

- 104: 163.
- [5] Pana S D J., 1980, *Cell Biol. Inter. Rep.*, 4:149.
- [6] 赵孟莲等, 1983, 解剖学报, 14(2) 196.
- [7] Axelrod D. et al., 1976, *J. Biophys* 16: 1055.
- [8] Wintersberger E. et al., 1983, *J. Cell Biochem.* 21(3): 239.
- [9] Culp I A. et al., 1971, *J. Cell Biol*, 50: 691.
- [10] Boslchck C B. et al., 1981, *Cell* 14: 175.
- [11] Yamada K. et al. 1985, *J. Cell Physiol.*, 125: 235.
- [12] Taylor-papadimitriou J. et al., 1981, *Cancer Res.* 41: 2491.
- [13] Wigley C G. et al., 1979, *Exp. Cell Res.* 118: 394.
- [14] Singer I I. 1979, *Cell* 16:675.
- [15] Weber K. et al., 1976, in *Contractile System and Non-Muscle Tissues* (Perry S V. et al. eds) Elsevier North-Holland Biomedical Press, 51-66.
- [16] 潘玉芝等, 1985, 实验生物学报, 18(3) 317.

用单宁酸作示踪剂观察上皮细胞间的紧密连接

江家婉 凌绍萍 俞永富 钟慈声

(上海医科大学细胞超微结构研究室)

铜、钨红和辣根过氧化酶^[1-3]常作为示踪剂来研究质膜的结构和功能。运用单宁酸染色技术观察细胞膜和细胞膜特化结构的功能是新发展起来的一种示踪技术。用戊二醛和单宁酸的混合物固定生物组织,能够提高各种类型细胞表面膜的电子密度和反差^[4-7],可跟踪观察质膜的结构和功能。本文报道了利用单宁酸能提高细胞膜电子密度和反差的特性结合冰冻蚀刻技术,观察了各种类型上皮细胞间紧密连接的发育程度,分析了不同类型组织细胞间紧密连接发育程度与其功能的关系。

材 料 和 方 法

一、戊二醛-单宁酸混合液的制备

在100 ml 0.2 mol/L二甲砷酸钠溶液中加入12克单宁酸,60℃加热溶解,过滤后即得12%单宁酸溶液;用重蒸馏水配制成5%戊二醛(原液:25%分析纯);在临用时,将两种溶液各对半均匀混合后,即成含有6%单宁酸、2.5%戊二醛混合液,用NaOH调整pH至7.2。

二、生物样品制备

小鼠颈椎脱臼后,立即取下肾脏、肝脏、小肠和

胃,切成小块(1 mm³)。各种组织分成两部分。其中一部分用含有6%单宁酸的2.5%戊二醛(pH≈7.2)4℃固定2小时,然后用1%的锇酸后固定,4℃,2小时。随后用乙醇和丙酮分别进行常规系列脱水。*618环氧树脂包埋。超薄切片不再用醋酸铀和枸橼酸铅染色,直接在H-500型透射电镜下观察。

另一部分样品用2.5%戊二醛固定,4℃,2小时后,再用30%生理盐水甘油浸泡约10小时,然后将样品快速投入液氮中冷冻,用日立HUS-5 GB型真空喷镀仪冷冻断裂,真空度为 1×10^{-5} Torr,温度控制在-100℃,断裂后蚀刻5分钟,然后在45°角方向喷铂金,90℃方向喷碳膜加固。喷镀铂金和碳膜均不旋转。最后将复型膜置于铜网上,在H-500型透射电镜下观察。

结 果

从复型膜P面上可见,肾近端小管上皮细胞近顶端处有向上突起的条索组成的网,但数量少,仅有1—2层,某些区域甚至缺如(图1)。在小肠粘膜上皮细胞和胃粘膜上皮细胞近顶端以及肝毛细胆管附近的质膜上皆可见排列紧密的条索组成的网状结构,其分布呈连续腰带状,层数多,有些部位甚至多达十几层(图

