

主编 李伯勤 张圣明 主审 高英茂

ESSENTIAL ULTRASTRUCTURE IN MEDICINE

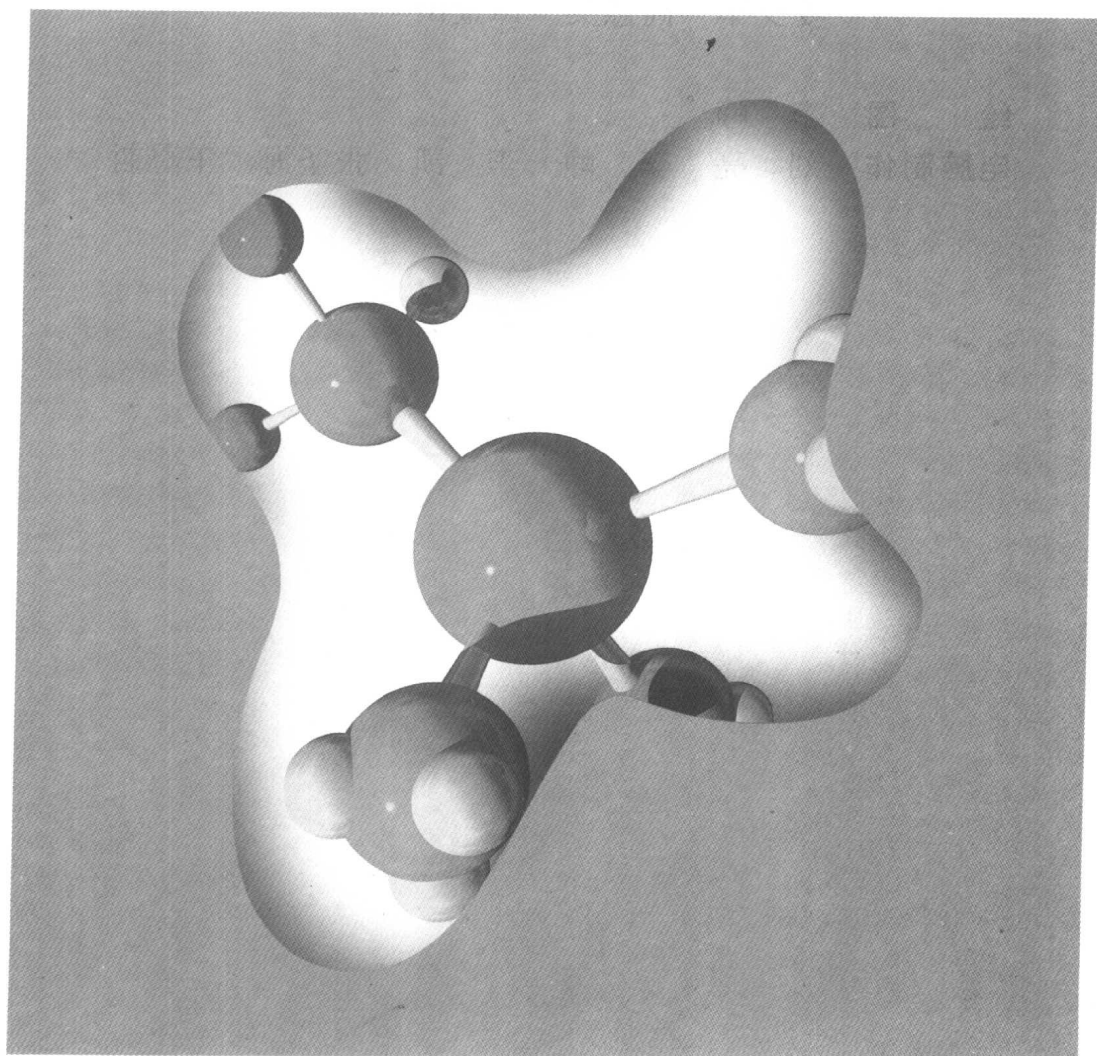
医学超微结构基础

山东科学技术出版社 www.lkj.com.cn

医学超微结构基础

ESSENTIAL ULTRASTRUCTURE IN MEDICINE

主编 李伯勤 张圣明 主审 高英茂



山东科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学超微结构基础 / 李伯勤, 张圣明主编. — 济南:
山东科学技术出版社, 2003
ISBN 7 - 5331 - 3406 - 0

I. 医… II. ①李… ②张… III. ①人体—细胞—
超微结构—基本知识 ②电子显微镜—基本知识
IV. R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 015263 号

山东大学出版基金资助出版

医学超微结构基础

主编 李伯勤 张圣明

主审 高英茂

出版者: 山东科学技术出版社

地址: 济南市玉函路 16 号

邮编: 250002 电话: (0531)2065109

网址: www.lkj.com.cn

电子邮件: sdkj@jn-public.sd.cninfo.net

发行者: 山东科学技术出版社

地址: 济南市玉函路 16 号

邮编: 250002 电话: (0531)2020432

印刷者: 山东汶上新华印刷有限公司

地址: 山东汶上爱国路 40 号

邮编: 272501 电话: (0537)7212822

开本: 787mm × 1092mm 1/16

印张: 28.25

字数: 649 千

版次: 2003 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

印数: 1 - 3000

ISBN 7 - 5331 - 3406 - 0

R·1035

定价: 44.00 元

主 编	李伯勤	张圣明				
主 审	高英茂					
副 主 编	辛 华	李鸿业	苏衍萍	吴洪娟	井建华	
编 委	(按姓氏笔画排序)					
	王立言	王尊哲	井建华	石运芝	朱传菊	
	辛 华	刘加强	李伯勤	李锋杰	李善刚	
	李鸿业	吴洪娟	苏衍萍	何秀全	陈红霞	
	张圣明	张训彪	张向红	张保华	张敦荣	
	姜少军	高慧英	谭金山			

