3 International Agency for Research on Cancer(IARC). 1,3-butadiene in occupational exposures to mists and vapors from strong inorganic acids and other industrial chemicals. IARC, 1992, 54(1): 237
4 US EPA. Cancer Risk from Outdoor Exposure to Air Toxic. Vol 1 (EPA-450/1-90-004a)
5 Malvoisin E, Roberfroid M. Hepatic microsomal metabolism of 1,3-butadiene. Xenobiotica, 1982, 12(2): 137
6 Segal A, Mate U, Solomon J J. In vitro Dimroth rearrangement of 1-(2-carboxyethyl) adenine to N6-(2-carboxyethyl) adenine in single-stranded calf thymus DNA. Chem Biol Interact, 1979, 28(3): 333
7 Cochrane J E, Skopek T R. Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: iv Mutagenic potential of 1,2-epoxybutene, 1,2,3,4-diepoxybutane and 3,4-epoxy-1,2-butanediol in cultured human lymphoblasts. Carcinogenesis, 1994, 15(4): 713
8 周志刚, 戴乾圜, 钟儒刚. 1,3-丁二烯代谢产物与DNA烷化作用和交联的AM1研究. 高等学校化学学报, 1988, 19(8增): 397
9 Anne-Marie S, Kathy G M, Leslie R. Analysis of hprt mutations occurring in human TK6 lymphoblastoid cells following exposure to 1,2,3,4-diepoxybutane. Mutagenesis, 1997, 12(2): 61
10 Dai Qianhuan. Di-region theory, new discovery on mechanism of carcinogenesis. Mol Eng, 1998, 8(1): 1

(1998-07-24收稿, 1999-02-08收修改稿)

CP包埋剂及其在昆虫体壁组织连续切片中的应用

暴学祥 郑一平 张恒山 夏颖哲 宋传涛
(东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

摘要 组织切片技术的核心是包埋剂的选择及应用. 针对昆虫体壁组织的特殊性(含外骨骼), 研制发明了一种新型包埋剂CP(colophony-paraffin). 应用其可在保持昆虫器官完整的前提下, 进行连续切片, 攻克了目前世界上昆虫体壁组织连续切片的3大难题, 即: ( )材料硬; ( )难以获得较薄的切片; ( )切片缺乏连续性. 这是目前其他任何单一组织切片技术, 包括石蜡切片技术难以协调解决的难题. 采用CP包埋剂, 可随意对昆虫的任何体段及器官(如触角、足、翅), 甚至整体(小型个体)进行连续切片观察. 它将为系统研究昆虫内部结构、器官系统之间的相互关系、组织的显微特征及其生理功能提供广泛的可能.

关键词 **CP包埋剂 昆虫体壁组织 连续切片**

自1882年Bourne发明石蜡切片技术以来[1], 该技术在生物科学(包括医学)基础研究领域里得到广泛的应用, 并产生重大影响. 伴随着显微技术和组织化学技术的不断革新, 人类对生物体的认识, 逐渐地从外部形态描述, 深入到生物体内部组织、细胞显微结构及其生理功能的系统研究. 在对生物体的认识上, 产生了质的飞跃. 至今, 该技术仍被广泛采用. 然而, 对昆虫体壁组织显微结构的研究, 还没有一个成熟、可行、且能广泛应用的切片技术. 目前, 世界上采用的组织包埋技术都不太适用于昆虫体壁组织(含外骨骼)的连续切片观察, 主要原因是昆虫成虫的体表被覆着一层既厚又硬的外骨骼. 外骨骼坚硬、易碎, 采用现有的包埋技术均不能切出完整、极薄而连续的理想切片, 并且极易损伤切刀. 这给昆虫体壁组织及其一些特殊器

