

隔由胶原纤维和弹性纤维所支持,能防止过度的膨胀。通常肺泡间隔有一层薄而连续的外皮,而肺泡细胞表面也被覆着一层脂蛋白、中性粘多糖等物质。在常规样品制备情况下,尽管扫描电镜分辨率相当高,但也不能清晰地观察到肺泡细胞表面的微绒毛、肺泡孔、毛细血管腔等微细结构形态(图版图1,3)。我们在电压为900伏,离子电流为3毫安条件下,蚀刻50分钟后,结果肺泡表面的一层脂蛋白等覆盖物被蚀刻清洗掉,清晰地暴露出肺泡孔腔、毛细血管、肺泡间隔的形貌。图中可见,每个肺泡壁是由双层上皮及其间毛细血管构成,其薄层间壁为相邻两个肺泡上共有,肺泡间隔的宽度约1.5—3微米(图2)。在保持电压、电流不变情况下,对肺泡Ⅱ型上皮细胞蚀刻30分钟,就能呈现出圆形的立方体外形的Ⅱ型肺泡形态,而细胞游离面上分布着浓密的微绒毛也清晰可见(图4)。

大白鼠的肾上腺用常规电镜方法观察时,因外表面有一层胶原结缔组织被膜,很难清晰

地观察到血管腔的形态结构(图5)。由于肾上腺胶原结缔组织被膜较厚,必须加大电压和电流,提高离子轰击速率,使其蚀刻掉。当电压为1200伏,电流为5毫安,把蚀刻时间延长到60分钟后,表面覆盖的一层糖蛋白、血污等物质被剥离清洗掉,使肾上腺中的血管腔及腔中红细胞结构形态清晰地显示出来,并且有很强的立体感(图6)。

用离子蚀刻技术暴露生物组织内部结构形态,方法简便,效果明显。但是,关于离子蚀刻的各种条件(电压、电流、蚀刻时间、真空度、放电气体种类等)和生物组织的材料与性质的关系等,有待进一步摸索和试验。

### 参 考 文 献

- [1] Lewis, S. M., et al, 1969, Scanning Electron Microscopy, 241—242.
- [2] 沈宝镕译, 1982, 基础组织学, 407—415, 山东科学出版社。
- [3] 李文镇等译, 1984, 图解扫描电子显微镜, 125—126, 科学出版社。

## M 期细胞选择性电镜取材与观察

周宁新 朱光明 侯 宁

(北京 解放军总医院)

从细胞形态学的角度观察,整个细胞的增殖周期唯有分裂期(M期)细胞的变化显著,便于从形态上区别与鉴定,因此M期细胞的变化是细胞形态学研究中极受重视的观察目标。然而,由于其在整个细胞周期中历时最短,在细胞群体中往往只占百分之几的比例,所以要想大量观察M期细胞的变化,按过去常规取材的方法是可能的,尤其是电镜水平的观察,就更难在狭小的观察范围内寻找到M期细胞。

为了能对M期细胞进行有选择地电镜观察,作者在M期细胞同步培养法的启发下,加以改进、简化,建立了单层培养细胞的M期细

胞选择性电镜取材新方法,收效良好,基本达到了电镜下大量观察M期细胞的目的,现将具体方法介绍如下:

### 材 料 和 方 法

#### 培养细胞

必须是贴壁率高,细胞分散良好的单层培养细胞,传代时掌握好细胞密度,最好到第三、四天时细胞均匀覆盖满瓶壁。此时在倒置镜下可见许多M期细胞浮贴在间期细胞表面,这是取材的最好时机。为满足取材细胞的数量,一般25 ml瓶需要10~15瓶,100 ml瓶2~4瓶取一次电镜样品(约 $1 \times 10^7$ 个细胞)。

### 取材方法

在净化操作台上进行,先小心倒去原培养液后,用 Hanks 液轻轻摇洗贴壁细胞一遍,以去除悬浮的死细胞,再加入 Hanks 液,用细弯头吸管缓缓轻轻地冲洗贴壁细胞(类似细胞传代培养时消化、冲洗过程,但冲洗必须轻柔),主要将贴壁能力差的 M 期细胞冲下,每瓶操作相同,可根据需要连续间隔地取样,将冲洗后液体收集离心(1000—1500 转/分, 5—10 分),去上清液,离心细胞块按常规透射电镜样品制作。

