DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.006

心肌细胞原位亚细胞 Ca^{2+} 定位及定量电子探针微区分析*

迟路湘** 杨宗城 张 宁 陈希炜 黎 莹 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,400038

提 要 **目的**:探讨测定心肌细胞原位亚细胞 Ca^{2+} 定位、定量分布的方法。**方法**:采用改良的 Ca^{2+} 细胞化学技术,并结合X射线电子探针显微分析。**结果**:发现正常心肌亚细胞 Ca^{2+} 以细小颗粒主要分布于肌纤维膜,线粒体内可见散在、单个 Ca^{2+} 沉积。实验测得心肌细胞胞浆 Ca^{2+} 峰背比为 0.231±0.075,心肌细胞线粒体 Ca^{2+} 峰背比为 0.579±0.052。**结论**:证明该方法既在原位保留了 Ca^{2+},又能特异地分析 Ca^{2+} 的含量,是观察超微结构并同时进行 Ca^{2+} 功能代谢变化分析的独特方法。

关键词 钙/分析;心肌;细胞化学;电子探针
中图法分类号 R582

应用 Ca^{2+} 细胞化学技术(Phosphate-Pyroantimonate, PPA 法),能使细胞内 Ca^{2+} 原位沉淀,并在电镜下可见。Suzuki[1]应用PPA技术观察到经常规电镜标本处理后,Ca^{2+} 是唯一不产生丢失、移位的元素。我们采用的X射线EPMA(Electron probe microanalysis)技术是观察超微形态结构并同时进行 Ca^{2+} 功能代谢变化分析的独特方法。

1 方法

1.1 标本制备及 Ca^{2+} 细胞化学步骤[2]

健康Wistar大鼠6只,1%戊巴比妥钠液全麻后,室温下,经主动脉逆灌注固定液(成分:3%戊二醛、90 mmol/L 磷酸钾和1.4%蔗糖,pH7.4),5 min后,取心肌 0.3 cm^3 组织块,浸泡在磷酸固定液中2 h,尔后用磷酸钾缓冲液冲洗。再将组织块切成 100 μm 的切片,置于后固定液(成分:在 0.01 mol/L 醋酸溶液中加入1%四氧化锇和2%焦磷酸锑盐,pH7.4)中固定 2 h,上述过程均采用低温固定,然后常规酒精脱水,Epon-812 包埋醋酸铀染色电镜观察细胞超微结构改变和 Ca^{2+} 定位分布特征。

1.2 Ca^{2+} 定量能谱仪微区分析[3]

将载有经 Ca^{2+} 细胞化学反应的薄片(片厚 100 nm,不染色)的铜网在高真空镀膜机内喷膜,用日立 H-800 分析扫描透射系统 EDX900(9100/60)进行分析,加速电压为 80 kV,探头倾角 20°,扫描面积为 2 μm^2,在 15000 放大倍率下进行,计数时间为 100 s。选出典型的细胞,每个细胞选 20 个区域进行扫描(一半在线粒体内,一半在胞浆内)。通过微机计算 Ca^{2+} 等元素的 Rq 值、p/b(峰背比)。背底连续谱区选在(10~20)kV 区。

2 结果

正常心肌组织的亚细胞 Ca^{2+} 以细小颗粒(焦锑酸钙)、电子密度很高的颗粒状沉淀物主要分布于肌纤维膜,见图 1,T小管内侧,线粒体内偶可见散在、单个 Ca^{2+} 沉积,见图 2。阴性对照组完全没有沉淀出现(图略)。心肌细胞 Ca^{2+} 电子探针微区分析能谱图,见图 3。从图中可以看出 Ca^{2+} 峰在游标处(X射线电子能量为 3.690 Kev)均能达到基线分离,且生物样本中 Ca^{2+} 的测定与其它元素能明显区分。实验测得心肌细胞胞浆 Ca^{2+} 峰背比为 0.231±0.075,心肌细胞线粒体 Ca^{2+} 峰背比为 0.579±0.052。



