

实验技术



利用细胞化学染色方法辨别体外培养的心肌细胞

王鸿秀 龚建林
(浙江中医学院)

在一般的心肌细胞培养物中含有相当数量的非心肌细胞,故应用培养的心肌细胞进行研究,需要辨别培养物中的心肌细胞与非心肌细胞,我们试图用细胞化学染色方法结合活细胞观察及 H.E 染色的细胞形态学观察对乳鼠心肌培养物中的心肌细胞进行鉴别。

材料和方法

心肌细胞培养物的制备:基本按照 Harary 及西苑医院方法^[1,2]。

观察指标:用倒置相差显微镜观察活细胞生长及搏动;用 H.E 染色作一般细胞形态学观察;用糖原及琥珀酸脱氢酶染色^[3,4]作细胞化学染色观察。

结果

活细胞观察:在倒置相差显微镜下观察细胞生长及自发性搏动。从培养 48 小时起心肌细胞开始生长并出现单个细胞的自发性搏动,随着培养天数增加出现成簇心肌细胞的同步化搏动。心肌细胞胞浆丰富,有足状突起逐渐增粗延长似肌纤维样,胞核呈圆形。非心肌细胞胞浆稀薄平坦铺开,无搏动,核大呈椭圆形。但培养的心肌细胞并非全部都有搏动,也有处于静止状态的,并且培养液的酸碱度、离子浓度及温度等均可影响心肌细胞的搏动功能;更因培养物中的心肌细胞与非心肌细胞混合生长,当长成单层后,二者在普通光镜下难以区别。

H.E 染色观察

常规的 H.E 染色显示心肌细胞胞浆内肌凝蛋白对伊红染色较深,有肌丝,胞核致密染色深呈圆形。非心肌细胞胞浆染色浅,胞核椭圆形,核质疏松淡染,胞核体积较大。但在幼稚的心肌细胞胞浆与胞核染色均较浅,肌丝不明显,颇难辨认,故 H.E 染色具有一定局限性

(图版图 1)。

细胞化学染色观察

一、糖原染色 根据 Polinger 用 PAS 糖原染色鉴别鸡胚心脏细胞培养物中的心肌细胞^[5],我们采用 PAS 染色识别乳鼠心肌细胞培养物中的心肌细胞,取得了良好效果。凡属心肌细胞其胞浆内均显示深红色糖原颗粒或小凝块(经 1% 淀粉酶处理后可消失,此颗粒随细胞的成熟度而增多,细胞形态学特点与 H.E 染色及相差显微镜中所见的心肌细胞相同,胞浆的足状突起内也含红色糖原颗粒,胞核未着色呈圆形空白,非心肌细胞因胞浆胞核全不着色而不显现(图版图 2),故镜下所见均为含丰富糖原颗粒的心肌细胞。在分裂增生的幼稚的心肌细胞细浆内有浅红色的糖原颗粒。成熟及幼稚的心肌细胞均可用 PAS 糖原染色法进行识别。

二、琥珀酸脱氢酶染色 据电镜观察心肌细胞内含有极为丰富的线粒体,线粒体中的琥珀酸脱氢酶为反映线粒体功能的敏感指标,籍此可鉴别心肌细胞与非心肌细胞。我们对不同培养时间的心肌细胞培养物作了琥珀酸脱氢酶染色。凡是心肌细胞其胞浆内含有密集的紫褐色酶颗粒,随着细胞生长酶颗粒增多密度增大,染色也较深。非心肌细胞浆呈浅灰色,未见酶颗粒(图版图 3)。含有酶颗粒的心肌细胞形态与 H.E 染色、PAS 染色中的心肌细胞一致,在幼稚的心肌细胞胞浆中也有琥珀酸脱氢酶颗粒,唯数量较少,密度较稀。

根据以上观察认为糖原及琥珀酸脱氢酶细胞化学染色均可识别培养物中不同成熟度的心肌细胞。但我们认为以 PAS 糖原染色法较为优越,因操作简便,结果稳定,琥珀酸脱氢酶染色易受操作条件影响,结果稳定性较差。

参 考 文 献

- [1] Harary. I. et al., 1960, *Science*, 131:1674-1675.
- [2] 中医研究院西苑医院基础研究室等, 1981, 中华心血管病杂志, 9(3):216-218.

- [3] Mc Manus. J. F. A., 1984, *Stain Technology*, 23:99-107.
- [4] 芮菊生等, 组织切片技术, 312页, 1980, 人民教育出版社.
- [5] Polinger. I. S., 1973, *Exptl. Cell. Res.*, 76: 243-252.

用电镜细胞化学方法显示胶原纤维中的-SH基*

陈 力 应芸书

(中国科学院生物物理所)

皮肤、胃肠道、肺和心血管等的结缔组织中含有一种特殊类型的胶原, 称Ⅲ型胶原, 其化学组成中有胱氨酸和半胱氨酸。本实验参照Swift^[1-4]的显示-SH基的电镜细胞化学方法, 进一步证实了这一事实。

材 料 和 方 法

取小白鼠肺、食道、皮肤和小肠, 用磷酸缓冲液(pH 7.4)配制的5%戊二醛和1%O₃O₄进行双固定, 用系列乙醇脱水, 并作电镜常规包埋、超薄切片。然后用六亚甲四胺银法(简称S-M法), 对上述四种材料的切片进行染色。具体步骤如下:

一: 实验组

1. 用新配制的S-M溶液浸染切片网, 在45℃、避光条件下染色2小时, 然后用蒸馏水彻底洗涤。S-M溶液配方: 5%硝酸银0.118 ml; 3%六亚甲四胺加到2.5 ml; 硼酸硼砂缓冲液(pH 9.0)0.5 ml; 重蒸水2.5 ml; 依次加入玻璃器皿, 最终pH 9.2。硼酸硼砂缓冲液配方: 1.44%硼酸1 ml, 加1.9%硼砂10 ml。

2. 用10%硫代硫酸钠水溶液在室温下浸泡经过S-M染色的切片, 40分钟后用蒸馏水洗。

3. 用饱和醋酸双氧铀染, 蒸馏水洗后, 切片自然干燥, 用JEM-7透射电镜观察。

二、两组对照

1. 空白对照: 切片只用铀染。

2. 两种抑制对照:

(1) 用1%醋酸配的2%丙酮, 在室温下浸泡切片网1.5小时, 以抑制醛基(-CHO), 然后用蒸馏水洗。

(2) 先用20% n-丙醇配的0.3 M苯甲醇, 在室温下浸切片网40分钟, 以还原二硫键(-S-S-), 然后依次用20% n-丙醇和蒸馏水洗。再用1.86%碘乙酸盐溶液在室温下浸泡切片网40分钟, 以烷化硫氢基(-SH), 最后用蒸馏水洗。碘乙酸盐溶液配方: 取0.93 g碘乙酸盐; 0.617 g硼酸; 20 ml蒸馏水, 用2 N KOH调pH 8.0; 用蒸馏水加到25 ml, 再加25 ml n-丙醇。

将两种抑制对照组的切片与实验组在同样的条件下, 同时进行S-M染色, 再用10%硫代硫酸钠水溶液洗, 最后用铀染。

实 验 结 果

实验组小白鼠的肺、食道、皮肤和小肠四种材料的切片经S-M染色之后, 在胶原纤维上都见到了黑色的银沉淀颗粒(图1)。

而在对照组中, 抑制-CHO基后, 再经S-M染色, 在胶原纤维上仍显示强烈的阳性反应。若先还原-S-S-键, 后烷化-SH基, 再经S-M染色, 胶原纤维上的黑色银沉淀颗粒显著减少。而只用铀染的空白对照片, 在胶原纤维上没有黑色的银沉淀颗粒(图2)。

讨 论

Epstein, E. H. (1974)^[5]用生化方法证明了Ⅲ型胶原分子中, 链与链之间由-S-S-键交联。Byers, P. H. 等(1975)^[6]通过免疫学等方法证明, 胶原合成时前 α 链的聚合中, C端的附加肽

* 本文蒙徐伟同志指导, 并得到本所电镜室技术上的支持, 深表谢忱。