### 观察结果

作者对 SGC-7901 胃癌细胞系进行了实验观察。按上述方法选择的细胞先涂片经 H、E 染色,光镜下观察 M 期细胞占 10—40%,比贴壁细胞群体(10—30%)高 10 倍以上。在电镜下观察,每个网孔内均可见 M 期细胞,而常规取材组有时找遍整个铜网也很难发现一个 M 期细胞。

电镜观察可见 M 期细胞前、中、后、末期各时相的亚细胞水平特征变化,尤其可喜的是观察到较少见的中心粒、纺锤体及微管的典型结构,为作者意想的下步实验方案提供了条件(见图版图 1、2)。

M 期细胞的形态分期,也是细胞周期变化中唯一能从形态上分期的时相,基本上是以核变的特征为依据的,各时相有着明显的动态趋向。作者的观察所见也符合以往的描述,但胞浆的相应变化也与间期细胞有显著差别,除早前期细胞的胞浆成份与间期细胞很相似外,细胞分裂过程中胞浆内细胞器明显减少,取代于大量的聚核糖体和游离核糖体,胞浆显得致密、均匀,同时内质网、高尔基氏复合体,以及微管、微丝等膜、管状结构增多。遗憾的是暂时无条件对 M 期细胞与间期细胞的细胞骨架结构进行比较观察。

### 讨论

根据单层培养细胞在 M 期时贴壁能力差,易于脱落的生物学特征,采用物理方法选择 M 期细胞进行同步化培养,已被广泛应用于辐射、

药物、加温等对不同细胞周期的生物学效应的研究,但用于选择性 M 期细胞的电镜观察还未见报道。

Terasima 和 Tolmach(1963)<sup>[1]</sup>首先采用冲洗法收集 HeLa S<sub>3</sub> 细胞系的 M 期细胞,获得 85—90% 的 M 期细胞,经放射自显技术监测同步培养细胞的 DNA、RNA 合成代谢无异常变化。以后 Robbins 和 Marcus<sup>[2]</sup>利用手摇振荡法,发现在低钙含量的培养液中能收获更多的 M 期细胞; Tobey<sup>[2]</sup>将其方法进行改进后,在 CHO 细胞系获得 95% 的 M 期细胞。Lindahl<sup>[3]</sup>等制作了较复杂的机械振荡、离心与培养器连接的整套自动装置,用于 M 期细胞选择与同步培养,但效果不理想而未能推广。目前使用较多的是利用振荡仪进行水平振荡收集 M 期细胞的方法<sup>[4-7]</sup>,但各报道的振幅、频律和振荡时间与间隙次数均不相同,显然,这与各细胞系的不同生物学特性或同一细胞系的异质性有关,并非所有单层培养细胞都可进行 M 期细胞选择性同步培养,只有少数贴壁率高,分散较好的细胞系才能收获较纯的 M 期细胞(90% 以上)。

作者对冲洗法、手摇振荡法和机械振荡法均进行了尝试,发现 SGC-7901 细胞系 M 期细胞的收集率基本相似,故选用了较为简便、损伤小、适用于电镜取材的冲洗法。由于我们旨在选择 M 期细胞的电镜观察,不必像同步培养时需要高纯度的 M 期细胞,只要求 M 期细胞在 10% 以上即可,所以此方法简便、易行,可以对同一瓶培养细胞进行连续性取材,增加资料的连续性与系统性,这也是常规取材所达不到的。

### 参考文献

- [1] Terasima, T. and Tolmach, L. T., 1963, *Exp. Cell Res.* 30:344—346.
- [2] Tobey, R. A., et al., 1967, *J. Cell. Physiol.* 70:63—67.
- [3] Lindahl, P. E. and Sörenby, L., 1966, *Exp. Cell Res.* 43:424—428.
- [4] Bedford, J. S. et al., 1977, *Radiat. Res.* 70:173—178.
- [5] Pettersen, E. O. et al., 1977, *Cell Tissue Kinet.* 10:511—515.

[6] Schneiderman, M. H. et al., 1972, *Exp. Cell Res.* 74:430—433.

