文章编号:1000-5404(2011)07-0753-03

技术方法

不同固定液对细胞骨架荧光染色标记效果的影响

罗 果,保玉心,李 晋 (563003 贵州 遵义,遵义医学院中心实验室)

【摘要】 **目的** 比较不同固定液对细胞骨架荧光染色的差异,选择最佳固定方法。**方法** 分别采用4%甲醛、2%戊二醛、95%乙醇和4%多聚甲醛/MES 4种固定液,对人肺腺癌细胞H1299进行固定,对其微管和微丝荧光标记后,在共聚焦显微镜下观察其形态结构。**结果** 4%多聚甲醛/MES对细胞的微管和微丝都有很好的固定作用。4%甲醛、2%戊二醛、95%乙醇对细胞的微丝基本能起到固定作用,而4%甲醛对微管的固定效果略差,2%戊二醛、95%乙醇固定的细胞看不到微管的具体形态结构。**结论** 细胞骨架的固定中需加入骨架稳定剂,且根据实验目的,选择适当的固定液获得最佳标记效果。

【关键词】 细胞骨架;激光共聚焦显微镜;H1299细胞;荧光染色
【中图法分类号】 R329-33 【文献标志码】 B

激光共聚焦显微镜是研究细胞骨架的最佳仪器[1]。从形态观察、定位、定量到分子结构与功能调节以及病理变化等各方面对细胞骨架进行研究,成为现代生物医学中重要课题[2-4]。共聚焦样本的制备包括样本的预处理和荧光标记2个主要步骤,样本制备的好坏直接决定实验的成功与否。2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)是一种具有较高去污力的表面活性剂,生物溶解性能好,工业上常用于液体洗涤中作活性物、分散剂等,在细胞生物领域中常用作某些组织结构的稳定剂,本实验中采用4种常用细胞固定液,同时结合MES,分别固定人肺腺癌细胞H1299,并对其微管和微丝进行荧光标记,通过激光共聚焦图像的观察和分析,探讨不同固定液对细胞骨架的影响,选择最佳固定方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

人肺腺癌细胞系H1299:由我校生化教研室范芳副教授惠赠。DMEM培养基(Gibco公司),胎牛血清(四季青生物公司),Phalloidin-TRITC(Sigma公司),鼠抗人β-tubulin(USBiological公司),羊抗鼠IgG-FITC(Santa Cruz公司),多聚甲醛(Sigma公司),MES(Solarbio公司),Triton X-100(Solarbio公司)。激光共聚焦显微镜(Leica SP2),二氧化碳培养箱(Thermo公司),超净工作台(苏州净化)。

1.2 H1299细胞培养

复苏液氮冻存的H1299细胞,加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,接种于细胞培养瓶中,置37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,0.25%胰酶消化传代。取对数生长期的细胞用胰酶消化成单个,调整细胞浓度为2×10^4/ml,接种于Petri皿中,培养12 h,待其贴壁后用于实验。

【通信作者】 罗 果,E-mail:lozens@126.com

1.3 H1299细胞的固定

取出Petri皿,分别用4%甲醛、2%戊二醛、95%乙醇和4%多聚甲醛/MES对Petri皿中的细胞进行固定,具体方法参考文献[5-9]:① 4%甲醛固定:Petri皿中的细胞用PBS冲洗3次,用4 ℃预冷的4%甲醛室温固定20 min;② 2%戊二醛固定:Petri皿中的细胞用PBS冲洗3次,用2%戊二醛室温固定15 min,再用1 g/L的$NaBH_4$洗3次,每次4 min;③ 95%乙醇固定:Petri皿中的细胞用PBS冲洗3次,用95%乙醇室温固定30 min;④ 4%多聚甲醛/MES固定:Petri皿中的细胞用37 ℃预热的MES(MES 90 mmol/L, $MgCl_2$ 2 mmol/L, EDTA 1.5 mmol/L, PEG8000 5 mmol/L)冲洗3次,用4%多聚甲醛/MES室温固定20 min,再用37 ℃预热的MES冲洗3次。

