

- [4] Sherrer, R. W. et al., 1972. *Cancer Res.*, 32: 339-342.
- [5] Garrett, C. T. et al., 1973, *Cancer Res.*, 33: 1662-1669.
- [6] Patel, N. T., D. S. Folse and V. Holoubek, 1979, *Cancer Res.* 39: 4460-4465.
- [7] Sherrer, R. W., 1974. *Biochemistry*, 13: 1764-1767.
- [8] 张玉砚等, 1982, 实验生物学报, 15: 137-143.
- [9] 张玉砚等, 1987, 实验生物学报, 20: 47-52.
- [10] 强家模等, 1978, 实验生物学报, 11: 87-93.
- [11] Belhard, M. G., Ovdelet, P., Chambon, P., 1973. Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *Europ. J. Biochem.* 36: 32-38.
- [12] 张玉砚等, 1978, 实验生物学报, 11: 97-104.
- [13] Bloemehdal, H., 1974, *Methods in Enzymology*, 30 (F): 313-327.
- [14] 徐亚男等, 1980, 实验生物学报, 13: 371-376.
- [15] 孙 蕊, 张玉砚, 1984, 实验生物学报, 17: 47-53.
- [16] Langridge, J., 1980, *Anal. Biochem.* 103: 264-271.
- [17] Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1982. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [18] Southern, E. M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- [19] Thomas, P. S., 1980, *PNAS USA* 77: 5201-5205.

硒对培养的心肌细胞的影响*

王治荣 李金凤 佟利家 徐世东 王孝铭

(哈尔滨医科大学病理生理教研室)

微量元素硒在机体内是一种非特异性抗氧化剂,是谷胱甘肽过氧化酶的组分之一,此酶能防止毒性过氧化物在细胞内蓄积,保护细胞免受损伤^[1-3]。近年来在细菌和哺乳动物细胞中陆续发现了多种含硒转移核糖核酸(se-tRNA),并证明这种se-tRNA对某些信使核糖核酸(mRNA)翻译蛋白质的过程具有特异的促进作用^[8]。se-tRNA在蛋白质合成中的作用越来越引起人们的重视。

本文利用小剖腹取得的4个月人胚、新生大鼠和胚胎小鼠心脏,进行了心肌细胞、组织和器官培养,观察:(1)硒对培养的人胚心肌细胞的影响;(2)硒对儿茶酚胺(异丙基肾上腺素和去甲基肾上腺素)性心肌损伤的保护作用;(3)硒对胍引起的心肌细胞脂质过氧化损伤的保护作用。

材 料 和 方 法

心肌细胞培养:从我校附属二院产科得到因产

科难产而小剖腹娩出的4个月左右胎儿5例,取材时胎心仍在跳动。取150只出生1—2日的Wistar新生大鼠心脏,对人胚和新生大鼠心脏均按Burt法^[6],用0.25%胰蛋白酶(Difco1:250)消化,按 10^5 /ml的细胞浓度分装于培养瓶,37℃下密闭培养。每2日更换1次培养液。实验结束后,剖取和离心收集心肌细胞。

心肌组织培养:取每个胎儿的部分心肌和50只新生大鼠心脏,剪碎为 1mm^3 左右,置于培养瓶壁,室温下放置20分钟后加培养液,37℃密闭培养。有时用转速12次/分的转鼓进行旋转培养,效果更好。

胚胎小鼠心脏器官培养:取妊娠16—17日的昆明雌鼠20只,开腹切开胃取出胚胎小鼠,取出心脏以Hanks液洗净血液,除去心包,将完整心脏置于不锈钢网上进行心脏器官培养^[9]。每窝8—10只胚胎小鼠的心脏共放于1个培养瓶中。

培养液:用Eagle MEM(日本),加20%胎牛血清(哈尔滨兽医研究所)。如培养的是人胚心肌细胞或组织,则加用15%人血清白蛋白(西班牙)。常规地便

* 国家自然科学基金资助课题,1986年第36号。

用青、链霉素。

实验分组：共分3组进行。

(1) 硒对培养的心肌细胞的影响：连续培养人胚和新生大鼠心肌细胞14日，每2日更换1次培养液。实验组在更换培养液时加 Na_2SeO_3 (10^{-7}mol/L ，沈阳市试剂厂，850726)。每日用倒置显微镜观察和拍照心肌细胞生长和搏动情况。每例5瓶实验组和5瓶对照组。

