DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.031

数间质细胞亦有阳性染色,该抗原在细胞内的分布有三型:膜型、胞浆型和混合型,以混合型为主。阳性染色细胞多呈灶性和弥漫分布。癌细胞内的 c-erbB-2阳性染色强于癌旁肝细胞。

2.3 HCC患者 HCV感染与 c-erbB-2基因表达的关系 如附表所示,癌组织中癌基因 c-erbB-2的蛋白表达阳性率与该患者的 HCV感染无关($P > 0.05$)。

附表 HCC患者 HCV感染与癌组织 c-erbB-2蛋白表达的关系

分 组	n	c-erbB-2	
		(+)	(-)
HCV(+)	15	7	8
HCV(-)	31	15	16

3 讨论

HCV为正链 RNA病毒,其复制经由一个负链 RNA[2],目前尚无其整合入宿主基因组的证据。故进一步揭示 HCV与 HCC发生的可能机理对了解 HCV的可能致癌性具有重要价值。

本实验结果证实我国西南地区肝癌和癌旁组织中存在 HCV NS3抗原,该抗原的保守性仅次于 HCV核心抗原,用作免疫病理诊断可能较理想。其定位与文献[3,4]报道的结果类似。

原癌基因 c-erbB-2与表皮生长因子基因有同源性,其编码蛋白具酪氨酸蛋白激酶活性,在细胞增殖与分化调控中起重要作用。肝癌发生的分子机理可能与 c-erbB-2的激活密切相关[5]。本实验对 HCV不同感染状态的 HCC组织标本进行 c-erbB-2蛋白的免疫组化染色发现,HCV感染与 c-erbB-2蛋白表达无关,提示 HCV的致癌可能与 c-erbB-2癌基因的激活无关。究其原因,可能与 HCV RNA不存在逆转录,没有整合入宿主基因组的可能,激活癌基因的作用就不存在,这于 HBV致 HCC的机理有不同之处。

关键词 肝肿瘤;基因表达; c-erbB-2
中图法分类号 R735.7

参考文献

1 Yang Jianmin, Liu Weiwen. HCV infection in primary hepatic carcinoma and liver cirhosis: A comparative study on serum anti-HCV and HCV RNA. J Gastroenterol Hepatol 1993; 8(suppl): S182
2 Gerber M A. Shieh YSC, Shim K S *et al*. Detection of replicative hepatitis C virus setuences in hepatocellular carcinoma. Am J Pathol 1992; 141(6): 1271
3 Haruna Y, Hayashi N, Hiramatsu N *et al*. Expression of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma. Cancer 1994; 73: 2253
4 Hiramatsu N, Hayashi N, Haruna Y *et al*. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 region of the hepatitis C virus genome. Hepatology 1992; 16(3): 306
5 苏 勤,刘彦仿. c-erbB-2蛋白和表皮生长因子受体在肝脏病变中的表达.中华病理学杂志, 1995; 24(2): 93

(收稿: 1996-07-08;修回: 1996-11-06)
(编辑 冷怀明)

血管内皮细胞的滤膜培养方法

The method of culturing artery endothelial cell on filter

许蜀闽* 王培勇 孙秉庸 (第三军医大学基础部病理生理学教研室、高原医学研究室)重庆, 630038

提 要 目的:建立、稳定内皮细胞滤膜培养的模型。方法:分组比较不同明胶浓度处理滤膜,不同种植密度及孵育时间,不同孔径滤膜对内皮细胞生长的影响,从而确定滤膜培养的各实验条件。结果:不同明胶浓度处理滤膜、不同种植密度,不同孵育时间对内皮细胞生长的影响差异显著($P < 0.01$)不同孔径滤膜对内皮细胞生长的影响差异不显著($P > 0.05$)。结论:用 1‰明胶处理滤膜, $10^5/cm^2$的种植密度及孵育 2 d即可获得较好结果。

血管内皮细胞覆盖全身所有心血管腔,具很多生理功能[1],对它的研究也日益深入。细胞培养是人们已熟悉的研究内皮细胞的方法。培养中常用的载体为玻璃,塑料制品。我们用滤膜为载体有其优越性,因为滤

* 许蜀闽,女,24岁,助理实验师

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

膜带有微孔,使培养出来的内皮单层更接近生理状态成为有用单层。因此,滤膜培养为内皮细胞的研究提供了新方法。为确定各种实验条件,建立、稳定内皮细胞滤膜培养的模型,我们做如下实验。

1 材料与方法

1.1 试剂用品

明胶(Sigma),微孔滤膜(0.8μm、0.45μm、0.22μm国产),小培养皿,M1640(Sigma),小牛血清,0.15%,胰蛋白酶(Difico)其它试剂均为国产 AR级。