官的显微结构研究带来很大的障碍. 长期以来, 这一难题始终困挠着人们对昆虫, 特别是成虫组织显微结构研究工作的深入开展. 目前还未见有关利用连续切片技术对昆虫成虫体壁组织进行显微结构研究的报道. 仅陈进生[3]利用石蜡包埋技术对蓖麻蚕蛹的体壁进行了连续切片观察. 近期国内外有关昆虫组织、器官显微结构的研究报道, 也仅仅局限在利用超薄切片技术[4~9]和冰冻切片技术[10], 对骨化程度不太高的器官, 如下唇须、下颚须、触角及其感受器进行了超微结构和显微结构观察. 对骨化程度较高的昆虫器官组织, 这两种切片技术仍然不适应, 这在我们的对比实验中已证实. 基于这种实际情况, 近几年来, 我们集中开展了有关昆虫体壁组织连续切片技术的研究. 首先研制出一种新型包埋剂 CP(colophony-paraffin) , 并将其应用于昆虫组织的连续切片, 获得成功.

1 材料与方法

( ) 药品 . 自制 CP 包埋剂(ⅳ, ㈦, ㈣ ㈤ ㈨, ⅴ) , 按松香: 石蜡= 1∶2. 3~ 1∶0. 2(质量比) 配制而成; 叔丁醇、氯仿、焦油紫、冰醋酸及切片所需其他常规药品.

( ) 设备及用具 . 手摇切片机、12 个 50mL 烧杯及石蜡切片所需其他备品.

( ) 昆虫材料 . 光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*、日本弓背蚁 *Camponotus japonicus*、白膝网翅蝗 *Arcyptera fusca albogeniculata* 的触角; 弓背蚁的头及幼虫; 天牛的幼虫等.

( ) CP 液的制备 . 将 CP 包埋剂 ⅳ, ㈦, ㈣ ㈤ ㈨, ⅴ 分别放入 1 , 2, 3, 4, 5 和 6 号烧杯内加热溶解后放入恒温箱备用. 浸透和包埋所用的 CP 剂可视材料的大小、骨化程度和室温而定.

(㈨) 主要实验程序 . 取活体新鲜材料放入 Carnoy[3] 固定液 2~ 8 h; 固定后的材料直接移入 95% 酒精中脱水(也可入 70% 酒精中保存) ; 经过 100% 酒精脱水(20~ 30 min) 后移入叔丁醇继续脱水、透明 4~ 24 h(换液 2 或 3 次) , 也可在其中长时间保存; 透明后的材料浸入 CP 液 4~ 8 h, 温度控制在 55 ℃以下; 用手摇切片机切片; Nissl 法染色[2]; 制片的其他程序同常规石蜡切片.

2 结果

CP 切片的适宜室温为 18~ 36 ℃. 切片厚度 1~ 12μm(适于切薄的切片) , 切出的标本片完整、厚薄均匀而且连续. 有时, 1 条 CP 带可包含百余个标本片(如触角横切) . CP 包埋剂便于连续切片, 利于对组织显微结构的连续观察.

采用 CP 包埋技术, 分别对上述昆虫实验材料进行了显微制片, 均达到满意的效果(图 1) . 切片的厚度为 4 μm. 经 Nissl 法染色后, 各种组织的层次分明: 神经细胞、感觉细胞、上皮细胞呈紫红色; 肌细胞、脂肪细胞呈紫色; 几丁质呈淡蓝色. 触角内部的主要结构包括: 2 条纵行的神经束、2 条气管(弓背蚁无) 、1 条血淋巴管, 各种感受器基部穿过几丁质层的感觉神经通道清晰可见; 头颅内的脑、视叶、食道、气管等结构及其在头内的自然位置明确; 幼虫体表的棘突、感觉毛及血腔内的各种组织器官清晰明了. CP 切片技术适用于直径为 0. 1~ 5 mm 的昆虫材料.

