

加了部分实验工作,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 刘树森:《生物学参考资料(生物膜专集)》,第十三集,第69—91页,1981,科学出版社。
- [2] 刘树森:《动物学报》,23(4),380—399,1977。
- [3] Inbar, M. et al.: *FEBS Letters*, 38, 3, 1974。
- [4] Shinitzkg, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 85, 603—615, 1974。
- [5] Inbar, M. et al.: *Cancer Res.*, 37(9), 3037—3041, 1977。

- [6] Yanovish, S. et al.: *Cancer Res.*, 38(12), 4654—4661, 1978。
- [7] Cercek, L. et al.: *Br. J. Cancer*, 29, 345, 1974。
- [8] 董志伟、刘树森等:《生物物理与生物化学进展》(即将发表)。
- [9] Dickinson, J. P. et al.: *Br. J. Cancer*, 27, 99, 1973。
- [10] 吉永秀:日本免疫实验操作法Ⅲ, P. 692, 1973。
- [11] 韦美福等:《细胞生物学杂志》,3, 31—34, 1980。

[本文于1982年4月26日收到]

Ehrlich 腹水癌细胞表面负电荷与 ConA 受体分布的定量电子显微镜研究

樊景禹 卫之湄 刘 智

(北京医学院生物物理教研组)

一、引 言

细胞表面电荷在细胞分化^[1,2],细胞识别^[3],细胞间的粘附^[4,5],细胞吞噬^[6]以及正常细胞向肿瘤细胞的转化中起重要作用^[7-9]。研究的方法主要有细胞电泳和电镜下的标记。最初用胶体氢氧化铁作表面电荷标记物^[10],但它只能在pH 1.8的介质中使用,其结果难以代表生理条件下细胞表面的性质。1972年 Danon 等人提出用正电荷铁蛋白标记细胞表面负电荷的方法^[11],它可在生理 pH 下使用,因而可用来研究活细胞。现已用于某些正常细胞或肿瘤细胞表面电荷的分布与运动的研究^[4,7,8,12-15]。

细胞表面电荷主要是由末端含有唾液酸的糖蛋白产生的。同时,这些糖蛋白可构成某些抗原或受体,如植物凝集素受体;其中以刀豆球蛋白 A (ConA) 受体研究得比较深入。在电镜下研究 ConA 受体通常用铁蛋白或辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 ConA,但是铁蛋白与 ConA 的结合常会影响 ConA 的活性,而对过氧化物酶反应难以进行精确的定量分析。Geoghegan 等^[16]提出先用胶体金吸附过氧化物酶,再经亲和法与 ConA 结合,研究 ConA 受体的方法,

克服了上述困难。

鉴于细胞表面负电荷与植物凝集素受体间可能存在的联系,本文一方面用正电荷铁蛋白作为标记物,重新考察了 Ehrlich 腹水癌细胞(简称 EAT 细胞)表面负电荷的分布,另一方面,又用胶体金-过氧化物酶法分析了该细胞表面的 ConA 受体,并且首次在定量的基础上,对两者的分布进行比较研究。

二、材料与方法

正电荷铁蛋白 (Miles Yeda Ltd 产品) ConA (Pharmacia Fine Chemicals 产品),辣根过氧化物酶 (II 型 Sigma) 氯化金合盐酸和聚乙二醇(分子量 20,000, E. Merck 产品)。

1. 细胞表面电荷标记方法 取 EAT 细胞悬浮于 2ml PBS (pH 7.2—7.4) 中,离心 1 分钟 (1000 rpm),除去悬液中的蛋白质。上述过程重复一次。细胞用 0.2% 戊二醛(溶于 PBS 内)在室温下固定 10 分钟, PBS 洗两次,将最后一次离心所得细胞重新悬浮于 2ml PBS 中,使细胞数约为 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 。在细胞悬液中加入正电荷铁蛋白至所需浓度(分别为 0.2mg/ml 和 0.05 mg/ml),充分摇动 1 分钟,离心除去游离铁蛋

白。沉降的细胞用 PBS 洗两次,最后用 3% 戊二醛(溶于 PBS)固定 1 小时, PBS 浸洗, 1% 四氧化锇后固定,丙酮系列脱水, 618 环氧树脂包埋。超薄切片用铀与铅盐双重染色, H-500 电镜下观察。