1.4 间接免疫荧光法标记细胞微管

将固定好的细胞用0.5% Triton/PBS洗涤3次、每次10 min,加入鼠抗人β-tubulin,37 ℃孵育1 h,再用0.5% Triton/PBS洗涤3次、每次10 min,加入羊抗鼠IgG-FITC,37 ℃孵育1 h,用0.5% Triton/PBS洗涤3次、每次10 min[10]。

1.5 直接标记法标记细胞微丝

向标记好微管的细胞中直接加入Phalloidin-TRITC,室温孵育15 min,再用PBS洗3次,每次10 min。最后向Petri皿中滴加90%甘油/PBS,激光共聚焦显微镜扫描成像,物镜用63倍油镜,图片标尺长度为20 μm。

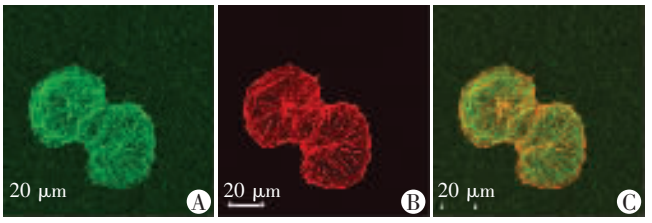
2 结果

2.1 用4%甲醛固定法的H1299细胞骨架形态观察

用4%甲醛固定的H1299细胞进行荧光标记后,微管结构隐约可见,层次不清晰,且细胞质中非特异荧光较强,整个图片的背景噪声较高(图1A);微丝呈现清晰的束状纤维,层次清晰,立体感较强(图1B);图像叠加之后的2种荧光有窜色现象,微管和微丝共定位不清晰,2种结构较难区分清楚(图1C)。

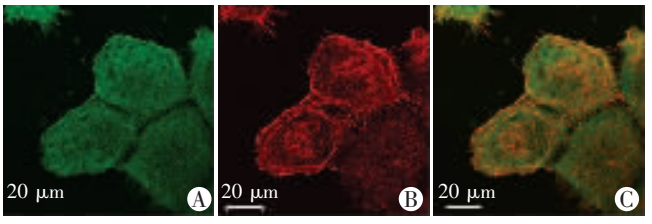
2.2 用2%戊二醛固定法的H1299细胞骨架形态观察

用2%戊二醛固定细胞后,细胞内呈现弥散均匀的绿色荧光,无法观察到微管的具体结构(图2A);微丝结构清晰,在细胞的外周形成较完整的网络体系(图2B);叠加图像仍然有荧光窜色现象存在,只能观察到微丝(图2C)。



A：微管(FITC)；B：微丝(TRITC)；C：微管和微丝的叠加图像

图1 用4%甲醛固定H1299细胞微管和微丝的激光共聚焦观察

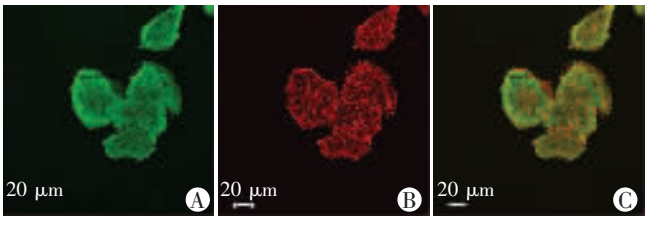


A：微管(FITC)；B：微丝(TRITC)；C：微管和微丝的叠加图像

图2 用2%戊二醛固定H1299细胞微管和微丝的激光共聚焦观察

2.3 用95%乙醇固定法的H1299细胞骨架形态观察

用95%乙醇固定的细胞，微管呈弥散状分布在细胞内，无法看清其结构(图3A)；微丝结构较为清楚，微丝纤维之间的区分不明显(图3B)；叠加图像依然存在荧光窜色，只能观察到较为模糊的微丝结构(图3C)。