图 1 心肌细胞内细小颗粒状 Ca^{2+} 主要分布于肌纤维膜 (PPA×39 000)
Fig 1 The fine granule-shaped Ca^{2+} of myocardial cells distributed mainly in sarcolemma (PPA×39 000)



图 2 心肌细胞线粒体内偶可见散在单个 Ca^{2+} 沉积 (PPA×21 000)
Fig 2 Scatter single Ca^{2+} deposit could be seen occasionally in the mitochondria of myocardial cells (PPA×21 000)

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39290700
** 迟路湘,男,35岁,主治医师,讲师,博士,现在心血管内科

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

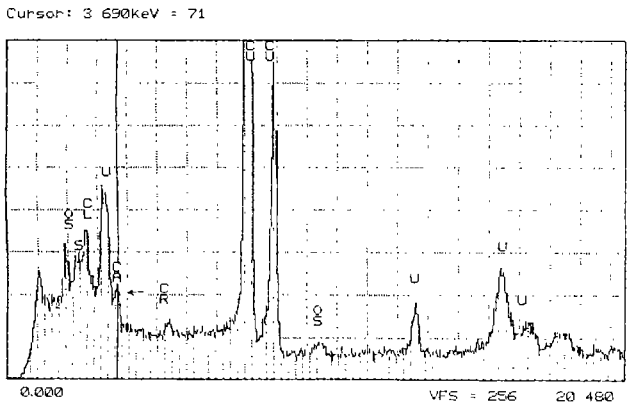


图 3　心肌细胞 Ca^{2+} 能谱分析示意图，其中 X 射线电子能量为 3.690 Kev 的游标处为 Ca^{2+} 峰

Fig 3　Schematic diagram of myocardial cell Ca^{2+} energy spectrum analysis. Ca^{2+} peak is marked by 3.690 Kev in X-ray electron energy

3　讨论

目前采用整块组织或用有机物提取的组织作 Ca^{2+} 测定，不能区分细胞内、外 Ca^{2+}，因此测得心肌匀浆 Ca^{2+} 含量不能反映心肌细胞内 Ca^{2+} 的变化，而 Ca^{2+} 在细胞内的分布是高度隔室化的，形成数个含 Ca^{2+} 浓度不同的 Ca^{2+} 池[1]。本研究采用电子探针，检测心肌细胞内原位 Ca^{2+}，能反映在体时真实情况，灵敏度高，且能对不同亚细胞结构进行检测。

3.1　固定液对沉淀的影响

由于锇酸对组织的渗透比戊二醛快，使得焦锑酸盐的穿透率与锇酸保持一致，在细胞内与 Ca^{2+} 发生沉淀反应，实现原位定位[5]。目前使用较广的一种 Ca^{2+} 沉淀方法是：前固定液由戊二醛和草酸钾组成，后固定液使用锇酸-焦锑酸盐，结果甚为理想。而在室温下固定，沉淀分布易发生改变，对 Ca^{2+} 而言，此时它的浓度已几乎达到固定液中焦锑酸盐溶解度的极限值，不再生成沉淀。为防止这一现象产生，我们采用低温固定，使细胞内阳离子堆积在膜受体位点上，以利于反应的进行。固定时间的长短对沉淀颗粒直径的大小有一定的影响，由于采用低温固定，必然对反应速度有所抑制。就锇酸-焦锑酸盐固定液而言，一般需 4 h 的固定才能使之完全渗入细胞内。