(2) 硒对儿茶酚胺性心肌损伤的保护作用：当心肌细胞、组织（胚胎小鼠心脏器官培养24-48小时，倒置显微镜下观察到心肌细胞、组织和胚胎小鼠的完整心脏搏动，确认成活后分为4组，每组3瓶，①加异丙基肾上腺素 0.1mg/ml （北京制药厂83081327）；②加 Na_2SeO_3 (10^{-7}mol/L)和 0.1mg/ml 异丙基肾上腺素；③加去甲肾上腺素 20ng/ml （上海第十制药厂，850802）；④加 Na_2SeO_3 (10^{-7}mol/L)和去甲肾上腺素 (20ng/ml)。实验时间为 37°C 下1小时。

(3) 硒对胍引起的心肌细胞脂质过氧化损伤的保护作用：当心肌细胞、组织和胚胎小鼠心脏器官培养24-48小时确认成活后，分2组进行实验，每组5瓶。①加胍（北京南尚乐化工厂，850504），培养液中的胍浓度为 $2 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ [12]；②加 Na_2SeO_3 (10^{-7}mol/L)和等量胍。 37°C 下各作用1小时。

电镜制片：取出各培养瓶中已生长有心肌细胞的细小盖玻片及刮取离心收集的各组心肌细胞、组织和胚胎小鼠心脏，经2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定，系列丙酮脱水。为透射电镜观察的标本经Epon 812包埋，LKB-5型超切机超薄切片，枸橼酸铅和醋酸双氧铀双重电子染色后，用H-600型透射电镜在75KV下观察和拍照。

观察和讨论

1. 硒对培养的心肌细胞的影响：培养24小时，大部分心肌细胞贴壁，有些出现搏动，频率50—100次/分。随培养日数增多，心肌细胞数量渐减，但仍有搏动，频率依旧。到培养第七天时，心肌细胞数明显减少，观察10个400倍的倒置显微镜视野平均可见心肌细胞数为 6 ± 2 个/视野。加硒组心肌细胞贴壁和搏动情况均较好，随培养天数的增多，心肌细胞数的减少不明显，培养第七天时，10个400倍放大的倒置显微镜视野可见心肌细胞为 13 ± 4

个/视野。加硒组和对照组相比，在培养第七天时心肌细胞数有显著性差异。

Christian [7] 证明体外培养的新生大鼠心肌细胞数量随培养天数增多而减少。培养第二天心肌细胞占85%，第四天为55%，第八天为29%；而非心肌细胞在培养的第二—八天期间增殖428%。并证明培养的心肌细胞分裂活性低，而在体的围产期心肌细胞仍表现很高的分裂活性。该作者认为培养时发生了尚未阐明的DNA合成的阻滞。本实验虽按Burt法 [6] 提高了心肌细胞的比率，仍不能完全排除非心肌细胞（成纤维细胞、上皮样细胞和内皮细胞），仍然表现出随培养天数增多心肌细胞数渐减，情况和Christian的观察相似。给 Na_2SeO_3 (10^{-7}mol/L)却能延缓心肌细胞数的减少，而且也观察到心肌细胞搏动较活跃。

在本实验条件下，从培养第四天起人胚心肌细胞出现变性变化（图版图1），适量硒延缓此种变性（图版图2），有的心肌细胞到培养的第十四天仍具较正常的超微结构。

适量硒何以能使培养的心肌细胞保持较正常的超微结构、随培养天数增多心肌细胞数减少不明显？Frost [2] 认为硒在维持机体内环境稳定（homeostasis）方面起着重要作用；能保持肌肉和红细胞的完整性；硒在DNA-RNA合成、蛋白质合成和结构形成（organization）上起一定作用；还能部分地调节离子流过细胞膜。最近杨毛周等 [1] 证明适量硒对人红细胞膜骨架蛋白有明显保护作用，使膜蛋白分子之间结构紧密、膜稳定性增高。Nakabayashi [9] 用人肝癌细胞株证明，适量硒 (10^{-7} — 10^{-8}mol/L) 促进癌细胞的生长； 10^{-6}mol/L 以上的硒反而抑制癌细胞生长。我们也观察到硒浓度增高，不仅起不到保护作用反而导致心肌细胞变性。说明硒起保护作用的剂量范围很窄。

2. 硒对儿茶酚胺性心肌损伤的保护作用： 10^{-7}mol/L 的 Na_2SeO_3 使异丙基肾上腺素或去甲肾上腺素性损伤心肌细胞的表面结构和超微结构保持较好（图版图3—6）。异丙基肾上腺

