文章编号:1000-5404(2005)12-1299-02

技术方法

树突状细胞扫描电镜样本制备方法

Sample preparation of dendritic cells for scanning electron microscopy

陶忠芬[1],蔡永国[2],杨仕明[2],可金星[1],黄文琪[1],肖桃元[1],房殿春[2] (第三军医大学:[1]高原军事医学系中心实验室;[2]西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨具有特殊结构的悬浮树突状细胞的扫描电镜制样方法。**方法** 对比观察细胞离心成团与自然沉降法制备扫描电镜样品对细胞形态学的影响。**结果** 自然沉降法能很好地显示树突状细胞的形态结构。**结论** 自然沉降法是制作具有特殊结构悬浮细胞的扫描电镜制样方法。

扫描电镜成为观察细胞、组织表面微细结构的一种必不可少的工具。在扫描电镜标本中,除了少数硬质标本如昆虫的甲壳和人的毛发、指甲、牙齿之类以外,许多标本在观察之前都要进行适当的处理[1],根据不同的样品和实验要求,采取不同的清洗液、脱水时间和干燥方法等。悬浮细胞的扫描制样比较复杂、特殊,就如何保持细胞的生活状态,我们对来源于人外周血的树突状细胞的扫描电镜制样方法进行了改进,采用离心成团涂片法和自然沉降法对不贴壁的树突状细胞进行扫描制样,发现自然沉降法效果理想。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

重组人粒-巨集落生长因子(rhGM-CSF),重组人白介素-4(rhIL-4),重组人肿瘤坏死因子-α(rhTNF-α),购自美国 BD-Pharmingen 公司,RPMI1640 培养基(Gibco BRL 公司,日本),人淋巴细胞分离液(1.077 TBD 生物技术发展中心,天津),小牛血清(成都哈里公司)。AMRAY 扫描电镜(1000B 型,美国),二氧化碳培养箱,超净工作台。

1.2 树突状细胞的培养

新鲜全血 40 ml 取自健康的志愿者。将新鲜全血在分离液上 1 cm 处,沿离心管壁缓慢加到淋巴细胞分离液表面,使分离液与全血体积比为 1∶1,1 000 r/min 离心 20 min 后,取白膜层细胞,用 RPMI1640 培养液洗涤 3 次,最后用 RPMI 完全培养液重悬细胞,并以 5×10^6/孔的细胞浓度加到 6 孔板中,37 ℃、5% CO_2 培养 2 h 后,弃上清及悬浮淋巴细胞,用 RPMI1640 完全培养基轻轻冲洗,充分洗去非贴壁细胞,获得粘附的贴壁单个核细胞,按 rhGM-CSF,rhIL-4 各1 000 U/ml 的终浓度加入培养体系中,隔日半量换液 1 次,培养第 5 天加入 rhTNF-α(终浓度为 1 000 U/ml),继续培养至第 7 d 收集悬浮的成熟树突状细胞。

1.3 扫描电镜样本的制备方法

1.3.1 自然沉降法 将收集的悬浮细胞用 0.1 mol/L PBS 清洗 2 次,1 000 r/min 离心 10 min。用少量 0.1 mol/L PBS 重悬,将细胞悬液滴加在多聚赖氨酸包被的玻片上,室温静置 10 min,使细胞自然沉降附着在玻片上。用生理盐水轻轻洗涤 3 次,2.5%戊二醛(pH 7.2~7.4)在 4 ℃固定 1 h,0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次,每次 30 min 以上,1%锇酸固定 1 h,0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次,乙醇梯度脱水(30%、50%、70%、80%、90%、100%,5 min/次),醋酸异戊酯置换,CO_2 临界点干燥,真空喷镀,最后在扫描电镜下观察并照相。

1.3.2 离心成团涂片法 对照组用以往的制样方法。取同样的悬浮细胞,离心成团后弃去上清液,加入 2.5%戊二醛(pH 7.2~7.4)在 4 ℃固定 1 h,去掉固定液,用生理盐水清洗 3 次,并将细胞团分散制成适当浓度的生理盐水细胞悬液,涂在微微加热的盖玻片上,使其吸附。其余操作同前述。

2 结果

经过上述方法培养的树突状细胞,生长状态良好。通过两种方法制备的标本经扫描电镜观察,树突状细胞的形态如图 1~2。采用直接沉降法制备的树突状细胞,能够很好地保持在培养状态下的自然形态,表面结构保持完整,树突状结构明显,微绒毛和突起清晰可见,细胞体积变化小,样品的污染和损伤小。离心成团涂片法的树突状细胞,细胞表面微细结构不明显,微绒毛减少,甚至消失,突起断裂,体积变化大,杂质多。

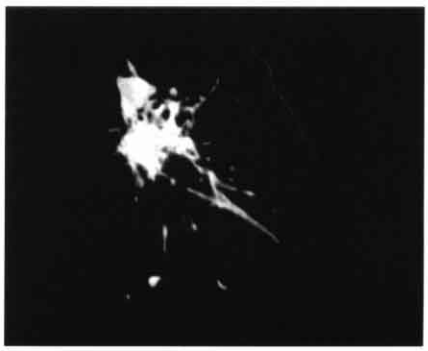


图 1 为直接沉降法制备的树突状细胞,突起和微绒毛清晰可见(SEM × 2 000)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200123)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200123)
作者简介:陶忠芬(1977-),女,重庆市人,助理实验师,主要从事电镜技术方面的研究。电话:(023)68752348
通讯作者:杨仕明,电话:(023)68754000-73055,E-mail. shiminyang@yahoo.com
收稿日期:2004-11-19;**修回日期**:2005-04-08