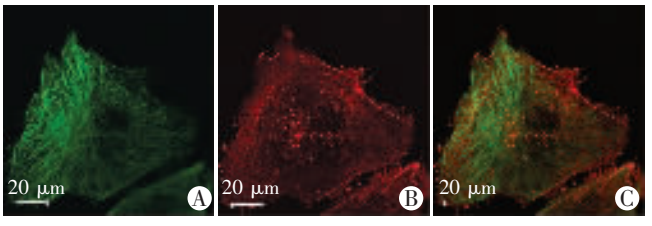


A：微管(FITC)；B：微丝(TRITC)；C：微管和微丝的叠加图像

图3 用95%乙醇固定H1299细胞微管和微丝的激光共聚焦观察

2.4 用4%多聚甲醛/MES固定法的H1299细胞骨架

用4%多聚甲醛/MES固定的H1299细胞，微管纤维呈有规律的束状排列，层次清晰，连贯性较好，立体感强，清楚地显示了细胞内微管的结构情况(图4A)；微丝纤维结构清晰，纤维之间区分明显，立体感强(图4B)；叠加图像背景干净，微管和微丝共定位层次清晰，2种结构能较容易区分开，且基本消除荧光窜色现象(图4C)。



A：微管(FITC)；B：微丝(TRITC)；C：微管和微丝的叠加图像

图4 用4%多聚甲醛/MES固定H1299细胞微管和微丝的激光共聚焦观察

3 讨论

本实验分别采用4%甲醛、2%戊二醛、95%乙醇和4%多聚甲醛/MES 4种常用的细胞固定液，对Petri皿中培养的H1299细胞进行固定，对其微管和微丝荧光标记后，在共聚焦显微镜下观察其形态结构。实验结果显示，4%多聚甲醛/MES固定液对细胞的微管和微丝都有很好的固定作用，固定结果层次清晰，区分明显，背景干净。4%甲醛、2%戊二醛、95%乙醇这3种固定液对细胞的微丝基本能起到固定作用，而4%甲醛对微管的固定效果略差，2%戊二醛、95%乙醇固定的细胞看不到微管的具体形态结构。

本实验结果显示，细胞微管的稳定性与微丝相比略差，微管对细胞生存的环境，如pH、温度等条件较为敏感，在细胞脱离培养环境时，微管蛋白容易发生解聚。因此在单独用2%戊二醛、95%乙醇固定细胞时，共聚焦显微镜下观察到细胞内呈现弥散均匀的绿色荧光，则是由于微管蛋白解聚所致。4%甲醛对微管能起到一定的固定作用，但是仍然有部分微管蛋白发生解聚，因此观察到的微管结构较为模糊，并且与微丝图像叠加之后有荧光窜色现象。甲醛溶液的纯度较多聚甲醛低，因此在固定细胞时，会引入较多的杂质在样品中，从而使样品的背景增高，信噪比降低。在用4%多聚甲醛固定细胞时，采用37 ℃ MES溶液清洗细胞和配置多聚甲醛固定液，MES在本实验中起到稳定微管蛋白的作用，因而观察到清晰的微管纤维结构，信噪比较好，故建议在检测细胞骨架的实验中采用细胞骨架稳定剂，以达到良好的固定效果。

激光共聚焦显微镜实验中的样品通常需要进行固定，样品固定、预处理和荧光标记等制备步骤往往成为影响整个实验成败的关键因素[10]。常用的固定剂有醛类固定剂、丙酮及醇类固定剂。醛类固定剂属于双功能交联剂，其作用是使组织之间相互交联，保存抗原于原位，其特点是对组织穿透性强、收缩性小、背景清晰，是常用的固定剂[5]。丙酮的组织穿透性和脱水性很强，常用于冰冻切片及细胞涂片的后固定，保存抗原性较好。醇类固定剂是最初的免疫细胞化学染色的固定剂，其作用是沉淀蛋白质和糖，保存抗原的免疫活性较好。但醇类对低分子蛋白质、多肽及细胞质内蛋白质固定效果较差[7]。在一些特定的实验中，比如本实验，由于细胞骨架的不稳定性，传统固定组织或细胞的固定剂无法对细胞骨架进行很好的固定，导致观察不到清晰的细胞骨架结构，因而需要加入一些辅助试剂，如稳定骨架结构的试剂MES，使细胞骨架在细胞脱离培养环境的时候不易发生解聚，达到稳定骨架以及固定作用。

