

- [9] Dvorak, H. F. et al., 1979, *J. Natn. Cancer Inst.*, 61: 6—11.
- [10] Roos, E. and K. P. Dingemans, 1979, *Biochim. Biophys. Acta.*, 560: 135—166.
- [11] Hauschka, P. V. et al., 1986, *Haemos-*

*tasis*, 16: 273—287.

- [12] De Metz, M. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257: 5326—5329.
- [13] Donati, M. B. et al., 1986, *Haemostasis*, 16: 288—294.

## 传代内皮细胞形态和功能变化的关系

王毅 朱佩芳 王正国

(重庆, 第三军医大学野战外科研究所 630042)

迄今为止, 国内外已有不少学者对体外培养的内皮细胞(EC)进行了研究。并已从凝血因子, 胞浆 Weibel-Palade 小体和染色体数目等方面证明了培养 EC 在有限的传代次数内保持了内皮细胞的生物学性质<sup>[1-5]</sup>。但关于传代 EC 形态和功能研究的专门报道还尚未见到。本实验发现, 传代 EC 在其生物学性质没有发生根本改变的前提下, 也存在着一些形态和功能规律性变化。这些变化对合理选择使用传代 EC 来进行实验研究有着重要的意义。本文结合传代 EC 在相差显微镜下的形态学改变及其图象分析研究和蛋白质分泌功能的变化, 来探讨传代 EC 形态和功能变化的关系, 旨在为合理选择传代 EC 来进行实验研究提供参考。

### 材料和方法

#### 一、内皮细胞分离及培养

参照我室建立的牛肺动脉 EC 的分离、培养、鉴定及纯化方法进行<sup>[6]</sup>。

#### 二、相差摄影

取 1、3、4、7、9、12、15 和 20 代融合单层 EC, 置倒置显微镜(重庆光学仪器厂产品)下, 给出指示光标(100  $\mu\text{m}$ ), 行负相差放大 100 倍摄影, 将其负片行统一倍数的光学放大, 制成照片备用。

#### 三、计算机图象分析

1. 样本 相差摄影所制成的统一放大照片。
2. 仪器 MAS-1 图象分析系统(重大光电精密仪器研究所提供)。

#### 3. 测量参数及计算

测量参数 Area(面积)和 CH(圆形度)。

每次测量, 计算机以照片上光标的长度换算为测量参照单位(mm), 然后直接用积分法算出细胞投影面积; 用细胞周长除以其外切圆周长算出圆形度(见图 1), 其值在 0—1 之间, 它反映细胞接近圆的程度, 比值越接近 1, 说明细胞平面图形越近似圆。

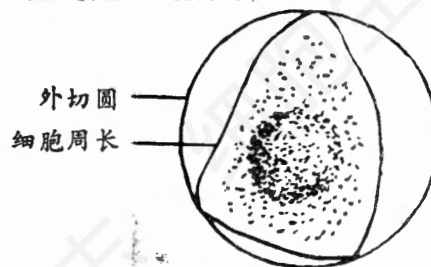


图 1 圆形度计算示意

#### 四、培养液上清蛋白测定

参照吴如丹<sup>[7]</sup>的考马斯亮蓝 G-250 染色法测定培养上清蛋白质。具体方法如下:

1. 标准蛋白质溶液 牛血清白蛋白 1 mg/ml。
2. 染色液 称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 ml 95%乙醇中, 加 100 ml 85%磷酸, 加水稀释到 1 升。
3. 标准曲线的制作 在试管内分别加 0、5、10、20、25、30、40、50  $\mu\text{l}$  标准蛋白质溶液, 用水补足到 50  $\mu\text{l}$ , 加 3 ml 染色液混匀, 在室温(20—25 $^{\circ}\text{C}$ )中放置 15 min, 用 752 型紫外分光光度计以 595 波长比色, 读 OD 值, 作标准曲线。

