

# 酸性磷酸酶在豚鼠耳蜗中的显示

陈海明 丁大连\*

(复旦大学生物学系)

**摘要** 采用组织化学方法,与耳蜗膜迷路铺片技术和耳蜗冰冻切片技术相结合。对豚鼠耳蜗进行了观察。正常耳蜗中的酸性磷酸酶主要集中分布在内、外毛细胞的表皮板下,血管纹细胞和 Boettcher 氏细胞。并对酸性磷酸酶与溶酶体的关系以及毛细胞富含酸性磷酸酶的生理学意义进行了讨论。

应用组织化学方法,与耳蜗膜迷路铺片技术和耳蜗冰冻切片技术相结合,显示出耳蜗内酸性磷酸酶的准确定位,并对酸性磷酸酶与溶酶体的关系、酸性磷酸酶的组织化学反应问题,以及毛细胞富含酸性磷酸酶的生理学意义进行了讨论。

溶酶体是维持细胞新陈代谢的重要细胞器,与细胞内含物质的分解、消化密切相关,它担负着清除老废细胞器、细胞内积压储存物质、病原体及外来毒性分子的重要使命。因此,溶酶体功能的变化,直接影响到细胞的存亡。酸性磷酸酶可作为主要标志酶,从酸性磷酸酶的变化可以反映溶酶体的活动情况。我们采用组织化学方法,以溶酶体的标志酶——酸性磷酸酶(以下简称 ACP)作为观察在耳蜗的分布。

## 材料与方 法

本文采用二种方法检查耳蜗中 ACP 的组

织化学变化。第一种方法是制作耳蜗分离片,即用改良耳蜗铺片术<sup>[1]</sup>和耳蜗螺旋韧带硬铺片术<sup>[2]</sup>相结合,对豚鼠耳蜗的一侧进行观察。第二种方法是明胶包埋冰冻切片,对豚鼠耳蜗的另一侧,通过中轴切片进行观察。

耳蜗 ACP 的显示是采用偶联偶氮法<sup>[3]</sup>。作用液的配方是:萘酚磷酸钠 AS-BI 5 毫克,用 N-二甲基甲酰胺 0.2 毫升溶解,再加缓冲六偶氮对品红 10 毫升。用 0.1N 氢氧化钠调节到 pH5。过滤后在 37°C 恒温箱中预温备用。

显示耳蜗 ACP 的步骤如下:

1. 豚鼠断头,取听泡。迅速在蜗尖钻孔,并将蜗窗和前庭窗开放,用 4°C 福尔马林钙溶液灌流后,浸入上述固定液在 4°C 冰箱中固定 45 分钟。
2. 用双蒸馏水灌洗耳蜗三次,每次半分钟。

\* 上海第二医科大学耳科研究室。

再浸入 37°C 的作用液中温育 60 分钟。

3. 将温育后的耳蜗浸入 10% 福尔马林溶液中固定 2 小时以上。

4. 将固定后的耳蜗制作耳蜗分离片。

5. 将固定后的耳蜗作冰冻切片。步骤如下:

(1) 将耳蜗浸入新配制的 10% 盐酸中脱钙 60 分钟。

(2) 水洗后分别浸入 37°C 明胶, 先 10%, 后 25% 各 4 小时。

(3) 把耳蜗连同明胶移入包埋框中, 浸入冰水骤冷, 使明胶凝固。

(4) 将明胶包埋块粘冻在冷台上, 用半导体致冷切片机制片, 切片厚度为 15 微米, 取中

轴切片。

(5) 切片铺在载波片上的甘油滴中, 盖上盖片, 周围用中性树胶封固。

## 结 果

正常耳蜗中的 ACP 通过偶联偶氮反应, 产生红色的偶氮染料。从基底膜铺片中可以清晰地显示全部毛细胞表皮板下的 ACP, 它们呈整齐红色的沉淀排列(图 1)。从螺旋韧带铺片中可以清晰地显示整个血管纹细胞和毛细血管壁上的 ACP(图 2)。冰冻切片显示 ACP 在毛细胞表皮板下的准确位置(图 3), 以及在血管纹上皮细胞的均匀分布, 此外在底回 Boettcher 氏细胞中也有 ACP 分布(图 3)。

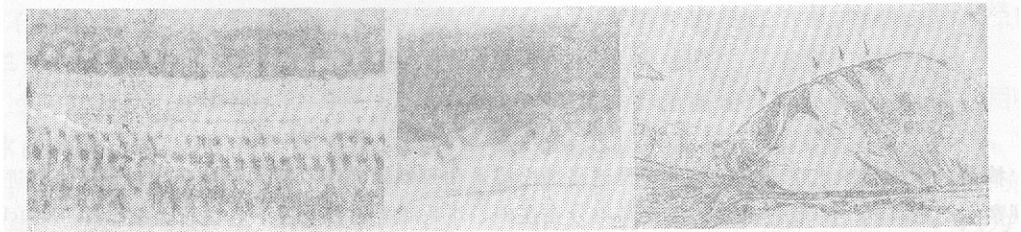


图 1 基底膜铺片示毛细胞中的酸性磷酸酶( $\times 320$ ); 图 2 螺旋韧带铺片血管纹上皮细胞中的酸性磷酸酶( $\times 160$ ); 图 3 切片示内外毛细胞表皮板下的酸性磷酸酶( $\times 320$ )

## 讨 论

ACP 是 pH 围绕在 4.5—5.0 范围的专职降解功能的酶类, 在细胞中是定位于溶酶体内, 以溶酶体膜与胞内其它物质相隔。不能随意释放, 一旦溢出, 即造成细胞自溶。溶酶体内所含的水解酶中绝大部分为酸性水解酶。因此, 组织化学切片中所示 ACP 存在部位, 实际就是溶酶体的部位。ACP 的变化, 实际反映着溶酶体的活动情况。根据 ACP 的组织化学反应定位于溶酶体, 而溶酶体是维持细胞新陈代谢的重要细胞器。

在正常毛细胞中, ACP 显示溶酶体存在于内, 外毛细胞内紧靠表皮板的部位。而周围

的柱细胞和支持细胞均无明显的 ACP 显示, 说明在螺旋器(又称 organ of Corti)中支持细胞内 ACP 含量甚少。只有毛细胞内含有丰富的 ACP, 这不但表明毛细胞内新陈代谢的活动非常旺盛, 而且也可以把 ACP 看做为毛细胞的特殊标志之一。

## 参 考 文 献

- [1] 丁大莲等 1981 改良耳蜗铺片术 中华耳鼻咽喉科杂志, 16: 207—209
- [2] 1984 耳蜗螺旋韧带硬铺术 上海医学 7: 657—658
- [3] 陈啸梅等 1982 组织化学手册 人民卫生出版社 189—190
- [4] R. T 迪安 1983 溶酶体 科学出版社 48—53。