技术方法

文章编号:1000-5404(2007)14-1446-02

细胞与生物材料共培养的样品扫描电镜制备法

路 菊[1],赵建华[2],郭乔楠[3],可金星[1] (第三军医大学:[1]高原军事医学系中心实验室,[3]西南医院病理学研究所,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所骨科,重庆 400042)

提 要:目的 通过不同的样品制备法,在扫描电镜下观察制样方法对细胞形态的影响,筛选细胞与生物材料共培养的样品制备法。**方法** 对样品分组采用戊二醛单固定和戊二醛、锇酸双重固定,使用间接移液法和直接移液法对样品进行脱水、置换。**结果** 镜下显示采用戊二醛、锇酸双重固定,使用直接移液法制备的样品细胞无塌陷皱折、表面结构丰富清晰,图像反差好。**结论** 对细胞与生物材料共培养的样品采用双重固定、直接移液法进行样品制备效果理想。

随着骨组织工程研究的发展,人们在研究细胞、支架材料的同时,更多的是研究细胞与材料的相互作用,基本方法是将种子细胞与生物材料体外复合,植入体内形成新生骨组织。因此要求骨组织工程生物材料不仅应具有良好的理化性能,还应具有良好的生物相容性,即对种子细胞生长、繁殖等生物学特性无不良影响,确保其临床应用的有效性和安全性。其生物相容性是组织工程材料的最基本要求[1,2]。为了能在扫描电镜下准确地反映出细胞在骨组织工程生物材料上的生长情况与形态变化,我们采用乳液共混法,将消旋聚乳酸(poly-D-L-Lactid acid, PDLLA)、羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)、脱钙骨基质(decalcified bone matrix, DBM)混合制成PDLLA/HA/DBM人工骨材料(2005年获国家发明专利No. 01118617.3)[3],选用股骨头置换术所取得的人股骨头碎片培养的成骨细胞与PDLLA/HA/DBM人工骨材料共培养,分时段取样,通过不同的制样法,在扫描电镜下观察细胞的生长情况与形态变化,探讨对这类样品的制备方法。

1 材料与方法

1.1 材料

F12培养基(Gibco),PDLLA/HA/DBM生物材料复合物,培养的人成骨细胞[4]。

1.2 成骨细胞的种植

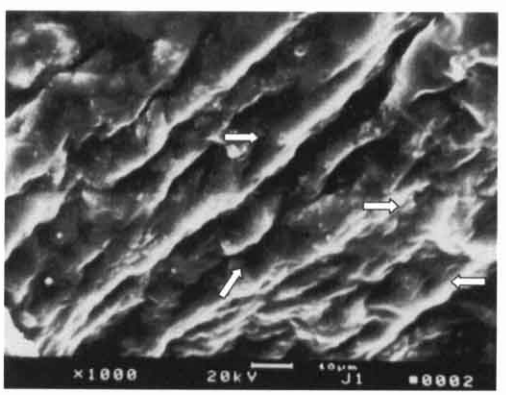
将培养的人成骨细胞(第3代)稀释至密度为3.5×10^5/ml,用加样器吸取0.5 ml的细胞悬液,均匀加入到PDLLA/HA/DBM生物材料复合物中,轻摇,使细胞悬液充分渗透到材料中,于培养箱中恒温(37 ℃)培养4 h,再向培养孔中加入充足的培养液,每2~3天更换培养液,并设空白对照组,其操作同实验组。

1.3 样品制备

取成骨细胞与PDLLA/HA/DBM生物材料复合物共培养3、7 d的材料,分组分别采用2.5%戊二醛单固定、2.5%戊二醛与1%锇酸双固定;脱水、置换分组分别采用间接移液法、直接移液法[5],临界点干燥,离子溅射喷金,AMRAY1000 B扫描电镜观察。

2 结果

不同制样法得到的空白对照组,其材料表面与细胞种植组材料表面无明显差异,材料无变形,孔隙大小及颗粒大小无改变。实验组采用2.5%戊二醛与1%锇酸双固定,使用直接移液法进行脱水、置换的样品,镜下显示细胞伸展充分,呈成纤维细胞样,细胞相互连接融合,表面微细结构清晰(图1)。



箭头指向为细胞

图1 成骨细胞与生物材料共培养的电镜观察 (SEM×1 000)

3 讨论

扫描电镜主要观察样品的表面结构,镜下样品表面形态的变化,不仅取决于电镜本身的工作状态,而且取决于样品的质量。理想的生物样品应如实反映样品在其生理过程中的状态,能在高真空和强电子束的轰击下保持稳定,而且细微结构清晰、无变形,同时具有

基金项目:重庆市攻关项目(2003)
Surpported by the Research Project of Sci & Tech of Chongqing(2003)
作者简介:路 菊(1964-),女,安徽省安庆市人,实验师,主要从事电子显微镜技术方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752350
通讯作者:赵建华,电话:(023)68716606
收稿日期:2007-01-15;修回日期:2007-06-07

