DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.03.004

激光共聚焦扫描技术在滑膜细胞波形蛋白形态学研究中的应用*

张正治 刘正津 (第三军医大学基础部解剖学教研室)重庆,630038
罗深秋 鲍永跃 张 薇 (第一军医大学基础部中心仪器室)广州,510515

提 要 激光共聚焦显微镜技术应用于细胞内骨骼波形蛋白(Vimentin)中间丝在人滑膜细胞中分布的研究。该技术包括滑膜细胞的分离和培养,用抗Vimentin荧光抗体对细胞内骨骼染色,在粘附式细胞人选仪(ACAS 570)上进行激光共聚焦扫描及三维图重建。获得了较理想的图像质量。本文对激光共聚焦扫描的光学原理,各实验步骤及技术参数作了较详细的报道。

关键词 激光共聚焦扫描技术;波形蛋白;三维图像重建
中图法分类号 R329.24

激光共聚焦显微镜(Confocal Scanning Laser Microscopy,CSLM)自80年代初问世以来,较好地解决了扫描过程中荧光标本的光漂白等作用,图像清晰度高,为定量研究提供的信息准确可靠,特别实用于观察较大标本的内部组织结构,已被广泛应用于医学生物学领域和工业固体材料的显微结构研究[1]。作者在粘附式细胞仪(Adherent Cell Analysis and Sorting,ACAS 570)上采用CSLM和三维图像重建方法,对体外培养滑膜细胞波形蛋白(Vimentin)进行了形态学观察,取得较好效果。现将有关的方法介绍如下。

1 材料准备

1.1 滑膜细胞的分离和培养

1.1.1 取材与细胞分离 滑膜细胞取材于成年男性截肢手的尺侧滑膜囊,经注射消化法获得一次消化下来的细胞,经离心,去上清液后将沉淀的细胞悬液计数(3×10^6),进行细胞培养。

1.1.2 细胞培养 把消化、离心出的滑膜细胞接种到无菌培养皿中,加入含有10%小牛血清的DMEM F-12培养液(培养基为Sigma公司产品),置于37℃,5%CO_2的孵箱内培养。每2~3 d更换一次培养液。在倒置显微镜下观察细胞的生长过程。原代培养第10天,长满培养皿的底壁。用0.25%胰蛋白酶和0.02%EDTA 1∶1混合消化液消化,离心,进行传代培养于有盖玻片的培养皿上。

1.2 免疫组化标本制作

将传代培养第4天的盖玻片固定24 h,PBS漂洗3次,共15 min,0.2%Trition X-100处理30 min,0.03%H_2O_2/甲醇封闭10 min,BSA封闭10 min,1∶100鼠抗猪Vimentin抗体4℃孵育24 h,再用1∶200 FITC标记的羊抗鼠IgG(中国军事医学科学院微生物流行病研究所提供),室温下反应1 h。各步之间均经PBS漂洗3次,共15 min。封片,待检。

2 实验方法

2.1 ACAS激光共聚焦扫描

将体外培养的成人滑膜细胞,经抗Vimentin抗体免疫荧光染色后,置于粘附式细胞分选仪(ACAS 570)上,打开激光共聚焦扫描显微镜的激光光源,找针孔定位后,在可见光下寻找待检细胞。本实验设置的激光共聚焦的各种扫描参数为:

Parameters for C:ZL4

PMT Setting:	38%	Z points:	40
Detector:	1	Stage Speed:	1.10mm/sec
Step Size:	0.20μm	Scanning Strength:	30%
Z Step:	0.10 μm	Laser Power:	100mw
X Points:	512	Samples/Pt:	32
Y Points:	480	Confocal:	YES
		Pinhole:	225μm