2. 胶体金的制备 按 Frens 法^[29]。在煮沸的 100 ml 0.01% 氯化金合盐酸内加入 4ml 1% 的柠檬酸钠,维持沸腾状态至溶液变为酒红色,迅速冷却后,用 0.2M 碳酸钾把溶液 pH 值调到 7.2。

3. 过氧化物酶-胶体金复合物的制备 首先确定使金的胶体状态得以稳定所必须的过氧化物酶浓度: 在过氧化物酶浓度递减的 10 支试管中,分别加入 0.5ml pH 为 7.2 的胶体金溶液。两分钟后,加入 0.1 ml 10% 的 NaCl 溶液。用目测法确定所需的过氧化物酶浓度^[27]。在本实验条件下,该浓度相当于 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在 10 ml 胶体金溶液中,加入 0.15 ml 浓度为 1 mg/ml 的过氧化物酶, 1ml 1% 的聚乙二醇溶液。轻轻混匀后在 Beckman 离心机离心 1 小时(4 $^{\circ}\text{C}$, 60,000 $\times g$),丢弃上清,将沉淀溶于 1 ml PBS 内,备用。

4. 刀豆球蛋白 A 受体的标记 经 0.2% 戊二醛预固定的细胞中加入 ConA,使其浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 0.5 小时,用 PBS 冲洗两次,加入过氧化物酶-胶体金复合物,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下再温育 0.5 小时。用 PBS 彻底冲洗细胞,除去未与细胞表面结合的复合物后,将细胞用 3% 戊二醛固定 1 小时, 1% 四氧化锇后固定。618 环氧树脂包埋,用铀与铅盐对超薄切片作双重染色。H-500 电镜观察。

5. 资料的搜集与分析 每一实验条件,观察 4 个铜网,每一铜网来自一个单独的组织块。每一铜网上,在 22,000 倍下拍摄 15 张照片,每一照片摄自一个不同的细胞,并含有细胞表面的区域。为保证所拍照片的随机性,在一个细胞拍完一张照片后,按一定顺序移动样品台,并拍摄下一细胞的进入取景框的第一个含有细胞表面的视野。用这种方法,对每一实验条件拍摄 60 张照片,它们分别来自 60 个不同细

胞。

资料的分析是在放大 44,000 倍的正片上进行的。分为两步。(1)对细胞表面微绒毛区(下略称为 M 区)与非微绒毛区(下略称为 N 区)的铁蛋白或胶体金颗粒进行计数;(2)确定 M 区与 N 区表面积之比。在每照片上覆以一个透明塑料屏,屏上印有均匀分布的横竖两组直线,每 10 厘米内的直线数为 15 条。分别计算 M 区和 N 区与两组直线的交点数,交点数之比即为两个区域截面境界长度之比^[18]。然而,在一张超薄切片上,同样长度的 M 区境界与 N 区境界所代表的表面积各不相同,前者大于后者。因此,为了将两区域截面境界长度之比转变为表面积之比,必须确定一个校正因子 α ,使 M 区长度乘以 α 之后所得数值与 N 区长度之比即为两区表面积之比。计算结果表明 $\alpha = 1.19$ 。确定校正因子的方法详见附录。

三、结 果

1. Ehrlich 腹水癌细胞的一般形态学特征 在电镜下, EAT 细胞略呈椭圆形。细胞核大而不规则,常居细胞一侧。细胞表面常常形成若干嵴状或槌状的胞质突起并有丰富的微绒毛。微绒毛大体为圆柱形,平均直径为 126 nm (见附录)。在微绒毛内除微丝外不含任何其它有形成分。

2. 细胞表面负电荷的分布特点 细胞预先经 0.2% 戊二醛固定,然后与带正电荷的铁蛋白温育,在电镜下观察这两种浓度铁蛋白(0.05 mg/ml 和 0.2 mg/ml)的分布特点没有明显区别。表现在:(1)铁蛋白随机分布于细胞表面,并不局限于某一区域,(2)在高倍放大下,铁蛋白分子在细胞质膜上的分布都是不均匀的。除单个存在外,铁蛋白分子常三五成群,聚集成簇(图 1)。对其出现频率进行统计分析,结果证明,除 38% 的单个分子外,绝大部分(在 0.2mg/ml 铁蛋白时 54%,在 0.05 mg/ml 时 56%)为 2—3 个一组的铁蛋白簇。两种浓度时,不同大小的铁蛋白簇的分布没有显著差异($p > 0.80$)(图 2)。(3)微绒毛是细胞表面的一种特化结构。

