5 克, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 1.6 克, 0.1M 硫酸铜 1 毫升。上述成分按照次序加入调匀后测 pH, pH6.5—6.8。调匀后再加入 0.02M 铁氰化钾 1.5 毫升, 5% 二甲亚砷 1 毫升。另配洗涤液: 0.2M 磷酸二氢钠 4 毫升, 0.2M 磷酸氢二钠 2.5 毫升, 蔗糖 3.0 克, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 1.5 克, 加蒸馏水至 20 毫升。

(3) 把薄片立即投入温育液, 在 37℃ 温育约 10—20 分钟, 然后放在配制洗涤液洗, 再用 2% 戊二醛二甲砷酸钠缓冲液固定 2 小时, 再用 1% 四氧化锇后固定 2 小时, 脱水, 618 环氧树脂包埋。

· 结果: 在心肌细胞线粒体可看到电子密度高的沉淀物主要分布在嵴上、嵴间间隙, 有时室外也可见到(图 10)^[11]。

讨 论

酶组织化学技术和电镜结合, 观察到这些酶在超微结构上定位的专一性, 因此对于这些酶的分布和演变有着重要意义。其中一些可以作为标志酶, 常用在细胞膜的标记^[4]有 5' 核苷酸酶、硷性磷酸酶、三磷酸腺苷酶, 用在内质网的标志酶有葡萄糖-6-磷酸酶, 用在高尔基

体的有硫胺素焦磷酸酶, 用于溶酶体的有酸性磷酸酶, 用在线粒体的有琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶, 用在过氧化物小体的有过氧化氢酶, 对于运动神经终板则常用胆碱酯酶等等。也有人利用这一技术来研究细胞在分裂时酶的演变^[2]。

这项技术要求酶的反应特异性强, 同时要保持良好的超微结构, 以便精确定位, 尽量避免人为的假象。要达到这个目的, 关键是在温育阶段, 使其在细胞内发生特异的反应, 产生一个高电子密度的沉淀物, 但是温育前后需要做的工作和注意事项是十分重要的。在温育前阶段主要是考虑酶的活性及超微结构的保存, 在后阶段主要是考虑保存已经形成的沉淀物。

1. 温育前阶段应注意的事项

在温育前阶段, 预固定非常重要。不同酶需要的固定剂, 固定时间, 固定方式不同, 大多数酶对四氧化锇很敏感, 只要稍微固定就会使这些酶活性丧失, 因此对于组织化学来说醛类固定剂较为妥当。醛类固定剂适用电镜组织化学的有两种, 一种是甲醛, 使用时必须新鲜制备, 用多聚甲醛解聚而成, 它对酶的保存较好, 但对超微结构保存较差, 另一种是戊二醛, 它对超微结构保存较好, 对酶活性保存不如甲醛好。我们在具体操作时有时选用戊二醛, 有时选用甲醛固定, 以取得较好的效果。琥珀酸脱氢酶很容易被常规固定剂抑制, 所以常用新鲜组织进行温育。葡萄糖-6-磷酸酶只能固定 2 分钟, 但有些酶如酸性磷酸酶固定 24 小时活性不会丧失。

固定除了超微结构及酶的保存外, 另一个目的是使有关膜的通透性改变, 因为温育介质中许多成分如底物、捕获剂要通过生理完整的膜是有困难的, 这样对于细胞化学定位就有影响, 所以固定剂要能改变膜通透性, 使温育介质成分很好的扩散。有时也用 DMSO^[12] 来协助温育介质穿入细胞内。

缓冲剂的选择也很重要, 一般选用二甲砷酸钠缓冲液(pH7.2), 如果使用磷酸盐缓冲剂

它常常能和重金属起作用, 为了避免混淆, 尽量不用。

组织薄片尽量要薄, 这样可使温育介质中底物很快进入组织和酶结合形成反应产物, 同时捕获剂也能尽快地扩散到酶所在部位, 使它能和反应产物及时结合, 一般说应少于40微米。切片太厚就会造成在外表层细胞化学定位较好, 在内层就差。我们通常采用半导体致冷切片机或CO₂冰冻切片机制片。

2. 温育阶段注意事项

温育液一定要新鲜配制, 但为了节省时间以及溶液充分均匀, 可先配好有关成分的原液, 在冰箱内保存, 在使用时把它按次序加入; 如有沉淀发生, 整个介质应该过滤。还要测定pH, 不符合时就要用适当缓冲液调节。

温育的时间和温度对不同材料要进行摸索, 尽量选择适合的时间避免反应产物弥散。如在人骨巨细胞瘤的酸性磷酸酶温育时间以60分钟较好, 时间过短就不明显, 时间长了就弥散到核内及其他区域。在心肌中琥珀酸脱氢酶经温育10分钟后线粒体就可显示得很清楚了; 而在培养的巨噬细胞中则需温育1小时才在线粒体有反应出现。

温育液的各项成分比例, 不要轻易变更, 否则将会扰乱溶液的浓度。使用的化学药品至少应该分析纯。

3. 温育后的处理

反应沉淀物产生后, 要使沉淀物不再发生溶解, 尽量减少外来因素影响, 洗涤时间不宜过长。有些作者认为是否使用钨酸后固定, 关系不大, 这是各人的习惯, 我们认为钨酸可以增加反差, 便于观察。包埋过程按照一般电镜方法进行, 没有什么特殊。超薄切片一般不需要染色, 由于重金属温育液引起非特异性染色已经足够在电镜下辨认组织结构。

4. 对照组

通常选用 ① 在温育中省去底物, 如琥珀酸脱氢酶, 反应中省去琥珀酸就看不到反应。

② 利用特殊抑制剂。

③ 阳性对照, 如酸性磷酸酶它在肝细胞肯定会出现, 因此在检测其他组织时, 同时取肝组织温育。观察有否酶出现从而证明温育液的特殊性。

参 考 文 献

- [1] Francine Puvion, et al., 1976. *J. Ultrastruct. Res.* 54: 95—108.
- [2] Saito, T. et al., 1976. *Recent Progress in Electron Microscopy of Cells and Tissues*, pp. 133—146, Igaku Shoin Ltd, Tokyo.
- [3] Aparist, T. et al. 1979. *Virchows Arch. Anat. and Histol.* 376: 299.
- [4] Evans, W. H. 1978. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Volume 7*, pp. 103—117, North-Holland Publishing Company, Oxford.
- [5] Lewis, P. R. et al., 1977. *Practical methods in electron microscopy*, Volume 5, pp. 137—287, North-Holland, Amsterdam.
- [6] Hayat, M. A. ed., *Electron Microscopy of Enzymes*, Vol. 1 (1973); Vol. 2 (1974); Vol. 3 (1974); Vol. 4 (1975); Vol. 5 (1977). Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- [7] Reale, E. and L. Luciano 1967. *Histochemie* 8: 302.
- [8] Friend, D. S. 1969. *J. Cell Biol.* 41: 269.
- [9] Kanamura, S. 1973. *J. Histochem. Cytochem.*, 21: 1086—1089.
- [10] Ogawa, K. et al., 1968. *J. Histochem. Cytochem.* 16: 49—57.
- [11] 韩玉升等. 1981. 上海第二医学院学报, 1: 9—11.
- [12] Makita, T. et al., 1971a. *Histochemie* 26: 305—310.