3 讨论

本实验对淋巴结细胞悬液作电镜包埋前胶体金染色，通过预固定和再固定，既很好地保存了细胞表面抗原，又保存了细胞的超微结构。电镜观察表明，T 辅助细胞和 T 抑制细胞在抗 原分布和超微结构方面均有所差异。前者抗原多成簇状，胞浆内线粒体和粗面内质网等相对较多，后者抗原多单个散在分布，胞浆内细胞器较少。这些结构特点可能与两者各自的功能有关。

关于淋巴结细胞悬液的制备方法，我们曾试用淋巴结组织研磨和200目不锈钢网过滤的方法，但研磨易使细胞破碎，钢网过滤在无负压吸引的情况下细胞通过较困难。标记前封闭非特异性抗原，对防止非特异性交叉反应十分重要，我们比较了2.5%BSA 和未标记 GAM 的封闭效果，发现后者效果更佳。对第一抗体的使用，孵育时先后加两次抗体比加1次染色效果好。

本方法还较好地克服了超微结构观察中由于 T 细胞在淋巴组织内区域性分布和电镜取材的局限性，致使各细胞亚群分布不匀，难于在一块标本中同时观察的问题。本方法也适合于胸腺、脾脏及骨髓组织 T 淋巴细胞亚群的免疫电镜检测。

关键词 T 淋巴细胞；免疫测定

参考文献

1. 上海市医学化验所主编。临床免疫学检验手册(上册)。上海：上海科学技术出版社，1983：20～48
2. 顾远锡 崔玉芳 徐海超。小鼠淋巴结及胸腺 T、B 淋巴细胞的鉴别。动物学研究，1983；4(2)：191
3. 葛依工 高 瀚 孔宪涛，等。流式细胞仪检测大鼠外周血 T 细胞亚群(微量全血法)。上海免疫学杂志，1988；8(2)：81
4. Mason DW, Arthur RP, Dallman MJ, et al. Functions of rat T-Lymphocyte subsets isolated by means of monoclonal antibodies. Immunol Rev，1983；74：57

(收稿：1992-10-26；修回：1993-06-06)

复合胶元酶法分离人血管平滑肌细胞的新方法

王旭开 杨成明 刘光耀 谯怡然* (第三军医大学大坪医院心内科) 630042

目前国内外分离血管平滑肌细胞的常用方法主要是贴块培养分离法和单纯胶元酶分离法[1,2]，但前者易出现“去分化”或“调整”现象[3]，后者又耗时、膜损伤作用大和收集细胞数量少[4]。本文采用复合胶元酶法对16例外科手术时标本组织血管进行分离与鉴定，以评价该方法的应用价值。现介绍如下：

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及配制

1.1.1 D-HANK'S 液：NaCl 8.00g，KCl 0.4g，Na_2HPO_4 0.06g，KH_2PO_4 0.06g，$NaHCO_3$ 0.35g，酚红0.02g，溶于1000ml 重蒸水，高温消毒，4℃备用。

1.1.2 酶制剂及配制

胶元酶 I 型(Sigma)：用 D-HANK'S 液配成1mg/ml 溶液，过滤除菌分装后－20℃保存备用。

* 第三军医大学基础部病理教研室

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

弹性蛋白酶Ⅱ型(Sigma):用 D-HANK'S 液配成0.5mg/ml 溶液,分装后－20℃保存备用。

胰蛋白酶抑制剂(Sigma):D-HANK'S 液配制成0.5mg/ml 溶液,分装后－20℃保存备用。

1.1.3 RPMI－1640培养基(日本):按说明书配制,加入10mmol/L HEPES,并加入小牛血清(终浓度10%)分装后－20℃保存备用。

1.1.4 肌动蛋白免疫组织化学试剂:抗肌动蛋白 IgG、IgG 抗体(IgM),PAP 辣根过氧化酶,按说明书配制,0℃待用。

1.2 血管组织的来源及处理

于外科腹部手术切除的组织无菌分离小动脉血管,纵行剖开,排尽残血,仔细剥离外膜,并刮除内膜,将动脉条剪为1mm × 1mm 小块,置于 D-HANK'S 液,4℃放置,2 h 内用酶消化[5]。加入消化酶(上述3种)后置入37℃恒温摇床,20min 收集1次细胞。将收集的动脉平滑肌细胞(ASMC)置入含10%小牛血清的培养基。