本文承蒙重庆大学光电精密仪器研究所大力协助, 在此深表谢意。

表1 各代内皮细胞面积和圆形成度

| 传代次数     | 样本数 | 细胞数(个) | 细胞面积(mm <sup>2</sup> )( $\bar{X} \pm SD$ ) | 圆形成度( $\bar{X} \pm SD$ ) |
|----------|-----|--------|--|--------------------------|
| 1        | 3   | 17     | 0.00008 ± 0.000                            | 0.63113 ± 0.191          |
| 3        | 3   | 16     | 0.00088 ± 0.000                            | 0.55143 ± 0.108          |
| 4        | 3   | 23     | 0.00115 ± 0.001*                           | 0.54786 ± 0.137          |
| 7        | 3   | 12     | 0.00121 ± 0.001*                           | 0.60270 ± 0.134          |
| 9        | 3   | 18     | 0.00142 ± 0.001*                           | 0.65769 ± 0.122          |
| 12       | 3   | 14     | 0.00196 ± 0.003*☆                          | 0.58414 ± 0.106          |
| 15       | 3   | 17     | 0.00222 ± 0.001*☆★○                        | 0.60622 ± 0.090          |
| 20       | 3   | 16     | 0.00224 ± 0.001*☆★○                        | 0.50957 ± 0.021          |
| <i>p</i> |     |        | <0.001                                     | = 0.050957               |

注： $p < 0.001$  说明代间 EC 面积均值的比较非常有非常显著的差异。其中\*表示与1代相比有显著性差异( $p < 0.05$ )，☆表示与3代相比有显著性差异( $p < 0.05$ )，★表示与4代相比有显著性差异( $p < 0.05$ )，○表示与7代相比有显著性差异( $p < 0.05$ )。余两两比较均无显著性差异。

表2 各代内皮细胞培养液上清蛋白

| 传代次数     | 样本数 | 上清蛋白 OD 值( $\bar{X} \pm SD$ ) |                  | 蛋白浓度( $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ )<br>( $\bar{X}$ ) |
|----------|-----|-------------------------------|------------------|---|
|          |     | 对照组                           | 测定组              |   |
| 1        | 4   | 0.0000 ± 0.000                | 0.6755 ± 0.028   | 30  |
| 3        | 4   | 0.0000 ± 0.000                | 0.5515 ± 0.015*  | 25  |
| 4        | 4   | 0.0000 ± 0.000                | 0.5615 ± 0.009*  | 26  |
| 7        | 4   | 0.0000 ± 0.000                | 0.5488 ± 0.055*  | 24  |
| 9        | 4   | 0.0000 ± 0.000                | 0.5948 ± 0.030*  | 27  |
| 12       | 4   | 0.0000 ± 0.000                | 0.5323 ± 0.066*  | 23  |
| 15       | 4   | 0.0000 ± 0.000                | 0.3225 ± 0.031*☆ | 13  |
| 20       | 4   | 0.0000 ± 0.000                | 0.3525 ± 0.023*☆ | 14  |
| <i>p</i> |     |                               | <0.001           | <0.001  |

注：对照组为无血清 M-199 培养基，其中\*表示与1代相比有显著性差异( $p < 0.05$ )，☆表示与3、4、7、9、12代比较有显著性差异( $p < 0.05$ )。余两两比较无显著性差异。

4. 培养液上清蛋白测定 取上述各代 EC 4 瓶(25 ml)，待4—6天长满后，用 D-Hank's 液清洗两遍，换上无小牛血清培养液 3 ml，置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 环境中培养 12 h，取 50 μl 培养液上清按上法测定。最后从标准曲线上查得蛋白质浓度。

#### 五、统计学处理

实验结果均用均数 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm SD$ ) 表示，多组均数的比较用单因素方差分析，均数间两两比较用 NEWMAN-KEUL'S TEST 和 BARTLETT TEST。两指标之间的关系的检验用相关系数的估计和其显著性检验。所用的 PDA-2 和 PDA-3 程序来源于 SPMR 系统(第三军医大学数学教研室提供)。

