

目前我们冻存胚胎脑组织的研究仍局限在大鼠这样较低等的哺乳动物,很有必要将研究扩展到高等哺乳动物,最终目的在于有效地冻存人胚胎脑组织,为脑组织移植的研究和实际应用提供方便。

摘 要

大鼠胚胎大脑组织用 1 mol/L 二甲基亚砜(DMSO)作为保护剂,以 1 °C/分的速率冷冻,至 -70 °C,在液氮中保存 60 天后在 37 °C 水浴中快速复温并去除保护剂,然后进行体外培养。结果表明,冻-融后的胎脑组织在 55 天的体外培养过程中,神经元及其他非神经元细胞逐渐生长分化成熟,具有正常的细胞形态;美兰活体染色、甲酚紫染色和乙酰胆碱酯酶(AChE)染色结果显示,组织中各种细胞的形

态和染色反应正常,神经细胞有发达的尼氏体,胆硷能神经元也分化成熟;放射自显影结果显示,培养的组织中 50% 以上的神经元有高亲和性摄取 GABA 的功能。这些结果说明,胚胎大脑组织在冻存后其活性在很大程度上能得以维持。

参 考 文 献

- [1] 柏秀松等, 1988 年, 中华器官移植杂志, 9(3): 114—115。
- [2] 李龄等, 1988 年, 中华器官移植杂志, 9(1): 46—48。
- [3] Das, G. D. et al., 1983, *J. Neurosci. Methods*, 8: 1—15.
- [4] Jensen, S. et al., 1987, *Cryobiology*, 24: 120—134.
- [5] Silani, V. et al., 1988, *Brain Research*, 454: 383—386.
- [6] Silani, V. et al., 1988, *Brain Research*, 473: 169—174.

V_E 对培养的鼠心肌细胞氧自由基损伤的影响

苗智慧 *刘京生 江 岩 于占久
(河北省医科学院病生理室 *微生物室)

近年来,自由基在发病中的作用普遍受到人们的重视,某些疾病如肿瘤、化学中毒、感染、炎症反应、自身免疫病、辐射损伤及心血管系统疾病等病理过程都与自由基引发的脂质过氧化作用有关^[1]。因而,抗自由基损伤的研究是当前倍受重视的课题。V_E 为抗氧化剂,已为许多实验证实^[2,3]V_E 对细胞的氧化损伤具有保护作用。本文采用培养的新生鼠心肌细胞,以电生理及膜通透性改变为观察指标,从细胞水平进一步观察和证实了 V_E 的抗自由基损伤作用。

材 料 和 方 法

取生后 24—48 小时的 Wistar 鼠心尖部组织进行常规的心肌细胞培养^[4]。培养基为 MEM (美国 Life Technologies Inc 生产) 加 20% 的小牛血清(浙江金华

市清湖犍牛利用研究站生产)。置于通 95% 空气和 5% CO₂ 气体、36.5 °C 的 CO₂ 孵箱内进行培养。实验分组: 对照组、XOD 组(在对照组基础上加入黄嘌呤 0.42 mmol/L 和黄嘌呤氧化酶 5.3 nmol/L。美国 Sigma Chemical Company 生产)、V_E 组(在 XOD 组基础上加入 V_E 16 ug/ml, 北京第二制药厂生产)。在培养的第 4 天,向培养基中加入黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、V_E 8 小时后,启开培养瓶上盖,将其置于恒温循环槽内,并通以 95% 氧气和 5% CO₂ 气体,以维持 pH 7.2、温度 36.5 °C 实验条件。应用玻璃微电极技术胞内引导心肌细胞动作电位及其一次时间导数。待电极刺入细胞内稳定 1 分钟后,Apple IIe 微机联机采样分析动作电位的波幅(APA)、超射(OS)、最大舒张电位(MDP)、阈电位(TP)、最大除极速率(V_{max}) 以及动作电位复极 10%、50% 水平时的波宽(APD₁₀、APD₅₀)。膜通透性检测采用向培养基中逐渐加 BaCl₂