3 讨论

昆虫体壁组织的连续切片成败与否, 包埋剂的使用是关键中的关键. 在常规的组织切片中, 各熔点的石蜡是较理想的包埋剂. 但针对昆虫体壁组织的特点(里软外硬) , 石蜡即失去其应有的作用. 切片时, 支持不住坚硬的外骨骼. 依据实验材料的特殊性及切片中的技术要

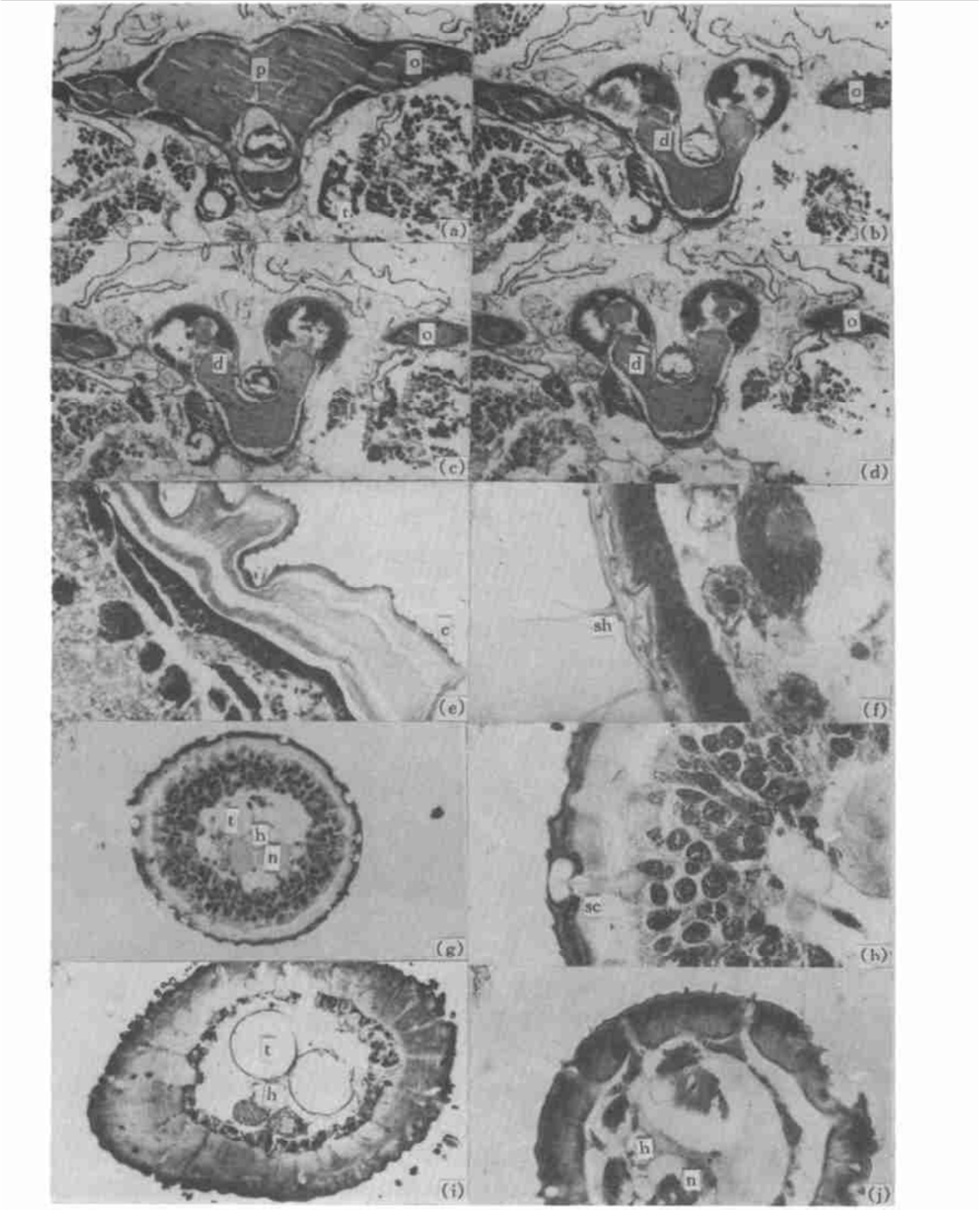


图 1　CP 切片的显微照片

(a) 弓背蚁前脑横切, × 40; (b) 、(c) 、(d) 过弓背蚁中脑的 3 张连续切片; (e) 光肩星天牛幼虫体壁横切, × 100; (f) 弓背蚁幼虫体壁横切 × 400; (g) 白膝网翅蝗触角鞭节横切, × 100; (h) 白膝网翅蝗鞭节横切, × 400; (i) 光肩星天牛触角鞭节横切, × 100; (j) 弓背蚁触角鞭节横切, × 40. p 示前脑(protocerebrum), o 示视叶(optic lobes), d 示中脑(deutocerebrum), c 示棘突(caltrops), n 示神经束(nerve bundle), t 示气管(trachea), h 示淋巴管(hemolymph vessel), sc 示钟形感受器(sensi-llum campaniformium), sh 示感觉毛(sense hair)

