DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.04.003

定量观察大鼠肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞紧密连接冷冻蚀刻的形态学差异

朱国标 王正国 王声文（野战外科研究所）

提 要 应用冷冻蚀刻电镜技术对正常大鼠的肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞的紧密连接进行了形态测量。结果显示两者在（1）索条数（4.54±1.86，2.64±0.67根）；（2）紧密连接宽度（0.399±0.268，0.175±0.077μ）；（3）紧密连接面积（0.353±0.35，0.11±0.098μ²）；（4）索条总长（3.97±3.5，1.47±0.916μ）及（5）索条形态和紧密连接构成方式有非常显著的差异。文中对上述两者间差异的功能意义作了讨论。

关键词 冷冻蚀刻—方法；毛细血管—细胞学；肺泡—细胞学

肺泡上皮细胞与毛细血管内皮细胞紧密连接（Tight Junction，TJ）的功能及形态学差异已为一些研究所证实[1-4]，但以往的研究多侧重于形态学的描述，形态测量资料较少。本实验旨在应用冷冻蚀刻图像的形态测量技术，阐明肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞TJ的结构特征及两者间的差异程度。

材料与方法

12只体重为150～200g成年健康雌性大鼠以5mg/100g体重戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。开胸经肺动脉以3%戊二醛/0.1mol/L二甲砷酸钠缓冲液灌注固定15～30min（灌注压力低于6.67kPa）。切取部分肺组织作光镜及电镜标本，以确定肺有无病变。另切取一些2mm大小的组织条作冷冻蚀刻样本。标本以30%甘油生理盐水抗冻8h，在液氮内完成冷冻，用HUS-5GB型真空镀膜仪的冷冻蚀刻附件进行冷冻蚀刻复型制样，JEM-100SX型电镜观察，以×25 000或×50 000拍摄TJ结构，分别以0.5cm及1cm方格网重合于TJ长轴洗印照片，这样照片上均覆盖有边长为0.2μ的方格（图1，2）[6][7]。然后参照Yoneda[6]及郑富盛[7]的方法采集数据。以每根与TJ长轴相垂直的方格线部作为数据采集点。例如TJ索条或浅沟在这条线上有五个交点（不相交不算），即为五根索条，然后将所得到数据和与方格线数相除得出TJ平均索条数。

TJ参数：（1）索条数（根）：在每根垂直于TJ长轴的方格线上计算索条或浅沟数，然后将得出的数据和与方格线数相除，得到平均索条数；（2）TJ宽度（μ）：在每条垂直于TJ长轴的方格线上测量TJ宽度，然后求其平均值；（3）索条密度（根/μ）：索条数－1/TJ宽度，反映索条的平均疏密程度。减1是按一般计数原则，即取一边舍一边；（4）TJ面积（μ²）：TJ平均宽度与TJ平均长度的乘积；（5）索条总长（μ）：TJ平均长度与索条平均数的乘积，对于PF面（Protoplasmic Fracture Face，PF）的毛细血管内皮细胞TJ仅作形态学描述。