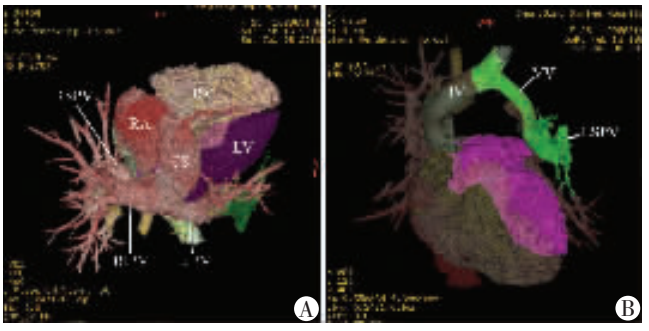
综上所述，不同固定剂的固定原理不同，对细胞成分、蛋白、结构等的固定效果也有差异。在不同的实验中，应根据实验目的选择合适的固定剂和辅助试剂，以达到最佳固定效果。

参考文献：

[1] 袁聿军. 细胞骨架的基本成分与功能[J]. 生物学教学，2006，31(4)：5－8.
[2] 周永红，陈利国，屈援，等. 2 型糖尿病患者血清对人脐静脉内皮细胞骨架及胞浆内游离钙的影响[J]. 中国老年学杂志，2009，29(15)：1865－1867.
[3] 曹小红，王爱华，王春玲，等. Surfactin 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及细胞骨架的影响[J]. 生物工程学报，2009，25(11)：1705－1710.
[4] 江奇峰，蔡绍皙，晏小清. 钙调蛋白结合蛋白通过调节细胞骨架稳定性影响肿瘤细胞运动能力[J]. 生物物理学报，2010，26(2)：125－137.
[5] 刘继红，蔡学泳，何其华. 细胞骨架的激光共焦研究技术[J]. 中国医学装备，2005，2(6)：49－51.
[6] 徐营，张庆华，关娜，等. 应用激光扫描共聚焦显微镜研究卵母细胞和早期胚胎的细胞骨架[J]. 细胞生物学杂志，2008，30(3)：406－410.
[7] 郑君芳，王瑛，陈鹏，等. EBP50 影响 HeLa 细胞微丝骨架的分布和定位[J]. 中国肿瘤临床，2008，35(20)：1192－1195.
[8] 蔡军，辛梅珍，姜叙诚，等. As_2O_3 诱导胃癌细胞凋亡及细胞骨架改变病理学观察[J]. 临床与实验病理学杂志，2003，19(4)：416－419.
[9] 杨本艳姿，王红兵，杨力，等. MLCK 和 ROCK 对细胞骨架和细胞行为的影响[J]. 细胞生物学杂志，2009，31(4)：469－475.
[10] 袁兰. 激光扫描共聚焦显微镜技术教程[M]. 北京：北京大学医学出版社，2004：66－71.

(收稿：2010-10-18 修回：2010-12-13)
(编辑　张　维)

(上接 752 页)



A：右上肺静脉、右下肺静脉及左下肺静脉经冠状静脉窦汇入右心房；B：左上肺静脉经垂直静脉汇入无名静脉；RA：右心房；RV：右心室；CS：冠状静脉窦；LV：左心室；RSPV：右上肺静脉；RIPV：右下肺静脉；LSPV：左上肺静脉；LIPV：左下肺静脉；IV：无名静脉；VV：垂直静脉