求, 作为一种包埋剂, 既要质纯透明, 硬度与韧性兼顾, 又要与透明剂相溶, 且其熔点越低越好, 这是最难克服的矛盾. 经过反复实验, 我们选择松香为 CP 包埋剂的主剂.

我们研制的 CP 包埋剂具有支持强度高、韧性好、熔点低的特性, 且不受室温限制. 采用这种新型包埋剂, 可切出 1~ 12 μm 的连续切片, 解决了昆虫体壁组织连续切片中几项最主要的技术难题.

(1) 支持强度高 . 本文采用的实验材料中, 弓背蚁、光肩星天牛的触角具有代表性. 弓背蚁的触角较细, 最大直径(梗节末端) 仅有 0. 2 mm 左右, 但触角的骨化程度极高, 特别是梗节, 其外骨骼最厚处约是直径的 1/ 3. 在切片时, 由于它的硬度强, 受力面小, 如用石蜡(最硬的), 无法支持; 光肩星天牛的触角粗大, 梗节直径约有 1. 5~ 2 mm, 骨化程度很高. 对比实验中, 用 58 ℃硬蜡(加蜂蜡), 均支持不住外骨骼, 标本碎, 极易断裂. 采用 CP 包埋剂, 从根本上解决了这一难题. 切出的标本片厚度均匀、完整.

(2) 韧性好 . CP 包埋剂不但具有较高的支持强度, 而且具有良好的韧性. 切出的 CP 带弹性很好, 不易断, 在室温条件下, CP 带可达 60 cm. 标本与 CP 剂不易脱离, 连续性好. 在相同条件下, 石蜡性脆, 蜡带易断, 标本在上表皮处与石蜡极易分离.

(3) 熔点低 . 使用 CP 包埋剂渗透时, 温箱温度可以控制在 55 ℃以下, 避免了高温对昆虫组织的破坏作用. 如用熔点高的石蜡作为昆虫体壁组织的包埋剂, 浸蜡需在 65 ℃条件下进行, 对组织有较强的破坏作用, 外骨骼会更硬, 更脆.

(4) 切片不受室温限制. 采用 CP 支持剂, 可对昆虫的不同器官、体段, 在 18~ 36 ℃条件下进行连续切片.

昆虫种类多, 数量大, 身体小, 适应力强, 与人类的关系十分密切. 在长期的生产实践中, 人们对昆虫, 特别是经济昆虫给予高度重视. 在昆虫分类、行为、生态、预测预报及防治方面, 做了大量的研究工作. 然而, 对昆虫内部器官、组织的显微结构进行系统研究则相对较少. 存在这种不协调的主要因素包括: ( ) 昆虫体小, 即便借助于目前已有的设备也很难对多数昆虫, 特别是较小的个体进行系统地解剖观察; ( ) 昆虫内部器官多数小而柔软, 如内分泌腺、神经系统等, 很难摘除并保持其完整; ( ) 昆虫体表具有发达的外骨骼, 尤其是成虫. 这种里软外硬的特殊组织构造给昆虫组织的显微制片工作带来很大的障碍. 这一障碍是目前采用其他常规显微制片技术难以克服的, 直接影响到昆虫基础理论研究及应用研究工作的深入开展.

CP 包埋剂的发明及其在昆虫体壁连续切片中的应用, 克服了这些技术难题和障碍, 使得对那些或微小、或柔软、或坚硬的昆虫器官甚至整体, 都可以进行连续切片观察. 这一新技术的应用将为系统研究昆虫内部结构特征、确定器官的位置、器官与系统之间的相互关系以及昆虫组织的生理和病理变化的研究奠定基础.