构成M区与N区的成分很可能是不同的^[19]。我们对两区的铁蛋白标记密度进行了定量分析,确定每张照片上两区质膜长度之比 γ_L ,当转变为表面积之比时,乘以校正因子 α ,即 $Y_s = \alpha \gamma_L$ (详见附录)。然后对结合于两区的铁蛋白分子分别计数。计数时,只考虑那些与质膜直接结合的铁蛋白分子,在一簇铁蛋白聚集物中通过其它铁蛋白分子与细胞膜结合者不计在内。由此得到在一张照片上结合于M区和N区的铁蛋白分子数的比值 γ_F 。因此,在该照片上两区负电荷密度之比

$$R = \frac{\gamma_F}{\gamma_s}$$

由图3可见,尽管在高浓度铁蛋白时R值有所下降,但微绒毛表面的负电荷密度均明显高于非微绒毛区。

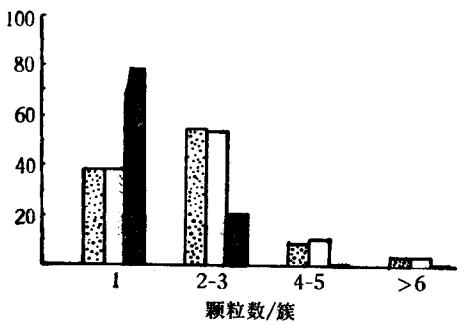


图2 铁蛋白 ConA-HRP-胶体金在细胞表面的分布特点
 铁蛋白 (0.05mg/ml)
 铁蛋白 (0.20mg/ml)
 ConA-HRP-胶体金

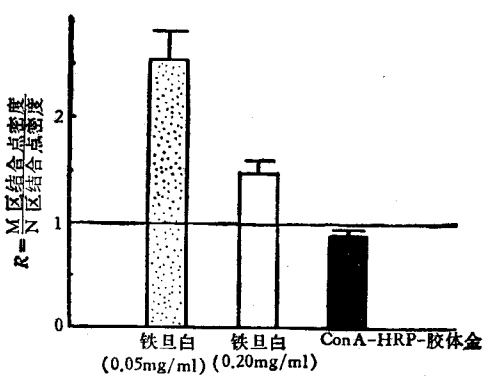


图3 不同标记物在细胞表面M区与N区的分布

3. 细胞表面 ConA 受体的分布特点 0.2% 戊二醛预固定的细胞,经胶体金标记(图4),宏观上,与负电荷的分布没有明显区别。但在高倍放大下发现,胶体金的分布远较铁蛋白的分布均匀。表现在(1)在细胞表面,绝大多数胶体金颗粒是以分散的单个颗粒形式存在的。除少数由2—3个颗粒组成的簇以外,极少有更大的胶体金簇。就各种大小的颗粒簇的频率分布来看与铁蛋白有明显区别 ($p < 0.001$) (图2;图4见封二)。(2)按上述方法,分析细胞表面M区与N区上 ConA 受体的密度,得到 ConA-HRP-胶体金的 $R = 0.9 \pm 0.05$ (图3)。这一结果证明,与负电荷不同,在 EAT 细胞表面,ConA 受体并不选择性的分布于微绒毛表面,相反,非微绒毛区质膜上的 ConA 受体密度略高于微绒毛。

四、讨 论

1. 在某些细胞中已经证明,免疫球蛋白^[19]、Semliki 森林病毒^[22]和标记胰岛素^[21]选择性地分布于微绒毛上。在正电荷铁蛋白标记细胞表面负电荷的研究中发现,当幼鼠肾细胞^[4]或3T3-L1 脂肪细胞^[23]与低浓度铁蛋白一起温育时,标记物选择性分布于微绒毛。这些结果以及本文的结果都表明,微绒毛表面的负电荷密度高于质膜其它区域。这一结论是否具有普遍意义,有待进一步研究。

Weiss 等^[24,25] 在研究 EAT 细胞表面的负电荷分布时提出,微绒毛表面负电荷密度显著高于非微绒毛区。这与本文的结论是一致的。但他们进行的定量分析中存在着严重缺陷。首先,他们忽略了在超薄切片上测得的微绒毛切面的平均直径小于微绒毛直径平均值这一事实,而直接用前者代替了后者。其次,计算切片内微绒毛截线的平均长度时,用的是整个弧长。而实际上,为了能够与非微绒毛区含于切片内的截线长度相比较,应当用半个弧长(见本文附录),因此增大了校正因子,使其数值 ($1/0.423 = 2.36$) 达到本文计算值两倍,影响了结果的可靠性。

