

用整装电镜技术观察体外培养的人体鼻咽癌上皮细胞(CNE细胞)的细微结构

潘玉芝 陆素萍

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

培养细胞具有复杂的细胞骨架三维结构,包括微丝、微管和中等纤维三种主要的胞质纤维。使用抗体标记技术在光学显微镜和超微结构水平对这些纤维的结构蛋白的定位有过许多工作,但在方法学上还具有不足之处。光学显微镜能观察样品的范围大,但解像力差。常规电镜虽然可用于观察细胞结构,但样品必须切片,因此对细胞内的成分很难重组出立体的概念。近年发展起来的整装电镜术,在研究细胞结构和细胞骨架的结构上很受重视。本实验将整装细胞术用于常规电镜,对体外培养的人体鼻咽癌上皮细胞细微结构进行了观察。

材料和方法

一、细胞

人体鼻咽癌上皮细胞株为北京医学科学院肿瘤研究所赠送。细胞培养液为 RPMI 1640 加 20% 小牛血清、青霉素 100 单位/毫升和链霉素 100 微克/毫升。部分 CNE 细胞培养在含有 1mM 丁酸培养液中。每周换液两次。用胰酶和乙二胺四乙酸二钠(0.25:0.25)分散细胞进行传代,每周一次。

二、电镜样品的制备

将电镜标本镍网夹在浓度为 1.2% 的 formvar 膜与窄条盖片之间,放入培养瓶中,然后将实验用的 CNE 细胞经消化分散后接种其中。约培养三天,当细胞平铺在标本网上即可开始固定细胞。样品的制备主要参考 Porter^[1] 和 Frankel^[2] 两实验室的方法。简述如下: (1) 细胞首先经 2.5% 戊二醛(用 0.05 M 二甲砷酸钠缓冲液 pH 7.2, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl 溶液配制)固定 20 分钟; (2) 水洗; (3) 1% 锇酸重固定 5 分钟; (4) 0.5% 水溶液醋酸铀处理 2 分钟; (5) 水洗; (6) 脱水,使用丙酮 30%、50%、70% 和 90%, 每次 2 分钟, 100% 丙酮共 5 次, 每次 2 分钟; (7) 临界点干燥; (8) 镍网喷碳, 存放干燥器待

观察。用 JEM 100 B 电镜观察样品, 加速电压为 100 kV。

结果和讨论

电镜下观察整体的 CNE 细胞, 可见细胞内所含的细胞核、核仁、线粒体、微丝束、微管、核糖体及内质网。由于细胞中央部分较厚, 其中膜层、细胞器与纤维重叠, 结构不易看清, 例如高尔基体不易分辨。但在细胞铺展较薄的边缘区, 可见细胞基质形成网格样结构, 由直径非常纤细的纤维相互连接构成。此结构图象与 Porter 等人^[3,4] 在高压电镜下所见的离体培养细胞(人胚肺细胞)基质的结构图象相似。CNE 细胞基质的网格结构像一个连续体, 在细胞边缘与质膜相连, 也伸入纤维足和微绒毛(图 1), 微丝、微管、线粒体、核糖体及内质网分布其中。胞质微丝清晰可见, 成束分布在质膜的下方(图 4)。部分微丝高度有次序的平行排列, 形成刚性的纤维束, 并构成纤维足和微绒毛的核心^[6](图 1)。微管在胞质中常沿细胞长轴排列或与微丝束及内质网并行(图 2)。核糖体呈小圆颗粒状, 部分颗粒单独存在, 也有部分颗粒成堆存在, 形成多聚核糖体(图 2)。无论单个核糖体或多聚核糖体均与基质网格的细纤维相连接。CNE 细胞的内质网不很发达, 但经 1mM 丁酸处理之后内质网明显增多^[6], 形成复杂的弯弯曲曲的网状结构(图 2), 在超薄切片中很难看到这种完整的网样的内质网。完整的线粒体的形态是多样化和大小不一的。多数是细长形, 长为 1.6—18 μ, 宽为 0.16—0.8 μ, 相差十分悬殊。有些线粒体形成环状或分枝状等(图 3 a, 4)。在较粗大的线粒体中清晰可见平