致谢 郝 水院士、张凤岭教授对本文的修改提出宝贵意见, 在此表示诚挚的谢意.

参 考 文 献

1 芮菊生, 杜懋琴, 陈海明, 等. 组织切片技术. 北京: 人民教育出版社, 1980

2 杜卓民. 实用组织学技术. 北京: 人民卫生出版社, 1982

3 陈进生. 昆虫器官的组织构造——组织切片的制作. 见: 郭 郛, 忻介六编. 昆虫学实验技术. 北京: 科学出版社, 1988. 107~ 112
4 严福顺, 钦俊德, 项秀芬. 七星瓢虫成虫下唇须化学感受器的细微结构. 昆虫学报, 1982, 25(2): 135~ 140
5 严福顺, 钦俊德, 项秀芬. 七星瓢虫成虫下颚须上的化学感受器. 昆虫学报, 1987, 30(2): 146~ 151
6 戴玲美, 吴敦肃, 郭一松. 松毛虫赤眼蜂触角板状感器的超微结构研究. 昆虫学报, 1990, 33(3): 319~ 322
7 孟联忠, 赵新宇, 徐小星. 蓖麻蚕触角的结构和嗅觉感受细胞对化学气味物质的反应. 北京大学学报(自然科学版), 1994, 30(2): 224~ 231
8 Jensen J C, Zacharuk R Y. The fine structure of the multiporous sensilla on the antenna of the diving beetle *Graphoderus occidentalis* Horn(Coleoptera: Dytiscidae). Can J Zool, 1992, 70: 825~ 832
9 Young H K, Kye C P, Kyung S B. Antennal sensilla in adult *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae): morphology, distribution, and ultrastructure. Ann Entomol Soc Amer, 1995, 88(4): 519~ 529
10 Monika S, Rita Z. Nadph diaphorase activity in the antennae of fhe hawkmoth *Manduca sexta*. J Exp Biol, 1996, 199: 1063~ 1072

(1998-08-19 收稿, 1998-11-27 收修改稿)

模拟微重力对鸡胚软骨细胞生长和胞外基质的影响

李小兵* 杨树长* 李生广** 江丕栋 林治焕
(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101. * 并列第一作者; ** 联系人)

摘要 利用回转器连续改变重力方向获得模拟微重力条件, 以鸡胚负重骨软骨细胞为实验材料, 光学显微镜下观察细胞生长状况. 与对照组相比, 回转组的细胞密度略低, 在同样的生长时间内, 对照组的生长斑比回转组范围大而多, 表明对照组的发育分化程度比回转组高. 用扫描电子显微镜研究培养软骨细胞在模拟微重力条件下胞外基质的变化, 发现回转后的软骨细胞胞外基质明显地比对照组少, 而且对照组的胞外基质纤维较回转组粗大清晰. 这表明模拟微重力环境对软骨细胞胞外基质的分泌和组装都有一定的影响. 同时对其中可能的机制进行了探讨.

关键词 **软骨细胞 胞外基质 回转器模拟微重力**

长期处于失重状态下的宇航员, 会出现不同程度的骨钙丢失、骨强度降低. 分析太空飞行中收集的尿, 发现羟脯氨酸逐渐增多, 说明骨骼中的胶原分解代谢加快[1]. 这些问题是当前航天医学及空间生命科学研究的热点, 有着重要的现实意义. 很显然, 骨钙丢失及胶原分解代谢加快等都涉及胞外基质的微重力效应, 但在整体水平上对此进行生化机理的研究是很困难的. 为了排除众多因素, 如激素调节、神经调节、不同细胞间相互作用等影响, 一般采用与骨细胞有着代谢相似性的培养单细胞进行研究. 在太空实验室 IML-1 上进行的太空中胚胎肢芽细胞培养表明软骨的生成减少[2]. 腓骨骨折的鼠在太空飞行状态下软骨质的形成减少[3]. Feed 等人[4]用组织工程学方法将牛软骨细胞进行三维重组形成软骨组织后, 发现失重条件下软骨组织的结构及软骨细胞的形态均有变化. 本实验采用鸡胚培养软骨细胞为材料, 目的是研究