

兔肺磷脂的超微结构定位和能谱分析

徐根兴 袁驾南 赵振金 陈 陵

(海军医学专科学校,南京 210049)

摘要 本文用形态学方法在超微结构上定位肺表面活性物质中含量丰富的磷脂,在肺泡 II 型细胞的板层小体和肺泡上皮细胞表面有明显的磷脂-铅-铁复合沉淀产物,用能谱仪对这些沉淀产物进行 X 射线微区元素分析,表明含铅和铁元素。

肺表面活性物质是一种充分酯化、完全饱和的磷脂,这种磷脂不与钙和钠离子,也不与常规固定剂起反应^[2]。因此,如果不用特殊方法沉淀这类磷脂,在脱水和环氧树脂包埋过程中就会丢失,无法在超微结构上原位显示。迄今尚无特异性强的方法在超微结构上显示肺表面活性物质。磷脂的超微结构定位方法报道不多。我们用硝酸铅和铁氰化钾与磷脂通过三合絮状作用(tricomplex flocculation)而原位显示磷脂的方法,以显示肺表面活性物质的超微结构定位,获得了较好的结果。

(一)材料和方法 本实验于 1990 年 2 月 4 日至 1990 年 11 月 5 日期间进行。将家兔麻醉,用 0.09 mol/L 草酸钾配制的 2.5% 戊二醛(pH 7.4)固定液灌流固定 30 分钟,取兔肺切成小块,再在固定液中 4℃ 固定 2 小时,0.1mol/L 二甲胂酸缓冲液漂洗,新配制的 0.1mol/L 硝酸铅和 0.1mol/L 铁氰化钾等体积混合作用液^[3]37℃ 作用 30 分钟,0.1mol/L 二甲胂酸缓冲液漂洗,常规丙酮脱水,无水丙酮(用无水氯化钙脱水)^[4]抽提非极性脂。EPON812 包埋,超薄切片,不经电子染色,直接在 H-300 型, JEM-100S 型及带有能谱仪的 JEM-200CX 透射电镜下观察。

为了比较不同方法的效果,将一部分材料分别用 0.1mol/L 磷酸缓冲液配制的 2.5% 戊二醛固定液(pH 7.4),0.1mol/L 二甲胂酸缓冲液配制的 2% 多聚甲醛-0.5% 戊二醛固定液(pH

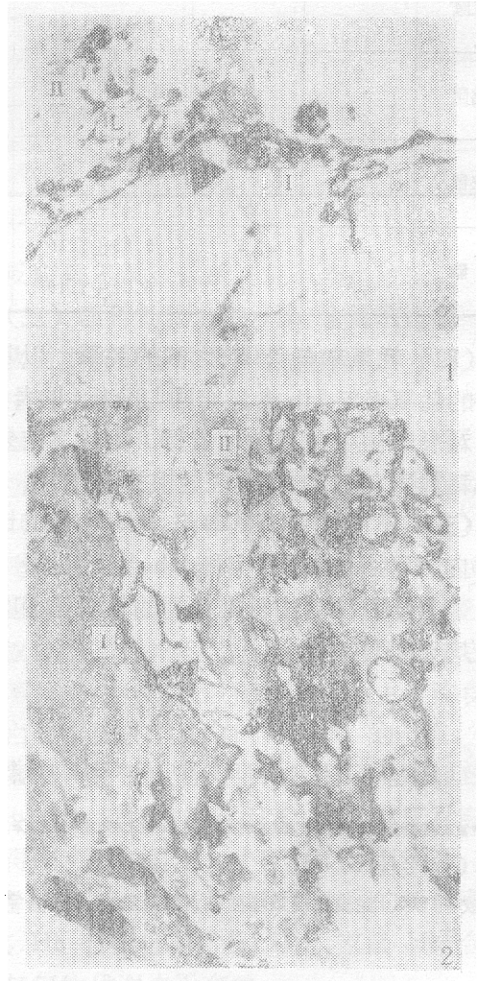


图 1 肺磷脂沉淀产物位于肺泡 II 型细胞的板层小体和肺泡腔上皮细胞表面 ×3500

图 2 未经无水丙酮处理时肺磷脂沉淀产物 ×3500

以上两图均未电子染色。I 型细胞;II 型细胞;L:为板层体;指示磷脂反应产物。

7.4) 固定,其余操作步骤同上。另外,为了比较脱水对磷脂定位的影响,一部分样品不经无水丙酮处理,用快速脱水法进行,即用 30% 和 50% 丙酮分别脱水 15 分钟,70% 丙酮脱水 60 分钟(换液二次),等体积 70% 丙酮与 EPON812 混合液浸透 2 次,每次 30 分钟,逐步过渡至纯包埋剂浸透包埋。在后固定中,一部分样品用 1% 钼酸-1.5% 亚铁氰化钾混合固定液后固定 1 小时。对照组采用去铁氰化钾的作用液处理,其余操作步骤则相同。