绘 图	李 峥					
电脑制作	刘 亮	李 峥	李 凯	张圣海	王尊哲	

前 言

2001年10月山东电镜专业委员会召开三届一次大会期间,省内医学院校从事超微结构教学的同志,在交谈中曾提及有关教材的问题。会后,山东大学医学院、潍坊医学院、泰山医学院、青岛大学医学院和滨州医学院电镜室的老师们,经反复酝酿后才着手编写这本书。其间,中南大学医学院电镜室的老师也参加了部分编写工作。经过长达一年半的紧张工作,《医学超微结构基础》终于完稿付印了。

医学超微结构是现代医学形态学的重要组成部分,是认识有机体的一个知识层面。超微结构的研究推进了人类对生命本质的认识,是生命科学中极其活跃的一个领域,其研究成果一直是其他学科不断获取新知识的来源之一。超微结构的对医学院许多学科的发展及课程教学都有促进作用。虽然在这方面的基础性、系统性参考书较少,但国内有条件的医学院自20世纪80年代以来,都先后为研究生、七年制和五年制学生开设了选修或必修课程,使学生得以学习一些医学超微结构知识,便于他们将来能从整个机体、脏器、组织、细胞、亚细胞、分子乃至原子的不同认知层面透彻地把握疾病,以提高诊疗水平。

《医学超微结构基础》不仅可以作为医学院的课程教材,还可以作为相关学科的专业参考书。为此,作者一方面注意保持普通教材用书的基础性和系统性,另一方面注重融合、吸纳本学科前沿领域的研究成果和实验实例,使各章节的内容具有先进性和实用性。同时,采用大量照片和模式图,提高了可读性。全书共七章,第一章对本书内容作以概括,其余各章系统介绍有关医学超微结构与亚细胞病变的基础知识,以及它们的基本研究方法——电镜技术。

参加撰稿的作者大部分是多年躬身于电子显微学教学、科研第一线的教授、副教授和年轻学者,所完成的《医学超微结构基础》是我省近30年来医学电子显微学从无到有、不断发展的结晶。

本书在编写过程中,参考了国内外大量专著、教材和论文,得到国内多所医学院电镜室同仁的大力支持,在此一并表示感谢。书中欠妥乃至错误之处,恳请读者予以批评指正。

编者

目 录

第一章	绪论	1
第二章	亚细胞结构及其病变	6
第三章	电子显微成像原理及医学电镜	223
第四章	医学电镜样品的制备方法	270
第五章	医学超微结构观察及电镜技术的应用	321
第六章	实验技术	362
第七章	电子显微镜的技术检定规程	407
附录 1	专业词汇英汉对照	428
附录 2	参考文献	441

第一章 绪 论

(一) 电子显微学的形成

古希腊人和中世纪的阿拉伯人较早使用单片玻璃透镜来取火。之后有一个漫长的历史,直到16世纪末(1590年)才发明了由若干玻璃透镜构成的复式光学显微镜。这项发明最初可能是由荷兰人 Janssen Zacharias 完成的,而后由 Galileo 最早把这种光学显微镜用于科学研究。A. V. Leewenhoek 应享有使显微术流行开来的殊荣。他用自己制造的、在当时可称得上最好的显微镜进行了出色的显微观察,他的《Micrographia》是第一本(1665年)论述显微观察的专著,这以后他另外两本代表作《Arcane Nature》和《Microscopic Observations》中的工作,在整个17~18世纪都无出其右。19世纪提出了相差(aberration)理论并发明了消相差透镜,使光学显微镜可以达到几乎无透镜相差的理想成像,这是19世纪生命科学迅速发展的重要条件之一。

由于当时还没有建立光学系统分辨本领(resolving power)的概念,只是追求更高的放大倍数(magnification, M),以期观察更微小的物体。但由于光的衍射(diffraction)和光学显微镜照明光源波长的限制,使任何试图通过提高光学显微镜放大倍率而获取更微小的结构信息的努力都是徒劳。

1931年6月4日,柏林工业大学年轻的研究生 Erust Russka 和他的导师 Max Knoll 等设计了世界上第一台透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM),这是二十世纪最重要的发明之一。自此,人类开始在一个崭新的认知层面上探索未知的微观世界,使电子显微学(electron microscopy)在电子显微镜技术日新月异的发展中形成和完善。

(二) 电子显微形态学与现代医学

电子显微学是电镜技术与各经典学科相结合的边缘学科,是一种在分子乃至原子尺度观察研究物质的形态结构,揭示物质的微观存在形式及运动规律的学说和技术。电子显微形态学(electron micro-morphology)的主要内容是观察研究小于显微结构(0.1mm~0.2 μ m)的更细微的物质结构,统称为超微结构(ultra-structure)。

医学超微结构以 TEM 观察组织细胞的内部结构、以扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察其表面形貌为基本方法,是现代医学形态学的重要组成部分,是人类认识有机体的一个知识层面,也称亚显微结构(submicroscopic structure)。因为这些结构主要展示细胞器以及大分子的形态结构,所以又常被称为亚细胞结构(sub-cellular structure)。