1.2 滤膜处理

参照文献[2]的方法,加以改进。取0.8μm、0.45μm、0.22μm孔径的滤膜各数张放入0.088 mol/L醋酸中60℃浸泡20 min,取出用双蒸水冲洗3遍。各种孔径的滤膜分别分为3份,分别放入1‰、0.5‰、0.05‰的明胶溶液中煮沸1 h,然后用电吹风吹干。将吹干的滤膜置烤箱100℃烤1 h,然后高压灭菌(15磅,30 min)备用。

1.3 内皮细胞悬液制备

取生长情况良好的小牛肺动脉内皮细胞(Pulmonary artery endo the lial cells,PAEC第13代)用0.15%胰蛋白酶消化,弃消化液,加入培养液吹打制成细胞悬液,对悬液做细胞计数,以便接种。

1.4 内皮细胞分组接种

1.4.1 不同明胶浓度处理滤膜对 PAEC生长的影响 取0.8μm孔径用1‰、0.5‰、0.05‰三种明胶处理的滤膜放入小培养皿中,以$10^5/cm^2$浓度接种 PAEC,2 d后观察生长情况。

1.4.2 不同种植密度和孵育时间对 PAEC生长的影响 取1‰明胶处理0.8μm孔径滤膜,置小培养皿中,分为2组,分别以$1\times10^5/cm^2$和$2.5\times10^4/cm^2$密度接种,并动态观察2、5、10 d后的生长情况。

1.4.3 不同孔径滤膜对 PAEC生长的影响 取1‰明胶处理0.8μm、0.45μm、0.22μm不同孔径滤膜置入小培养皿中,以10^5/cm接种 PAEC,2 d后观察生长情况。

以上各组样本数 $n=5$,接种后放入 CO_2孵箱孵育(37℃ 5% CO_2)。

1.5 观察方法

观察时因滤膜不透明,光镜下无法直接看到细胞,所以我们将滤膜经梯度脱水后,滴加纯醋酸,使滤膜透明,然后做 HE染色,光镜下做单位面积内细胞计数。每个样本取滤膜中央及其上、下、左、右四个边缘共5个视野的平均数为结果。

2 结果

见表,对影响 PAEC生长的因素:明胶浓度,种植密度,孵育时间及滤膜孔径分组,观察结果见表1,2,3。

表1 不同明胶浓度处理滤膜对 PAEC生长的影响($n=5$)

明胶浓度	1‰	0.5‰	0.05‰
细胞数	$2.3\times10^5\pm0.3\times10^5$	$5.7\times10^3\pm0.8\times10^3$	$3.4\times10^2\pm0.5\times10^2$

经方差检验和 q 检验,各组间 $P<0.01$,说明各组间差异显著。

表2 不同种植密度及孵育时间对 PAEC生长的影响($n=5$)

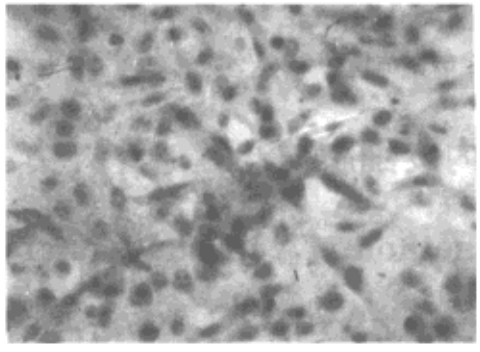
种植密度	孵育天数(d)		
	2	5	10
$10^5/cm^2$	$2.1\times10^5\pm0.2\times10^5$	$7.5\times10^3\pm1.0\times10^3$	无细胞
$2.5\times10^4/m^2$	$4.8\times10^4\pm0.4\times10^4$	$3.2\times10^2\pm0.6\times10^2$	无细胞

经 t 检验,不同种植密度相同,不同孵育时间组间都有 $P<0.01$差异显著。

表3 不同孔径滤膜对 PAEC生长的影响($n=5$)

滤膜孔径	0.8μm	0.45μm	0.22μm
细胞数	$2.7\times10^5\pm0.8\times10^5$	$3.0\times10^5\pm0.5\times10^5$	$1.8\times10^5\pm1.1\times10^5$

经方差检验各组间 $P>0.05$差异无显著性。



附图 滤膜上致密连接的内皮细胞单层 (HE×400)

3 讨论

PAEC在滤膜上生长在其它载体上生长难。本实验探讨了各种合适的实验条件,既使内皮单层形成又可节省药品及细胞。我们用1‰明胶处理滤膜,$10^5/cm^2$的种植密度及孵育2 d,获得较好结果如附图。内皮细胞胞质透亮,连接紧密,形成单层。其中短时间孵育有