良好的反差，这与样品的制备技术密切相关。

PDLLA/HA/DBM生物复合材料的孔隙率为71.3%，孔径100～400 μm，支架有效空间大，有利于种子细胞黏附、分化和生长。采用2.5%戊二醛单固定、使用直接移液法进行脱水置换的样品，细胞表面皱缩、体积缩小，这可能与戊二醛对细胞膜蛋白的作用，引起细胞膜内外渗透压的改变有关，从而导致渗透压升高引起细胞脱水收缩。使用2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定，采用直接移液法进行脱水置换的样品，镜下显示材料无变形，孔隙大小及颗粒大小无改变，细胞无塌陷皱褶，表面结构丰富清晰（图1）。这可能与锇酸对细胞结构中的蛋白质等成分有良好的固定作用有关，使生物膜结构的主要成分磷脂蛋白稳定。同时由于锇酸具有强烈的电子染色作用，所以用它固定的样品图像反差较好。同时根据材料多孔性的特征以及孔隙较深，对放大倍率要求不高的特点，在电镜观察中采用较低的加速电压（20 kV）和较长的工作距离（28 mm），使得图像不仅具有较强的立体感，而且结构清晰，能很好地观察到孔洞底部的微细结构。

结果表明，采用戊二醛、锇酸双重固定，使用直接移液法进行脱水、置换的样品，细胞无塌陷皱褶、表面结构丰富清晰，同时具有良好的反差，效果理想，对类似于细胞与生物材料共培养的样品制备具有一定的指导意义。

关键词：细胞；生物材料；细胞培养；扫描电镜
中图法分类号：R318.08 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Sammarco V J, Chang L. Modern issues in bone graft substitutes and advances in bone tissue technology[J]. Foot Ankle Clin, 2002, 7(1): 19-41.
[2] Rose F R, Oreffo R O. Bone tissue engineering: hope *vs* hype[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(1): 1-7.
[3] 赵建华，廖维宏，王远亮，等. 消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质的制备及其体外讲解特性研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2003，17(1)：61-64.
[4] 郭乔楠，赵建华，卢佳友. PDLLA/HA/DBM复合生物材料对成骨细胞增殖活性的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(10)：905-907.
[5] 路 菊，陶忠芬，可金星，等. 悬浮状物质的样品制备及扫描电镜观察[J]. 第三军医大学学报，2007，29(4)：368-369.

（编辑 龙 亮）

技术方法

文章编号：1000-5404(2007)14-1447-02

部分肝血流阻断器在腹腔镜肝切除术中的应用

朱新生[1]，章跃民[1]，李柏红[2]，王成友[3]，田 进[1]（[1]武警广东总队医院外一科，广州 510507；[2]湖南省湘阴南湖中心医院外科，湘阴 8548500；[3]深圳市第二人民医院肝胆外科，深圳 518035）

提 要：**目的** 通过动物实验评价部分肝血流阻断器在腹腔镜肝切除术中的作用。**方法** 采用血流阻断器阻断局部肝血流后，实施腹腔镜下猪左肝切除术。**结果** 连续8例猪左肝叶切除术中局部血流阻断均成功，术中阻断器操作耗时平均1.48 min；术中断肝出血量平均135 ml，未发生与操作有关的并发症。**结论** 部分肝血流阻断器应用于腹腔镜下肝切除术是可行的，具有对血流动力学影响小、止血彻底、术野清晰的特点。

自1991年Reich等首先报道腹腔镜肝脏切除术以来，腹腔镜肝切除术报道日益增多，但其仍然处于探索阶段，难以推广应用[1]。究其原因主要是受到术中出血难以控制等因素的限制[2]。因此，如何控制术中出血是目前肝脏外科成功实施腹腔镜肝切除术的主要问题之一[3]。本研究借鉴开腹肝切除经验，自行研制了腹腔镜用血流阻断器，初步探讨了腹腔镜肝切除术中，运用局部肝血流阻断技术的可行性和实用性。

1 材料与方法

1.1 动物准备

成年杂种猪8头（市售）；雄性5头，雌性3头，体质量52-74 kg。术前3 d进行流质饮食，术前8 h禁食水。

1.2 实验器械准备

新型腹腔镜用肝血流阻断器（杭州市桐庐江南医光总厂制造），见图1；腹腔镜及成像系统（STOZE，德国），包括0°，30°和45°镜；全自动连发钛夹钳；腹腔镜超声刀；Driger麻醉机及血流动力学监测系统；秒表（国产）。

1.3 手术方法

严格遵循操作流程进行，左肝叶局部血流阻断8例。具体

基金项目：广东省自然科学基金（04005274）
Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (04005274)
作者简介：朱新生（1968-），男，安徽省庐西县人，硕士，副主任医师，主要从事肝胆外科临床和医学工程学方面的研究。电话：(020)61627157，E-mail：zhuhm928@126.com
收稿日期：2007-04-09；修回日期：2007-05-26