早期的医学超微结构研究多限于观察各种细胞器、细胞膜及其表面特化结构,细胞间连接结构及间质成分;观察不同种属、不同器官、不同组织和细胞在不同生理功能状态下的形态变化;观察亚细胞结构的异常改变与疾病的发生、发展和转归的关系;观察分离的细胞器、细菌、病毒、亚细胞碎片、蛋白质分子、核酸等。20世纪70年代以后,高分辨电子显微学(high resolution electron microscopy)崛起,在生物大分子结构的研究方面取得了突破

性进展。与此同时,电子显微形态学逐渐从医学基础走向临床,在对疾病病因、病情、分型及鉴别诊断中做出重要贡献,“诊断电镜”(diagnostic electron microscopy)应运而生。

医学电子显微形态学以其优于光学显微镜 2~3 个数量级的高分辨能力和在生命的微观世界里的大量发现,导致了细胞、亚细胞、生物大分子结构与机能的许多崭新概念的产生,丰富、充实了细胞生物学、组织学、胚胎学、病理学、微生物学及临床医学等学科,是这些学科发展、不断获取新知识的重要来源之一,完全符合 18 世纪以来科学与技术不断趋于融合的发展历史。超微结构的研究,推进了人类对生命本质的认识,是生命科学中极其活跃的一个领域。

(三) 医学电镜

医学超微结构观察研究的主要工具就是电镜。对这类大型精密仪器了解得越多越透彻,日常工作越得心应手,科研工作越容易出成果。

各类电镜的共同点有三:①“光源”为电子波;②“透镜”为电磁场;③用来成像的信号均产生于电子散射(electron scattering)。

电子显微成像理论阐释了各种电镜的构成、不同电子显微模式的成像原理、成像质量的控制以及如何利用电子散射过程产生的样品信息等,其理论基础是电子物理学和电子光学、电子电路技术和高真空技术等。

常用的医学电镜有:TEM、SEM、高分辨型 TEM 和 SEM、分析电镜(analytical electron microscope, AEM)、超高压电镜(ultrahigh voltage electron microscope, UTEM)和环境扫描电镜(environmental scanning electron microscopy, ESEM)等。

1. TEM 是发展最早、应用最普遍的电镜。其分辨本领 D_{TEM} 一般可达 0.1~0.3nm,放大率 M 为 50~500000,加速电压(acceleration voltage)为 20~200kV。主要用于生物样品内部结构二维图像的观察。

2. SEM 的应用比 TEM 晚了 30 年,但发展很快。其 D_{SEM} 一般为 3~10nm, M 为 3~300000,加速电压为 1~30kV。虽然分辨本领比 TEM 差,但总比光镜高得多,还可获得生物样品表面三维结构的立体图像,而逐点逐行采集样品结构信息的模式又便于实时微区分析。

3. 高分辨型 TEM 和 SEM 采用场发射枪、超高真空、低球差和高加速电压等技术,易于高分辨操作。目前,高分辨型 TEM 在生命科学上用来研究 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子结构;高分辨型 SEM 可以在接近 TEM 分辨水平上观察样品,这样生物样品断裂表面的结构即内部结构便可以在 SEM 下立体呈现出来。

4. AEM 是一类不仅可以成像,还可以对样品微区成分进行定性定量分析的 TEM 或 SEM。它们利用电子散射过程中带有样品元素成分信息的一些信号,如 X-ray、Auger-E、 ΔE 甚至二次电子等,在超微结构水平上检测元素的性质和分布,如利用 X-ray 设计 X-ray 波谱仪和能谱仪;利用 Auger-E 设计 Auger-E 谱仪;利用 ΔE 设计电子能量损失谱仪(electron energy losses dispersive spectrometer, EELS)。用于医学的 AEM 主要有 4 种:① EELS;② TEM 配备 X-ray 谱仪;③ SEM 配备 X-ray 谱仪;④ 配备 X-ray 谱仪的专用扫描透射电镜(scanning transmission electron microscope, STEM)。

5. UTEM 其加速电压最高可达 1000000kV,对薄样品的损伤小,在生物医学上可用来

观察较厚的或活的试样。

6. ESEM 采用多级压差光阑,使得镜筒保持高真空的同时,样品室可维持高达 2.66×10^2 Pa 的气压,其特殊的气体二次电子探测器不仅能将生物样品微弱的二次电子信号放大,还能消除样品表面的电荷积累。这些特点为含水量大、导电性差的生物样品和湿样品准备了环境条件,可以直接在 ESEM 中清晰成像。

7. 低压扫描电镜(low voltage SEM, LVSEM)和扫描低能电镜(scanning low energy EM, SLEEM) 是 SEM 的一个新的发展方向。不导电的生物样品不需喷镀也可以观察,在低压时会出现新的二次发射特性和新的衬度机制。

8. 扫描探针显微镜(scanning probe microscope, SPM) 是一个显微仪器家族,在生物医学上使用较多、也最具代表性的是扫描隧道显微镜(scanning tunnel microscope, STM)和原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)等。实际上 SPM 不能称为“电镜”,它们没有上述一般电镜的三个特点。SPM 是利用两电极在纳米尺度距离之间产生的电、力、磁场等来获得样品表面形貌结构和物质特性的。使用 SPM 对 DNA 等生物大分子表面结构以及溶液覆盖的有机样品的研究倍受众多科学家关注。

(四)医学电镜样品的制备

如同光学显微镜组织学样品制备技术那样,把生物医学材料制备成在电镜下能够成像的样品,也是一系列复杂的过程。由于亚显微结构比显微结构更精细,所以电镜样品制备过程的技术性更强、要求更高。同时,针对不同的生物材料、不同的观察研究目的、不同类型的电镜以及不同电镜的不同工作模式,均有不同的样品制备方法。生物医学样品制备技术的发展与电镜自身技术的发展,是医学超微结构观察研究的两个先决条件。