## 结 果

### 一、形态学改变

在相差显微镜下，单层 EC 呈典型的铺路石状，EC 有圆形、多边形、椭圆形等多种形状，各代内和代间的细胞大小和形状均有一定差异，其中以代间细胞大小的差异比较明显(图版图 1—4)。

图象分析结果如表 1 所示。

统计分析结果表明：①代间细胞“面积”存在显著性差异，而代间细胞圆形成度则无显著性

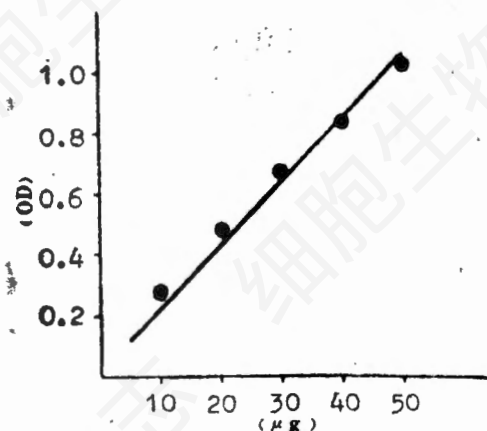


图2 蛋白测定标准曲线

差异；②代间细胞“面积”的显著性差异存在于原代与4、7、9、12、15、20代之间；3代与12、15、20代之间；4代与15、20代之间；7代与15代、20代之间。

### 二、功能改变

蛋白标准曲线见图2。

EC培养上清蛋白测定结果见表2所示。

统计结果显示，代间细胞的培养液上清蛋白测定值有显著性差异，且此显著性差异存在于1代与3、4、7、9、12、15、20代之间和3、4、7、9、12代与15、20代之间。

### 三、形态和功能的相依关系

取上述各代EC面积均值和培养液上清蛋白

表3 传代内皮细胞面积及其上清蛋白浓度

| 指标                     | 样本点 | 样本容量 | $\bar{X} \pm SD$   |
|------------------------|-----|------|--------------------|
| EC面积(mm <sup>2</sup> ) | 8   | 133  | 0.001395 ± 0.00074 |
| 上清蛋白浓度(μg/50 μl)       | 8   | 32   | 22.75 ± 5.6539     |
| 相关系数                   |     |      | -0.86035           |

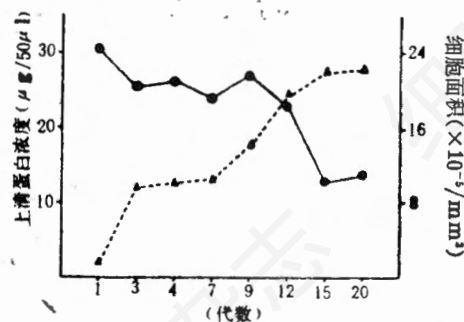


图3 各代内皮细胞面积与培养液上清蛋白浓度

●—●上清蛋白浓度 ▲—▲细胞面积

白浓度均值，作相关系数估计和相关系数的显著性检验，其结果见表3。

相关系数显著性检验结果： $p=0.00306$ 。二指标为显著性负相关关系(见图3)。

## 讨 论

### 一、形态学变化

各代EC间的圆形度经统计学分析未见有显著性差异，说明代间EC在形状上的差异没有统计学意义。而各代细胞“面积”随传代次数增加却呈逐渐增大趋势，并且代间细胞“面积”存有显著性差异，其中4—9代、15—20代相对稳定。这种EC“面积”的逐渐增大有两种可能：①是附壁面积增大所致(见图4)。

取活体动物大动脉作扫描电镜观察，发现EC呈“柱状”(图版图5)，而培养EC则呈“扁平状”(图版图6)。EC从体内到体外培养，这种由“高”到“低”的变化可能在传代EC中重演。因为从理论上讲，传代次数越少，EC的生物学性质及功能和其正常生理情况下的性质和功能就越接近，反之愈远。因此EC投影面