粘附式细胞分选仪(ACAS)将按指令对待检细胞进行激光共聚焦自动扫描,每个断层扫描厚度为0.1 μm,ACAS将扫描的信息自动存在计算机内。

2.2 ACAS三维图像重建

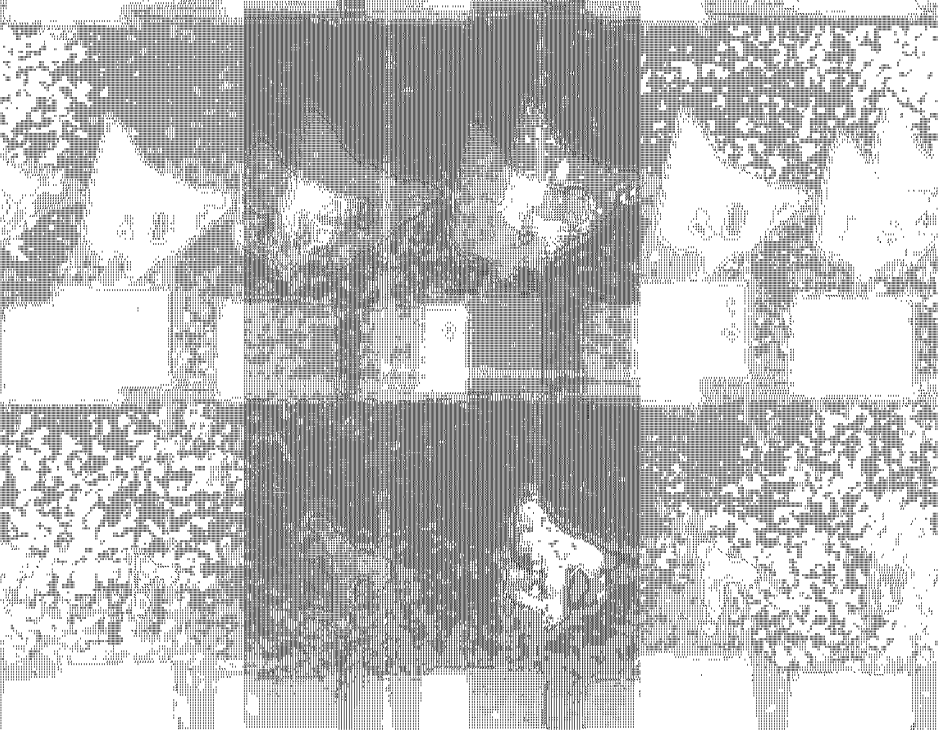
将激光共聚焦断层扫描的信息,用SFP(Simulated flouresscence process)法进行伪彩色三维重建,重建图像的各种信息均可在屏幕上显示,并可经视频打印机打印出结果,用计算机图像记录仪将结果拍照在彩色反转片上。本实验设置的参数为:

C:\zzz\z11\zL3

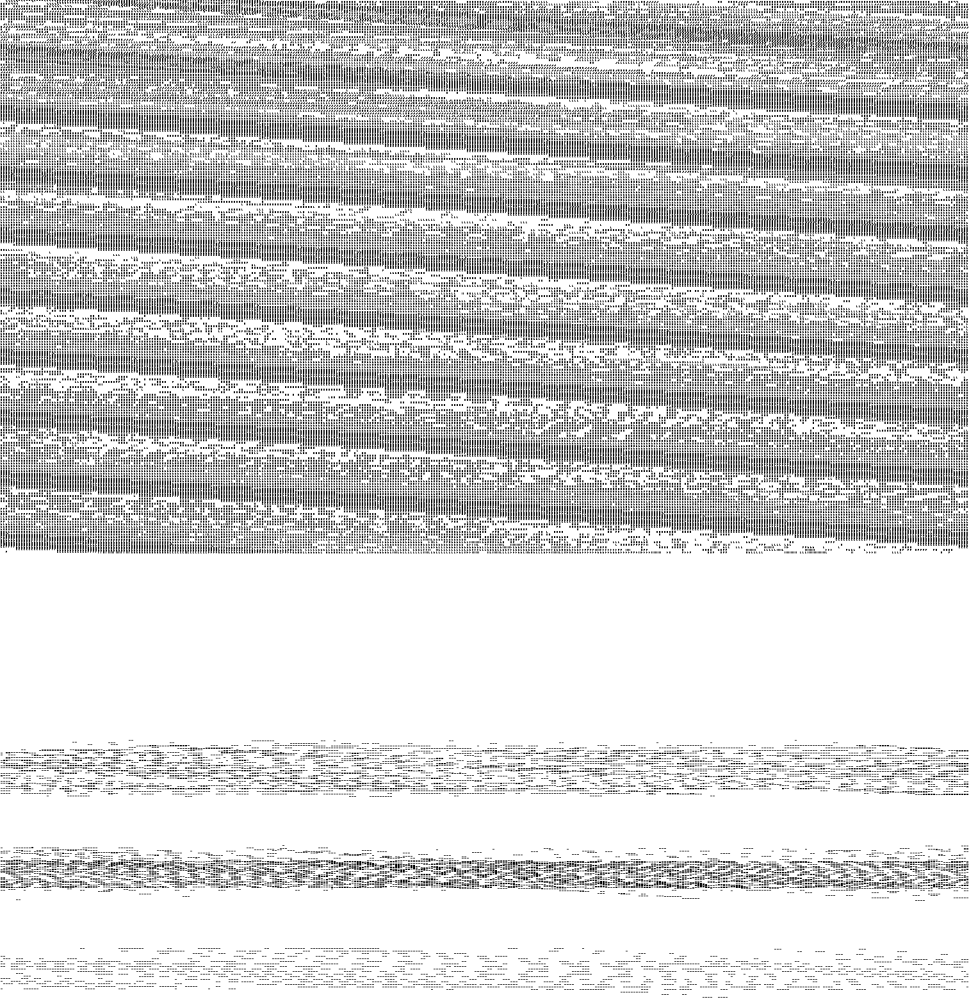
F1	File name C:	ZL3	F2	Out name	L1
F3	St Slice	100	F4	Plot	NO
F5	End SLice	0	F6	Slice Inor	1
F7	Illum Anal	60°	F8	Bkgd Brite	25%
F9	Opcity	25%	F0	Replicate	NO