2. Robinson 等^[26] 曾从 Novikoff 肝癌和 AS-30 D 肝癌细胞表面分离出一种低分子量的具有 ConA 受体活性的唾液酸糖肽。Moller 等^[27] 对 Chang 大鼠肝癌腹水细胞的工作证明, 细胞预先与 ConA 温育会改变正电荷铁蛋白在细胞表面的分布方式。Moller 等认为细胞表面负电荷主要是由末端含有唾液酸的糖蛋白产生的。因此在细胞表面, 正电荷铁蛋白和 ConA 很可能结合在同一个分子上。Kuniaki 等人^[28] 在巨噬细胞上的工作发现, 正电荷铁蛋白结合点和 ConA 受体在细胞表面的运动是彼此独立的。本文证明, ConA 受体与正电荷铁蛋白结合点的分布存在着明显区别。这有两种可能: (a) 在 EAT 细胞表面, ConA 受体和产生负电荷的基团存在于不同分子上, 两者没有结构上的联系; (b) 细胞表面产生负电荷的分子中只有一部分具备 ConA 受体活性, 另一部分不具备这种活性的分子才选择性地分布在微绒毛表面。

3. 本文试用 Geoghegan 等^[16] 提出的方法, 用吸附有过氧化物酶的胶体金作为标记物对 ConA 受体分布进行了定量分析, 结果证明, 它不失为一种研究定量形态学的有效的工具。其主要优点是: (a) 胶体金不是生物制品, 在普通实验室里制备十分方便; (b) 胶体金颗粒大小可以随需要加以控制, 在电镜下电子密度极高, 在进行定量时将不会由于辨认上的困难而发生偏差; (c) 本法比较稳定, 便于掌握。

附录: 校正因子的确定

为了将在超薄切片测得的 M 区与 N 区截面境界长度之比换算为两区表面积之比, 必须引入一个校正因子。因为, N 区在超薄切片内的截线近似等于切片的厚度; M 区在切片内的截线长度随切片的位置而有不同, 但总是大于切片厚度。设 M 区在切片内的平均截线长度为 $\bar{S}$, 则

$$\alpha = \frac{\bar{S}}{l} \quad (1)$$

其中 α 为校正因子, l 为超薄切片厚度, 从切片

的干涉色可以估算出。因此, 要确定 α 必先求得 $\bar{S}$ 。可通过以下两种情况考察。在图 5 的情况下,

$$\begin{aligned} S_1 &= r(\theta_1 - \theta_2) \\ &= r \left(\cos^{-1} \frac{x - \frac{l}{2}}{r} - \cos^{-1} \frac{x + \frac{l}{2}}{r} \right) \quad (2) \\ 0 &\leq x \leq \left(r - \frac{l}{2} \right) \end{aligned}$$

在图 6 的情况下,

$$\begin{aligned} S_2 &= r\theta = r \cos^{-1} \frac{x - \frac{l}{2}}{r} \quad (3) \\ \left(r - \frac{l}{2} \right) &\leq x \leq \left(\sqrt{r^2 - b^2} + \frac{l}{2} \right) \end{aligned}$$

其中 b 为在超薄切片上所能测得的最小微绒毛半径。因此, M 区在切片中的平均截线长度

$$\bar{S} = \frac{1}{\sqrt{r^2 - b^2} + \frac{l}{2}} \left(\int_0^{r - \frac{l}{2}} S_1 dx + \int_{r - \frac{l}{2}}^{\sqrt{r^2 - b^2} + \frac{l}{2}} S_2 dx \right) \quad (4)$$

由此可知, 只要确定切片厚度, 微绒毛平均半径和在切片上的最小微绒毛半径, 即可求得 $\bar{S}$ 值。

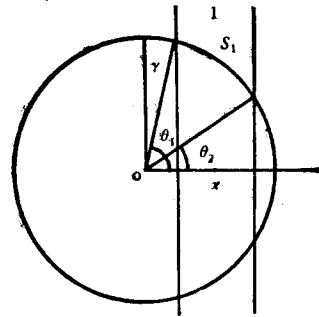


图 5 在 $0 \leq x \leq \left(r - \frac{l}{2} \right)$ 时超薄切片与微绒毛的关系

r , 微绒毛半径, l 切片厚度, x 微绒毛中心至切片中心距离, S_1 微绒毛在切片内截线长度。

本实验所用切片厚度约为 50 nm。在放大 44,000 倍的正片上对 100 个微绒毛截面测量的结果, 其平均半径 $R = 49.5 \text{ nm}$ 。一圆的真正直径比其在超薄切片上截线的平均长度要大 $\frac{4}{\pi}$ 倍^[20], 因此,