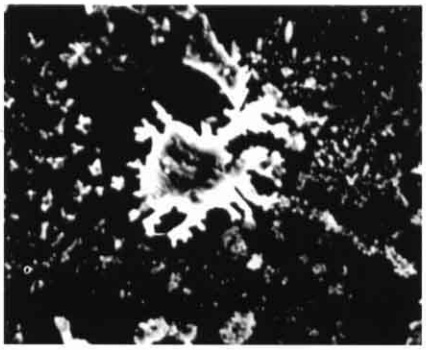


图 2　为离心成团涂片法制备的树突状细胞，突起断裂，微绒毛减少，甚至消失　(SEM×2 000)

3　讨论

扫描电镜的样本制作过程繁琐，对样品的处理方法非常重要，标本的留取以及后续处理过程应尽量符合活体状态下的生理条件，如清洗时要注意漂洗液的离子浓度、pH 值、渗透压、温度等。以往培养细胞的扫描电镜制样，多采用细胞离心，将离心所得的细胞团固定后涂片来制备样本。对于无特殊结构的培养细胞可采用上述方法。由于树突状细胞为悬浮状，细胞表面有特殊的树突状结构，要理想地显示上述结构，给样品的制备带来一定的难度。我们采用直接沉降法，将收获的足量成熟树突状细胞，均匀地分散在载体上再固定。为防盖玻片上细胞脱落，在涂片前采用多聚赖氨酸将盖玻片进行“膜化”。因为多聚赖氨酸带正电荷，能使较多的表面带负电荷的细胞附着[2]。清洗的目的是去除杂质，这就涉及到一个“量”的问题，过度清洗则细胞脱落、丢失较多，清洗不足则样品表面杂质较多，影响观察，一般清洗 3～4 次，30 min/次。换液过程中，用吸管缓慢滴加或吸走液体，避免冲散细胞，并始终保持样品湿润，避免样品长时间裸露在空气中发生干燥。采用“乙醇梯度脱水法”，脱水时间要根据样品的大小而定，细胞脱水时间不可过长，3～5 min 为宜，避免细胞表面的收缩变形等。样品干燥时受其表面张力的作用易使细胞变形甚至破裂，所以采用临界干燥法干燥，可使样品得到较好的保护。该法较好地保持了细胞培养状态下的树突状形态，经固定、脱水、干燥等处理后获得了理想的效果。该法对于处理具有特殊结构的培养细胞有较好的应用价值。

关键词：树突状细胞；样本制备；扫描电镜
中图法分类号：R446.8　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 洪　涛. 生物医学超微结构与电子显微镜技术[M]. 北京：科学出版社，1984. 183－184.
[2] 李伯勤，张圣明. 医学超微结构基础[M]. 济南：山东科学技术出版社，2003. 315－316.

（编辑　王　红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)12-1300-01

表现为病毒性脑炎的 Moyamoya 病 1 例报告

Moyamoya disease misdiagnosed as viral encephalitis: a case report

郭　峰[1]，杨　华[1]，强永乾[2]　（西安交通大学第一医院：[1] 神经内科，[2] 影像中心，西安 710061）

患者，女，14 岁。以“发热 12 d，左侧肢体无力 5 d”之主诉入院。12 d 前受凉后感头昏，测体温 38 ℃，咽痛，流涕，打喷嚏，按“感冒”治疗 3 d 后症状好转。5 d 前作手工时突感头晕，左上肢无力，持物坠地，行走无异常，无头痛，恶心，视物旋转及耳鸣等。在我院门诊给予阿昔洛韦、强的松口服无缓解后收住院。入院查体：神清，语利，左侧鼻唇沟浅，伸舌偏左，其余颅神经检查未见异常。颈软，克氏征(±)，左侧肢体肌力Ⅲ级，四肢肌张力无增减，左上肢腱反射(+++)，余肢体腱反射(++)，双侧 Babiski 征(+)。心肺腹检查(-)。入院头颅 CT 检查：颅内多发点片状低密度影，占位效应不显著，颅内感染可能性大，按病毒性脑炎给予更昔洛韦、地塞米松治疗 5 d，左侧肢体无力加重，左上肢肌力 0 级，左下肢 1 级，左侧肌张力降低，左侧腱反射(++++)。进一步行头颅 CT 强化检查显示：右额颞叶片状低密度未见强化，仍提示符合病毒性脑炎改变。头颅 MRI 提示：右额叶深部、颞叶片状异常信号影，范围 5.0 cm×5.2 cm×6.0 cm。MRA 提示：右颈内动脉颅外段远端及颅内段不规则变窄，右侧大脑中动脉近端及右侧大脑前动脉不同程度变窄、纤细，远端血管未显影。DSA 提示：右侧颈内动脉变细，呈普遍狭窄，右大脑前动脉未见显影，右大脑中动脉闭塞，其周围形成数条侧支血管。确诊期雾病后给予活血、钙离子拮抗剂等治疗好

（下转 1305 页）

作者简介：郭　峰(1975－)，男，陕西省西安市人，硕士研究生，主要从事老年性痴呆与免疫方面的研究。电话：(029)85324034
通讯作者：杨　华，电话：(029)85324146
收稿日期：2004-07-07；修回日期：2004-12-05