行排列的线粒体嵴的结构(图 3 b)。

小 结

以上实验结果表明,常规电镜与整装技术相结合,能部分的观察到在高压电镜下所能看到的细微结构。由于样品是完整细胞,工作者可得到细胞细微结构的整体概念。因此,这个方法可以弥补在常规电镜下观察超薄切片的不足之处。

参 考 文 献

- [1] Buckley, I. K. and K. R. Porter, 1975, *J. Microsc. (Oxf)*, 104:107—120.
- [2] Franke, W. W. et al., 1978, *Cytobiologie*, 17:365—391.
- [3] Wolosewick, J. J. and K. R. Porter, 1976, *Am. J. Anat.*, 147:303—324.
- [4] Wolosewick, J. J. and K. R. Porter, 1979, *J. Cell Biol.*, 82:114—139.
- [5] Macartney, J. C. and E. K. Parkinson, 1981, *Exp Cell Res.*, 132:411—421.
- [6] 潘玉芝等,实验生物学报(待发表)。

离子蚀刻扫描电镜技术在生物样品制备中的应用

蔡继炯

(浙江省测试技术研究所, 杭州)

近年来离子蚀刻技术已成为扫描电镜样品制备中的一种新方法。由于其操作简便,效果显著,应用日趋普遍。国外在生物样品的离子蚀刻方面做了不少工作, Lewis 等^[1]1969 年用这一方法观察了红细胞、胰脏外分泌细胞的核表面结构,看到了特异的放射状结构和核孔分布的情况。国内不少电镜工作者在化工等样品制备中开始应用该技术,但在生物样品方面的应用,目前未见文章报道。

众所周知,生物样品的细胞表面一般都覆盖着一层脂蛋白和糖脂等物质,不同程度地掩盖了细胞的表面结构,电镜下很难看清微绒毛等微细结构形貌,影响分析研究。作者采用离子蚀刻方法,对大白鼠肺、肾上腺,进行离子蚀刻和未经蚀刻的比较。结果证明,离子蚀刻法具有净化未充分清洗组织表面的效果。它可使肺泡和肾上腺的细胞表面所被覆的一层糖蛋白、糖脂及基底膜等物质剥离,暴露出细胞表面的微细结构,在扫描电镜下清晰可见。现将实验结果报道如下。

材 料 和 方 法

将活体大白鼠处死后解剖,用锋利的双面刀片割

取肺和肾上腺组织块(5×5 mm),用生理盐水洗去表面血污,立即于 2.5%戊二醛溶液中前固定 4 小时,1%锇酸后固定 2 小时(置 4℃冰箱中),酒精梯度脱水到 100%后,用 50%、100%醋酸异戊脂过渡置换(每次 15 分钟),CO₂临界点干燥。样品经干燥后分成两份:一份经表面喷镀 Pt 膜后直接送扫描电镜进行观察;另一份用银胶固定在样品铜台中央(离子蚀刻时,离子束流中心部能量大),然后放入 EiKO IB-5 型离子溅射仪中样品座上(靶电极正下方),样品座高度钮调到 DOWN 位置,靶和样品间隔为 9 cm,COAT(溅射)/ETCH(蚀刻)转换开关放到 ETCH 处。真空抽气到 0.05 托以下,电压调到 900—1200 伏,离子电流 3—6 毫安(调节针形阀,真空度保持在 0.1 托左右,辉光放电颜色呈紫红色为宜)。蚀刻时间 30—60 分钟(每蚀刻 15 分钟,间歇 3 分钟,以防止热损伤)。蚀刻的条件要视不同样品调节电压、电流、蚀刻时间。原则上,软组织电压低,电流小,时间短,反之亦然。蚀刻中为了防止样品热损伤而变形,样品座下方要通入冷却水或间歇蚀刻。蚀刻完毕立刻将蚀刻表面喷镀上 Pt 膜达 200 Å 厚,用日立 S-450 型扫描电镜观察,加速电压 20 KV,样品倾斜角 15°。

结 果 和 讨 论

大白鼠的肺组织因有许多肺泡而成海绵状,肺泡是一边开口的小袋,似蜂房状。肺泡间