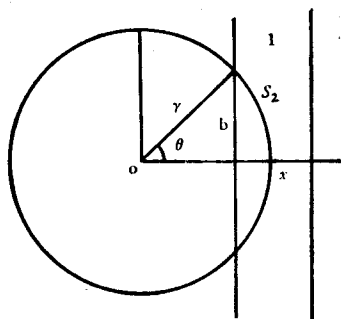


图6 在 $(\gamma - \frac{l}{2}) \leq x \leq (\sqrt{\gamma^2 - b^2} + \frac{l}{2})$

时,超薄切片与微绒毛之间的关系

b 为在超薄切片上所能测得的微绒毛截面的最小半径。余同图5。

$$r = \frac{4}{\pi} R = 63 \text{ nm}$$

在上述测量中同时发现微绒毛的最小半径 $b = 23 \text{ nm}$ 。将以上数据代入(4)式,得到 $\bar{S} = 59.3 \text{ nm}$, 因此,校正因子:

$$\alpha = \frac{\bar{S}}{l} = \frac{59.3}{50} = 1.19 \quad (5)$$

致谢: 正电荷铁蛋白和氯化金合盐酸等为日内瓦大学医学院组织胚胎研究所 L. Orci 教授所赠; 超速离心机技术得到本院生化教研组章云津同志协助, 在计算校正因子时得到本室郑富盛教授指导。

参 考 文 献

- [1] Skutelsky, E. et al.: *J. Cell Biol.*, **71**, 218, 1976.
- [2] Yanagimachi, R. et al.: *Am. J. Anat.*, **135**, 497, 1972.
- [3] Skutelsky, E. et al.: *J. Cell Biol.*, **43**, 8, 1969.
- [4] Grinnell, F. et al.: *J. Cell Biol.*, **66**, 470, 1975.

- [5] Nilsson, O. et al.: *Exp. Cell Res.*, **83**, 421, 1973.
- [6] Nagura, H. et al.: *Acata Path. Jap.*, **23**, 279, 1973.
- [7] Borysenko, J. Z. et al.: *Exp. Cell Res.*, **118**, 215, 1979.
- [8] Marikovsky, Y. et al.: *Exp. Cell Res.*, **89**, 359, 1974.
- [9] Miller, S. C. et al.: *J. Cell Biol.*, **72**, 511, 1977.
- [10] Gasie, G. J. et al.: *Lab. Invest.*, **18**, 63, 1968.
- [11] Danon, et al.: *J. Ultrastr. Res.*, **38**, 500, 1972.
- [12] Blok, et al.: *Histochem.*, **69**, 131, 1980.
- [13] Skutelsky, E. et al.: *J. Cell Biol.*, **71**, 232, 1976.
- [14] Deneff, J. -F. et al.: *J. Ultrastr. Res.*, **71**, 203, 1980.
- [15] Conti-Devirgiliis, L. et al.: *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, **1**, 73, 1980.
- [16] Geoghegan, W. D. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 1187, 1977.
- [17] Horisberger, M. et al.: *Experientia*, **31**, 1147, 1975.
- [18] Weibel, E. R.: in *Int. Rev. of Cytol.*, **26**, 235, 1968.
- [19] de Petris, S.: *Nature*, **272**, 66, 1978.
- [20] Williams, M. A.: in *Practical Methods in Electron Microscopy*, Vol. **6**: 1, 1977.
- [21] 樊景禹: «生理科学», 1982年, 2期 23页。
- [22] Helenius, A. J. et al.: *J. Cell Biol.*, **84**, 404, 1980.
- [23] 樊景禹: «生理科学», 1982年, 2期 24页。
- [24] Weiss, L. et al.: *J. Cell Sci.*, **14**, 215, 1974.
- [25] Subjeck, J. R. et al.: *J. Cell Physiol.*, **85**, 529, 1975.
- [26] Robinson, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 81, 1976.
- [27] Moller, P. C. et al.: *Eur. J. Cancer*, **15**: 63, 1979.
- [28] Kuniaki, T. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 858, 1981.
- [29] Frens, G.: *Nature Phys. Sci.*, **241**, 20, 1973.

