

一种简易的灌注固定装置

黄立 夏明玉 王玲 卢勤
(南京医学院)

通常在电镜技术中使用的浸泡固定方法，组织是在离体以后浸泡在固定液中进行固定。由于固定液的浸透需要相当长的时间，组织块的表面和内部不能同时都得到良好的固定，固定是不均匀的。特别是组织块的内部常常固定不佳。为了减少这种不均匀性，需将组织块切得很小，这样又带来了由于切割而产生的机械损伤。这些都能使细胞的微细结构发生改变。有一些动物组织如脑、肾和肺等必须通过灌注固定方法才能使其组织的细胞形态保持原来的生活状态。固定液是在动物死亡以前通过血管进入脏器，因此，它能使各处的细胞都能得到迅速而均匀的固定，增加了固定速度和深度。细胞的迅速固定不仅保持了原来的形态而且减少了细胞成分的扩散和迁移。

虽然灌注固定的方法优于其它的固定方法，但是由于操作比较复杂，需要专门的设备，不能得到广泛的应用。我们研究了各种灌流固定装置，选择了 Rossi (1975) 的设计，制作了一种简易的灌注固定装置(见图 1)对大白鼠肾进行灌注固定取得了满意的效果。

固定液和缓冲液分别装在 A、B 两只玻璃瓶内，瓶口是磨口的，上面有一只磨口的玻璃塞，每只塞子上用喷灯烧结二只玻璃管，其中一只玻璃管直插到瓶底，另一只只插到塞子下方。在瓶口和瓶塞两边相对应部位各烧结二只“羊角”。在药液倒入后用绳将上下两只“羊角”扎紧，以免在向瓶内充气加压时，瓶塞蹦出。两只三通活瓣阀门 C 和 D，分别用橡皮管与瓶塞上的玻璃管连接起来。一只双连橡皮球(F)或血压计上的打气球接到三通阀门 D 上。橡皮

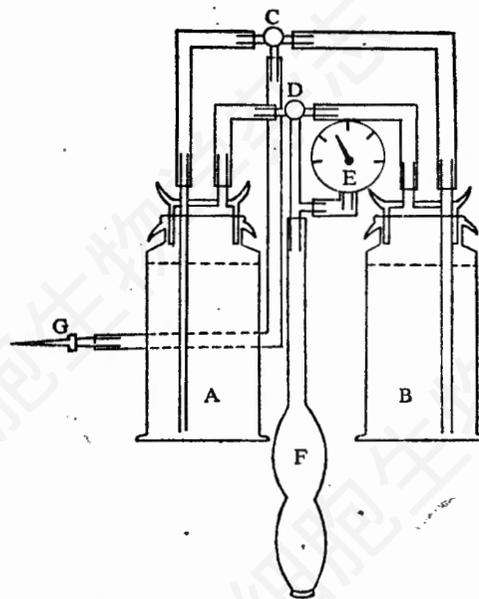


图 1 血管灌流装置(Rossi, 1975)

A、B 是两只磨口的玻璃容器；C、D 是三通阀门；E 为金属压力计；F 是双连橡皮球；G 是灌注用注射针头

球将气体通过阀门 D 充入玻璃瓶液体的上方。瓶内液体在气体压力下通过阀门 C 由注射器针头 G 流入血管和脏器。瓶内气体压力可通过一只金属压力计 E 测出。压力大小可调节充入气体的多少来加以控制。两边瓶内的压力相等，在通过阀门 C 由一种液体转换为另一只瓶内的液体时，压力可保持稳定。注射针头大小可根据血管大小决定。

我们用大白鼠作试验动物。灌注固定液是 0.135 M 磷酸缓冲液配制的 1% 戊二醛，pH 7.2，渗透压约 420 mOsM。血管冲洗液是磷酸缓冲液。灌流压 140—160 mmHg。动物经

乙醚麻醉，剖开腹腔，扒开肠子，暴露出腹主动脉，并将它与周围组织分开，从血管下方插入二根细线，一根结扎住动脉下端，另一根在灌注的针头插入腹主动脉后，将动脉与针头一起扎紧。调节三通阀门C，先用缓冲液冲洗血管，切断一小静脉放血，待血液基本冲净，再用固定液灌注，固定10分钟左右。将肾脏切成小于 1 mm^3 的小块，再放入2.5%戊二醛中继续固定2小时，1% OsO_4 后固定一小时，乙醇、丙酮系列脱水，醋酸铀块染，环氧树脂618包埋，柠檬酸铅染色，EM 400电镜观察。

经过上述方法制备的肾脏标本，近曲小管管腔都是打开的，细胞内的结构保存良好(图2)，而未进行灌注仅使用浸泡固定的肾脏，其近曲小管的管腔都是闭合的。显然，闭合的管腔是人工假象。



图2 大白鼠肾近曲小管。管腔是张开的。

我们在灌注中也失败过，查找成功和失败的原因，可以总结以下几方面：

1. 注射器插入血管必须迅速，不能耽搁太长时间，以免动物在灌注前死亡。由于大白鼠血管较细，注射用皮下注射针头，在开始灌注时要防止血液在细针头内凝固(未用抗凝剂)，否则，灌注液不能进入血管，使组织不能得到固定。

2. 在血管灌注时，选择适当的条件是重要的。影响细胞形态的因素除了固定液的浓度、pH、温度、成分和灌注的时间外，灌注液的渗透压和灌注压亦是十分重要的。

灌注液的渗透压与动物血液的渗透压应该尽可能一致。随着动物种类不同，血液渗透压亦不同。表1列举了几种动物组织的渗透压。

表1 推荐的几种组织灌注液的渗透压 (Hayat, 1978)