(二) 结果 在肺泡 II 型细胞的板层体、肺泡腔上皮细胞表面均可观察到数量不等的磷脂沉淀产物。这些沉淀物电子密度大,有时充满整个板层体。在肺泡腔上皮细胞表面有时连成一片,形成片层结构(见图 1)。在肺泡 II 型细胞的膜,肺泡 I 型细胞的细胞膜上偶见有少量沉淀产物。

在肺泡腔上皮细胞表面和肺泡 II 型细胞板层体上的沉淀产物用能谱仪进行 X 射线微区元素分析,表明含有 Pb 峰和 Fe 峰(见图 3),而在没有沉淀物的区域则不显示这两个峰。

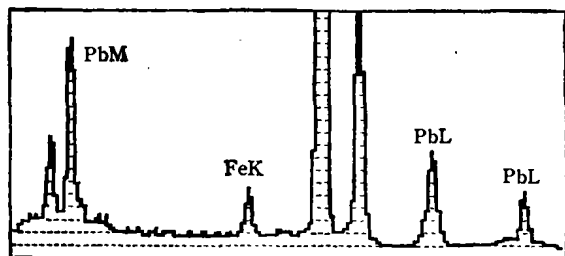


图 3 磷脂沉淀物的 X 射线微区元素分析铁 (Fe) 和铅(Pb) 的谱峰

当样品经快速脱水,未经无水丙酮处理时,除了在上述位置可见大量磷脂沉淀物外,在血管腔内和毛细血管内皮细胞膜上亦有大量沉淀物,在肺泡 I、II 型细胞,血细胞的膜和胞质内亦有许多沉淀物(见图 2)。用磷酸缓冲液配制的戊二醛固定液固定,磷酸沉淀物则比用草酸钾配制的戊二醛固定的样品少,用 2% 多聚甲醛-0.5% 戊二醛固定的样品,磷脂沉淀物则更少。在后固定中,用钼酸-亚铁氰化钾混合固定液后固定,可提高细胞结构的反差,不经铀和铅

电子染色亦能清晰地观察到细胞的超微结构和磷脂的沉淀产物。用去铁氰化钾的作用液处理,不显示磷脂沉淀物。

(三) 讨论 肺表面活性物质的测定通常用生化的手段进行,而生化方法往往只能测定其总量,无法定位。在超微结构上显示这类物质则可揭示表面活性物质的形成、包裹、分泌和变化情况,但此技术还不完善。Dermer^[2] 认为肺表面活性物质是一种充分酯化、完全饱和的磷脂,平常在脱水和包埋过程中无法保存。用硝酸铅和铁氰化钾混合固定液与磷脂产生三合絮状作用,大体上能使肺表面活性物质在肺上皮细胞表面以片层形式显示出来,但用此法,很多上皮细胞表面沉淀物可能是非特异结合的固定液中的胶体粒子,且在其它结构中亦有非特异性反应^[3]。Kao 等^[4]认为,用无水丙酮进行抽提,可使脂和非磷脂分子(如 ATP DNA RNA 等)物质引起的非特异反应减少,而相对专一地显示磷脂的定位。我们在实验中观察到,若不用无水丙酮抽提,非特异反应较多,经无水丙酮处理后,一般仅在肺泡上皮的细胞表面和肺泡 II 型细胞板层体内出现磷脂沉淀物。而一般不显示细胞内其它磷脂。Kao 等认为,胃粘膜表面也有与肺表面活性物质性质一样的表面活性磷脂 (Surface-active phospholipids, SAPL) 的吸收层,可用专一的染色方法显示 SAPL,往往不显示细胞膜等处的磷脂物质。在本实验中,仅显示肺泡表面活性物质所在部位的磷脂,其它区域的磷脂极少显示,这可能是所用方法主要显示充分酯化、完全饱和的磷脂,再加上用无水丙酮抽提,从而相对专一地显示出肺泡表面活性磷脂所在的定位。用能谱仪进行 X 射线微区元素分析也证实这些沉淀物含有 Pb 和 Fe 元素,这正是所用的硝酸铅、铁氰化钾和磷脂发生作用而产生沉淀反应的证据。

参 考 文 献

- [1] 林钧安等 1989 实用生物电子显微术 122 辽宁科学技术出版社。
- [2] Dermer G. B. 1969 The fixation of pulmonary surfactant for electron microscopy. *J. Ultrastruct Res* 27:

88—92.

- [3] Gil J. 1972 Effect of tricomplex fixation on lung tissue. *J. Ultrastruct Res* 40: 122—126.
- [4] Kao Y. J. and L. M. Lichtenberger 1987 Localiza-

tion of phospholipid-rich zones in rat gastric mucosa: possible origin of a protective hydrophobic luminal lining. *J. Histochem Cytochem* 35(11): 1285—1290.