

分裂的进程,只是阻止新壁形成,因此有诱导双核产生的效能。秋水仙素作为一种常用的有丝分裂阻滞剂,并不影响核的DNA复制,其作用主要是阻止纺锤体微管的形成,使染色体停留在赤道板不能向两极移动。大蒜根尖细胞中常常出现微核,这种微核可以和大核同步地进行DNA复制。

参 考 文 献

- [1] 郑若玄 1980, 实用细胞学技术, 科学出版社, 249-271页。
- [2] Byrne J. and C. Heimsch, 1970, *Amer. J. Bot.* 57:1179.
- [3] Clowes F. A. L. 1954, *New Phytol.* 53: 108.
- [4] Clowes F. A. L. 1956, *New Phytol.* 55: 29.
- [5] Clowes F. A. L. 1956, *J. Exp. Bot.* 7: 307.
- [6] Clowes F. A. L. 1958, *New Phytol.* 57: 85.
- [7] Clowes F. A. L. 1958, *J. Exp. Bot.* 9: 229.
- [8] Clowes F. A. L. 1959, *Biol. Rev.* 34: 501.
- [9] Clowes F. A. L. and B. E. Juniper 1964, *J. Exp. Bot.* 15:622.
- [10] Clowes F. A. L. 1967, *Phytomorphology*, 17:132.
- [11] Gonzalez-Fernandez A. et al. 1971, *Chromosoma*, 36:100.
- [12] Jensen W. A. 1958, *Exp. Cell Res.* 14: 575.
- [13] Miksche J. P. and Greenwood M. 1966, *New Phytol.* 65:1.
- [14] Prescott D. M. 1976, *Reproduction of Eukaryotic Cell*, Academic Press.
- [15] Seago J. L. 1971, *Amer. J. Bot.* 58:604.
- [16] Thimann K. V. 1934, *Gen. Physiol.* 18: 23.
- [17] Thompson J. and F. A. L. Clowes, 1968 *Ann. Bot. N. S.* 32:1.
- [18] Torrey J. G. 1963, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 17:285.

大鼠心肌细胞色素氧化酶光镜和电镜定位观察

孟宪忠* 李相忠**
(哈尔滨医科大学)

细胞色素氧化酶是线粒体呼吸链中的终末氧化酶,在电子传递过程中起着重要作用。以往有关细胞色素氧化酶的生物化学研究,为了解该酶在组织细胞的分布和活性提供了定量资料。1968年, Seligman等^[1]建立了以3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 以下简称为DAB)为底物的细胞色素氧化酶细胞化学定位方法。此后,相继有人应用这种方法对不同动物的肝、肾和脑等组织的细胞色素氧化酶活性分布作了定位研究^[2-4],揭示了该酶在这些组织中的分布特点及在线粒体内的确切定位。本文实验以光镜和电镜对比观察的方法,探讨了大鼠心肌细胞色素氧化酶的分布特点。

材 料 和 方 法

实验用动物为体重150—200克的雄性大鼠。断头处死,立即开胸取出心脏。在3%解聚的多聚甲醛0.1M磷酸缓冲液(pH7.4, 4℃)中将左室心尖部心内膜下层心肌切成约0.5mm³的小块,在其中浸泡固定1小时。用含有0.2M蔗糖的0.1M磷酸缓冲液(pH7.4, 4℃)洗涤4小时,更换三次洗涤液。然后在参照Seligman方法^[1]配制的温育液中温育1小时, 37℃。

温育液配方:

DAB(分析纯, Sigma)	20毫克
细胞色素C(分析纯, 南非)	10毫克

* 克山病研究所。 ** 中心实验室电镜组。

过氧化氢酶(分析纯, 南非) 20 微克/毫升
 蔗糖(分析纯, 北京化学试剂研究所) 684 毫克
 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 10 毫升

温育液在每次使用前新鲜配制。配制温育液及温育过程均在暗室中进行。温育时需间断搅拌。

温育结束后, 用蔗糖磷酸缓冲液洗涤 2 小时, 4℃, 更换三次洗涤液。1% 四氧化钼磷酸缓冲液 (pH7.4, 4℃) 后固定 2 小时。逐级乙醇脱水, 国产环氧树脂 *618 包埋。制备半超薄切片和超薄切片, 均不经染色, 分别作光镜和电镜观察。