图 1　混合完全性肺静脉异位引流 MDCT 心脏大血管成像观察

2　讨论

完全性肺静脉异位引流或连接(total anomalous pulmonary venous drainage or connection，TAPVD or TAPVC)是一种少见的先天性心脏病，占先天性心脏病发病率的 1.5% ～3%，常伴发继发性房间隔缺损和/或动脉导管未闭，以及室间隔缺损、右心室流出道狭窄、体静脉异位回流、肺动脉狭窄、主动脉骑跨及大动脉转位等，因此患者的临床表现复杂多样[1－3]。完全性肺静脉异位引流病情大多都很严重，存活率很低，大多患者在婴儿或儿童时期就需要手术。Darling 根据肺静脉畸形连接部位，将完全性肺静脉异位引流分成四型：心上型占 55%，心内型占 30%，心下型占 12%，混合型约占 3%[1]。本例为心上与心内的混合型，实属罕见。

超声心动图及彩色多普勒超声是目前诊断 APVD 最常规的检查方法，超声对于心脏内部结构及心脏功能的诊断优于其他检查。但是，由于受声窗的限制、远场分辨率及空间分辨率低以及受操作者主观判断等原因限制，对于部分复杂的 APVD，超声并不能准确判断流入、流出道及肺静脉异位引流的方向[2]，因此超声对本例患者也未能做出准确的诊断。心脏造影是诊断先天性心脏病最传统的检查方法，准确率高，但它是一种有创检查，辐射剂量大，并存在一定风险，潜在死亡率为 1%[4]。而 MDCT 和 MRI 心脏大血管成像具有安全、无创的优点，近年来在心血管疾病的诊断上得到了广泛的运用，就诊断而言完全能够替代传统心脏造影检查[1,5]。MDCT 与 MRI 比较，MRI 检查时间长，分辨率不够理想，图像清晰度不如 CT，因此 MDCT 在心血管疾病方面的运用较 MRI 更为广泛。

就超声和 MDCT 对本例患者的检查效果来看，尽管超声提示存在肺静脉异位引流，但由于受远场分辨率的限制，仅仅探查出右上肺静脉及右下肺静脉汇入冠状静脉窦，而左肺上、下静脉显示不清，因此未能作出准确的诊断。采用对比剂增强 MDCT 心脏大血管成像，通过多平面重组、容积再现等重组方式清晰地显示右侧肺静脉及左下肺静脉汇入冠状静脉窦，而左上肺静脉通过垂直静脉汇入无名静脉，同时还对房间隔缺损也做出了准确的诊断，图像质量高，为外科手术计划的制定提供了充分的诊断依据，确保了手术的成功。但 MDCT 在心脏方面的应用也存在一定缺陷，尽管它能够清晰显示肺静脉异位引流的走行及形态变化，对其他先天性心脏病也能够做出准确的诊断，但 MDCT 对心内细微结构和瓣膜的显示并不理想，而超声的优势在于通过动态实时显像可有效观察 MDCT 存在的不足，因此 MDCT 心脏大血管成像与超声检查相结合，也许是目前检查 TPVD 等先天性心脏病最有效、准确的检查模式。

参考文献：

[1] Chowdhury U K, Airan B, Malhotra A, *et al*. Mixed total anomalous pulmonary venous connection：anatomic variations, surgical approach, techniques, and results[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135(1)：106－116.
[2] Kobayashi D, Williams D A, Cook A L. Mixed-type total anomalous pulmonary venous connection[J]. Pediatr Cardiol, 2010, 31(6)：929－930.
[3] Wang Z, Qi W, Hu Y, *et al*. Mixed-type total anomalous pulmonary venous connection in an adult[J]. Ann Thorac Surg, 2011, 91：610－612.
[4] Aggarwal S K, Sai V, Ramnath-Iyer V. Mixed supra- and infradiaphragmatic totally anomalous pulmonary venous connection in an adolescent[J]. Pediatr Cardiol, 2008, 29(4)：858－859.
[5] Ucar T, Fitoz S, Tutar E, *et al*. Diagnostic tools in the preoperative evaluation of children with anomalous pulmonary venous connections[J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2008, 24(2)：229－235.

(收稿：2011-02-11 修回：2011-03-12)
(编辑　张　维)