

培养人胚心肌细胞的透射电镜观察*

王治荣 王孝铭

(哈尔滨医科大学病理生理教研室)

离体培养心肌细胞已有很长的历史^[1-4], 关于人胚心肌细胞的培养也有一些报道^[5-9]。

关于培养人胚心肌细胞的电镜研究曾散见于文献^[10,11], 太田等^[12]对培养2日和14日的新生大鼠心肌细胞进行了透射和扫描电镜的研究。文献所见多限于对动物(鸡胚、新生大鼠等)心肌细胞的培养和观察, 也多缺乏系统的观察。胰蛋白酶消化分离对心肌细胞超微结构影响方面的报道也不多^[17,18]。还未见到对培养的人胚心肌细胞的电镜研究。

本文报告5例4个月人胚心肌细胞培养前(对照)、胰蛋白酶消化后、培养后1、2、3、4和5日的透射电镜所见。

材料和方法

几年来从哈医大附属二院妇产科获得胎儿5例(因手术指征而子宫切开娩出), 取材时胎心仍在跳动。胎龄均为4个月左右(从末次月经第1日计算, 实际受孕日数比4个月少12-14日; 从冠臀长度计算也只有3个月多一点)。

取人胚心室在Hanks液内剪碎, 用0.25%胰蛋白酶(伊犁出品, 1:250)消化20分钟, 共8次。收集消化液经冲洗和离心后, 加1/2 199(Difco)+1/2 RPMI 1640(SERVA)+15%小牛血清(旅大奶牛场, 最终浓度15%)培养液, 在37℃温箱内静置90分钟以除去最先贴壁的成纤维细胞^[17]。以 $10^6/\text{ml}$ 的细胞浓度分装于培养瓶, 塞紧瓶塞, 37℃下密闭培养。5例人胚心肌细胞共做50瓶。每日用显微镜和倒置显微镜观察心肌细胞搏动和生长情况。每2日更换一次培养液。

培养前的正常人胚心肌组织、胰蛋白酶消化8次后离心、培养1、2、3、4和5日的心肌细胞分别经刮取和离心收集, 用2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定, 逐级丙酮脱水, 国产环氧树脂618包埋。用LKB 4801型超薄机切片, 经醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重电子染色后, 用JEM-7和H-600透射电镜在50和

75KV下观察和拍照。

共做50块包埋块, 每块超切后捞取2网铜网进行观察。

观察和讨论

培养24小时后大部分心肌细胞贴壁。仅少数心肌细胞出现搏动。培养48小时后多数细胞出现搏动, 搏动次数为每分钟4、10、14、24等不等。成片 and 成簇细胞出现同步搏动。最近我们曾培养人胚心房细胞, 心房细胞搏动次数较心室细胞快, 为58-78次/分。说明心房细胞的节律性较心室细胞为高。

培养前的4个月人胚心室肌细胞(对照): 如作者先前的文章所述^[14], 构成心脏的细胞主要是心肌细胞, 心肌细胞应含有肌原纤维。4个月人胚心肌细胞虽含肌原纤维, 但数量远少于成人。其突出特点是胞浆较疏松, 少量肌原纤维主要分布在肌膜下(胞浆周围), 有时也可见于核附近, 可见到Z线、A带和I带, 未见H带和M线。线粒体数目较少, 嵴发育差且分布不太规则。线粒体和肌原纤维之间在分布上的关系不如成人密切。胞浆中央有一较大的细胞核, 其余主要被糖原和核糖核蛋白体所占据。可见到粗面内质网和高尔基器。细胞间可见到中间连接、间隙连接和桥粒。有时可见到特殊的心房细胞颗粒(图3), 不仅见于心房细胞, 心室细胞中也可见到, 数量较少。核糖核蛋白体和肌原纤维之间关系密切, 肌丝之间存在线样排列的核糖核蛋白体, 故收缩蛋白可能由这些核糖核蛋白体合成(图1)。

