技术方法

文章编号:1000-5404(2007)04-0368-02

悬浮状物质的样品制备及扫描电镜观察

路 菊,陶忠芬,可金星 (第三军医大学高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 通过改进悬浮状物质的样品制备,以提高扫描电镜观察的图像质量。**方法** 将体外培养的人骨髓间充质干细胞(hMSCs)悬液经2.5%的戊二醛(pH 7.2~7.4)固定后,用吸管直接吸出固定液,经洗涤、梯度脱水、叔丁醇梯度置换,再制成细胞悬液进行涂片,空干燥,离子溅射镀膜进行扫描电镜观察。**结果** hMSCs饱满、表面结构清晰,凸现质量改善明显。**结论** 用直接移液法处理悬浮物质扫描电镜样品明显优于传统的样品制作方法。

人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)在特定的培养条件下能定向诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、肌腱细胞以及成纤维细胞等,在组织工程学中具有广阔的应用前景。应用扫描电镜观察hMSCs在Cytodex-3微载体上的生长情况为实验提供依据。采用悬浮细胞常规制样技术得到的样品,镜下显示Cytodex-3微载体和Cytodex-3微载体上负载的hMSCs的数量均极少,且负载在Cytodex-3微载体上的hMSCs的体积和表面形态结构变化较大。为了避免这类问题对实验结果的影响,我们对样品制备技术进行了改进,取得了显著的效果。

1 材料与方法

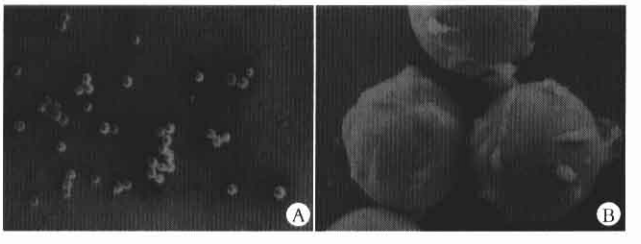
细胞培养:于青年健康志愿者髂前上嵴穿刺抽取骨髓6 ml,加等量DMEM/F12培养液,混匀加入等体积密度为1.073 g/ml的PercollⅡ分离液于离心管中,以2 000 r/min离心20 min,吸取中间乳白色云雾状有核细胞层,加入D-Hanks液10 ml吹打漂洗,1 000 r/m离心5 min,弃上清,沉淀加入原代培养液吹打制悬,细胞计数后,按$5\times10^5/cm^2$接种培养瓶,置37 ℃,5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养,48 h后全量换液,以后隔日换液。待细胞融合80%后进行传代培养。0.25 %胰蛋白酶消化传代,按1×10^4个细胞/cm^2接种,换用传代细胞培养液培养,用P2代的细胞进行下列试验。使用RCCS中50 ml容积的高截面纵横比容器(high aspect ratio vessel, HARV)进行培养。Cytodex-3微载体经浸泡、洗涤、灭菌预处理后,置于4 ℃冰箱中备用。

取hMSCs 1.0×10^7个和0.5 g Cytodex-3加入到HARV中,调整旋转速度到微载体的运动轨迹既不与周围碰撞也不在中心聚集,将整个反应器放入37 ℃,5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养。每日调整RCCS旋转速度,保持微载体的运动轨迹既不与周围碰撞也不在中心聚集,2 d后收集Cytodex-3微载体上培养的hMSCs进行细胞形态观察。