1. TEM 生物医学样品制备 TEM 虽然发明于 20 世纪 30 年代,但真正用于生物医学超微结构研究却是在 20 世纪 50 年代以后的事。其原因主要是 TEM 样品制备要求很高:TEM 的成像机制要求样品必须具有质量厚度(mass - thickness)的差异、“厚度”一致的样品,其“厚度”必须 $< 100\text{nm}$,并在高能量电子束和高真空作用条件下仍然能保持良好的超微结构。20 世纪 50 年代初发明了超薄切片(ultra - thin section)机,又用了近 10 年的时间完善了超薄切片技术后,TEM 才开始广泛应用于生物医学,带来生物医学电子显微形态学研究的大发展。经过 50 多年的不断努力,超薄切片技术现已成为程序化的常规技术,在 TEM 制样技术中占有重要地位。在此之后,相继出现了多种制样方法,本书将对其中常用的几种技术方法进行讨论:①超薄切片技术 组织细胞经固定、脱水后用树脂包埋成块,使用超薄切片机进行超薄切片,经电子染色后观察,用于各种亚细胞结构的研究。②电镜细胞化学技术 是细胞化学技术与超薄切片技术的结合,用于亚细胞水平上研究各种生化物质,尤其是酶的细胞内定位。③电镜免疫细胞化学技术 也称免疫电镜技术,是免疫学技术与超薄切片技术的结合,用于亚细胞水平上研究细胞内抗原、抗体的定性和定位。④电镜放射自显影技术 是放射自显影技术和超薄切片技术的结合,用于亚细胞水平上研究生化物质在细胞内的合成、转移、转化等代谢过程以及某些生物大分子在生物合成中的位置变化。⑤冷冻制样技术 是一种物理制样技术,用快速冷冻取代了常规制样中的化学处理步骤,保持了细胞和组织的生活状态。主要包括冷冻干燥、冷冻取代、冷冻超薄切片、冷冻断裂及复型技术等。冷冻制样技术与细胞化学、免疫细胞化学、放射自显

影技术相结合,是很理想的制样方法。⑥冷冻蚀刻(freeze-etching)技术 也称冷冻断裂复型技术,是TEM冷冻制样方法中的一种,将断裂和复型技术相结合制备细胞断裂面的铂碳复型膜,在TEM下观察浮雕样的生物膜内部结构,主要用于生物膜的研究。⑦负染色技术 是使重金属盐类包绕生物样品,使其在TEM下呈负像(背景暗、结构亮)的技术,广泛应用于微颗粒状生物样品如细菌、病毒、亚细胞碎片、分离的细胞器、DNA、RNA和蛋白质分子等的TEM观察。⑧真空喷涂技术 为金属投影技术中的一种,主要是将重金属物质(或碳)加热到熔点,形成极细小的颗粒喷射到样品上。不适宜进行负染色处理的上述各种微颗粒状生物样品均可采用此方法,只是图像分辨率比负染色稍差。另外,电镜细胞化学技术(包括免疫电镜细胞化学技术)不仅用于超薄切片技术,也可以与负染色技术、冷冻蚀刻技术等结合。

2. SEM 生物学样品制备 普通 SEM 的成像机制要求样品的被观察面要充分暴露并具有质量厚度的一致性,能耐受较高能量的电子束及高真空,不含水分及挥发物,导电性好并具有良好的二次电子发射强度等。SEM 的生物样品制备就是围绕这些基本要求展开的。常规制备主要包括清洗与固定、脱水与干燥、导电化处理三个过程,也可以把电镜细胞化学技术与 SEM 常规制样技术结合起来,用于扫描电镜下生物样品的定性定量分析。ESEM 等新型 SEM,有与之功能相适应的样品制备方法。

(五)医学超微结构教学的重要性

由解剖学、组织学、细胞学、超微结构到分子结构,是生命科学在漫长的发展过程中建构起来的认知体系。从形态学角度来看,则是一个从宏观到微观的知识链条,超微结构是这个知识链条中较新的环节之一。缺少这个环节,就会造成现代医学形态学知识结构的断裂,使分子生物学研究缺少相应分辨率水平的形态学支持。所以,医学超微结构教学对建立医学生系统的形态学知识结构至关重要。

临床医学对亚细胞形态学教学和研究提出了要求。近年来,从超微结构的角度认识、研究疾病是临床医学的新视角。每年在山东大学医学院超微结构室完成的 20~50 项科研项目,均需要研究人员具备较系统的显微、亚显微形态学知识,才能顺利阅读文献、完成课题设计以及观察研究任务;而超微结构观察结果又是许多科研论文必要的形态学指标,以它的客观性、真实性和高分辨率,提高论文的应用价值。另外,刚刚兴起的“诊断电镜”已经直接应用于临床辅助诊断。所以,原卫生部部属 13 所医学院校及部分条件较好的医学院,自 20 世纪 80 年代以来先后为研究生、七年制和五年制学生开设选修或必修课程,使学生得以系统地学习医学超微结构知识,便于将来能从整个机体、脏器、组织、细胞、亚细胞、分子乃至原子等不同水平透彻地把握疾病,不断提高诊断和治疗水平。

现代生命科学的一个显著特点是它的多层次体系,和各层次间的互相渗透、互相影响、彼此补充和彼此促进。医学超微结构教学与解剖学、组织胚胎学、病理学、细胞生物学和分子生物学等课程的教学相衔接、相辅佐。如果从 20 世纪 50 年代末形成较完善的生物电镜样品制备技术计算,医学超微结构知识的积累不过 40 多年。而在这 40 多年里,超微结构研究成果一直是其他形态学或相关学科不断获取新知识的来源之一。所以,系统的而又能及时反映研究动态的超微结构教学,对多门学科的发展及课程教学都有促进作用。