3, 5, 7)。

在小肠粘膜和胃粘膜上皮细胞的超薄切片上, 可以观察到相邻细胞侧面质膜被单宁酸染色, 膜厚度和电子密度均增加。但是在顶端有紧密连接的部位则没有被染色。然而管腔中微绒毛的质膜电子密度也同样增强, 致使上皮细胞侧面质膜与微绒毛质膜在紧密连接处呈中断现象(图4, 6)。在肝细胞的超薄切片上, 细胞表面质膜的电子密度均增强, 只是近毛细胆管的紧密连接处质膜的电子密度未见增强, 毛细胆管的质膜及微绒毛表面膜亦未见电子密度增加(图8)。由于实验中样品是浸泡固定于单宁酸和戊二醛混合液中, 固定液可通过细胞间隙以及管腔面双向与质膜接触, 因而胃和小肠上皮细胞的侧面质膜和微绒毛的质膜都可接触单宁酸, 其电子密度增加; 而肝毛细胆管必须经胆管方能与外界相通, 所以毛细胆管内侧面质膜不能和单宁酸接触, 其电子密度不见增加。在肾近端小管上皮细胞相邻细胞间隙内全部被单宁酸染色, 近顶端处亦不见深染线的中断(图2)。单宁酸能够通过近端小管上皮细胞之间的紧密连接处。

讨 论

应用单宁酸增加膜的反差是由于单宁酸表面带负电荷, 当它与细胞膜接触后, 就与细胞膜上带正电荷的蛋白质结合形成复合物。但单宁酸本身对提高细胞膜的电子反差作用很小, 当用钨酸固定时, 钨酸就与单宁酸作用形成高电子密度的沉淀物沉积在膜上^[4], 在低放大倍数下, 就可见深色的细颗粒沉积于质膜上^[7]。1972年 Mizuhira^[8]等首次应用戊二醛加单宁酸对生物样品作前固定, 以增加膜的电子密度和反差。目前还有不少工作是利用单宁酸的这种性质以显示细胞质中细胞膜衍生物, 如质膜内陷所形成的管道系统和质膜折叠^[9]。

冰冻复型技术是研究质膜结构的一种很好的方法; 结合单宁酸示踪技术, 则可进而了解膜上某些结构及其功能。在上述结果中已显示

肾近端小管上皮细胞的冰冻复型膜上可见组成紧密连接的网状索条仅有1~2层, 单宁酸能够通过这个部位不受阻挡。单宁酸分子量平均为1700, 单宁酸分子能够通过肾近端小管上皮细胞间隙进入管腔, 说明在生理条件下, 多种离子和小分子物质能够自由通透肾近端小管上皮细胞的间隙, 参与肾小管的重吸收和对机体水盐代谢平衡的调节。在胃和小肠粘膜上皮细胞以及肝毛细胆管处的冰冻复型膜上显示网状索条数量多, 排列紧密, 此处紧密连接结构发育较好, 单宁酸不能通过这个部位, 起到了生理性通透屏障作用, 防止管腔中物质与细胞间液中物质的自由交换, 保持着二侧物质各自一定的浓度梯度。上述两项技术结合使用, 从形态学上论证了这几处上皮细胞紧密连接的结构与功能关系。

虽然细胞经戊二醛固定后, 能增加细胞膜对各种化学物质的渗透能力, 但并不增强细胞膜对单宁酸分子的通透性, 故在正常细胞中, 用戊二醛加单宁酸固定生物组织, 单宁酸不会通透细胞膜进入胞质中, 只能与细胞膜外侧蛋白质结合, 形成复合物沉积于膜外侧; 如果细胞受到各种因素引起损伤时, 细胞膜的通透性增大, 单宁酸分子就能通过细胞膜而进入细胞质中, 致使细胞膜内侧以及胞质中的一些膜性细胞器上也有单宁酸沉积, 在电镜下显示这些部位电子密度增加, 反差增强。由于钨酸能影响细胞膜的通透性^[9], 从而增加细胞膜对小离子和一部分蛋白质分子的通透性。生物样品如果先用钨酸固定, 再用戊二醛—单宁酸混合液固定, 导致细胞膜内叶层和胞质中膜性细胞器均被染色, 电子密度增加, 这样就不利于实验的观察, 应予以注意。