* 国家自然科学基金资助项目,No.39070825

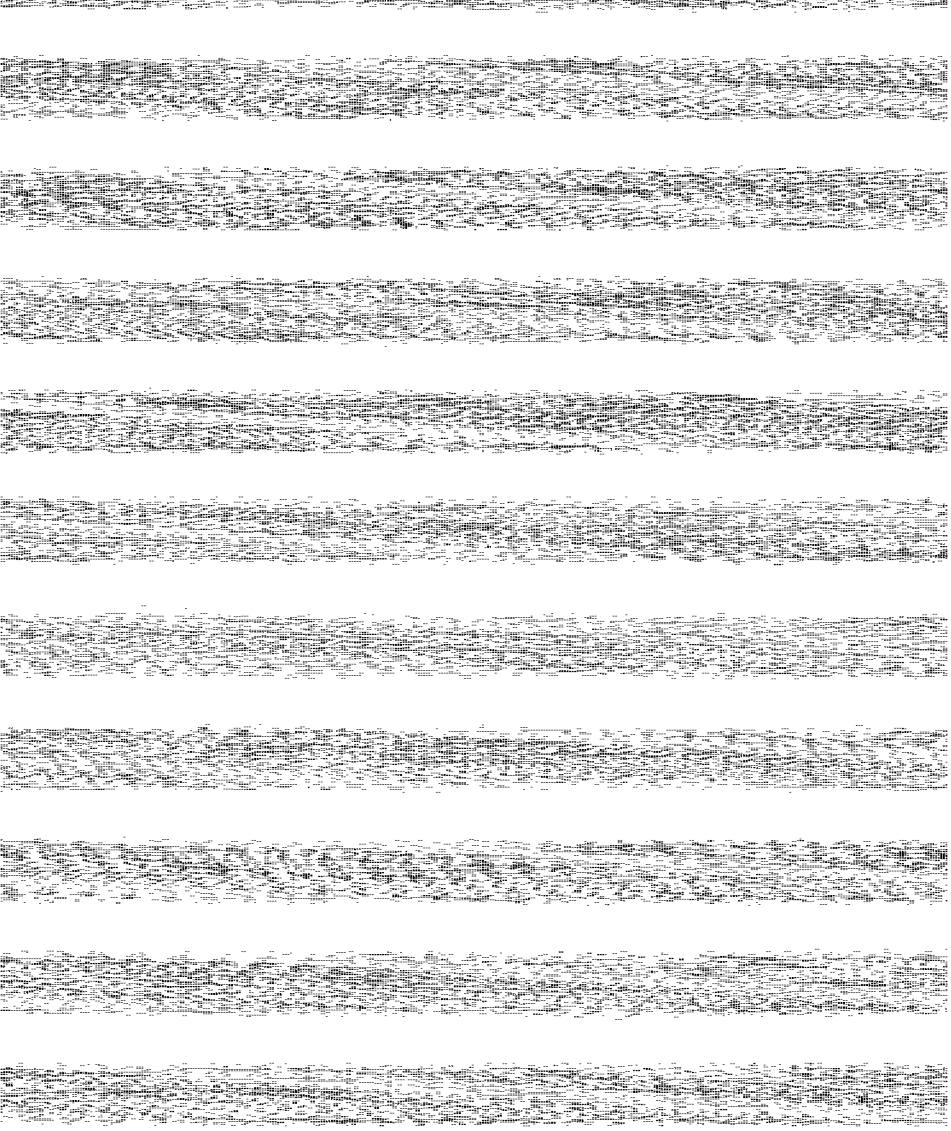
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