将部分心肌组织块温育在去除 DAB 或加入 0.1M 氰化钾的温育液中, 作为去底物或酶活性抑制对照, 以验证方法的特异性。

结 果

光镜观察

在光镜下观察半超薄切片, 可见心肌细胞内呈现大量清晰的细胞色素氧化酶活性产物, 为黑褐色颗粒, 多呈圆形或椭圆形。颗粒的分布形式与心肌细胞线粒体一致。在心肌细胞的纵切面, 颗粒沿细胞长轴成行排列。行内颗粒间常有可辨认的间隙。行间为未呈色的狭长区域, 复染后观察显示为肌原纤维。在核极区和肌膜下区, 颗粒密集成团。细胞核和间盘处为空白区, 其轮廓清楚可辨。细胞的侧向分界亦易于辨认(图版图 1)。在心肌细胞的横切面, 细胞色素氧化酶活性产物颗粒常呈点状散在分布, 偶见颗粒集聚成团。

在心肌间质部分, 未见到细胞色素氧化酶活性产物。

电镜观察

超薄切片电镜观察证实, 光镜下见到的细胞色素氧化酶活性产物颗粒均是心肌细胞的线粒体。心肌细胞富含线粒体, 线粒体的结构多保存完好。在心肌细胞的纵切面, 线粒体成行密集排列。行间的肌原纤维隐约可见(图版图 2)。

细胞色素氧化酶活性产物为高电子密度物质, 沉积在线粒体和内膜。相邻线粒体的酶活性产物的电子密度并非一致。酶活性产物在

线粒体内的分布亦呈现不同的类型。一些线粒体脊的数目多, 排列致密, 电子密度也较高。有的线粒体则无可辨认的脊, 但在其内充满均质的细胞色素氧化酶活性产物。这种线粒体的酶活性产物电子密度较低。尚有部分线粒体的细胞色素氧化酶活性产物的分布形式介于上述两者之间, 即在同一线粒体内既有电子密度较高的脊密布区, 又有电子密度较低的均质区。这三种类型的线粒体常在同一细胞内存存, 而且互相密邻(图版图 2、3), 但以脊致密型线粒体的数目为最多。

线粒体脊多平直, 成角扭曲的比较少见。酶活性产物在线粒体脊的分布存在着多寡之差, 即使在同一条脊的不同节段, 电子密度也有高低之别(图版图 4)。

经去除 DAB 或加入氰化钾的温育液温育的心肌组织, 在光镜和电镜下均未显示出细胞色素氧化酶活性产物。

讨 论

酶细胞化学是生物化学与超微结构形态学相结合而产生的较新的研究方法。近年来, 酶细胞化学发展较快, 目前已能对 60 余种酶进行电镜定位观察。酶细胞化学方法正在医学和生物学研究领域得到越来越广泛的应用。酶细胞化学方法是利用高电子密度的酶活性产物或酶活性产物捕获剂在酶存在部位沉积的原理, 在电镜下同时窥知某种酶的分布特点以及具有该酶活性的细胞器的形态之研究手段。因此, 能否完好的保存细胞的超微结构和酶的活性便成为决定成败的关键问题。固定液的种类、浓度和固定时间的长短; 固定液、洗涤液, 温育液的 pH 值、渗透压和温度; 温育时间的长短等因素均可影响酶的活性和/或细胞的超微结构。线粒体的结构和呼吸链的酶活性更易受细胞内外环境变化的影响。因此, 在定位线粒体内氧化还原酶类时, 对上述影响因素尤应加以注意。

以往有关细胞色素氧化酶细胞化学研究多

采用戊二醛或戊二醛和多聚甲醛混合固定液以浸泡或灌注的方法固定组织。近年来,一些研究表明,虽然戊二醛可较好的保存细胞的超微结构,却明显的抑制细胞色素氧化酶活性。Reith和Schüler^[2]以生物化学研究方法发现,经戊二醛短时间固定过的肝细胞线粒体氧化DAB的能力比新鲜肝细胞线粒体明显为低。Martinez-Murillo等^[5]报道,先将肝和肾冰冻切片用3%戊二醛固定1小时,再经细胞色素氧化酶温育液温育后,用细胞光度法检查未见到氧化型DAB的存在,说明细胞色素氧化酶活性已完全丧失。本文实验将大鼠心肌组织放在3%解聚的多聚甲醛溶液中浸泡固定1小时,较好的保存了心肌细胞线粒体的结构和细胞色素氧化酶的活性。