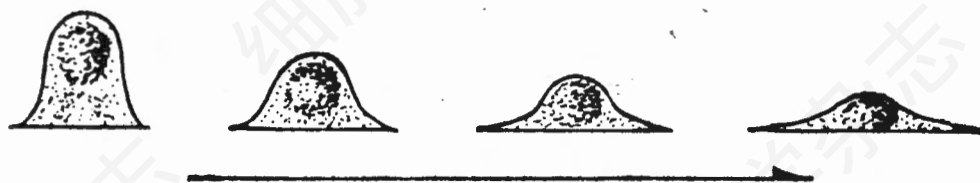


图4 各代内皮细胞附壁面积变化示意

注：→表示传代方向

积随传代次数增加而增大的现象,受EC附壁面积增加的影响的可能性是存在的。有人<sup>[8]</sup>认为,EC在附壁,伸展到融合成片的过程中,EC在原伸展状态下产生了一定的回缩。因此,可以认为这种EC摄影面积的大小,在一定程度上反映了EC的收缩功能,即面积越大,收缩功能越低,反之收缩功能越强。②是EC体积增大所致。本实验虽然没有进行对EC的三维测量工作以及对EC体积的推估。但从原代到20代EC面积增加了27倍左右的情况来看,这种EC“面积”的大幅度增加,单纯归因于EC附壁面积的增加,似乎不好解释,因此推测,传代EC也有体积的增加。

## 二、功能变化

在EC的体外实验中,已有不少学者选用过ACE,前列腺素,LDH, FN、酸性磷酸酶等指标来评估EC的功能。在这些指标中绝大部分物质都属于蛋白质,因此选用上清蛋白含量能比较宏观地反映EC的代谢功能。从本实验的结果来看,3—12代、15—20代EC培养液上清蛋白测定值是稳定的(相互之间没有显著性差异)。因此,可以认为3—12代、15—20代EC的功能是稳定的。

## 三、形态和功能的关系

传代EC“面积”和上清蛋白浓度的相关分析显示,二者呈显著负相关( $p < 0.01$ )。说明随着EC“面积”的增大,其蛋白分泌功能降低。产生这种现象的原因可能与以下两个因素有关:①EC投影面积的增大势必影响到单位面积上的细胞数量。通过对3、7、12、20代的EC的细胞核点计数(即长度点计数法,测量单位为:细胞核数/1cm线段,反复随机取点测量25次,取均值),并将其倒数与相应各代EC摄影面积作相关分析来进行验算,其相关系数为0.82。说明细胞投影面积的改变与单位面积上细胞数的改变密切相关。因此可以认为单位面积上EC数量的减少是蛋白质分泌量下降的原因之一。②从图版图3、4可以看出,EC在12代以后已出现空泡,这是细胞逐

渐老化的征象之一。因此细胞老化,功能降低也影响到蛋白质的分泌功能。

综合细胞投影面积和蛋白分泌情况来看,在4—12代,15—20代EC的形态和功能均处在相对稳定的阶段。这提示:在传代EC中可能存在着多个形态和功能的“平台期”,处在这些“平台期”中的传代EC,只要不是功能丧失,就可以作为实验选材。

通常选用哪几代细胞来进行体外实验,习惯上依据两点考虑:①要有足够的细胞数量;②要有稳定的生物学特性。目前国内外在体外实验中所选用的EC传代次数和范围有较大的差异,如5—12代、2—9代、2—8代、4—12代、22—30代,5—15代等<sup>[9-15]</sup>。有的甚至没有说明所使用的是哪几代细胞<sup>[10-12]</sup>。本实验的结果显示,传代EC间的形态和功能存有显著性差异,忽略这些差异,就会给EC体外实验的结果带来误差。当然,EC种类的不同、实验材料和方法的不同,对代间EC的形态和功能的差异会有影响。因此,如何选用传代EC来进行体外实验,应根据不同EC和不同的实验方法的预实验结果来决定。

## 结 论

1. 传代EC间形态和功能存有显著性差异。
2. 传代EC间形态和功能的变化呈统计相依关系,可以利用其中任何一方的状况对另一方的状况作出大致的判断。
3. 传代EC中有一个规律,即形态和功能有相对稳定的阶段,是作为体外实验选材的正确时期。如果从细胞数量充足,细胞生物学性质稳定且功能旺盛三方面考虑,那么3—12代以内应该是体外实验选材的最佳范围。