[7] Leeper, D. B. et al., 1972, *Radiat. Res.* 50: 401—404.

## 大鼠卵巢颗粒细胞纤溶酶原激活因子的测定\*

张仕明 许河生

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

人们从多种途径来研究排卵过程中滤泡壁的变化。多年来,随着研究方法的发展,认识不断深入,并提出了许多假设和理论。早在1916年, Schochet(1916)用试管内渗透的方法提出了蛋白水解酶能降解滤泡壁的假设;此后, Espey 等人用空斑法试验了包括酶与非酶类的多种物质,证明蛋白水解酶能溶解滤泡壁的结缔组织,减弱了滤泡壁强度(Espey 1970)。他们又将浓缩的牛胰蛋白酶直接注射到兔子的滤泡内,看到这一做法能造成滤泡壁与排卵时相同的变化(Espey, 1974, Rondell, 1974)。Unkless(1973)建立了蛋白水解酶的同位素测定法,借此, Beers 等人进一步证明在滤泡液中含有纤溶酶原(plasminogen, 简称Pg)及纤溶酶原激活因子(plasminogen Activator, 简称PA)。同时发现, PA在动情周期的不同时期有量的变化,与排卵活动紧密相关,在排卵前的瞬间出现高峰。由于PA的催化, Pg转变为纤溶酶(plasmin, 简称P), P能引起滤泡壁结缔组织纤维的降解以致破裂(Beers et al., 1975)。这些工作既说明PA是对排卵活动产生重要作用的一个激活酶,其量的变化是研究排卵机制的有意义的指标;同时也表明蛋白水解酶同位素测定法在此项研究中的实用意义。本文旨在介绍该方法及其测定排卵前滤泡颗粒细胞在体外培养条件下所产生的PA值,作为研究排卵机制的基本手段。

### 材 料 和 方 法

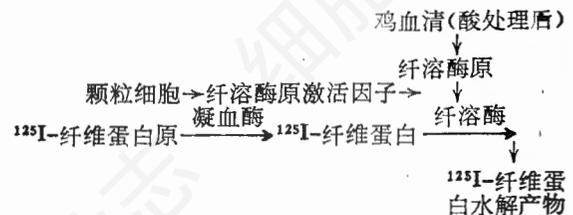
#### 一、材料

纤维蛋白原, 凝血酶, 两者均系Sigma公司产

品。McCOY's 5 A 培液, 购自GIBCO实验室。孕马血清(PMSG), 长春生物制品厂出品, 1000国际单位/支。人绒毛膜促性腺激素(HCG), 购自上海生化制药厂, 1000国际单位/支。十六孔板购自天津有机玻璃厂, 孔径16毫米。雌、Wistar大鼠, 年龄26天。

#### 二、方法

方法的原理 在十六孔板的小孔中铺上<sup>125</sup>I-纤维蛋白原(<sup>125</sup>I-Fg), 用凝血酶使<sup>125</sup>I-Fg转化为纤维蛋白<sup>125</sup>I-F。然后把卵巢中成熟滤泡的颗粒细胞接种于铺有<sup>125</sup>I-F的小孔中, 用无血清培液培养, 并补充鸡血清, 作为Pg的来源。颗粒细胞产生PA, 使Pg转化为P, P水解<sup>125</sup>I-F, <sup>125</sup>I-F水解后释放出同位素, 测定培液中的放射性即能间接反应PA的值。方法的原理用图解式表示:



具体操作按下列程序进行:

1. 纯化纤维蛋白原 参考并改良了 Sidney Strickland('76)的方法, 主要目的是去除其中可能存在的Pg。将Fg溶解于0.3 M NaCl, 并对0.3 M NaCl液透析平衡。10000转离心10分钟, 取上清液使蛋白浓度为10毫克/毫升, 加入0.1 M 赖氨酸液, 使赖氨酸的最终浓度为0.09 M, 0℃放置半小时后, 加入冷的95%酒精, 使酒精的最终浓度为7%, 4℃以下放置30分钟, 离心10000转×10分钟。取沉淀溶于pH 7.0

\* 本工作得到世界卫生组织(W. H. O.)小额资助, 特此致谢。

Acknowledgment-We are grateful to W.H.O. for the support of the small Supplies Programme,