数据处理：各参数以平均数±标准差表示，组间资料以“PDA-2”医用统计程序进行均数间比较[8]，以$P<0.05$为显著性界限。

结 果

一、肺的大体、光镜及常规电镜观察

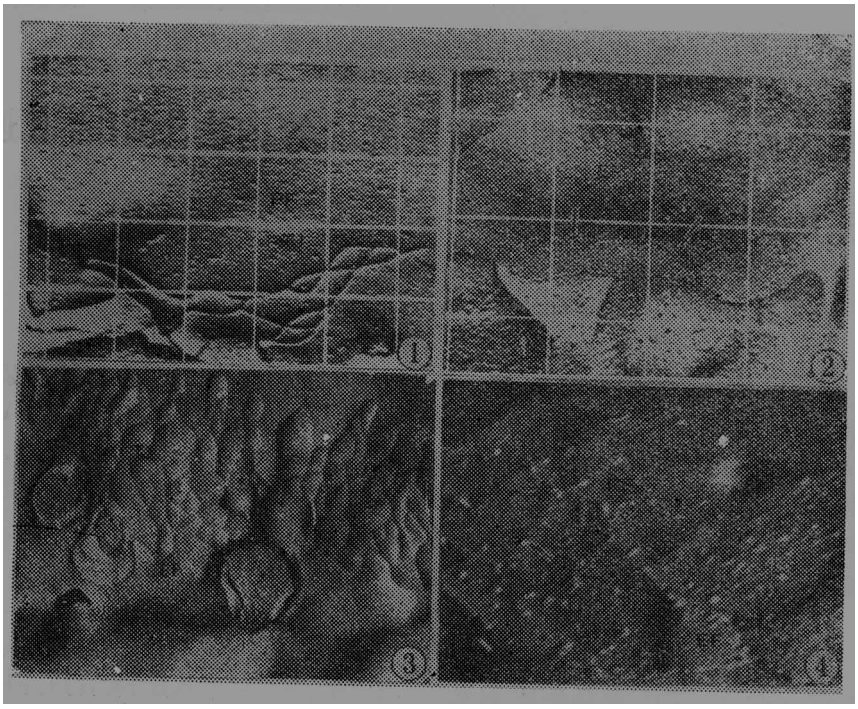
未发现肺组织有异常改变，电镜观察见肺泡上皮细胞TJ多位于上部或上中部，毛细血管内皮细胞TJ多位于中部，部分位于中上部或基底部。

二、肺冷冻蚀刻电镜观察

本研究共制作95个冷冻蚀刻复型膜，观察了118个细胞TJ。

1. TJ的基本形态：肺泡上皮细胞TJ索条在PF面呈嵴状，这些嵴状索条相互吻合成网（图1），在EF面（Extracellular Fracture Face，EF）呈与PF面相互补的浅沟，浅沟内偶见因冷冻断裂时从PF面上剥离下来的短索条（此时PF面上的索条

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



则出现中断）（图2）。肺毛细血管内皮细胞TJ索条在EF面由相互连续的颗粒构成，这些索条多平行排列位于浅沟内（图3）；在PF面呈与EF面相互补的宽嵴，嵴上可见残存的颗粒（此时在EF面即可见到索条有颗粒缺失）（图4）。

图1　大鼠肺冷冻蚀刻电镜照片。图中显示肺泡上皮细胞TJ在PF面的外观。TJ索条呈嵴网状排列。箭头所指方向(⇧)为铂投影方向。方格边长为0.2μ。×68 000

图2　大鼠肺冷冻蚀刻电镜照片。图中显示肺毛细血管内皮细胞TJ在EF面的外观。颗粒索条平行排列，位于浅沟内，颗粒之间有间隙（↑）箭头所指方向(⇧)为铂投影方向。方格边长0.2μ。×97 500

图3　大鼠肺冷冻蚀刻电镜照片。图中显示肺泡上皮细胞TJ在EF面的外观，TJ由网格样浅沟组成，其中可见PF面（●）的嵴状索条。箭头所指方向（⇧）为铂投影方向×53 000

图4　大鼠肺冷冻蚀刻电镜照片。图中显示肺毛细血管内皮细胞TJ在PF面的外观。TJ由稍微突起的宽嵴组成，其上有少数颗粒。另可见EF面的TJ。箭头所指方向（⇧）为铂投影方向。×125 000

2. TJ的形态测量数据：表1～5

讨　论

细胞TJ是多细胞生物细胞之间一种最重要最广泛的细胞连接，其结构的完整，索条的多寡、组成的差异将直接影响有机体的功能，在此着重讨论肺泡上皮细胞与毛细血管内皮细胞TJ的冷冻蚀刻形态学差异及其与功能的关系。