董力同志参加本实验技术工作。

(重庆北碚化学试剂厂)的方法,使培养基中BaCl₂的浓度成倍依次增加,通过闭路电视系统经光电转换和频率放大后,由频率分析仪记录心肌细胞收缩频率变化曲线,并同时记出BaCl₂诱导的心肌细胞停跳的阈值,以此反映心肌细胞膜受损程度。

实验数据经组间t检验进行统计学处理。

结 果

各组动作电位的表现及电参数的变化

XOD组动作电位的波幅减低、波宽变窄、最大去极化速率减慢(图1),动作电位各电参数减小,与对照组比较有明显差异(P<0.05—0.001)。V_E组与XOD组比较,APA、OS、MDP、V_{m_{ax}}、APD₅₀各数值显著增大(P<0.05—0.001)。而与对照组比较则无显著性差异(表1)。

BaCl₂对各组心肌细胞频率曲线改变的影响

对照组加BaCl₂后频率曲线变化较缓慢,平稳。XOD组对BaCl₂反应敏感,随着BaCl₂浓度的升高,频率增快明显,曲线陡度大,而V_E组曲线变化亦较平缓(图2)。

BaCl₂引起心肌细胞停跳的阈值

XOD组与对照组比较,引起心肌细胞停跳所需BaCl₂的最低浓度明显减低(P<0.05)。V_E组与XOD组比较所需BaCl₂的浓度明显增高(P<0.05),而与对照组比较则无显著性差异(表2)。

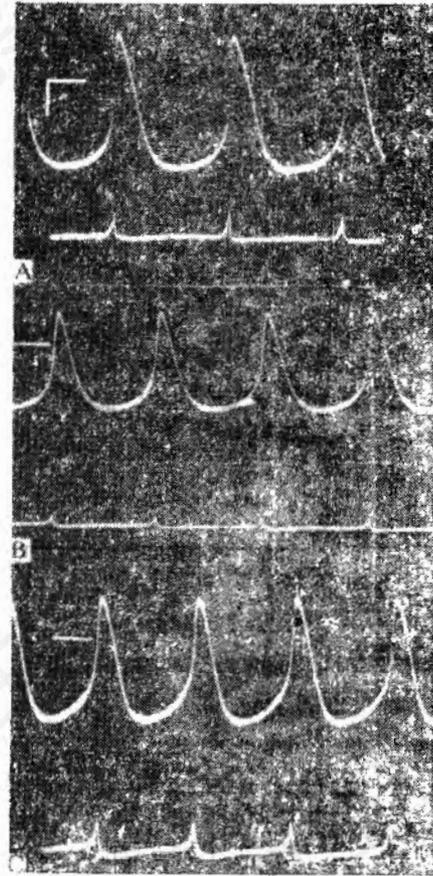


图1 各组动作电位及V_{m_{ax}}的表现
A 对照组 B XOD组 C V_E组
水平标尺: 100 ms
垂直标尺: 20 mV 20 V/s

讨 论

黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统在分子氧作用

表1 各组动作电位电参数的改变

	APA (mV)	OS (mV)	MDP (mV)	V _{m_{ax}} (V/s)	TP (mV)	APD ₁₀ (ms)	APD ₅₀ (ms)
CON	68.7±10.4 (80)	24.6±6.3 (79)	43.9±6.6 (80)	10.4±3.6 (72)	27.7±5.7 (80)	21.0±4.4 (76)	79.7±21.5 (79)
XOD	51.7±15.9 (25)	15.7±6.2 (25)	36.0±11.3 (25)	4.9±2.4 (25)	23.9±7.1 (25)	18.7±4.2 (25)	70.2±17.8 (25)
	###	###	###	###	##	#	#
XOD + V _E	64.2±12.3 (29)	22.0±6.9 (29)	42.2±8.0 (29)	9.0±3.7 (29)	26.4±6.3 (29)	21.2±5.0 (29)	81.8±23.2 (29)
	**	***	*	***			*

$\bar{X} \pm SD$ (N): 动作电位数

*, P<0.05 **, P<0.01 ***, P<0.001: 与对照组比较
*, P<0.05 **, P<0.01 ***, P<0.001 与XOD组比较

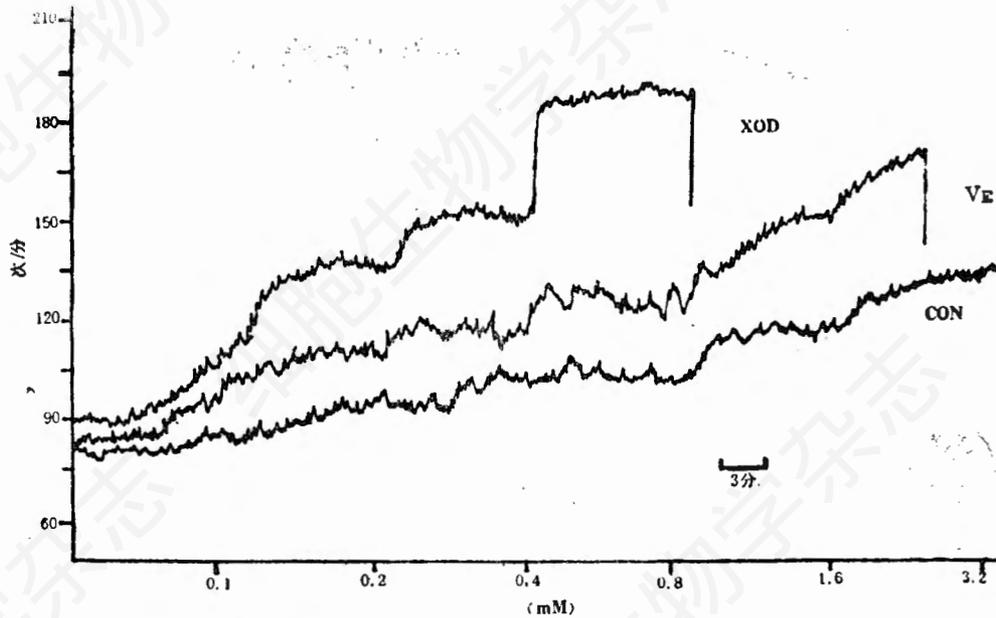


图2 BaCl₂对心肌细胞搏动频率的影响

横坐标: BaCl₂的浓度

纵坐标: 细胞搏动频率

表2 BaCl₂致心肌细胞停跳的阈浓度

	CON	XOD	XOD + V _E
BaCl ₂ (mM)	2.56 ± 0.88	1.13 ± 0.92	2.56 ± 0.88
	(5)	(6)	(5)
		井	*

$\bar{X} \pm SD$ (N): 细胞群落数

*, P < 0.05 与对照组比较 *; P < 0.05 与 XOD 组比较

下产生有细胞毒性的超氧阴离子自由基, 进一步歧化反应生成过氧化氢, 然后通过 Haber Weiss 反应生成具有更大毒性的羟基自由基。这些氧代谢毒物首先通过对细胞膜和线粒体膜的脂质过氧化引起细胞损伤^[5,6]。当心肌细胞膜完整性受损时, Ba²⁺跨膜扩散容易, 膜对 Ba²⁺的通透性加大, 以致 BaCl₂的停跳阈低^[7]。本实验 XOD 组表现为心肌细胞动作电位电参数降低, 膜对 BaCl₂的通透性增大, 频率曲线变化明显, BaCl₂引起细胞停跳的阈值明显减低, 均表明细胞明显受损, 细胞膜完整性差。V_E为多不饱和脂肪酸的强抗氧化剂, 能使脂质过氧化过程中产生的 LOO·转变为 LOOH,

从而阻断脂质过氧化的链式反应^[8], 并可迅速代谢已形成的过氧化物^[9], V_E发挥抗氧化作用后本身转变为化学性质较不活泼的 V_E自由基, 由此减轻细胞的氧化损伤。本实验 V_E组与 XOD 组比较, 心肌细胞 APA、OS、MDP、V_{max}和 APD₅₀数值增大, 加 BaCl₂后频率曲线变化转缓慢, BaCl₂引起细胞停跳的阈值明显增高, 均表明细胞受损程度明显减轻, 细胞膜完整性较好。证实 V_E对黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统所致的培养心肌细胞氧自由基损伤具有保护作用。

