

金鱼成熟红血细胞的超微结构研究*

傅莉娟 高 平 严绍颐

(中国科学院发育生物学研究所,北京)

关键词 成熟红血细胞、冷冻蚀刻技术、超微结构、金鱼

Weinreb^[1] 首先报道了利用电镜超薄切片技术对金鱼红细胞超微结构的观察,但此项观察比较简单。近年来有关鱼类血细胞超微结构研究的报道较少,为了进一步了解硬骨鱼类成熟红细胞的精细结构。本文以金鱼 (*Carassius auratus*) 为材料通过扫描电镜观察了它的外部形态,并主要应用透射电镜的冷冻蚀刻技术对其外周血成熟红细胞的亚显微结构进行了研究。鉴于国内迄今尚未见到利用冷冻蚀刻技术研究鱼类红细胞的报道,因此本实验所报道的内容将为有关红细胞超微结构的研究提供一种实用的方法和比较精确的资料。

一、材料和方法

金鱼隶属于鲤科 (Cyprinidae) 鲤亚科 (Cyprininae) 鲫属 (*Carassius*) 的一种硬骨鱼类。实验用金鱼取自本所鱼场的两年龄鱼,体重约 80g。

从金鱼尾部侧线鳞下用肝素浸润过的无菌注射器取血 2ml,将血液移入 2.5% 的戊二醛液 (磷酸缓冲液配) 中固定 30—60min,用 0.1mol/l 磷酸缓冲液 (pH7.3) 按离心法漂洗三次,所得的沉淀物均为血细胞(绝大部分是红血球)。然后把沉淀物分为两份:一份放入 30—100% 的乙醇中逐级脱水,用吸管将少量红血球滴在已用多聚赖氨酸浸渍过的 4mm × 5mm 长方形盖玻片上,使其自然铺展开。再换入乙酸异戊酯液浸渍 1h,用日立 HCP-2 型临界点干燥仪进行二氧化碳临界点干燥。干燥后的样品移入日立 IB-3 型离子溅射仪中做金离子溅射。日本电子 JSM-T200 型扫描电镜观察。

另一份沉淀的血细胞用于冷冻蚀刻的样品制备。先将其放入 30% 的甘油中浸渍 2—4h,然后取少量红血球装入样品杯内并快速插入液氮中冷冻。使用日本电子公司生产的 JEE-4X 真空喷镀仪和 EE-FED·B 型冷冻蚀刻附件进行样品的冷冻断裂、蚀刻和喷镀铂炭操作。然后选用 70% 的次氯酸钠腐蚀掉组织,分离后的复型膜用重蒸水漂洗几次,除去残留物和尘污。最后捞在无支持膜的 400 目铜网上,用日本电子 JEM-100S 透射电镜在高压 80kV 下观察。

二、观察结果

扫描电镜观察:金鱼成熟红细胞的形态为扁平椭圆状有核细胞(见图 1)。它是金鱼外周血中含量最高,数目最多的一类细胞,约占各种血细胞总数的 90%。它的平均大小为 $8.5\mu\text{m} \times$

本文 1987 年 11 月 17 日收到。

* 本实验工作受中国科学院重点课题资助和美国洛氏基金会 RF 84031 基金资助。

12.8 μm ，细胞核位于细胞中央，核的长轴平行于细胞的长轴。

冷冻蚀刻样品的透射电镜观察：(1) 金鱼成熟红细胞的细胞核(N) 在不同的细胞中形态有所变化。有些细胞中核的表面较光滑(见图 2)，另一些细胞中核的表面则凹凸不平(见图 3)。

(2) 根据 Branton^[2] 对冷冻断裂面的命名法，从对细胞断裂后 E 半膜和 P 半膜的观察发现，细胞核孔(Np) 贯穿两层核膜之间，且在核中分布较均匀，个体较大(见图 4)。核孔的形状在不同膜面上也有所区别，EF 面上的核孔多呈圆屋顶状或圆柱状的孔(见图 4)。而 PF 面上的核孔则多呈边缘隆起，四周呈环形的小窝，在小窝中央还可见到一隆起的小点(见图 3)。一般来说 EF 面和 PF 面上的核孔结构总是凹凸相对，彼此可以嵌合。