医学超微结构仍然是一个不断被刷新的形态学领域。近几年出现的前沿交叉学科,如“结构生物学”(structure biology)和“纳米生物学”(nano-biology)等,又都与超微结构内容相关联、相交融,它们的方法学也有很多相关性。在人类基因组工作草图(working draft)完成以后,后基因组时代(post-genome era)的中心任务之一则要研究整个基因组及其全套蛋白质产物的结构、功能及在亚细胞、亚细胞器(sub-cellular organelle)上的定位,这意味着人类将系统整合生物学的全部知识,揭开生命活动的奥秘。所以,学习医学超微结构内容,不仅可以使医学形态学知识系统化,加强对相关课程的理解,而且可为以后接受新科学做准备。

医学超微结构实验课教学的意义不言而喻。医学生建立组织细胞的显微学概念,是通过使用光镜观察的实践逐渐建立起来的。同样,亚显微结构概念的建立则必须通过使用电镜观察实践来实现。其实验课教学过程与别的形态学教学是相似的,应该尽可能的增加超微结构观察实践学时。由于设备条件及实验场所对学生操作电镜进行观察的限制较大,一般只能辅以解读超微结构照片的方法弥补。

无疑,建立起“亚显微结构”的概念非常重要,它可以使学生对机体各个层面的结构(有机体、器官、组织、细胞、亚细胞、分子)形成连续的思维。同时,那些出现在各种资料上有关超微结构的内容不再是死记硬背、看不到摸不着的东西,而是亲自制备样品又亲眼观察到的有形的客观存在。许多学生在我们开设的“医学超微结构”教学反馈意见中生动地谈到这一点。

总之,本书系统介绍有关医学超微结构与亚细胞病变的形态学基础知识,包括它的基本研究方法——电镜技术,其内容是国家自然科学学科分类中“细胞结构形态学”和“细胞病理学”(均为新设定的三级学科)的核心知识。认真的学习有关内容,对完善医学生系统的形态学知识结构很有必要,也是培养 21 世纪新一代优秀医学人才的需要。

(李伯勤)

第二章 亚细胞结构及其病变

第一节 细胞外基质	7	七、过氧化物酶体	117
一、细胞外基质概述	7	八、线粒体	120
二、胶原	8	九、中心体	135
三、网状纤维	16	十、细胞骨架	137
四、弹性蛋白	16	第四节 细胞核	147
五、非胶原糖蛋白	19	一、概述	147
六、糖胺多糖和蛋白多糖	24	二、核被膜的化学组成、核/质转运与超微结构	148
七、基膜	28	三、染色质和染色体的化学组成、功能和电镜观察	157
八、细胞外基质中的其他成分与结构	30	四、核仁	164
第二节 细胞膜	31	五、电镜下的核体	165
一、细胞膜的化学组成和分子结构	32	六、核基质	166
二、细胞膜的功能	37	七、细胞核的超微结构变化	170
三、细胞膜与疾病	50	八、细胞凋亡时核的超微结构特点	186
四、细胞膜的特化结构	54	第五节 组织的超微结构观察	191
第三节 细胞质	77	一、上皮组织的超微结构观察	191
一、细胞质基质与细胞器	77	二、肌组织的超微结构观察	195
二、核糖体	81	三、神经组织的超微结构观察	198
三、内质网	89	四、结缔组织的超微结构观察	206
四、高尔基复合体	98		
五、内体	104		
六、溶酶体	108		

自电子显微镜问世以来,观察研究超微结构就成为人类重要的科学活动之一。医学超微结构作为现代医学形态学的重要组成部分,已渗透到基础医学和临床医学的各个学科。

医学超微结构研究的内容主要分三个方面:第一方面是生物大分子高分辨电子显微成像、蛋白质分子的三维重构等,其图像分辨率(image resolution)接近电镜的分辨本领(resolving power),可达0.5nm甚至更高。它的样品制备技术、电镜操作技术、图像处理与阐释等也是生命科学前沿领域—结构生物学(structure biology)和纳米生物学(nano-biology)的重要内容之一。第二方面是普通超微结构观察研究,其图像分辨率最佳值在2~2.5nm。它是使用电镜常规技术针对组织细胞中未知的或处于资料积累阶段的结构进行观察,以期得到某些规律性、特征性的研究结果。第三方面是把已形成共识的亚细胞特征性结构

直接用于临床诊断,即所谓“诊断电镜”(diagnostic electron microscopy),也是超微病理学(ultra-structural pathology)的主要内容。

目前,大多数医学超微结构观察研究内容仍然集中在第二或第三方面,局限在 $1\mu\text{m}\sim 2\text{nm}$ 水平上观察研究组织细胞的存在形式及变化规律。即便是这样,当面对比光镜显微百倍甚至千倍的医学超微结构图片时,看不懂或不能做出客观、准确解释的事,是经常发生的。本章内容的编写旨在有助于解决这方面的问题。

了解浩如烟海的亚显微世界,探索微米至数纳米之间的形态结构,比较清晰、便捷的途径是以细胞器为线索展开讨论。为了保持知识的连续性,本章充分吸纳了分子细胞生物学的内容和医学超微结构研究方面较系统的权威资料,在介绍每种细胞器的一般结构、化学组成和功能的基础上,较详细地讨论了在不同细胞不同功能状态(尤其病理状态)下,细胞器的超微结构变化及其分子机制。同时,针对四种基本组织,讨论其在不同功能状态下的超微结构观察。