1.3 血管平滑肌细胞的鉴定

1.3.1 光镜观察:将生长的 ASMC 自培养基中取出后用无菌 HANK'S 液冲洗后,甲醇固定后,台盼蓝染色,置于 Olympus 显微镜下观察细胞形态。

1.3.2 肌动蛋白免疫组织化学鉴定[6]:将生长在玻片上的 ASMC 以 HANK'S 液洗干净培养基,用甲醇:冰乙醇(3:1)固定在4℃ 20min,再放入60℃烤箱 4 h。根据 ABC 免疫组化进行染色(图1)。

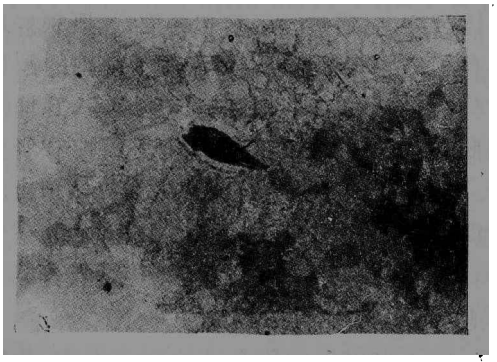


图1 人 ASMC(免疫组化 HE 染色) ×400

1.3.3 电子显微镜观察:顷去细胞培养液,以37℃ HANK'S 液充分洗涤,最后1次离心1700～2000rpm 10min,弃上清,加入固定液,再用环氧树脂包埋,制成超薄切片,于透视电镜下观察照像(图2,3)。