我们在应用单宁酸标记技术中, 仅用了单宁酸加戊二醛前固定以及钨酸后固定, 没有用铀和铅染色, 是为了不与单宁酸染色发生干扰现象。但是钨酸对增加胞质中细胞器反差能力有限, 故实验中, 我们在2%钨酸中加入了0.8%亚铁氰化钾, 使钨酸中的钨还原, 增强

钨酸的染色效果,提高细胞器的反差。

摘 要

运用单宁酸染色示踪技术是研究细胞膜和细胞膜特化结构与功能关系的一种新发展起来的技术。用戊二醛加单宁酸的混合液固定生物组织,能够提高各类细胞表面膜的电子密度和反差。冰冻复型技术是研究质膜结构的一种很好方法,结合单宁酸示踪技术,可进而了解膜上某些结构及其功能之间的关系。冰冻复型膜上显示:在胃和小肠粘膜上皮顶端相邻两上皮细胞之间以及近肝毛细胆管处组成紧密连接的网状索条层数多,排列紧密,此处紧密连接结构发育好,单宁酸不能通过这个部位;在肾近端小管上皮细胞,网状索条仅有1~2层,单宁酸能通过此部位不受阻挡,在生理条件下,有利于肾近端小管参与重吸收和对机体水盐代谢平衡的调节。

图 版 说 明

图1 小鼠肾近端小管上皮细胞冰冻蚀刻象。左下方可见微绒毛的不同断面(vi),微绒毛部质膜的pF(PF)面上可见索条状网格突起(Tj),部分区域只有1~2层(→)×33000

图2 小鼠肾近端小管上皮细胞超薄切片的电镜象。上皮细胞侧面的质膜至游离端皆被单宁酸染色(→),游离面微绒毛(vi)的质膜也被单宁酸染色。×10350

图3 小鼠小肠粘膜上皮细胞冰冻蚀刻象。上方可见微绒毛的顶部质膜(vi),微绒毛下方质膜的PF面上可见索条状网格突起,排列整齐,呈连续分布(Tj);在EF面上可见索条状网格相应的凹槽(Tj)。×25500

图4 小鼠小肠粘膜上皮超薄切片的电镜象。相邻上皮细胞侧面的质膜被单宁酸染成深色黑线,近顶端(→)紧密连接处未被染色。微绒毛(vi)的质膜也被染色。×12600

图5 小鼠胃粘膜上皮细胞冰冻蚀刻象。左上方可见上皮细胞质膜pF面上有紧密排列的网格状索条(Tj),层数多。索条下方可见微绒毛的不同断面(vi)。图下方可见另一个上皮细胞的胞浆。×13500

图6 小鼠胃粘膜上皮细胞超薄切片的电镜象。可见近胃腔(Lu)处的相邻两个粘膜上皮细胞侧面的质膜未被单宁酸染色(→)。侧面质膜(▲)和腔面质膜(△)的电子密度均增强。×13650

图7 小鼠肝细胞冰冻蚀刻象。左面可见肝毛细胆管处微绒毛的横断面。微绒毛的右侧可见肝细胞质膜PF面上有紧密排列的网格状索条(Tj),层数多。×12600

图8 小鼠肝细胞超薄切片的电镜象。两个相邻肝细胞侧面的质膜在毛细胆管附近的紧密连接处未被单宁酸染色(→)。毛细胆管腔内微绒毛表面的质膜也未被染色(▲)。×13500

参 考 文 献

- [1] Burton, P. R. et al., 1973, *J. Cell Sci.*, 12: 567.
- [2] Luft, J. H., 1964, *J. Cell Biol.*, 23: 54 A.
- [3] Forssmann, W. G. et al., 1970, *J. Cell Biol.*, 44: 1.
- [4] Futaesaku, Y. et al., 1972, *Histochem. Cytochem.*, 4: 155.
- [5] Mizuhira, V. et al., 1972, *Acta. Histochem. Cytochem.*, 5: 233.
- [6] Burton, P. R. et al., 1975, *J. Cell Biol.*, 65: 227.
- [7] Van Deurs, B., 1975, *J. Ultrastruct. Res.*, 50: 185.
- [8] Fujita, M. et al., 1984, *Archiyum Histicologicum*, 47: 113.
- [9] Wagner, R. C., 1976, *J. Ultrastruct. Res.*, 57: 132.