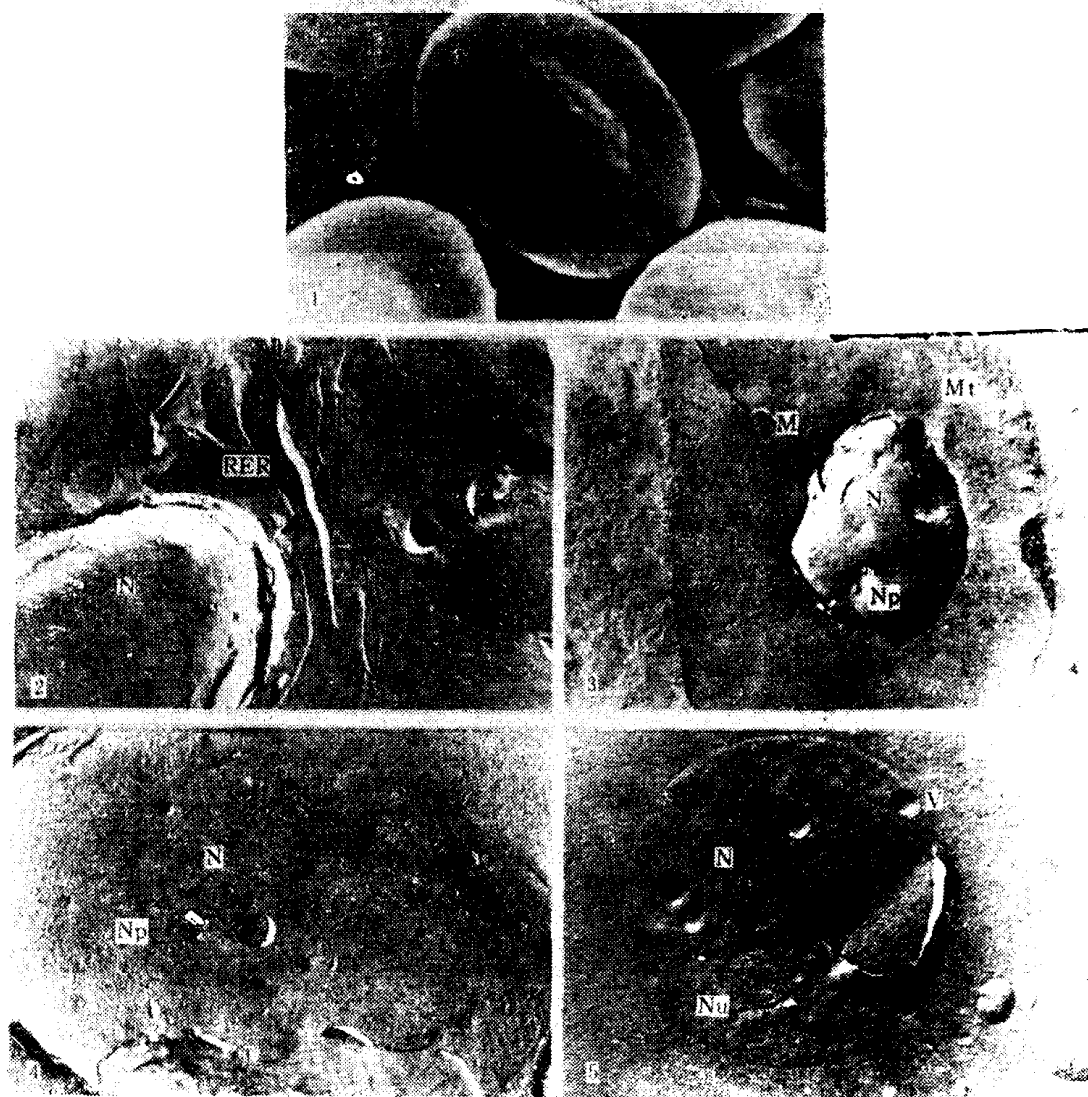


图 1—5

1. 金鱼红血细胞扫描电子显微镜照片示细胞外部形态呈椭圆状。×4200； 2. 透射电子显微镜观察的冷冻蚀刻图象。金鱼红血细胞的细胞核(N)，粗糙型内质网(RER)。×9100； 3—5. 金鱼红血细胞冷冻蚀刻图象。细胞核(N)、核孔(Np)、线粒体(Mt)、微管(Mt)、核仁(Nu)、液泡(V)。

图 3 ×7100，图 4 ×14000，图 5 ×16100

(3) 在有些核内还能观察到一至数个由凹陷浅沟状的索盘绕不定形部分所形成的核仁结构,它们集中分布在核内的某一区域。其中索状结构可能即为核仁丝,核仁的外形基本呈圆形(见图5)。

(4) 在少数细胞核内还可观察到一至数个形态、大小较为规则的圆球状液泡。液泡内容物的颗粒很小,有些液泡的界膜与核膜相连(见图5)。

(5) 膜内颗粒的分布在断裂开的两个互补半膜上大多是不对称的。PF面上的颗粒较多,EF面上的颗粒则较少。根据现在较为公认的生物膜的液态镶嵌模型学说^[3],这些膜内颗粒可能即为镶嵌于脂类双分子层中的蛋白质微粒。