组织的类型	渗透压(mOsm)
大白鼠	
心脏	300
脑	330
肺	330
肾	420
肾髓质*	
髓质外区线条部	700
髓质内区外带	1000
髓质内区中带	1300
肾乳头端部	1800
生长期肾皮质**	828
骨骼肌	475
大白鼠(猫、鸡)肝脏	450
蛙肝脏	300
兔脑	820

* 固定液加3%葡聚糖可以使细胞间质的结构与细胞间的关系保存更好(Bohman, 1974)。

** 固定液里含6%戊二醛(Larsson, 1975)。

灌注时灌注压的大小也影响结构的保存，一般在30—210 mm Hg之间。不同动物的不同脏器所要求的灌注压是不同的(表2)。它的大小取决于动物的正常血压。大白鼠的肝脏无论是扫描电镜还是透射电镜标本，灌注压均以100 mmHg或稍低一些为佳。对肾脏标本，髓质内部就须较高的灌注压(200 mmHg)才能得到较好的固定。在灌注期间，灌注压应保持平稳。

表2 几种代表性组织的灌注压 (Hayat, 1978)

组织的种类	灌注压(mmHg)
兔脾	110~120
兔(猫、鼠)脑	150
大白鼠、猫心脏	103~120
大白鼠肾	100~200
大白鼠(猫、鸡)肝脏	100
大白鼠骨骼肌	100
大白鼠(猫)胎儿肝脏	50
兔动脉	100~120

参 考 文 献

- [1] Rossi, G. L. 1975. *Experientia* 31:998.
 [2] Hayat, M. A. 1978. *Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy*. Uni-

versity Park Press, Baltimore, Maryland, U. S. A.

- [3] Bohmon, S. -O. 1974. *J. Ultrastruct. Res.* 47:329.
 [4] Larsson, L. 1975. *J. Ultrastruct. Res.* 51:140.

细胞和细胞膜内过氧化脂质的微量定量

翁玉椿 王秀平 卢泳才 郭肇铮 石方

(北京中医学院)

近年来许多学者报道了机体衰老以及脏器退行性变化与脂质过氧化作用有着密切关系^[1-3]。了解细胞内脂质过氧化作用有助于探讨某些病变以及某些药物的作用机制。目前测定细胞或细胞膜内过氧化脂的方法均采用硫代巴比妥酸比色法^[2-5]，但该方法需要细胞量较多，而且受到细胞内糖类、醛类、胆红素等干扰。考虑到荧光微量法测定人血清中过氧化脂质在灵敏度和选择性等方面优于比色法，为此本文探讨了该法应用于测定细胞和细胞膜内过氧化脂质的可能性。

材 料 和 方 法

材 料

(1) 兔主动脉平滑肌细胞采用贴壁法培养^[7]。本实验所用者是经连续传代并冻存后，复苏生长的第15~25代细胞。将40万细胞种入25ml培养瓶中，稳定生长6天后供实验用。

(2) 兔红细胞膜的制备按低渗溶血法进行^[8]，溶血后低温离心(10,000转/分，10分钟)，沉淀用缓冲溶液洗涤2~3次，最后悬浮于磷酸缓冲液中。用福林酚法测定膜蛋白浓度或细胞蛋白量。

(3) 硫代巴比妥酸(下简称TBA)(Fluka AG Buchs)。

(4) 1,1,3,3-四甲氧基丙烷(1,1,3,3-Tetramethoxypropan)(Fluka AG Buchs)。

其余试剂均为国产分析纯。仪器为国产721分光光度计和日立MPF-4型荧光分光光度计。

实验操作步骤

方法主要原理：细胞或细胞膜在稀硫酸酸性条件下用磷钨酸沉淀，脂质过氧化物也随之沉淀(为防止脂质过氧化物在沉淀操作中进一步被氧化，稀酸性条件是必要的)，在醋酸酸性条件下与TBA反应(95℃)，产物被正丁醇提取，该产物荧光激发峰波长为532nm，发射峰波长为553nm，由于两峰位波长相近，实际测定采用激发波长515nm，发射波长553nm，其详细步骤如下^[6]。

(1) 细胞悬液离心(3000转/分，10分钟)，细胞用生理盐水洗涤1~2次。(细胞膜悬液直接按下步操作)。

(2) 在细胞或细胞膜中加入N/12硫酸4ml，10%磷钨酸0.5ml，室温放置5分钟，离心(3500转/分10分钟)。

(3) 在沉淀中再加入N/12硫酸2ml，10%磷钨酸0.3ml，摇匀，离心(3500转/分，10分钟)。

(4) 在沉淀中加入4ml双蒸水和1ml TBA冰醋酸溶液(0.67%TBA溶液与冰醋酸等体积混匀)，充分悬浮。

(5) 悬液于95℃油浴中加热1小时。

(6) 急冷至室温后加入5.0ml正丁醇，充分摇匀，离心(3500转/分，15分钟)。

(7) 取上清液测量其荧光强度f。

(8) 过氧化脂质(Lipid peroxide简写Lp)的计算：

$$Lp = 0.5 \times \frac{f}{F} \times \frac{1}{\text{mg 蛋白质}}$$

式中F值为标准管的荧光强度，即每管含0.5nmol标准物按(4)至(7)步骤操作。对于整个细