电镜真正用于医学只不过40多年的时间,仍然是一个处于快速发展中的新兴边缘学科,远远达不到有数百年发展史的光镜组织学、病理学那样的理性和规律性。所以在阅读本章内容的过程中,应注意密切联系临床、联系组织细胞水平甚至解剖水平的系统知识,以逐渐建立有机体从宏观到微观的形态学知识链,锻炼既能通观全局又能深入细微的形态学研究素养。实际进行医学超微结构观察研究时,需要注意的问题还有很多,请参考本书第五章的内容。

第一节 细胞外基质

机体的组织由细胞和细胞外基质(又称细胞间质)(extracellular matrix)共同组成,细胞与细胞外基质是相互依存的。细胞外基质成分的合成、分泌、组装是细胞活动的产物,它不仅参与组织结构的维持,而且对细胞的存活、形态、功能、代谢、增殖、分化、迁移等基本生命活动具有全方位的影响,有时甚至具有决定性作用。此外,细胞外基质还与许多病理过程有关,例如肿瘤转移、老年病、胶原病、心血管病、骨关节病及糖尿病等,因而近年来细胞外基质成分及其生物学作用的研究倍受重视,成为生物学领域的一个热点。

一、细胞外基质概述

在动物组织中,细胞外基质所占据的空间因组织而异,例如结缔组织中细胞外基质含量很大,而上皮组织、肌肉组织、脑与脊髓中含量较少。细胞外基质的组成成分及组装形式由产生细胞外基质的细胞决定,并与组织的特殊功能需要相适应,例如角膜的细胞外基质为透明柔软的片层,骨、牙的细胞外基质坚硬如岩石,肌腱的细胞外基质则坚韧如绳索。

(一) 胞外基质的组成成分

各种动物组织中的细胞外基质虽然在含量和形态上各不相同,但在结构组成上主要是由纤维网架和凝胶样基质(gel-like ground substance)所组成(图2-1-1)。在生化性质上前者为纤维蛋白,后者为多糖,包括糖胺多糖(glycosaminoglycan)和蛋白多糖(proteoglycan)。在功能上,纤维蛋白可分为两种:一种是具有结构作用的胶原(collagen)蛋白和弹性

蛋白(elastin),另一种是具有粘着作用的非胶原(non-collagen)糖蛋白,如纤粘连蛋白(fibronectin)和层粘连蛋白(laminin)。

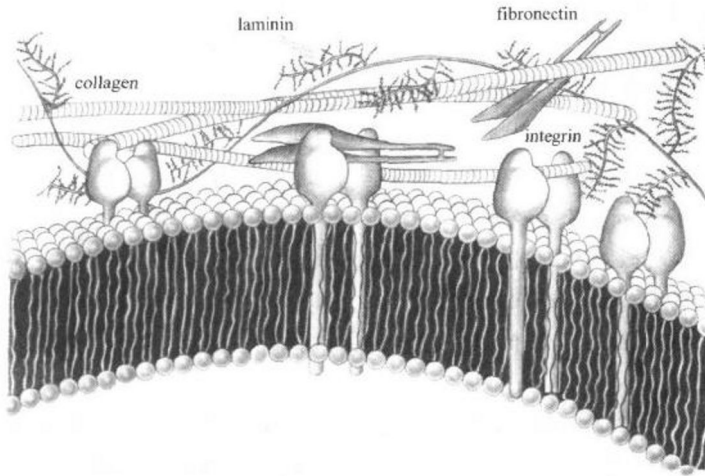


图 2-1-1 细胞外基质成分与结构示意图

(二)纤维成分的命名

纤维成分的命名在过去极为混乱,在此把比较通用的线样结构的名称列举如下:

1. 原丝(protofilament) 是指直径在 0.15~0.3nm 的纤维,为组成细丝的亚单位。
2. 丝或细丝(filament) 由原丝聚集而成,直径 2~20nm,可单独存在,也可聚集成束。
3. 原纤维(fibrile) 直径 20nm~2 μ m,由多数细丝聚集而成。

4. 纤维(fiber or fibre) 由原纤维聚集而成,因各类纤维性质不同而粗细迥异,如胶原纤维为 1~20 μ m,横纹肌纤维则为 10~100 μ m。但原纤维并非必然集结为纤维,也可呈板层状结构。

光镜下能分辨的原纤维实际上是较细的由原纤维聚集而成的纤维,有人为了区别光镜下和电镜下所见的纤维,就把光镜下能分辨的纤维称为原纤维,把电镜下能分辨的原纤维称为微纤维(microfibril)。但有人认为微纤维这一术语是不必要的,因为它在原纤维前边加上一个容易混淆的“微”字,一种结构应根据该结构自身的性质和特征,而不应根据显示它的仪器来命名和分类。不过,仍有一些作者习惯使用这一术语,尤其是在描述弹性纤维的组成时常常使用“微纤维”这一术语。

需要说明的是,微管(microtubule)、微丝(microfilament)和中间纤维(intermediate filament)是细胞内骨架成分,一般不用于描述细胞外基质的纤维。

二、胶原

胶原(collagen)是动物体内含量最丰富的蛋白质,在人体内,约占蛋白质总量的 30% 以上。它遍布于体内各种器官和组织,是细胞外基质中的框架结构,可由成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞及某些上皮细胞合成并分泌到细胞外。

(一)胶原的分子结构和胶原纤维

1. 胶原的分子结构 各种类型的胶原分子分子结构不同。但其基本结构单位为由三条 α 多肽链构成的三股螺旋结构,图 2-1-2 为胶原的三股螺旋结构。每一条 α 链是左手螺旋结构,又相互缠绕成右手超螺旋结构。三螺旋结构区都是由重复的 Gly-X-Y 序列构成,其中的 Gly(甘氨酸)残基是必需的,X 位主要为 Pro(脯氨酸),Y 位为任一氨基酸残基。这种结构的形成由 Gly 及 Pro 的重复存在所决定,是胶原的典型结构,然而近年发现类似的结构也存在于非胶原蛋白分子中。

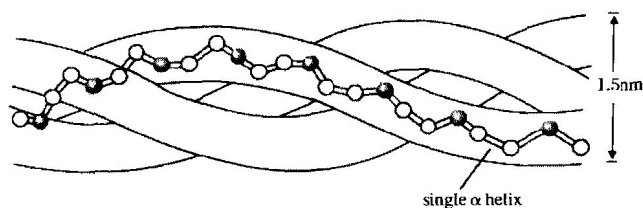


图 2-1-2 胶原的三股螺旋结构

2. 胶原纤维

(1)细胞外基质中常见的胶原纤维 由胶原分子装配成的最常见的结构形式是胶原纤维(collagen fiber)。这种纤维新鲜时呈白色,有光泽,故又称白纤维。胶原纤维粗细不等,直径可达几微米;长度变异大,有的可达几百毫米,在光镜下即可分辨。在电镜下可以看出,胶原纤维是由若干胶原原纤维(collagen fibril)平行排列组成,胶原原纤维的直径约 10~300nm,长达几百微米。图 2-1-3 为人肺泡隔间质 TEM 照片。图的上、下两部分为成纤维细胞(F)的胞质突起,中央部分为胶原纤维(Co),平行排列成束,胶原原纤维上可见横纹。胶原原纤维的长度和直径因所在组织不同、胶原的水合状态不同、个体年龄不同及样品制备的方法和条件不同而有很大差异。

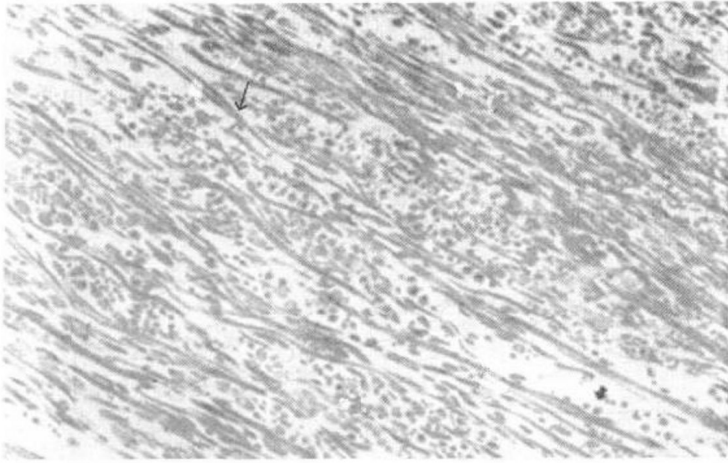


(源自钟慈声)

图 2-1-3 人肺泡隔间质细胞

原纤维成束出现,其排列方式和紧密程度,也因部位不同或功能不同而有差异。肌腱和韧带原纤维走向较直,且呈平行,构成明显的束状,这与疏松结缔组织的原纤维呈波状走向有所不同。腱膜处的原纤维还相互交织。图 2-1-4 为人骨骼肌腱膜 TEM 照片。图中可见腱膜由大量紧密排列的胶原原纤维相互交织而成。图示许多胶原原纤维纵切面,上有明显的周期性横纹(细箭头),此外并有许多胶原原纤维的横切面(粗箭头)。

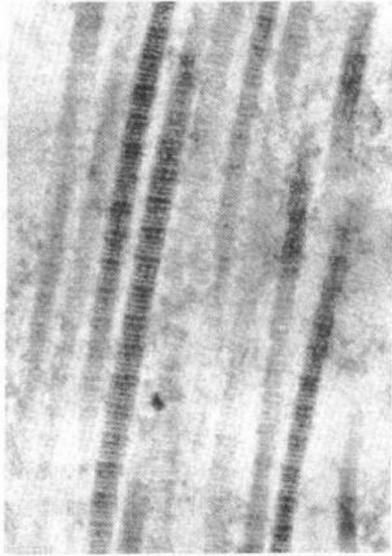
每条胶原原纤维是由胶原分子规则装配而成,胶原分子首尾相连接成线,并列成束,组成胶原原纤维。由于分子行排列极规则,从而使原纤维显现出周期性的横纹。应用 X 射线衍射技术和电镜技术可测得原纤维标本的横纹周期,每一周期的长度取决于原纤维的水合状态。在新鲜的湿胶原中周期范围在 64~70nm;在超薄切片上,其范围在 52~



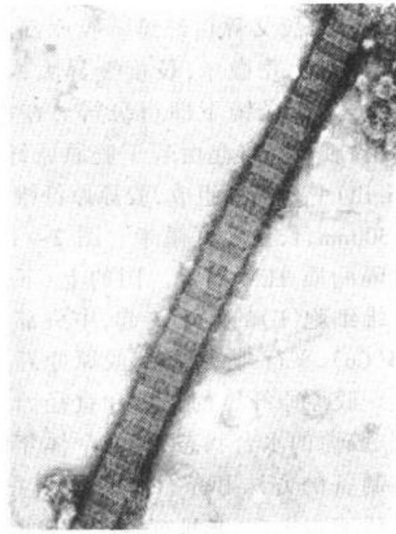
(源自钟慈声)

图 2-1-4 人骨骼肌腱膜 TEM 照片

62nm。制备电镜标本时,若注意防止皱缩,其周期也可达 68nm。绝大部分胶原原纤维,在电镜的正染(图 2-1-5)和负染(图 2-1-6)标本中,均呈现有周期性横纹,横纹周期过



(源自钟慈声)

图 2-1-5 人输尿管粘膜固有层
胶原原纤维 TEM 照片

(源自钟慈声)

图 2-1-6 分离的胶原原纤维
负染标本 TEM 照片

去多认为是 64nm,现在一般认为是 67nm。在正染标本中,每一周期内还可见 b、c、d、e、a 5 个亚带。图 2-1-5 为人输尿管粘膜固有层 TEM 照片,图示胶原原纤维的周期性横纹。在负染标本中,每一周期内可见明暗相间的 A、B 两个亚带,A 带较浅,B 带较深,两个亚带中还可见 8 条不清楚的条纹及一些纵向细丝。有人在暗带 B 中分辨出 10~13 条细条纹。图 2-1-6 为分离的胶原原纤维负染标本 TEM 照片。图中可见一条胶原原纤维,上有明

显的周期横纹,每一周期内有 A、B 两个亚带, A 带颜色较浅, B 带颜色较深,在 A、B 两亚带中还可见到更细的横纹,以及与胶原原纤维纵轴平行的纵行细丝。

(2) 几种特殊形态的胶原纤维

①锚原纤维(anchoring fibril) 其作用是将上皮细胞基板与其下的结缔组织连接起来,也见于许旺氏细胞外板四周。此种原纤维有直的、J 形的、V 形的,是否都是 V 形的不同切面尚不清楚。超薄切片中可见 J 形或 V 形锚原纤维将下方横向胶原纤维钩住,使之不易脱开。此种原纤维直径 20~60nm,长约 200~600nm,有周期性横纹,对细菌的胶原酶很敏感。纤维常结合 IgA 而存在,在一定的刺激下锚原纤维可以增多,在正常肺中看不到,肺纤维性硬化时常伴有该纤维增生。在退缩性营养不良性大泡性表皮溶解症(epidermolysis bullosa dystropica recessive)时,据称是由于锚原纤维形成受阻而导致数量减少所致。

②棘胶原(spiny collagen) 棘胶原是指成熟胶原纤维周期性横纹分节旁附有比较致密的物质颗粒,使其如棘而得名。颗粒间距是 64nm,棘胶原的意义尚不清楚。其所附颗粒内部呈细毛状结构,而蛋白多糖颗粒均匀一致。但在低倍镜下两者外形上相似。常见于皮下血肿、心血管壁内及一些肿瘤细胞间。

③纤维性长间距胶原(fibrous long-spacing collagen fibril) 简称 F.L.S 胶原。一般的胶原原纤维周期性横纹间距 67nm,而 F.L.S 胶原的横纹间距增宽。在试管内人工形成的 F.L.S 胶原,其间距可达 200~260nm,体内固有的可达 100~150nm。所谓人工 F.L.S 胶原是将正在溶解的一般胶原,加血清酸性糖蛋白,使糖蛋白与胶原结合而产生。天然的 F.L.S 胶原可出现在正常或病理器官,如角膜基膜、神经鞘瘤、星形细胞瘤组织内。如神经鞘瘤 TEM 观察可见纤维型长间距胶原,周期约为 125nm;家兔髓核 TEM 观察可见纤维型长间距胶原,周期 100nm。有时,此种胶原灶状群集称为 Luse 小体。F.L.S 胶原较正常胶原纤维粗,看不见细横纹,有纵行细丝。不论是人工的或是天然的 F.L.S 胶原,其形成与胶原与蛋白多糖或糖蛋白的结合有关,此外也常见于心肌炎、麻风病变、骨肉瘤、脉管肉瘤及副甲状腺癌等。

④巨胶原纤维或石棉样纤维(giant collagen or amiantoid fiber) 一般胶原原纤维的直径为 10~120nm,最粗可达 300nm。巨胶原原纤维的直径可比正常粗 6~10 倍,达 1 μ m 左右。横纹周期仍保持在 56~62nm 间。多发生在软骨组织。此等原纤维的灶状群集称为石棉样纤维,与老年性或退行性改变有关。老年性关节炎性软骨,基质减少,原纤维间结合力增加,即形成这种改变或称微瘢痕(microscar)。巨胶原纤维可能由更细的原纤维融合而成,在其融合增粗处(两个短箭头之间)达 1 μ m 宽,并贯穿全粗切面。

⑤螺旋化胶原(spiralled collagen) 此种胶原原纤维纵切面呈螺旋状,横切面直径及形状不一,不呈圆形,常呈花瓣样或星状,并变粗。有时横切面可见洞或腔。可出现在肺气肿、弹力纤维瘤等病理情况下。如骺端发育不良的螺旋状胶原,其横切面原纤维呈虫蛀样,纵切面原纤维呈螺旋状或磨损状;挪威硝石损害的皮肤,其螺旋状胶原横切面呈花样;淀粉样变活检样品的螺旋状胶原的纵切与横切面呈圆形的胶原原纤维。关于此种改变的发生机理有两种看法:原胶原细丝因聚合缺陷不能形成实体的胶原原纤维或胶原原纤维的分解或发育不良所致。

3. 一般细胞外基质的胶原纤维形态学变化