一、肺泡上皮细胞与毛细血管内皮细胞TJ的冷冻蚀刻形态学差异　本次研究发现两者间存在以下几方面的差别：（1）索条的构成不同。肺泡上皮细胞TJ的索条为连续的嵴，较窄且深，与互补面嵌合较紧；而毛细血管内皮细胞TJ索条由颗粒排列而成，颗粒间存在有一定间隙。Schneeberger[4]认为这是某些大分子通透的形态学基础。(2)索条所在裂面不一样。经戊二醛固定的样品，肺泡上皮细胞TJ索条位于PF面，而毛细血管内皮细胞TJ索条位于EF面的浅沟内。（3）TJ复杂程度不一样。肺泡上皮细胞TJ索条数多，且相互吻合成网（表1），这种结构即使某一部分索条破坏，也不会导致整个TJ屏障功能的丧失。毛细血管内皮细胞TJ索条数量少，而且很少吻合呈网。Claud[9]认为索条数多少，是决定TJ屏障功能强弱的重要因素之一。（4）TJ宽度不一样（表

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

2）。肺泡上皮细胞TJ宽度为毛细血管内皮细胞TJ宽度的2.28倍，但是组成两者TJ的索条密度非常相近（表3），这表明两者差异是因索条数不同造成的。（5）TJ面积及索条总长不一样（表4、5）。这两个参数均与TJ长度有关（这里所指的是断裂面上显示出来的TJ长度）。其除了与细胞大小及细胞表面形态有关外，还与细胞膜内脂质双分子层的结构，病理状态等因素有关，在疾病状态下，其可以作为观察TJ有无破坏或增生的指标。

表1　TJ 索 条 数（根）

	TJ数	最小值	最大值	平均值±标准差	P值
肺泡上皮细胞	61	1.67	14	4.54±1.86	<0.0001
毛细血管内皮细胞	53	1.33	4.5	2.64±0.67	

表2　TJ 宽 度（μ）

	TJ数	最小值	最大值	平均值±标准差	P值
肺泡上皮细胞	61	0.1	1.475	0.399±0.268	<0.0001
毛细血管内皮细胞	53	0.035	0.34	0.175±0.077	

表3　TJ 索 条 密 度（根/μ）

	TJ数	最小值	最大值	平均值±标准差	P值
肺泡上皮细胞	61	4	18.25	9.83±3.32	0.2344
毛细血管内皮细胞	53	5	17.86	10.02±3.01	

表4　TJ 面 积（μ^2）

	TJ数	最小值	最大值	平均值±标准差	P值
肺泡上皮细胞	61	0.025	1.9	0.353±0.35	<0.0001
毛细血管内皮细胞	53	0.0175	0.6	0.11 ±0.098	

表5　TJ 索 条 总 长（μ）

	TJ数	最小值	最大值	平均值±标准差	P值
肺泡上皮细胞	61	0.46	18.25	3.97±3.5	<0.0001
毛细血管内皮细胞	53	0.06	5.4	1.47±0.84	

二、TJ与屏障功能的关系　冷冻蚀刻电镜下观察到的细胞TJ，并不是真实的细胞间连接，而是细胞膜内脂质双分子层类脂分子的一种特殊排列形式。但是大量研究表明这种排列与细胞间TJ有明显的相关性[1-4]。

文献表明血气屏障的功能与肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞TJ的形态密切相关：（1）TJ 形态的复杂程度与屏障功能 呈 正比。如肺泡上皮细胞TJ由嵴状索条交错排列而成，故仅能通过某些离子、水及小分子物

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

质[4]，而毛细血管内皮细胞TJ由颗粒性索条平行排列而成，所以能够通过象辣根过氧化酶这样的大分子物质[1][4]。(2)TJ形态与机能状态相适应。如人的肺底部毛细血管内皮细胞TJ索条数明显多于肺尖部毛细血管内皮细胞TJ索条数，据认为这是因为前者承受的静水压较高[6]。(3)TJ破坏程度与通透性呈正比。渗透性肺水肿时，TJ索条出现中断、游离或消失，此时TJ可以通过象铁蛋白，血红蛋白这样的大分子[10-12]。