关于温育液中DAB的浓度各家方法互异,一般均在每10毫升温育液含DAB5—20毫克之范围内^[1,4,6-8]。较高的底物浓度可增强反差,便于观察,但又常常导致酶活性产物非特异性扩散,影响观察结果。在预实验中,作者曾对DAB的浓度作了筛选,认为每10毫升温育液中含DAB20毫克较为适宜,不仅可得到较好地组织反差,且无酶活性产物扩散。

一般认为,在细胞色素氧化酶温育反应过程中,DAB被细胞色素C氧化,氧化型DAB则聚合成不溶性嗜锶多聚物沉积在细胞色素C所存在的部位。还原型细胞色素C的再氧化依赖于细胞色素A、A₃的活性,倘若细胞色素A、A₃的活性受到抑制,尽管细胞色素C可氧化少量的DAB,但不足以形成光镜和电镜下可见到的沉积物。因此,本方法显示了细胞色素C、A、A₃三联体的活性^[5,9]。在温育液中加入氰化钾可抑制DAB的氧化,而抗霉素对其没有影响^[2,5],证明反应部位在线粒体呼吸链中的细胞色素C至A₃之间。

氧化型DAB的嗜锶多聚物兼备呈色和高电子密度的特性。因此,使同时在光镜和电镜下观察细胞色素氧化酶的活性分布成为可能。本文实验结果表明,树脂包埋的半超薄组织切

片能清晰地显示心肌细胞色素氧化酶活性产物颗粒。通过对半超薄切片的光镜观察,不仅可较广泛地了解酶活性产物在心肌组织和细胞中的分布特点,而且也为准确地选择有意义部位在电镜下作更精确的定位观察创造了条件。光镜与电镜对比观察使组织化学与细胞化学研究方法有机地结合起来,对酶活性分布进行由微观到超微观的观察和比较,从而加深认识。

心肌细胞内线粒体含量丰富,线粒体脊的数目多,排列致密,细胞色素氧化酶活性产物的电子密度较高。这与心脏的功能和代谢特点有关。迄今,有关细胞色素氧化酶活性产物在心肌细胞线粒体内呈现不同分布类型的研究报告甚少。Harris等^[10]在生化研究中发现,在心肌细胞内存在着脊排列致密、扭曲的能态构型的线粒体和脊稀疏的非能态构型的线粒体。前者处于能量生成旺盛阶段,后者处于相对静止状态。在活体心肌细胞,线粒体的功能状态是可变的。本文实验见到的脊致密型线粒体的细胞色素氧化酶活性产物电子密度较高,而在无脊型线粒体,酶活性产物的电子密度较低,在脊致密区和无脊区并存的线粒体,酶活性产物的电子密度介于前两者之间,这能否是不同功能状态的线粒体的酶细胞化学表现,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Seligman, A. M. et al., 1968, *J. Cell Biol.*, 38:1-14.
- [2] Reith, A. and Schüler, B., 1972, *J. Histochem. Cytochem.*, 20:583-589.
- [3] Nir, I. and Pease, D. C., 1974, *J. Histochem. Cytochem.*, 22:1019-1027.
- [4] Al-Ali, S. Y. and Robinson, N., 1979, *J. Histochem. Cytochem.*, 27:1261-1266.
- [5] Martinez-Murillo, R. et al., 1978, *Cellul. Molec. Biol.*, 23:403-409.
- [6] Anderson, W. A., 1970, *J. Histochem. Cytochem.*, 18:201-210.
- [7] Sotonyi, P. et al., 1980, *Cellul. Molec. Biol.*, 26:9-15.
- [8] Marinos, E., 1978, *J. Histochem. Cytochem.*, 26:658-662.
- [9] Seligman, A. M. et al., 1973, *J. Histochem. Cytochem.*, 21:756-759.
- [10] Harris, R. A. et al., 1969, *Science*, 165:700-703.