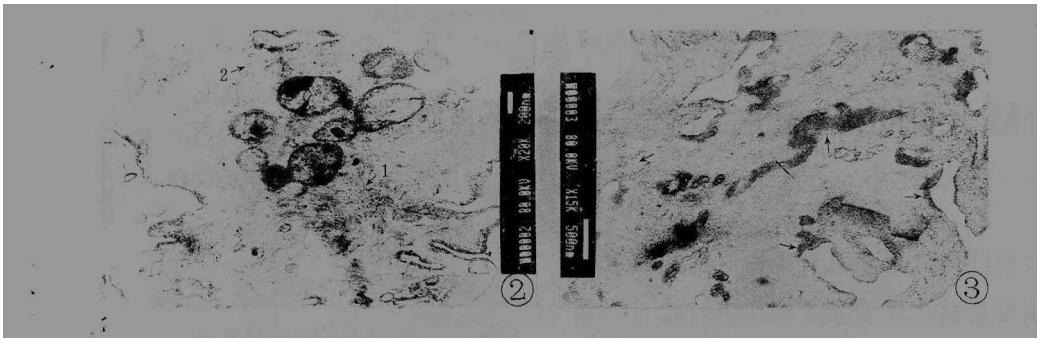


图2 人 ASMC 胞内微丝管(箭头1)和饮泡(箭头2) ×20 000

图3 人 ASMC 质膜下密斑和胞浆内的密体(箭头所指) ×20 000

2 结果

2.1 ASMC 分离后的形态及其鉴定[3]

血管组织经复合酶消化成单细胞后在光镜下见呈长形或椭圆形,胞质密度高,不透明,胞核多为卵圆形,有数个以上的核仁。置入培养液中6 h 左右就开始沉下贴壁生长。

电子显微镜下见 ASMC 呈不规则形态,胞内有大量饮泡(图2),基膜下有密斑,胞内有密体(图3),沿胞核呈束集分布的微丝管(图2),没有高尔基体。

肌动蛋白免疫组化观察在光镜下见 ASMC 呈长形或椭圆形,培养时间稍长时呈圆形,胞质中有较

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

多的丝样物质(图1),这就是着色较深的肌动蛋白是ASMC 特征之一。

2.2 单纯胶元酶法与复合胶元酶法分离人ASMC 效果的比较

	单纯胶元酶法	复合胶元酶法
消化时间	30～40min	20min
1次收集细胞数	1～1.25×10⁶/ml	8～11×10⁶/ml
细胞碎片	多/H	少/H
台盼蓝排斥率	70%～80%	95%以上
收集液蛋白含量	65μg/ml	20μg/ml
ASMC 胞内[Ca^{++}]i	240nmol/L	170nmol/L

3 讨论

哺乳动物血管中层仅含有平滑肌细胞,因此除去内膜和外膜,可获得 ASMC 的纯培养,但由于贴块培养有不同程度污染成纤维细胞的可能,而单纯胶元酶分离 ASMC 在单位时间内所分离下来的细胞数量少,细胞膜损伤大,只能用于传代培养,传代培养所出现的"去分化"现象表明 ASMC 的某些性状已改变,不适于高血压细胞离子转运模型的研究以及药物干预研究。我们对单纯胶元酶法进行了改进[5],加强了对弹性蛋白的松解作用,并加入了特异抑制胰蛋白酶的抑制剂,减轻了酶对细胞膜的非特异性损伤作用。在消化后收集的 SMC 中加用了含高浓度的小牛血清,防止了 ASMC 由于细胞外电荷或离子改变或某些抗原暴露而发生再聚集成块。

因为人动脉血管壁中除含有大量弹性纤维外,还有成纤维细胞,而易与平滑肌细胞在形态上相混淆的主要是成纤维细胞。因此有必要进行鉴别。在普通光镜下,ASMC 呈椭圆形或长形,加1μm 去甲肾上腺素和等量台盼蓝5min 后 ASMC 呈圆形成椭圆形蓝染[3],而成纤维细胞则扁平而稍大,胞质透明,无收缩反应,长时间培养后在培养基上呈同心圆旋涡状生长。本实验5个培养基中生长7 d 均未见到这种现象。在电镜下,成纤维细胞的胞质中无饮泡,无密斑密体,亦没有束集状的微丝管,而有许多高尔基体。免疫组化鉴定是鉴定 SMC 有力的直接手段。我们采用的是人 Actin 单克隆抗体,在 ASMC 中含有大量肌动蛋白,肌动蛋白单克隆抗体进入细胞内与肌动蛋白结合,继而与二抗、三抗结合,染色后呈深棕色,而成纤维细胞内无肌动蛋白,不显色。

在本实验中,我们建立的复合酶消化分离人血管 SMC 的方法具有明显的优越性,能明显缩短消化时间,更具良好的选择性,这样收集的 ASMC 数量显著较单一酶多,并且对细胞膜损害程度明显减轻,成活的细胞数量和质量都有提高。由于酶作用时间缩短,松解成纤维细胞的机会减少,保证了分离细胞的纯度。最大限度保护了离体 ASMC 的原有性状和代谢行为。

关键词 肌,平滑,血管;细胞分离

参考文献

1. Remmal A, Koutouzov S, Girard A, et al. Defective phosphoinositide metabolism in primary hypertension. Experientia,1988;44:133～137
2. Labelle EF, Murray BM. Differences in inositol phosphate production in rat tail artery and thorcic aorta. J Cellular Physiol,1990;144:391～400
3. 夏人仪。兔主动脉平滑肌细胞培养及形态学观察。中华心血管病杂志,1982;10(2):134
4. Judithy A. Three-dimensional organization of the extracellular matrix scereted by cultured rat smooth muscle cell. In Vitro,1988;24(77):633
5. Lusiane MB, Ram VS, Ramesh CB. Altered signal transduction in vascular amooth muscle cells of sportaneously hypertensive rats. Hypertens,