参考文献

1. Schneeberger EE, Karnvosky MJ. Substructure of intercellular junctions in freeze-fracture alveolar-capillary membranes of mouse lung. Cir Res 1976; 38:404～411
2. Yoneda K. Fluid-overload pulmonary oedema in mice: the intercellular junctions of bronchiolar epihelium and arterial endothelium. Br J Exp Path 1983; 64:215～224
3. Perry MA. Capillary filtration and permeability coefficients calculated from measurements of interendothelial cell junctions in radbit lung and skelital muscle. Microvasc Res 1980; 19:142～157
4. Schneeberger EE, Lynch RD. Tight junctions-their structure, composition and function. Cir Res 1984; 55:723～733
5. 李文镇主编。组织细胞冷冻复型电镜图谱。北京：人民卫生出版社，1981
6. Yoneda K. Regional differences in the intercellular jnnctions of the alveolar capillary membrane in the human lung. Am Rev Respir Dis 1982; 126:893～896
7. 郑富盛。细胞体密度特征参数的测算方法。细胞生物学杂志 1984；6:80～83
8. 苑锡光，等编著。以电子计算机为工具的医用统计分析。第一版。成都：四川科学技术出版社，1985
9. Claude P, Goodenough DA. Fractnre faces of zonulae occludentes from "tight" And "leaky" epithelia. J Cell Biol 1973; 58: 390～400
10. Wang Zheng-guo. The effect of oxygen intoxication on the morphology of intercellular junctions on pulmonary endothelium and alveolar epithelium:a freeze-fracture study. Chi Med J 1987; 100:177～184
11. Fishman AF, et al. Pulmonary edema. Waverly Press. USA, 1979
12. Brody JS, et al. Binding of charged ferritin to alveolar wall components and charge selectivity of macromolecular transport in permeability pulmonary edema in rats. Cir Res 1984; 55:155～167

(收稿日期：1987年11月10日，修回日期：1988年5月5日)

Morphological Differences in the Tight Junction of the Freeze-etched Alveolar Epithelium and Capillary Endothelium in Normal Rat with Morphometry

Zhu Guobiao, et al

(Research Institute of Surgery, Third Military Medical College)

One hundred and fourteen tight junctions of the alveolar epithelium and capillary endothelium in rat lungs were studied with morphometry by freeze-etching technique. Statistically, there was highly significant difference in the following

(下转297页)

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

Study on the Prophylactic Effect of Folic acid on the Toxicity of Nitroquine

Hu Youmei and Nie Mei

(Department of Pharmacology, Third Military Medical College)

232 mice were utilized in this study. (1) After administration of nitroquine 570mg/kg×1 po, the mice were given with normal saline(NS)and folic acid(NF,8 mg/kg×1 im)in two subgroups respectively. 96h later, decrease in number and shorter in length of intestinal villi, and necrosis of epithelial cells, especially the crypt cells showed markedly in NS group, but much mild in NF group. (2) The DNA contents in the tissue of the small intestine showed decrease after nitroquine administration, & markedly in the larger dose and as the time going on. The values of cpm after the[^{3}H] TdR incorperation into DNA were much higher in NF group than in the NS group. The results suggest that the DNA synthesis in small intestine is promoted by folic acid, so that it is advantage for the repairing of damaged intestinal mucosa.

Key words: Folic acid/pharmacodynamics; Nitroquinolines/toxicity; DNA/biosynthesis; Poisoning/prevention and control

---

(下转292页)

five aspects between alveolar epithelium and capillary endothelium: (1) Number of strands (4.54±1.86; 2.64±0.67). (2) Width of tight junction (0.399±0.268; 0.175±0.075 micron). (3) Area of tight junction (0.353±0.35; 0.11±0.098 square micron). (4) Total length of strands (3.97±3.5; 1.47±0.916 micron). (5) Morphology of strands and pattern of the tight junction. However, there was no significant difference in density of strands of tight juuctions between the alveolar epithelium and capillary endothelium. The functional significance of these differences between alveolar epithelium and capillary endothelium was discussed in detail.

Key words: Freezing etching/method; Capillaries/cytology; Pulmonary alveolo/cytology

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