3.2　缓冲液对沉淀的影响

在焦锑酸盐组化技术中以磷酸盐缓冲液用得较为普遍，就 Ca^{2+} 而言，磷酸盐缓冲液的加入对单价离子（Na^+，K^+）的抑制远比对双价离子大[5]，在某种程度上提高了细胞内 Ca^{2+} 沉淀反应的特异性。磷酸盐缓冲液的浓度和 pH 对单价离子的沉淀反应亦有很大影响，适合 Ca^{2+} 的 pH 为 7.4。不论是采用锇酸-焦锑酸盐直接固定，还是以磷酸盐缓冲液-戊二醛作前固定，锇酸-焦锑酸盐作后固定，在一定的 pH 下，都可使细胞内被束缚的或是被隔离的 Ca^{2+} 与焦锑酸盐在原位进行反应，生成沉淀。

3.3　电子探针微区分析

运用 EDX 对沉淀离子进行显微分析，具有：①某些离子沉淀很少，可运用显微分析显示其存在；②焦锑酸盐和阳离子沉淀反应的非特异性，可运用显微分析对沉淀进行鉴别；③阳离子不总是以同样比例和焦锑酸盐结合生成沉淀，可运用显微分析对阳离子浓度进行定量分析。

参考文献

1　Suzuki S, Sugi H. Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by the X-ray microanalysis of cryosectons. Histochemistry, 1989; 92(1): 95

2　刘国树. 心肌不同缺血阶段超微结构改变及 Ca^{2+} 分布特点. 中华病理学杂志, 1994; 23(2): 115

3　窦　鸿，沙继红，赵　麟等. 烫伤早期大鼠肾皮质细胞氧自由基、Ca^{2+} 细胞化学和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性的变化. 第二军医大学学报, 1996; 17(2): 141

4　Clapam D E. Calcium signalling. Cell, 1995; 80(2): 259

5　Simson I A V, Spicer S S. Selective subcellular localization of cations. With variants of the potassium (pyro) antimonate technique. J Histochem Cytochem, 1975; 23(8): 575

（收稿：1997-09-28；修回：1998-06-03）

（编辑　冯崇英）

A modified method of subcellular *in situ* calcium localization and quantitation in myocardial cell by the X-ray electron probe microanalysis*

Chi Luxiang, Yang Zongcheng, Zhang Ning, Chen Xiwei, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing, 400038)

Abstract　Objective: In search of the method for detecting subcellular *in situ* calcium localization and quantitation. Methods: Modified Ca^{2+} cytochemistry technique was adopted and followed by the X-ray elec-

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39290700

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

tron probe microanalysis. Results: Subcellular fine Ca^{2+} granules were distributed in the sarcolemma of normal myocardial cells, while scattered, single Ca^{2+} deposit was distributed in mitochondria. The Ca^{2+} peak/background ratio in cytoplasm was 0.231±0.075 and that in mitochondria was 0.579±0.052, respectively. Conclusion: The study showed that Ca^{2+} could be preserved *in situ*, and analyzed specifically. It is a unique method for ultrastructural observation and functional metabolic analysis of Ca^{2+}.

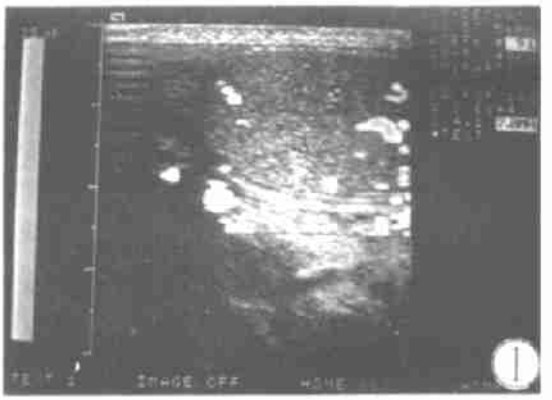
Key words calcium/analysis; myocardium; cytochemistry; electron probe