素为外源性(机体内不存在、人工合成物)儿茶酚胺,去甲肾上腺素为内源性(机体内存在)儿茶酚胺,它们都能引起心肌能量耗竭、心肌相对缺氧、心肌细胞膜通透性增高、心肌细胞内 Ca^{2+} 过负荷,它们的氧化物导致心肌细胞膜脂质过氧化^[10],造成心肌变性和坏死,称为“梗塞样坏死”,特点为形成收缩带、收缩带性坏死和线粒体呈颗粒样密度。我们也看到收缩带形成和收缩带性坏死,更多的是肌丝模糊、肌节构造丧失、线粒体肿胀且内含高电子密度颗粒(图版图3、5)。这些颗粒可能是磷酸钙和钙蛋白复合物。由儿茶酚胺过度刺激心肌细胞膜的 β 受体,大分子通过,膜通道改变, Ca^{2+} 流入细胞,造成 Ca^{2+} 过负荷所致^[10]。而 Na_2SeO_3 (10^{-7}mol/L)使人胚心肌细胞表面及超微结构保持较好(图版图4、6),体现出适量硒起到一定程度的保护作用。

3. 硒对胍引起的心肌细胞膜脂质过氧化损伤的保护作用:将 $2 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 的胍(联氨、diamide、 NH_2NH_2)作用于培养的心肌细胞、组织和胚胎小鼠心脏,引起了明显的超微结构变化——收缩带、肌原纤维的肌节不完整、线粒体固缩重则肿胀、出现颗粒样内含物(图版图7)。胍还使心肌细胞表面变扁平 and 失去微绒毛。预先加适量硒则减轻胍引起的损伤,呈明显的保护作用(图版图8)。据Noro-nha-Dutra^[11]报告,胍氧化巯基,使细胞的还原型谷胱甘肽含量降低,从而起动了细胞膜脂质过氧化而损伤细胞。适量硒恰好起到抗氧化剂作用,通过含硒谷胱甘肽过氧化酶以及增加细胞膜骨架蛋白的稳定性而起到了保护作用。

综上所述, 10^{-7}mol/L 的 Na_2SeO_3 对较长期培养的心肌细胞、儿茶酚胺性或胍引起的脂质过氧化性损伤,不论在细胞、组织或器官水平上都起到了一定程度的保护作用。

摘 要

微量元素硒在机体内作为一种非特异性抗氧化剂、谷胱甘肽过氧化酶和含硒转移核糖核

酸的组分之一以及红细胞膜的稳定剂,近年受到各界关注。本文采用人胚、新生大鼠和胚胎小鼠的心脏,进行了心肌细胞、组织和器官培养。在扫描和透射电镜下观察到 10^{-7}mol/L 的 Na_2SeO_3 对较长期培养的心肌细胞、儿茶酚胺性损伤心肌细胞和胍引起的脂质过氧化损伤心肌均有明显的保护作用。

图 版 说 明

1. 培养5日的人胚心肌细胞, $\times 5000$ 。肌丝稍模糊,线粒体肿胀,有的只剩线粒体的痕迹。
2. 培养5日的加硒组人胚心肌细胞, $\times 15000$ 。肌原纤维排列整齐,肌节清晰,线粒体保持较好。
3. 培养48小时加异丙基肾上腺素的新生大鼠心肌细胞, $\times 5000$ 。肌原纤维呈典型的收缩带性坏死,肌丝模糊,Z线隐约可见。线粒体肿胀,内含高电子密度颗粒。
4. 加硒和异丙基肾上腺素组新生大鼠心肌细胞, $\times 5000$ 。肌原纤维排列较整齐,仍可见肌节构造。线粒体肿胀和固缩并存,肿胀的线粒体也含高电子密度颗粒。
5. 培养48小时加去甲肾上腺素组人胚心肌细胞, $\times 15000$ 。肌原纤维呈收缩带性坏死,肌丝模糊,隐约可见Z线。线粒体肿胀,有的含高电子密度颗粒。
6. 培养48小时加硒和去甲肾上腺素组人胚心肌细胞, $\times 10000$ 。线粒体呈致密变化(固缩),肌节和Z线清晰可见。
7. 胚胎小鼠心脏器官培养24小时加胍组, $\times 6000$ 。肌原纤维呈收缩状态,线粒体固缩,隐约可见嵴。
8. 胚胎小鼠心脏器官培养24小时加硒和胍组, $\times 10000$ 。肌丝排列整齐,肌节结构完整。线粒体仍有肿胀。

参 考 文 献

- [1] Stadman, T. C., 1974, *Science*, 183: 915-922.
- [2] Douglas, V. Frost, et al., 1975, *Ann. Rew. Pharmacol.*, 15: 259-284.
- [3] Cross, J. D., et al., 1981, *J. Clin. Pathol.*, 34: 393-395.
- [4] 杨毛周等, 1988, 中国营养学会第2届微量元素讨论会论文汇编, p1.
- [5] Nakabayashi, H., et al., 1982, *Cancer Research*, 42: 3858-3863.
- [6] Burt, J. M., 1982, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 14: 99-110.
- [7] Christian, F., 1980, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12: 1329-1340.
- [8] 吴有能, 1987, 生命的化学, 7(3): 36.