(6) 在金鱼成熟红细胞的细胞质中,均匀分布着大量血红蛋白微粒(HbP),同时也观察到了少量呈退化状的细胞器。线粒体(M)呈小圆球形,有较为明显的内、外两层膜及二膜之间的间隙,内膜向基质中伸入形成少量隆起的嵴(见图3)。细胞质内还存在少量粗面内质网(RER),呈板层样排列(见图2)。当内质网被纵着断裂后,可显现出一长条膜面,在此膜面上有很多核蛋白体颗粒均匀分布。此外在靠近边缘的细胞质中还观察到了一些管状或圆孔状结构,它们的分布较集中(见图3)。从这些结构的形状和位置我们推测其可能是边缘微管(Mt)结构。

三、讨 论

鸟类、两栖类和鱼类的成熟红细胞都是有细胞核的细胞。从以上观察结果来看,金鱼的成熟红细胞是一种结构比较简单的细胞。在细胞质中除存在着少量呈退化状的细胞器外,其主要成分是血红蛋白微粒。在蛙和其它的有核红细胞中,Grasso等^[4]曾提出:由于核膜孔的存在可使部分血红蛋白由细胞质进入核质中。

Phillip和Donald^[5]曾分别提出核孔复合体模型。他们认为在核孔的周围有八对排列规律的球状颗粒,孔的中央还有一粒,但不充满全孔。其间自孔壁到中心还有一薄层无定形物质隔膜,并有细丝与周围的孔壁相连。核孔复合体内充满了不同电子密度的无定形物质,这样就成为核与质之间自由扩散的一个屏障。因此我们在PF面上观察到的核孔边缘隆起的环形,可能即为该模型中的周围颗粒;而孔中央隆起的小点可能为该模型中的中央颗粒。

Weinreb^[1]用电镜的超薄切片技术对金鱼成熟红细胞进行观察时,发现细胞质中有少量呈丝状的线粒体,其中一束纵向管状结构代替了通常的嵴结构。本实验中所观察到的金鱼成熟红细胞中的线粒体则具有较典型的线粒体结构特征。这一结果与Sekhon^[6]利用超薄切片技术在八目鳗及鳊鱼的成熟红细胞中所观察到的线粒体结构是一致的。

由于冷冻蚀刻技术的特点是使得细胞沿着膜结构断裂开,故利用此技术观察细胞的超微结构时,一般来说看到核仁的机会较少。目前在国内外已报道的一些有关研究中,尚未见到有对核仁的冷冻蚀刻图象的报道。本实验中我们在有些成熟红细胞核中观察到了由凹陷浅沟状的索盘绕不定形部分所形成的圆形结构。根据Weinreb^[1]利用电镜超薄切片技术观察到的金鱼红细胞的核仁形状和John^[7]绘制的动物细胞亚显微结构的理想图来判断:此圆形结构即为核仁,其中浅沟状的索即为核仁丝结构。

边缘微管束又称作边缘带(marginal band),是许多低等脊椎动物有核红细胞的特征之一。这种结构在许多生物种类的成熟红细胞中均有报道,如鱼类、两栖类、爬行类^[8]和鸟类^[9]。Weinreb^[1]也曾报道过金鱼红细胞中边缘微管束的存在,并认为这些微管束可能具有骨架的

功能,而且使得细胞具有一定程度的弹性,在维持红细胞的形状方面起着很重要的作用。本实验中所观察到的微管结构在金鱼的红细胞中可能也起到类似的作用,因为红细胞在密集并被挤压时会有所变形,但一经稀疏放松便立即恢复原状。

综上所述,利用扫描电镜技术和透射电镜的冷冻蚀刻技术对金鱼成熟红细胞的研究。使我们观察到了用透射电镜的超薄切片等方法所不易观察到的结构特征。通过这些比较研究将进一步探讨红细胞的结构与功能的关系以及血细胞的进化提供可靠的依据。

参 考 文 献

- [1] Weinreb, E. L., *Anat. Rec.*, 147(1965), 219—238.
- [2] Branton, D., *Phil. Trans.*, B261(1971), 133—138.
- [3] Nobuhiro, D. et al., *J. Cell Biol.*, 75(1977), 619—634.
- [4] Grasso, J. A. et al., *J. Cell Biol.*, 14(1965), 235—254.
- [5] Phillip, S. and Donald, E. B., *Cell Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 1983, 491—493.
- [6] Sekhon, S. S. et al., *Amer. J. Anat.*, 131(1970), 211—236.
- [7] John, W., *Cell Biology*, 2nd ed., Addison-Wesley, 1978, 53—57.
- [8] Naser, M. D. et al., *Anat. Rec.*, 150(1964), 365—382.
- [9] Lucy, A. et al., *Developmental Biology*, 36(1974), 72—81.