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

利于生长与在其它载体上培养情况不一致。如前所述，选择滤膜为载体具有优越性。这种模型可直接用于:① 单层内皮细胞的通透性研究。② 内皮细胞分泌的物质可通过滤膜微孔，故可做联合培养，以同时观察两种细胞的相互作用。③ 因滤膜较玻片软，电镜制样中可直接用于包埋、切片，便于原位观察细胞间的相互关系。本室已采用这种模型进行了一些研究。如缺氧对肺动脉内皮细胞的通透性影响；缺氧时肺动脉内皮细胞与平滑细胞的相互作用机制等。这些实验稳定性较好。本方法适用于不同孔径需要的滤膜内皮单层培养，也可作为其它细胞滤膜培养的基础。

关键词 血管内皮细胞；细胞培养

中图法分类号 R329.2

参考文献

1 杨映波.血管内皮细胞研究的一些进展.见:孙秉庸主编.病理生理学进展.第3册.北京:科学技术文献出版社，1993.99~101

2 A. E. Postlethwaite, R. Snyderman. The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte derived factor. J of Exp Med, 1976; 144(2): 1188

(收稿: 1996-03-08;修回: 1997-10-09)

(编辑 张大春)

内皮素-1在内毒素对肝血流量影响中的作用

Effect of endothelin-1 on endotoxin influenced hepatic blood flow

刘宝华* 陈惠孙** 王代科 胡德耀** 杨恒文** (第三军医大学附属大坪医院普通外科)重庆，630042

提 要 目的:观察内皮素-1(ET-1)在内毒素对肝血流量影响中的作用。方法:选用 Wistar大鼠 20只，分为对照组；ET-1组: 4 μg·kg⁻¹；内毒素组: 10 mg·kg⁻¹内毒素；内毒素+ ET-1抗体组: 10 mg·kg⁻¹内毒素和 1∶2000 ET-1抗体 0.4 ml·只⁻¹。采用氢气清除法观察肝血流量。结果:内毒素和 ET-1均能使肝血流量降低，其中 ET-1作用较强，持续时间较长。ET-1抗体能部分拮抗内毒素所致肝血流量降低作用。结论:ET-1参与了内毒素所致的肝血流量降低作用。

机体对致炎物质的反应十分复杂，涉及神经、体液、内分泌等许多系统，目前认为最重要的是免疫系统和血管内皮细胞系统[1]。内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)是血管内皮细胞分泌的最强的缩血管因子，以自分泌、旁分泌的方式调节局部血管紧张度，参与局部循环稳定的维持[2]。本实验采用氢清除法观察内毒素对肝血流量的影响，以及 ET-1在内毒素对肝血流量影响中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌内毒素($O_{111}B_4$)、内皮素-1(Endothelin-1, porcine sequence)购自美国 Sigma公司。内皮素-1抗体(ET-1 antibody)购自英国皇家医学院。末梢组织血流仪(PHC-300日本)。

1.2 动物的准备及分组

取 Wistar大鼠 20只，体重 250 g~280 g雌雄不拘，每组 5只。实验前禁食过夜，自由饮水。1.5%戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹腹腔注射。动物麻醉后，分组如下:① 生理盐水对照组(C组)；② 单纯内皮素-1组(ET-1组): 4 μg·kg⁻¹；③ 单纯内毒素组(LPS组): 10 mg·kg⁻¹内毒素；④ 内毒素+ ET-1抗体组(LEA组): 10 mg·kg⁻¹内毒素和 1∶2000 ET-1抗体 0.4 ml·只⁻¹。

1.3 实验方法[3]

麻醉后动物仰卧位固定于实验架上，行气管切开插管。腹部正中切口，长约 3 cm，显露右侧肝脏。参考电板置于腹部切口左侧皮下。记录电极针于距肝右叶下缘的 0.5 cm，斜行 45°，插入约 1 cm 电极固定稳定 10 min后，经气管插管进行人工呼吸，控制频率为 40 beat/min 开始吸入氢气进行肝血流量(Hepatic blood flow, HBF)测定，氢气浓度为 20%。用末梢组织血流仪记录氢气清除曲线。根据该仪器提供的血流量计算方法，将记录氢气清除曲线，经半对数转换，求出半衰期($t_{\frac{1}{2}}$)。根据下列公式计算 HBF:

$$HBF = 0.693 \div t_{\frac{1}{2}} \times 100/100(ml \cdot 100g^{-1} \cdot min^{-1})$$

肝血流量测定的时间点:给药前、给药后 5、15、30、45、60 min。给药方法:自肠系膜小静脉头皮针穿刺，后接三通管，给以

* 刘宝华，男，37岁，副教授、副主任医师，博士

** 野战外科研究所 重庆，630042

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