[本文于1982年10月7日收到]

猪胸腺素对人体外周血姐妹染色单体交换 (SCE) 及微核率的影响

黄 权 光 史 纪 兰

(山东省医学科学院, 济南)

胸腺素是胸腺分泌的一簇多肽类激素, 具有促进T淋巴细胞增生和恢复机体细胞免疫功能的生物活性^[1]。近年胸腺素已被应用于临床,

治疗免疫缺陷病、变态反应病、自身免疫病、肿瘤以及细菌、病毒和霉菌感染性疾病等。

因此对从胸腺提取的化学成分和物质有无

«Ehrlich 腹水癌细胞表面负电荷与 conA 受体分布的
定量电子显微镜研究»一文的照片

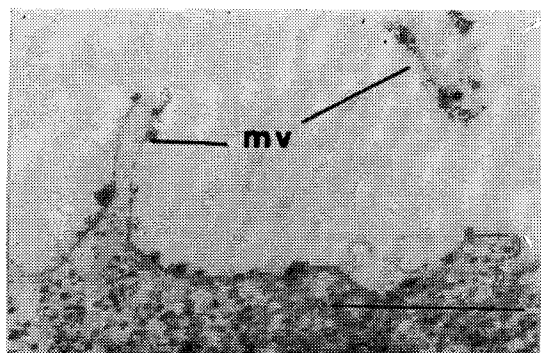


图1 Ehrlich 腹水癌细胞与正电荷铁蛋白(0.2mg/ml)温育后铁蛋白颗粒在细胞表面的分布特点

mV: 微绒毛, 标尺: $0.5\mu\text{m}$.

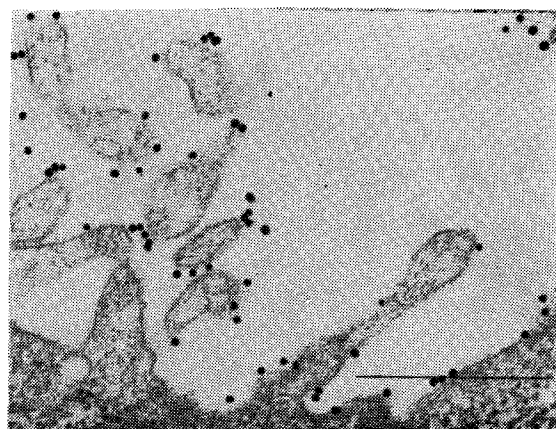


图4 胶体金颗粒在细胞表面的分布
标尺: $0.5\mu\text{m}$.

«DNA 浮雕图象电子显微镜方法»一文的照片

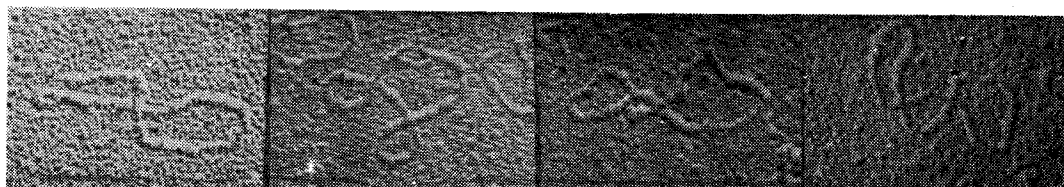


图1 松弛态闭环状 pBR322 DNA 浮雕图象
($\times 60,000$ 倍)

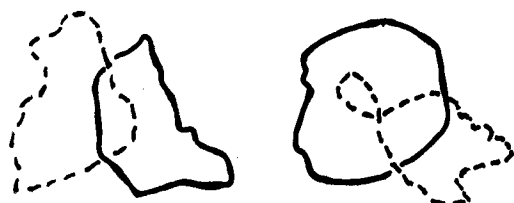
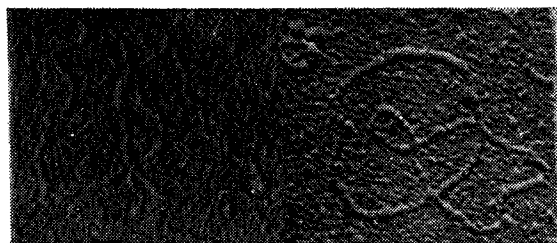


图2 变性的 pBR322 DNA 浮雕图象
($\times 60,000$ 倍)