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



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



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

置被重复照射，使样品遭受极少的光漂白和极少的光损伤。激光照明系统是在每一像素点上闪光高达256次，来测量极其暗淡模糊的样品进行扫描平均，而不是多次扫描平均，从而极大的提高了信噪比，保证了扫描过程中任一平面，任一点上保持着原有信息量不变。

4.3 ACAS三维图像重建的应用及其评价

立体形态结构研究是当代形态科学发展的重要方向之一。三维立体图像能够原位地、直观地、精确地展示出被研究对象，特别是微观结构内部的空间构形。随着电子计算机的问世，这一研究领域不断扩大蓬勃发展，已广泛应用于生物医学研究的许多学科。但是要获得高质量的三维图像还受到许多方面的限制。在硬件方面，由于三维图像的数据信息量大，所以要求存储量大，运算速度高的计算机。国外目前大多采用中、小型机或专用机[4]。而国内大多采用微机[5]。在软件方面，目前大多数是针对某一特定的研究目的自行设计的非商业性软件，通用性差，难以适应不同的研究目的。在性能、质量、兼容性等方面都还不成熟。在信息输入方面，大多采用切片、照片、幻灯片等，图像质量受到切片的厚度、组织的固定与染色、人工操作的干扰等因素影响。且重建的图像大多也仅是外形轮廓重建[6]。

本实验在ACAS 570上，将体外培养的成人滑膜细胞骨架结构vimentin进行三维图像重建，首次获得了vimentin中间丝在细胞内形态分布的立体图像。该图像准确逼真地反映了vimentin细微的立体形态特征。这是因为在本实验中，①ACAS 570较好地解决了上述存在的问题，ACAS 570匹配的电脑是486微机CPU和NPP均为80486DX，速度快(50 MHz)，内存容量大(32MB)，外围设备齐全(34MB硬盘、650MB光盘、HP彩色绘图机、在线照相机、高频打印机等)。为图像数据处理提供了可靠的保证。②本实验的数据采集过程是通过先进的CSLM进行的，Z轴步进距离仅0.1 μm，整个数据采集过程完全是在电脑控制下自动进行的。③被显示结构特异性强。结构特异性取决于特异性的荧光探针(抗体)。这是建立在免疫学的抗原抗体结合的理论基础之上的。所得的结果准确可靠。④ACAS 570备有丰富的普通软件及专业软件，微机和用户直接对话全菜单操作。

参考文献

1 Knoester A, Brakenhoff GJ. Applications of confocal microscopy in industrial solid materials: some examples and first evaluation. J Microsc, 1990;157:105

2 Wite JG, Amos WB, Fordham M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures of fluorescence light microscopy. J Cell Biol, 1987;105:41

3 Vassy J, Rigaut JP, Hill A—M et al. Analysis by confocal scanning lasser microscopy imaging of the special distribution of intermediate filaments in foetal and adult rat liver cells. J Microsc, 1990;157:91

4 左焕琛. 电子计算机三维重建用于手解剖研究的初步探讨. 解剖学杂志, 1986;9(4):237

5 应大君，何光篪. 肌内动脉树的数学表达和在微型计算机三维图形重建. 第三军医大学学报, 1988;10(suppl):55

6 黄泽齐，左焕琛，陈丽琏等. 婴幼儿法乐氏四联症房室结和房室束的外科解剖及计算机三维重建Ⅱ. 光镜形态与计算机三维重建. 解剖学杂志, 1992;15(6):411

(收稿：1994-08-31；修回：1995-03-16)

Morphological study of vimentin of synovial cells with laser cofocal scanning microscopy

Zhang Zhengzhi, Luo Shenqiu, Liu Zhengjin, Bao Yongyue, Zhang Hui (Department of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The spatial distribution of cytoskeleton vimentin intermediate filaments of human synovial cells was studied with laser cofocal scanning microscopy (LCSM). The technique consisted of the isolation of synovial cells and their culture staining of immunofluorescent antibodies against vimentin optical section of LCSM and three-dimensional imaging reconstruction of vimentin cytoskeleton on adherent cell analysis and sorting apparatus of model ACAS 570. The perfect stereopictures of cytoskeleton were obtained. The detailed descrition about the optical principle of LCSM and the procedure of every step of the technique and its parameters was presented.

Key words laser cofocal scanning microscopy; vimentin; three dimensional imaging reconstruction

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