胰蛋白酶消化8次后的心肌细胞: 各细胞

* 中国科学院(现改为自然科学基金委员会)科学基金资助课题。

受影响程度不等,有的细胞核内出现空白区,染色质呈颗粒样外观。胞浆内空泡数目增加,肌原纤维呈收缩状态,肌节变短,Z线变粗,严重者肌丝和Z线都模糊不清。线粒体嵴减少并模糊,甚至消失。偶可出现残渣小体(图2)。间质细胞内出现了多个残渣小体。

多数学者认为胰蛋白酶不损伤生活的细胞,对细胞没有毒性。胰蛋白酶水解蛋白质时,作用于赖氨酸或精氨酸相连接的肽链,故细胞间粘蛋白和糖蛋白被除去,细胞骨架受到影响,使细胞分离^[13]。有些学者认为胰蛋白酶对心肌细胞有一定损伤作用,改变细胞特性使细胞分化能力一时性丧失^[17],细胞膜上药物受体灭活,并穿透细胞膜损伤肌原纤维^[9],也有人观察到胰蛋白酶使肌原纤维的结构破裂^[15],并主张胰蛋白酶的作用可逆。本文观察到胰蛋白酶使人胚心肌细胞的超微结构发生了明显改变,甚至间质细胞也发生了改变。而且国内有的学者发现伊犁出品的胰蛋白酶的毒性似较Difco产品大。本文采用0.25%胰蛋白酶(伊犁出品)消化8次,每次20分钟,使心肌细胞的超微结构明显改变。但这些变化在培养24小时后基本消失,心肌细胞的超微结构基本恢复正常。可见胰蛋白酶对心肌细胞的损伤作用确是可逆的,而且我国伊犁出品的胰蛋白酶还是可用的。今后应降低胰蛋白酶浓度,可加用胶原酶等以分离出更多的心肌细胞,并将胰蛋白酶的损伤作用降至最低限度。

培养1、2、3日的心肌细胞:文献报道^[10-12]培养1—2日的新生大鼠心肌细胞出现了肌原纤维的变化,Z线变形呈彗星状,心肌细胞呈崩坏像,肌节构造不完全,并主张系由反分化所致。本文所见与上述不同,培养后1、2、3日的人胚心肌细胞超微结构与对照(培养前的心肌细胞)基本一致(图3—6)。培养1日后心肌细胞超微结构基本恢复正常(图3—5),培养第2日起出现桥粒等细胞间连接结构(图6),文献记载^[12]培养第3日方可见。肌原纤维上可见Z线、A带和I带,未见H带和M

线。在肌原纤维的横切面上粗细肌丝呈典型的六角形排列(图5)。

培养4和5日的人胚心肌细胞:有的细胞幼稚化,肌原纤维变得不成熟,肌节不完全,Z线变粗,线粒体肿胀,有的只剩下膜和嵴的痕迹(图7)。有的细胞仍存在较完整的肌原纤维(图8)。我们认为从培养第4日起部分心肌细胞所出现的变化,并非如文献所述反分化或成纤维细胞大量均殖所致,乃在本文所述培养条件下出现的变性变化,因为培养第7日和第9日心肌细胞崩坏。Halbert^[7]也见到人胚心肌细胞培养5—7日出现了空泡化,如向培养基内添加冻干人血清或结晶的人血清白蛋白即可防止空泡化。我们最近也加用人血清白蛋白培养人胚心肌细胞,发现心肌细胞贴壁、搏动和生长都优于未加白蛋白者(另文报告)。

作者体会到利用本文所述方法培养人胚心肌细胞是研究心肌细胞生理和病理条件下代谢、机能和结构变化的良好模型,显然优于动物心肌细胞培养,因为可消除种属的差异性。当然胚胎心肌细胞有其区别于成人心肌细胞的限制。我们认为利用培养的人胚心肌细胞,宜在培养后1、2、3日内进行模型制备,过长则不妥。至于胞浆内富含糖原和核糖核蛋白体,不单纯是培养心肌细胞的特点,根据我们先前的工作,我们认为^[14]也是胚胎心肌细胞的特点。

由于培养1—5日过程中始终存在搏动,正如Halle^[15]主张,对培养心肌细胞的收缩来说,发育良好的肌原纤维固属必需,原始纤维(Primitive fiber)和少量肌丝(带Z线或不带Z线)也可维持搏动。