摘 要

本文通过向培养基中加入黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶系统造成细胞的氧自由基损伤, 以心肌细胞动作电位和膜通透性的改变为指标, 从细胞水平观察了 V_E对氧自由基损伤的影响。实验结果: XOD 组心肌细胞动作电位各电参数明显降低, 与对照组比较有明显差异 (P < 0.05—0.001), BaCl₂引起心肌细胞停跳的阈浓度减低 (P < 0.05), 而 V_E组与 XOD 组比较,

动作电位各电参数增高($P < 0.05-0.001$), $BaCl_2$ 的阈浓度增高($P < 0.05$)。提示 V_E 对黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶引起的培养心肌细胞氧自由基损伤具有保护作用。

参 考 文 献

- [1] 曹锡清, 1986, 生物化学与生物物理进展, 2: 17-23。
[2] 陈远等, 1987, 生物化学杂志, 3(2): 113-118。

- [3] Pascoe, Gary A, et al. 1987, *Eur. J. Biochem*, 166(1): 241-247.
[4] 苗智慧等, 1988, 生理科学, 8(3): 158-161。
[5] 时安云等, 1988, 中国病理生理杂志, 4(4): 250-254。
[6] 赵保路等, 1989, 生理科学, 9(4): 1-4。
[7] 江岩, 1989, 河北省医学院学报, 13: 31-37。
[8] 靳永刚等, 1989, 中国药理学与毒理学杂志, 3(2): 138-141。
[9] 方允中, 1989, 生理科学, 9(4): 5-9。

人胚心肌细胞心房利钠多肽的免疫电镜观察*

王 治 荣

(哈尔滨医科大学病理生理教研室)

M. Ghazizadeh、佐佐木喜廣、相原薰

(日本医科大学中央电子显微镜研究施設)

心肌细胞尤其心房肌细胞内含有特殊颗粒(Specific granules, SG)^[1-4]。由于此种SG的超微结构不同而分之为A、B和D颗粒^[2-4, 11], 至于C型颗粒在早期文献中虽有描述, 但后来发现属溶酶体或残渣小体, 故已废弃不用。

1979年DeBold等^[5]提出SG的内含物起调节动物机体水容量和钠含量的作用。1984年美国的Currie^[6]和日本的Kanagawa^[7]实验室分别从大鼠和人心房组织中提取、分离、纯化出一类活性肽, 称为心房肽(atripeptins)。此类肽具有强烈的利尿、利钠和降血压作用, 也称为心钠素(cardionatrin)或心房利钠多肽(atrial natriuretic polypeptide, ANP)。

近年以放免法^[8]和免疫细胞化学方法^[4]证实一些动物和人心房肌细胞中确存在ANP。肾、唾液腺、脑和造血组织中也存在ANP^[9]。

贮存在心房肌细胞SG中的ANP为高分子量的前驱物(pro-ANP, 134个氨基酸组成的多肽), 在分泌或分泌后快速转变为由28个氨基酸组成的活性肽——ANP^[10]。

本文采用因妇产科指征而小剖腹取得的14

例人胚(3—4个月, 少数为2个月或6个月)心房和心室的超薄切片, 以免抗人ANP(α -hANP)血清和金标记的山羊抗兔IgG进行了免疫电镜观察。

材 料 和 方 法

用美国Peninsula实验室的人心房肽(α -hANP)经载体连接免疫家兔制得抗ANP血清(购自河北省医学科学院), 金标记的山羊抗兔IgG血清系东京市场上的销售品。

由小剖腹取得的14例3—4个月(少数为2或6个月)胎儿(取材时胎心仍在搏动)心房和心室, 经常规的2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定, 系列丙酮脱水和Epon 812包埋。Reichert超切机超薄切片, 镍网捞取切片, 经过夜干燥切片后, 按下述步骤, 室温下在潮湿小室内进行免疫反应:

1. 10% H_2O_2 液滴内蚀刻10分钟, 使组织表面暴露出来, 以利于随后的结合反应。然后以PBS彻底清洗。
2. 正常山羊血清(1:20)15分钟, 以封闭非特异

* 本文受中国国家自然科学基金和WHO基金资助。