扫描电镜样品制备:将送检样品分为2组,1组采用悬浮细胞常规制样技术:样品用2.5%的戊二醛(pH 7.2~7.4)固定1 h,吸取1~2滴悬浮液迅速在经过净化处理的盖玻片上涂片,干燥20 min后用0.1 mol/L PBS轻轻洗涤2次,每次5 min,乙醇梯度脱水[30%、50%、70%、80%、90%、100%(2次),5 min/次],叔丁醇梯度置换[50%、70%、80%、90%、95%、100%(2次),3 min/次],真空干燥,离子溅射镀膜。另1组采用直接移液法,将培养的hMSCs放入EP管内用2.5%的戊二醛(pH 7.2~7.4)固定1 h,用吸管从EP管内直接吸出戊二醛固定液,加入0.1 mol/L PBS洗涤2次,吸出上清液;再加入30%的乙醇1 ml,5 min后吸出0.4 ml的30%的乙醇,同时再加入0.4 ml的100%的乙醇,依此比例进行梯度脱水直到100%的乙醇;参照梯度脱水的方法进行叔丁醇梯度置换;最后制备成悬浮液,吸取1~2滴悬浮液在经过净化处理的盖玻片上涂片,真空干燥,离子溅射镀膜,AMRAY-1000B扫描电镜观察。

2 结果

镜下观察显示2种不同的制样方法获得的图像结果差异较大,采用悬浮细胞常规制样技术得到的样品,在扫描电镜下极难找见Cytodex-3微载体,且负载在Cytodex-3微载体上的hMSCs的数量更为少,且细胞干瘪、表面细微结构不丰富;采用直接移液法获得的样品,镜下可见大量的Cytodex-3微载体(图1A),且Cytodex-3微载体上附着大量的hMSCs,细胞饱满、表面结构丰富清晰(图1B)。



A: Cytodex-3微载体(×30); B: Cytodex-3微载体上附着大量的hMSCs(×500)

图1 直接移液法制样扫描电镜观察

3 讨论

扫描电镜广泛用于对物质材料的表面结构观察,在悬浮状物质的样品制备过程中,采用常规制样技术方法不仅会引起样品表面结构和体积的变化,同时还会导致样品的丢失[1];为了避免制样过程中样品的丢失以及液体表面张力对样品表面形态结构的影响,我们对样品制备方法进行了改进[2],如负载在Cytodex-3

作者简介:路 菊(1964-),女,安徽省安庆市人,实验师,主要从事扫描电镜方面的研究。电话:(023)67852350
通讯作者:可金星,E-mail: kjx@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-09-24;修回日期:2006-12-20

微载体上的hMSCs的样品制备及扫描电镜观察。

采用传统的悬浮细胞常规制样技术制备的样品，在PBS洗涤、乙醇梯度脱水和叔丁醇梯度置换过程中，可能引起了大量的Cytodex-3微载体和负载在Cytodex-3微载体上的hMSCs流失；同时由于制样过程中样品在空气中裸露频繁，各种液体的表面张力导致了负载在Cytodex-3微载体上的hMSCs表面形态的变化。本实验中作者改进的直接移液法，样品的洗涤、脱水和叔丁醇梯度置换均在EP管内进行，而且由于Cytodex-3微载体的比重较大，易自然沉底，避免了在样品制备过程中的Cytodex-3微载体和负载在Cytodex-3微载体上的hMSCs丢失；采用直接移液法，由于样品始终处于液体之中，避免了样品裸露空气中时液体表面张力对细胞表面形态结构的影响。

通过2种不同样品制备方法的比较，采用直接移液法制样技术得到的样品，其单位面积内Cytodex-3微载体和负载在Cytodex-3微载体上的hMSCs数目较多，且细胞表面微细结构丰富。结果表明直接移液法制样技术在组织工程学中具有一定的推广应用意义，更适合于制备培养在各种人工支架和骨骼组织上的细胞。

关键词：悬浮状物质；样品制备；扫描电镜
中图法分类号：R446.8 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 田中敬一，永谷隆. 图解扫描电子显微镜-生物样品制备[M]. 李文镇，译. 北京：科学技术出版社，1984：89-91.
[2] 黄晓红，张奇亚. 扫描电镜细胞样品制备方法的改进[J]. 电子显微学报，2003，22(6)：671-672