摘 要

本文报告5例4个月人胚(因妇产科指征小剖腹娩出)心肌细胞在培养前胰蛋白酶消化后培养1、2、3、4和5日后的透射电镜所见。胰蛋白酶消化对心肌细胞核、肌原纤维等都有明显影响,但培养24小时基本恢复正常。培养1、2和3日的人胚心肌细胞超微结

构和培养前的心肌细胞基本相似。培养4和5日的部分心肌细胞出现Z线变形、肌节不完全等变性变化,部分心肌细胞仍具较正常结构。

用培养的人胚心肌细胞制备病理模型,宜在培养后1、2和3日内进行。

参 考 文 献

- [1] Burrow M. T., 1912, *München Med Wochr.*, 59: 1473.
 [2] Cavanaugh M. W., 1955, *J. Expil. Zool.*, 128: 573.
 [3] Harary I. et al., 1960, *Science.*, 131: 1674.
 [4] Vahouny G. Y. et al., 1970, *Science*, 167: 1616.
 [5] 李连达等., 1982, 细胞生物学杂志 4(3):6.
 [6] Chang T. D. et al., 1972, *Circ Res* 30: 628.
 [7] Halbert S. P. et al., 1973, *Life Science.*, 13: 969.

- [8] Thompson A. et al., 1977, *J Mol Cell Cardiol.*, 9: 945.
 [9] 李连达等., 1982, 细胞生物学杂志 4(4): 29.
 [10] Wollenberger A., 1964, *Circulation Res* 14 & 15:supple 11, 1184.
 [11] Goshima K. et al., 1969, *Expil Cell Res.*, 56: 387.
 [12] Ohata I. et al., 1977, *Japanese Circulation J.* 4: 539.
 [13] 李连达等., 1980, 心肌细胞培养 中医研究院西苑医院 p 48 & 32.
 [14] 王治荣等., 1986, 细胞生物学杂志 8(1): 27.
 [15] Halle W. et al., 1970, *Am J. Cardiol.*, 25: 292.
 [16] Ikemoto N, et al., 1968, *J. Cell Biol.* 39: 620.
 [17] Robinson P. B. et al., 1980, *J. Mol Cell Cardiol.*, 12: 493.
 [18] Masson-Pevet M. et al., 1976, *J. Mol Cell Cardiol.*, 8: 747.

人外周血淋巴细胞长期冻存后结构和功能的研究

徐婉燕 郑斯涌 江希明 *赵露珊 *章崧英
 (杭州大学生物系) * (浙江省中医院)

自从六十年代提出小鼠和人淋巴细胞短期低温保存方法以来,吸引了许多学者从事这方面的研究,期望能在不改变免疫学活性和生理功能的前提下,改进冻存淋巴细胞的方法,以提高冻存的效果,和延长冻存时间。

已经证实,短期冻存的淋巴细胞能用于花环试验^[1,2];细胞介导的免疫反应:如对各种有丝分裂原的应答反应^[3,4]、混合淋巴细胞反应^[5]和细胞毒试验^[5];和组织分型试验^[6]等。Scheiwe(1981)^[7]曾将冻存淋巴细胞用于临床输注,亦取得良好的治疗效果。

迄今,国内外对冻存淋巴细胞的方法和冻存细胞的形态结构、生理功能和免疫学反应能力等全面和比较系统的研究尚不多见。本文采用肝素和ACD抗凝的人外周血淋巴细胞,对

不同的低温保护剂进行优选对比,通过对冻存人外周血淋巴细胞进行多项免疫活性、生理生化功能的检测和超微结构的观察,以建立较好的长期冻存人外周血淋巴细胞的技术方法,为冻存淋巴细胞用于细胞免疫试验提供依据,亦为冻存淋巴细胞用于临床免疫治疗指出前景。

材 料 和 方 法

1. 淋巴细胞的分离

肝素或ACD抗凝的助血员(年龄25—34岁)O型外周血(杭州市中心血站提供),用淋巴细胞分离液(比重1.077)分离得到淋巴细胞(PBL),配成10⁷细胞/毫升的淋巴细胞悬液。

2. 淋巴细胞的冻融

将淋巴细胞悬液分成3组: