DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.055
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0237-03

技术方法

大鼠心、脑、骨骼肌毛细血管染色方法比较

Comparison of staining methods for visualizing capillary in heart brain and skeletal muscle of rats

黄庆愿[1],史景泉[2],高钰琪[1],刘福玉[1],孙秉庸[1] (第三军医大学:[1]高原军事医学系高原医学研究室、病理生理学教研室;[2]附属西南医院病理学研究所;重庆 400038)

提 要:目的 对大鼠心、脑、骨骼肌毛细血管染色方法进行比较。方法 采用Mg^{2+}-ATPase、碱性磷酸酶、肌球蛋白-ATPase等酶组化法及墨汁灌注法和Ⅷ因子相关抗原免疫组化法对毛细血管进行染色。结果 心脏和脑组织毛细血管用碱性磷酸酶染色,而骨骼肌组织毛细血管用肌球蛋白-ATPase染色效果最好;Ⅷ因子相关抗原免疫组化法用于脑组织毛细血管显示次之;Mg^{2+}-ATPase法在心脏、脑、骨骼肌定位效果较差;墨汁灌注法只要方法掌握得当,各部位毛细血管显示均较好。结论 对毛细血管染色,不同器官和组织应采用不同的方法。在心脏和脑用碱性磷酸酶组化法显示较好,而在骨骼肌用肌球蛋白-ATPase酶组化法较好。

可用于显示器官组织微血管构筑的方法很多,如:灌注色剂、X-线造影、血管铸型及针对微血管结构中的特异成分即微血管标志物进行染色的各种组织化学方法等。为从这些方法中找出能显示大鼠心脏、脑和骨骼肌组织毛细血管的快速、简便、准确、可靠的方法,我们分别用墨汁灌注法、Ⅷ因子相关抗原免疫组化法、Mg^{2+}-ATPase、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)、肌球蛋白-ATPase(Myosin-ATPase, mATPase)进行了染色和比较。

1 材料与方法

18只健康Wistar大鼠(本校实验动物中心提供),体重180~220 g,雌雄不拘,分别进行如下实验。

1.1 墨汁灌注

5只大鼠用戊巴比妥钠麻醉,剪开胸腔,经心行主动脉插管,用0.1%肝素生理盐水冲洗后,注入碳素墨水、低分子右旋糖苷、30%甲醛混合液(三者以7∶2∶1混合过滤)。标本放置2 h后,取脑和腓肠肌的外侧头入10%甲醛溶液中固定24 h。经石蜡包埋,冠状(脑组织)或横断(腓肠肌)切片,切片厚7 μm,脱蜡透明后DPX封片。另取5只大鼠,经主动脉逆行插管行心脏灌注,同其它动物一样取材,在心脏中部冠状切片。

1.2 组化染色

8只大鼠用3%戊巴比妥钠麻醉,速取完整的心、脑及腓肠肌外侧头。心脏在左室最宽部位横断;脑在海马部位横断;腓肠肌外侧头在其红色部分切3~5 mm长。3种组织于液氮预冷的异戊烷中速冻,-70 ℃保存。做12 μm厚连续横断冰冻切片(-20 ℃),风扇吹干,进行下列染色。

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39730190)
作者简介:黄庆愿(1967-),男,山东省莱芜市人,博士,讲师,主要从事高原缺氧习服适应方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752340
收稿日期:2000-07-15;修回日期:2001-01-08

1.2.1 酶组化染色

①ALP染色:采用四唑盐法[1],蓝色示酶活性部位。②mATPase染色[1~3]:黑色为阳性反应产物。③Mg^{2+}-ATPase组化染色:采用Wachstein和Meisel法[4]。棕褐色沉淀示酶活性部位。

上述酶组化染色方法均按不同要求作相应的组化方法对照[1~4]。

1.2.2 Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色

采用Santa Cruz公司兔抗人Ⅷ因子相关抗原多抗(使用效价为1∶100),S-P法,根据试剂盒(北京中山生物技术公司)说明进行检测,DAB显色,棕褐色为阳性反应产物。3%H_2O_2-甲醇封闭内源性过氧化物酶,PBS代替一抗作阴性对照。

2 结果

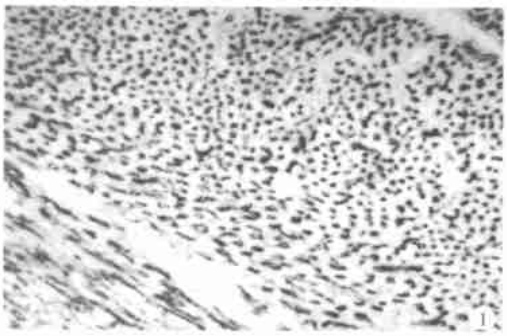
2.1 心脏、骨骼肌毛细血管染色

在光镜下,心脏、骨骼肌用ALP法显示的微血管呈蓝色点状(心肌的内、外层及骨骼肌的横断面)或线状(心肌的中层),十分清晰,密集,对毛细血管的显示效果良好,见图1。骨骼肌mATPase染色,毛细血管呈黑色点状,清晰,定位效果好,见图2。Mg^{2+}-ATPase法显示的微血管呈棕色,管壁结构完整,但除了血管着色外,部分肌膜亦出现着色,故用Mg^{2+}-ATPase法显示的微血管定位效果不及ALP法好,见图3。Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色,在心脏和骨骼肌组织易出现背景着色。墨汁灌注法在有些部位显示血管较好,但常出现充盈过度、血管破裂或充盈不足等现象。

2.2 脑组织毛细血管染色

ALP法显示海马微血管呈蓝色,结构较完整,清晰,呈点状、线状或短树枝状,对毛细血管的显示效果良好,见图4。Mg^{2+}-ATPase法在脑的着色呈棕黑色,但除了部分血管着色外,明显地有其它非血管物质着色,定位效果不好,管壁结构不清晰。墨汁灌注法对海马毛细血管显示较好,但常出现充盈过度、血管破裂或充盈不足等现象。Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色海马微血管呈棕色,血管结构完整,呈线状或短树枝状,对毛细血管的显示较好。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



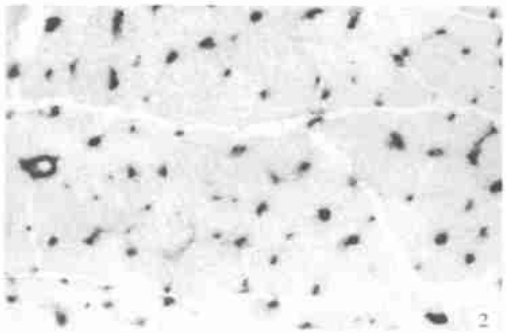


图 1 碱性磷酸酶组化法示心肌微血管呈点状或线状 （ALP× 100）
图 2 肌球蛋白-ATPase 法示骨骼肌毛细血管呈黑色 （mATPase× 200）





图 3 Mg^{2+}-ATPase 法示骨骼肌血管，除血管着色外，部分肌膜亦出现着色 （Mg^{2+}-ATPase× 100）
图 4 碱性磷酸酶组化法示海马区脑组织微血管呈点状、线状或短树枝状 （ALP× 40）

3 讨论

ALP 法是利用酶组织化学方法显示微血管较早就获得成功的范例，并适用于多种器官[5~7]。但此酶在同类动物不同器官或者不同类动物的相同器官的血管内皮细胞中酶的活性不同，不是任何组织的毛细血管都能染上。ALP 法也可以显示骨骼肌毛细血管。但 Hansen-Smith 等[8]报道在新生儿发育过程时，胸锁乳突肌的毛细血管 ALP 表达很弱。缺氧时，骨骼肌毛细血管 ALP 的表达落后于毛细血管的生长[9]。ALP 可能是成熟毛细血管内皮细胞的标志物，新生的毛细血管可能并不表达。在光镜下，心肌和骨骼肌用 ALP 法显示的微血管呈蓝色点状或线状，海马微血管呈短树枝状，十分清晰，密集，结构较完整，对毛细血管的显示效果良好。

骨骼肌 mATPase 法显示的毛细血管呈黑色，定位效果好，便于图像分析，是显示骨骼肌毛细血管最常用的方法[2,3]。该法不仅可以显示毛细血管，而且通过改变预孵液的 pH 值，可以对骨骼肌肌纤维进行分类。预孵液的 pH 值是决定毛细血管显色及不同类型肌纤维染色深浅的主要因素[3]。

Mg^{2+}-ATPase 法也可以用来显示微血管，但从我们所染的大鼠心、脑、骨骼肌毛细血管结果来看，该法对毛细血管的显示不够理想，定位效果不好。说明 Mg^{2+}-ATPase 可能并不是毛细血管内皮细胞所独有。

Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色虽然被广泛用来显示人心肌组织毛细血管及多种肿瘤组织的毛细血管，但在正常大鼠心肌和骨骼肌组织的毛细血管上表达较弱[10]，常规免疫组化染色易出现明显的非特异性着色。另外，毛细血管上的Ⅷ因子相关抗原可受许多因素的影响，如在放射损伤后，大鼠心肌组织血管内皮表达Ⅷ因子相关抗原增多[11]。在脑组织，Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色海马微血管呈棕色，血管结构完整，呈线状或短树枝状，对毛细血管的显示较好。但该法与 ALP 法相比较，操作较为繁琐。

与上述各种组化方法相比，墨汁灌注法虽然古老，但只要注意掌握灌注方法和灌注压力，可以获得较好的效果。但墨汁灌注法也有其不可克服的缺点：向血管内灌注有色物质，由于受颗粒大小的限制，很可能不能进入比较微细的毛细血管内，也由于受灌注压力的影响，会使血管壁产生某些程度的扩张，导致不能准确测量血管直径。

总之，对毛细血管染色，不同器官和组织应采用不同的方法。经比较发现，在心脏和脑用碱性磷酸酶组化法显示较好，而在骨骼肌用肌球蛋白-ATPase 酶组化

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

法较好。

关键词：毛细血管；染色方法；大鼠
中图法分类号：R446　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1998. 132－136.
[2] Lind A, Kernell D. Myofibrillar ATPase histochemistry of rat skeletal muscles: A "two-dimensional" quantitative approach[J]. J Histochem Cytochem, 1991, 39(2): 589－597.
[3] Skorjanc D, Jaschinski F, Heine G, *et al*. Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle [J]. Am J Physiol, 1998, 274(6 Pt1): C810－C818.
[4] 陈啸梅，周文郁，彭俊云，等. 组织化学手册[M]. 北京：人民卫生出版社，1982. 117－182.
[5] 王有伟，陈以慈. 碱性磷酸酶染色法（钙铅法）在研究人脑和心脏微血管方面的应用[J]. 解剖学杂志，1986, 9(2): 227－228.
[6] Xie Z, Gao M, Batra S, *et al*. The capillarity of left ventricular tissue of rats subjected to coronary artery occlusion[J]. Cardiovas Res, 1997, 33(2): 671－676.
[7] LaManna J C, Vendel L M, Farrell R M. Brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia in rats[J]. J Appl Physiol, 1992, 72(6): 2 238－2 243.
[8] Hansen-Smith F M, Watson L, Joswiak G R. Postnatal changes in capillary density of rat sternomastoid muscle[J]. Am J Physiol, 1989, 257(1 Pt 2): H344－347.
[9] Hansen-Smith F M, Blackwell L H, Joswiak G R. Expression of muscle capillary alkaline phosphatase is affected by hypoxia[J]. J Appl Physiol, 1992, 73(2): 776－780.
[10] Koyama T, Xie Z, Gao M, *et al*. Adaptive changes in the capillary network in the left ventricular heart[J]. Jpn J Physiol, 1998, 48(2): 229－241.
[11] Kasper M, Schobel R, Haroske G, *et al*. Distribution of von Willebrand factor in capillary endothelial cells of rat lungs with pulmonary fibrosis[J]. Exp Toxical Pathol, 1996, 48(1): 283－288.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2001)02-0239-02

技术方法

体外分离培养正常成人肝细胞的方法

Study on isolation and culture of adult hepatocytes *in vitro*

马巧玉，王宇明，郝　飞，刘国栋　（第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所，重庆 400038）

提　要：目的　探讨体外分离培养成人肝细胞的方法。方法　用体外二步灌流法分离正常成人肝细胞，用 PRMI-1640 细胞培养液维持培养 1 月以上。结果　成人肝细胞可在体外被分离并存活 1 月以上。结论　正常成人肝细胞可在体外分离培养以供各种肝病基础和临床研究。

各种肝脏疾病（特别是病毒性肝炎、原发性肝癌）在我国发病率高，无可靠治疗方法，因此，迫切需要在肝脏疾病的发病机制及治疗方面有所突破。近年来，国内外有许多关于用动物肝细胞，肿瘤细胞甚至胎儿肝细胞进行肝脏疾病研究的报道，但这些细胞与自然状态的成人肝细胞有较大差别，我们在体外分离培养正常成人肝细胞，以期寻找与自然状态最为接近的、更适宜于进行肝脏疾病的发病机制和防治研究的细胞模型。

1　材料和方法

1.1　主要材料

1.1.1　正常成人肝组织标本　　取意外死亡之 3 例成年男性（19、24、35 岁）、1 例成年女性（27 岁）肝脏，均无肝病史，临床生化和病理检查无异常，各种肝炎病毒标志物、AIH 检测均阴性。

1.1.2　试剂　　小牛血清由本校试剂中心提供，用前 56 ℃× 30 min 灭活补体。PRMI-1640 培养基购自美国 GIBCO 公司。胶原酶、胰蛋白酶抑制剂由美国 SIGMA 公司提供。分散酶购自德国宝灵曼公司。

1.2　实验方法

1.2.1　正常成人肝细胞分离　　采用体外二步灌流法分离正常成人肝细胞[1,2]。取肝脏 100 g，将肝组织置于培养皿中，用 37 ℃含 Ca^{2+}、Ma^{2+} 前灌流液自残存血管中反复灌注，至大部分肝脏呈现灰白色，用 37 ℃、0.05％的胶原酶（含 0.1％分散酶）反复注入残存血管，剪碎肝组织，37 ℃震荡，消化 30 min，3 层无菌沙布过滤，450 r/min× 4 min 离心，弃上清，反复 3 次，最后用含 10％小牛血清 RPMI-1640 培养液（完全培养液）按细胞密度 1×10^6/ml 稀释后按 5 ml/瓶，10 ml/瓶分别接种至 25 ml，50 ml 培养瓶，置于 37 ℃、5％ CO_2 培养箱孵育。

1.2.2　正常成人肝细胞培养　　24 h 后换液，弃去含漂浮细胞的培养液，按上述比例，加入 RPMI-1640 完全培养液，此后每 2～3 d 更换完全培养液 1 次，维持培养 1 月以上。于培养第 10、20、30 天分别计数肝细胞数，台盼蓝染色确定肝细胞存活率。

2　结果

2.1　细胞分离

由于肝组织为非全小叶标本，前灌液和胶原酶灌注仅可到达部分肝组织，分离效果稍差，分离后用台盼蓝染色，肝细胞存

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39770682）
作者简介：马巧玉（1963－），女，浙江省义乌市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事 HCV 核心区多肽对 CTL 抑制作用方面的研究，发表论文 6 篇。电话：（023）68752679
收稿日期：2000-04-15；修回日期：2000-08-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net