- [9] Kloner, R. A., et al., 1980, *Experimental and Molecular Pathology*, 32: 317-335.
 [10] Rona, G., 1985, *J. Mol. Cell. Cardiol.*,

- 17: 291-306.
 [11] Noronha-Dutra, A. A., et al., 1982, *Laboratory Investigation*, 47(4): 346-353.

小鼠嵌合体制作技术的研究

张锁链 旭日干 斯琴

(内蒙古大学实验动物研究中心)

自从 Tarkowski^[1]、Mintz^[2] 等用聚合法和 Gardner^[3] 用显微注入法分别制作出嵌合体小鼠以来, 这项技术作为研究个体发育过程中细胞间的相互作用与基因表达的一种手段, 以及研究遗传、免疫机制等方面的动物模型, 发展十分迅速。本文以植物血球凝集素 P(PHAP) 为接合剂, 分别将两个不同品系小鼠的和同品系不同个体之间的 8 细胞期胚聚合为一体, 用 3 种不同的培养液培养后获得了较高的发育率, 并把一部分发育为桑椹期或胚泡期的嵌合胚移植给受体小鼠得到了产仔结果。现将实验结果报告如下。

材料与方 法

一、实验材料

1. 供试动物 包括黑色的 C57 BL/6 J (以下简称 C57) 小鼠(图版图 4b) 和白色的中国昆明小鼠(以下简称昆明白)(图版图 4a), 均为在本研究中心的全空调标准饲养室饲养的清洁、级别标准化动物。饲养温度为 18—24℃, 湿度为 60—70%, 光照时间 12 小时, 换气次数 12 次/小时。饲料是自行配制生产的固型饲料。

2. 药品试剂 PMSG (长春生物制品研究所)、HCG (宁波激素制品厂)、BSA (Sigma 制品)、链霉蛋白酶(MERCK) 制品、PHAP (美国 DLDM)。

二、实验方法

实验一 分别选取供卵鼠 C57 和昆明白(8—12 周龄), 用 PMSG (5 IU) 和 HCG (5 IU) 以 48 小时的间隔注射并在注射 HCG 的当日与同品系雄鼠合笼。次日上午选取有阴道栓的小鼠, 并将当日定为妊娠第一天, 在妊娠的第三天下午 2 时进行采卵。用温热的 Hanks 溶液分别自小鼠子宫和输卵管收集卵子, 挑选

形态正常的 8 细胞期胚胎, 洗净后移入经 37℃ 温育两小时的含有 0.5% 链霉蛋白酶的 Hanks 溶液中, 在室温下处理 5—7 分钟, 在透明带溶解后立即取出裸胚在培养液中以 5 分钟的间隔冲洗 3 次, 充分去除残存的链霉蛋白酶。然后以昆明白 \leftrightarrow C57 和昆明白 \leftrightarrow 昆明白的组合取两枚胚胎, 分别放进血凝滴淀板小孔内含有 0.5% PHAP 的培养液中。用细玻璃针使两个胚胎相互靠拢, 置于 37.5℃ CO₂ 培养箱内温育 20 分钟后, 移入用灭菌石蜡油复盖的 3 种培养液, 即含有 20% 的 FCS (自制品) 的 PBS 液, 含有 5 mg/ml BSA 的 BWW 液 (Biggers, Whitten & Whittingham) 和 BMOC-III (Brinster) 溶液的微小滴中继续培养。培养 20—24 小时后在立体显微镜下观察嵌合胚的发育, 并以发育为嵌合的桑椹胚或嵌合的胚泡数目计算发育率。

实验二 将以 PBS 添加 FCS 和 BWW 加 BSA 为培养基, 用上述方法制作并发育为晚期桑椹胚或早期胚泡的嵌合胚昆明白 \leftrightarrow C57 和昆明白 \leftrightarrow 昆明白, 按所用培养基不同分别移植给受体小鼠(图版图 4c), 观察受胎及产仔结果。受体为比供体交配晚 24 小时, 作假孕处理的 10 周龄初胎昆明白雌鼠。移植时用 10% 戊巴比妥钠麻醉, 经背部手术将嵌合胚植入子宫角内, 每侧移植 5—8 枚胚。移植胚胎之后的受体小鼠单独饲养管理。

结 果

1. 不同品系的和同一品系的嵌合胚在不同培养液中的发育率: 由不同品系的 8 细胞期胚组成的和由同一品系 8 细胞期胚组成的聚合胚昆明白 \leftrightarrow C57 和昆明白 \leftrightarrow 昆明白, 分别在 3 种不同的培养液, 即 PBS + FCS、BBW 和 BMOC-III 中培养 20—24 小时后, 结果如表 1。在昆明白 \leftrightarrow C57 聚合物(图版图 1) 中