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2007)04-0369-01

个案与短篇

氨基胍和维生素C调节糖尿病大鼠主动脉层黏连蛋白B_1 mRNA表达的研究

李强翔[1]，张新生[2]，贺金莲[1]，钟惠菊[2]，朱飞跃[1]，钟 警[3]，张 卓[1]（[1]湖南省娄底市中心医院内分泌科，娄底 417000；[2]中南大学湘雅医院内分泌科，长沙 410008；[3]南华大学附一医院临床医学研究所，衡阳 421001）

1 材料与方法

1.1 实验动物、仪器和试剂

雄性SD大鼠70只，2月龄，体质量200～250 g，购自中南大学动物部。怡成SENTEST手持式快速全血葡萄糖测试仪，日丽7170型自动生化。氨基胍(AG，Sigma，Co. USA)；维生素C(VitaminC，VitC，天津药业焦作有限公司，批号：040217-1)；链脲佐菌素(Streptozotocin，STZ，Sigma，Co. USA)。原位杂交(ISH)检测试剂盒(经典型)(生物素标记探针，HRP检测系统)。层黏连蛋白B_1多相寡核苷酸杂交探针(LaminB_1，LB_1)(5′地高辛标记，序列：5′ > GGCGACTGCGACCCCCGTGCCGCCGCGGATGGGCAGCCGCGCTGGCGGCC < 3′)由武汉博士德生物公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物建模 70只大鼠随机留取10只为正常对照组，注射0.45%柠檬酸钠缓冲液(60 mg/kg)。将余下60只腹腔注射1%STZ-柠檬酸钠缓冲液(STZ，60 mg/kg)。72 h后尿糖 ++ + - ++++，测血糖≥16.7 mmol/L者，确定模型建立成功。除去造模失败及死亡大鼠，将40只糖尿病鼠纳入本实验。

1.2.2 分组 将10只正常鼠定为正常对照组(CN组，n = 10)；按血糖高低将40只糖尿病鼠再随机分为以下4个处理组：①糖尿病组(D组，n = 10)；②氨基胍治疗组(D + A组，n = 10，按100 mg/kg大鼠灌胃，1次/d)；③维生素C治疗组(D + C组，n = 10，按100 mg/kg大鼠灌胃，1次/d)；④维生素C和氨基胍联合治疗组(D + A + C组，n = 10，按氨基胍和维生素C各100 mg/kg大鼠灌胃，1次/d)。为了避免酮症和维持糖尿病鼠的生存，4个处理组隔日腹腔注射长效胰岛素2～4 U，使血糖波动在25 mmol/L左右，实验共进行16周。

1.3 标本采集

第16周实验终止时，各组大鼠在禁食的基础上，动物经乙醚麻醉后称体质量，股动脉放血5 ml测大鼠血糖、糖化血红蛋白、血脂。在主动脉弓下取主动脉(约1 cm)，置于4%多聚甲醛中固定12 h，石蜡包埋，连续切片6 μm。氧化LDL测定：按文献[1]方法。

1.4 原位杂交检测操作步骤

参照武汉博士德生物公司实验指南。

1.5 原位杂交结果定性判别方法

原位杂交结果图像分析：采用计算机显微图像处理系统，在400放大倍数下以其平均相对灰度值作为表达量的值。在显微镜下根据作色程度按以下标准判定结果：(1)阴性(-)：无黄色；(2)弱阳性(+)：淡黄色；(3)阳性(++)：黄色；(4)强阳性(+++)：深黄色或黄褐色。

1.6 统计学处理

数据均以$x \pm s$表示，采用SPSS 10.0软件进行t检验。

2 结果

2.1 造模过程大鼠一般情况观察

正常组：大鼠体质量增加明显，精神状况良好，毛皮有光泽，

（下转371页）

基金项目：湖南省中医药科研基金(2006-6301)
Supported by the Research Foundation of Traditional Chinese Drug of Hunan Province (2006-6301)
作者简介：李强翔(1970-)，男，湖南省邵阳市人，博士研究生，副主任医师，主要从事糖尿病血管并发症方面的研究。电话：(0731)7442453
收稿日期：2006-05-16；修回日期：2006-12-04