应用彩色多普勒能量图(CDE)诊断睾丸扭转一例

Report of a case of testicular torsion diagnosed by Color Doppler Energy

李 锐* 郭燕丽 (第三军医大学附属西南医院超声诊断科) 重庆, 400038

患者男性, 13岁, 3 d前不明原因左下腹及腹股沟疼痛, 阵发性加重, 经外院输液抗感染治疗无效, 近1 d疼痛加重并固定于左侧腹股沟及阴囊处。查体: 左侧阴囊明显红肿, 触痛明显, 睾丸及附睾肿大, 压痛明显, 右侧正常。体温37.8℃, 血常规WBC6.1×10³/L。临床初步诊断: ①急性化脓性睾丸炎; ②左侧睾丸扭转。急诊行彩超检查右侧附睾头6.1 mm×7.6 mm, 睾丸上下径33.7 mm, 前后径19.0 mm, CDFI及CDE检测, 睾丸附睾均探及丰富的点状及短棒状血流信号, 见图1。左侧附睾头21 mm×12 mm, 睾丸上下径33 mm, 前后径25 mm, 肿大呈球形, 回声减弱且不均质, 附睾及睾丸周围鞘膜腔内可探及3.0 mm～3.3 mm液性暗区, CDE显示睾丸及附睾无血流信号, 而阴囊皮下组织中有丰富血流环绕睾丸及附睾, 见图2。诊断为睾丸扭转, 行急诊手术, 术中见左侧睾丸及附睾顺时针方向扭转360°, 已坏死, 经热敷及利多卡因封闭, 观察30 min后12号针穿刺仍无血液溢出, 即切除睾丸及附睾。病理诊断: 睾丸组织出血坏死。



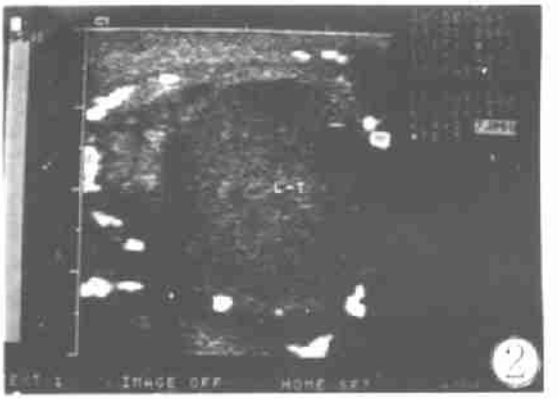


图1 患者右侧睾丸及附睾大小形态正常, 睾丸内显示丰富的点状及短棒状血流信号
图2 患者左侧睾丸及附睾肿大, 回声减弱且不均质, 睾丸内血流信号消失

讨论

睾丸扭转, 又称精索扭转, 好发于青少年, 部分患者也可无明显诱因[1]。睾丸扭转与急性睾丸炎, 临床上均表现为腹股沟及阴囊疼痛红肿, 睾丸及附睾肿大压痛, 鉴别诊断困难, 尤其是在没有明显诱因时, 睾丸扭转时睾丸及附睾血液循环受阻, 静脉先于动脉, 睾丸及附睾组织发生水肿、出血及变性坏死。声像改变为睾丸附睾肿大, 回声减弱不均匀, 组织结构紊乱, 血流信号减少或消失, 后者出现较早且特异性强[2], 附睾血供通畅, 受到睾丸非感染性炎症刺激, 阴囊表现为充血, 为超声彩色多普勒成像鉴别睾丸扭转与急性睾丸炎提供了良好的解剖和病理背景。因此, 临床上发现患者有上述症状体征者, 应及时进行超声诊断检查。

关键词 睾丸疾病; 超声, 多普勒
中图法分类号 R697.22

参考文献

1 朱有华 主编. 泌尿外科诊疗手册. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 379～380
2 Patriquin H B, Yazbecks, Trinh B. Testicular torsion in infants and children: diagnosis with Doppler sonography. Radiology, 1993; 188(6): 781

(收稿: 1998-01-05; 修回: 1998-06-17)
(编辑 冷怀明)

* 李 锐, 男, 35岁, 副教授, 博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net