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1992;19(suppl Ⅰ):142～148
6. 杨景山。细胞生物化学技术。北京:北京医科大学出版社,1991

(收稿:1993-04-08;修回:1993-06-10)

经皮心包穿刺活检术临床应用16例次分析

司良毅 张远慧 倪廷枢 何国祥 马慧卿 (第三军医大学西南医院心肾科) 630038

临床上心包疾病的病因近年因结核性致病的发生率相对下降而有所改变,但准确的病因诊断较为困难,其病理学诊断通常只能经过间接检查心包积液或需开胸手术取心包组织方能进行。这对临床应用极为不便[1];故此我们探索采用经皮穿刺介入心包的方法进行心包活检,取得较好效果,现将我们对16例次原因不明的中至大量心包积液患者所作心包穿刺活检结果报告如下:

1 器材与方法

心包活检针系自制,由三部分组成:(1)活检针外套;(2)穿刺针芯;(3)切割针芯。针长15cm,直径与14号注射针相同。穿刺针芯比外套针长0.2cm,外套针距针尖0.3cm 处有一呈45°角的活检倒钩,切割针芯较外套针短0.2cm,其顶端为边缘锐利的平凹面。具体活检方法如下[2]:

病人取平卧位或头高30°位,于常规剑突下或左前胸心包穿刺点,常规消毒铺巾局麻后,在心电图监护导引下先用细针作探查性穿刺,成功后改用带穿刺针芯的活检针穿刺,当拔出针芯见有心包液流出通畅时,表明穿刺针及前端倒钩部已进入心包腔,如无把握时,可在心电监护下将针与胸壁的角度变小后再进针0.3cm 左右,抽液顺利后,换用切割针芯插入外套中约2/3,将外套针倒钩面对向壁层心包,缓慢回拉外套针,当其活检倒钩钩住心包时,有阻力感,这时另一手迅速将切割针芯全部插入,利用切缘与外套针之间的切割力即可切取心包组织,退出活检针,抽液100～300ml 减压,以防心包液从活检创口外渗,平卧6 h,第2天作胸透了解有无气胸或心包液外渗入胸膜腔。本操作可多部位重复进行。

2 临床资料

本文对11例经心包穿刺抽液检查仍不能明确病因的患者共作了16例次经皮心包穿刺活检术,其中男6例,女5例,年龄19～56岁,有1例先后共行3次活检,3例作2次活检,16次活检中仅1次未取到心包组织,本组中无并发症发生,结果见附表。

附表 心包活检患者临床资料表

例号	性别	年龄	心包积液量及性质	临床诊断	心包病理诊断
1	男	28	大量、草黄色渗出液	结核性心包炎	多量淋巴细胞浸润及少许炎性渗出物
2	男	54	大量草黄色渗出液	结核炎	弥散分布的异形细胞
3	女	56	中量血性渗出液	结核性	淋巴细胞浸润及大量纤维素
4	女	29	中量草黄渗出液	结核性?病毒性?	淋巴细胞浸润玻璃样变性
5	男	17	大量血性渗出液	结核性	大量淋巴细胞浸润
6	女	55	大量血性渗出液	癌性?结核性?	少量淋巴及中性白细胞浸润
7	女	34	中量草黄渗出液	病毒性	少许淋巴细胞浸润
8	男	21	大量血性渗出液	结核性?癌性?	大量淋巴细胞及中性白细胞浸润,可见少许干酪样坏死物
9	男	42	大量草黄渗出液	病毒性	少许淋巴细胞浸润
10	女	40	大量血性渗出液	结核性?癌性?	大量淋巴细胞浸润,纤维素沉积
11	男	32	大量草黄渗出液	病毒性	少许淋巴细胞浸润

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net