## 摘 要

现在内皮细胞体外培养技术已在医学实验中得以日渐广泛的应用,为了更为合理地选择传代内皮细胞来进行各种研究,本实验结合了

传代内皮细胞在相差显微镜下的形态学改变及图象分析技术和蛋白质分泌功能的变化,探讨了传代内皮细胞形态和功能变化的关系。结果显示,传代内皮细胞存在着形态和功能相对稳定的阶段,在此阶段的几代细胞是作为实验选材的理想对象。而非稳定阶段的各代细胞间形态和功能都存有显著性差异,不应作为实验选材。

### 参 考 文 献

- [1] Maciag T. et al., 1982, *J Cell Biol.*, 94: 511—513.  
 [2] Martin G. M. et al., 1977, In *growth, nutrition, and metabolism of cells in culture*. ed. by Rotblat. G. H., et al, New York Academic pp. B—27.  
 [3] 魏少敏等, 1987, 中国病理生理杂志, 3(3): 188—191.  
 [4] 董玉兰等, 1989, 中国医科大学学报, 18(2): 81—85.  
 [5] 卢耀增等, 1982, 中华病理学杂志, 11(3): 176—179.  
 [6] 王毅等, 1991, 细胞生物学杂志, 13(1):

47.

- [7] 鲁子贤, 1989, 蛋白质与酶学研究方法, 山东科技出版社, 5—7页。  
 [8] 盛民立等, 1987, 上海医科大学学报, 14(1): 71—73.  
 [9] Meyrick B. et al., 1989, *J Cell Physiol.*, 138(1): 165—174.  
 [10] Meyrick B. et al., 1987, *Fed Proc.*, 46(8): 2516—2520.  
 [11] Block E. R. et al., 1985, *J Cell Physiol.*, 122(2): 240—248.  
 [12] Hamill R. J. et al., 1986, *Infect Immun.*, 54: 833—836.  
 [13] 饶花平等, 1989, 湖南医科大学学报, 14: 115—118.  
 [14] Meyrick B. et al., 1986, *Am J Pathol.*, 122: 140—151.  
 [15] 汪建等, 1988, 中国病理生理杂志, 4(1): 31—34.  
 [16] Harlan J. M. et al., 1983, *Lab Invest.*, 48(3): 269—274.  
 [17] Kenneth L. et al., 1987, *J Appl Physiol.*, 63(2): 840—850.  
 [18] Gerrity R. C. et al., 1975, *Experimental and Molecular Pathology*, 23: 379—385.  
 [19] Shasby D. M. et al., 1987, *Experimental Lung Research*, 15(3): 345—357.

## 运用包埋后免疫细胞化学方法研究视网膜神经细胞的多递质共存\*

吕建利 王厚华

(中国科学院上海生理研究所 200031)

包埋后免疫细胞化学方法 (Postembedding immunocytochemical technique) 是一种组织先用树脂包埋、切片后再进行免疫细胞化学反应的方法<sup>[1-4]</sup>。与通常冰冻切片的免疫细胞化学方法相比,其最大优点是可以按照实验的不同要求,制备连续的超薄切片(500—1000 Å)和半薄切片(0.5—2 μm),再进行免疫细胞化学反应。

在视网膜神经递质及其共存的研究中,由于无长突细胞包含的递质、调质和其他神经活

性物质特别多<sup>[5]</sup>,在视信息调控中具有特别重要的作用,因此引起了人们极大的关注。但是这种细胞的胞体较小,若要检测一个细胞同时包含2种以上递质和调质,最好的方法是采用树脂包埋后半薄切片的光镜免疫细胞化学方法。该方法在应用中有两大困难:1. 如何使浸蚀得当,既要使组织抗原决定簇从被封闭状态中解脱出来,恢复自由态,又不影响其免疫

本所电镜室曲富金、尹眉协助切片,特此致谢。

\* 国家自然科学基金项目。