DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.04.022

附表 细胞损伤和冲击波参数关系的比较

分组	峰值 (kPa)	持续时间 (ms)	脱落细胞 (%)	恢复细胞 (%)
低压组	938～1024	0.70～0.75	20	90
高压组	2814～3000	0.45～0.51	35～40	50～60

3 讨论

本研究采用培养细胞进行冲击损伤实验，避免了活体动物细胞、组织和血供复杂的相互作用，以及血液循环障碍所产生的营养代谢紊乱等继发因素的影响，尤其是排除了继发作用引起的损伤超过原发损伤改变的可能性。同时，培养细胞还提供了以简单方式研究短时冲击波对细胞直接损伤作用的条件，从而消除了由于动物组织密度不同形成的难以预测的反射与干涉压力波的影响。因此，采用本模型可以在单纯的条件下，研究冲击波对细胞的直接损伤作用。

我们在建立的钢筒中进行细胞冲击损伤实验，测得的压力值稳定，变化范围小，从观察结果看，本模型稳定性及重复性均达到实验要求，结果分析可靠。用此实验模型研究了冲击波对原代培养兔角膜内皮细胞的损伤作用，结果表明，角膜内皮细胞受损程度随着冲击波压力峰值增加而加重，而细胞恢复程度减弱。

关键词 爆炸伤/病理学；细胞，培养的

参考文献

1. Suneson A, Hansson HA, Lycke E, et al. Pressure wave injuries to rat dorsal root ganglion cells in culture caused by high-energy missiles. J Trauma, 1989; 29: 10～18
2. Suneson A, Hansson HA, Kjellstrom BT, et al. Studies on effects on cell cultures of pressure waves generated by high energy missile impact. J Trauma, 1990; 6(2)Supplement: 124～131
3. Suneson A, Hansson HA, Seeman T. Peripheral high-energy missile hits cause pressure changes and damage to the nervous system. Experimental studies on pigs. J Trauma, 1987; 27: 782～789
4. Suneson A, Hansson HA, Seeman T. Pressure wave injuries to the nervous system caused by high-energy missile extremity impact. Part I. Local and distant effects on the peripheral nervous system. A light and electron microscopic study on pigs. J Trauma, 1990; 30: 281～294
5. Suneson A, Hansson HA, Seeman T. Pressure wave injuries to the nervous system caused by high-energy missile extremity impact. Part II. Distant effects on the central nervous system. A light and electron microscopic study on pigs. J Trauma, 1990; 30: 295～306

(收稿：1992-11-20；修回：1993-04-13)

大鼠淋巴结 T 淋巴细胞亚群的免疫电镜标记

李爱莲 (第三军医大学基础部病理教研室) 630038

T 淋巴细胞是细胞免疫的主体，了解 T 细胞亚群的变化在病理研究中具有重要意义。光镜下检测 T 细胞亚群的方法较多，但在超微结构水平标记观察的报道较少，尤其是淋巴组织的细胞。本文参照有关文献[1～4]，用胶体金技术对大鼠淋巴结 T 淋巴细胞及其亚群进行了免疫电镜检测，取得良好效果，报告如下：

1 材料与方法

1.1 动物为健康雄性 Wistar 大鼠，体重 180～220g。大鼠断头活杀，取肠系膜淋巴结，分离周围结缔组织。将淋巴结置无菌生理盐水内剪碎，用注射器和4号针头滤器过滤，制成淋巴结细胞悬液。

1.2 抗大鼠 T 细胞亚群的单克隆抗体 MRC OX-

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

19(抗全 T 细胞)、OX-35(抗 T 辅助细胞)和 OX-8(抗 T 抑制细胞),由英国牛津大学 Mason 教授惠赠。胶体金标记的羊抗鼠 IgG 抗体(GAM)和未标记的 GAM 由军事医学科学院基础所提供。淋巴细胞分离液为上海化学试剂二厂产品。

1.3 染色过程

1.3.1 分离淋巴细胞:用8～10ml 玻璃试管,放入淋巴细胞分离液1.5ml,再加淋巴结细胞悬液约2 ml,2000rpm 离心15min。吸取淋巴细胞层,用0.1mol/L pH7.2的 PBS 离心洗涤1次,即得到淋巴细胞悬液。加 PBS 调整细胞浓度在2×10^7/ml 左右,将淋巴细胞悬液转入4支1.5ml 的塑料管内,每管各1ml,离心去除 PBS。

1.3.2 预固定:离心管内加入3%多聚甲醛和0.025%戊二醛混合固定液,室温10min。然后高速离心去除固定液,用 PBS 洗涤。

1.3.3 封闭:细胞悬液内加入2.5%牛血清白蛋白(BSA)或1:20未标记的 GAM,室温8min。再离心去除封闭液,混旋器震荡,分散细胞团。

1.3.4 孵育:三个试管内分别加入浓度为 1:200 的单克隆抗体 OX-19、OX-35 和 OX-8,4℃ 孵育 12～16 h,再加单抗1次,室温30min。另一试管内用 PBS 代替单抗,其余处理相同,作阴性对照。

1.3.5 洗涤:用 pH7.2,内含0.5% BSA 的 PBS 洗细胞2次,每次10min,再用 pH8.2的 PBS 洗2次,每次10min。

1.3.6 染色:加10nm 金颗粒标记的 GAM,浓度为1:20,室温孵育40min,最后将细胞离心成团。

1.3.7 再固定:用2.5%戊二醛4℃下再固定细胞团4 h,PBS 冲洗,把细胞团修成1mm×1.5mm 小块。

1.3.8 制备电镜标本:用1%锇酸后固定2h,常规方法包埋、切片、染色,JEM-2000EX 电镜观察。

2 结果

细胞超微结构保存良好,各种表面阳性的淋巴细胞清晰可辨。OX-35阳性的辅助细胞表面金颗粒多呈簇状存在,每簇约5～10个金颗粒,在胞浆伪足样突起的胞膜处尤为明显。细胞核大多呈椭圆形,核膜曲折内折较浅,胞浆内有少量线粒体、粗面内质网和一些游离核糖体(图1～2)。OX-8阳性的 T 抑制细胞表面金颗粒相对略少,多为均匀散在分布,多数胞核有较深曲折,胞浆内细胞器很少(图3～4)。OX-19阳性细胞中多数细胞的结构特点同 OX-35阳性细胞,少量细胞与0X-8阳性细胞相一致。以 PBS 取代单抗的阴性对照组细胞用未标记 GAM 封闭后未见阳性着色,用2.5%BSA 封闭的偶可见到非特异性阳性标记细胞。

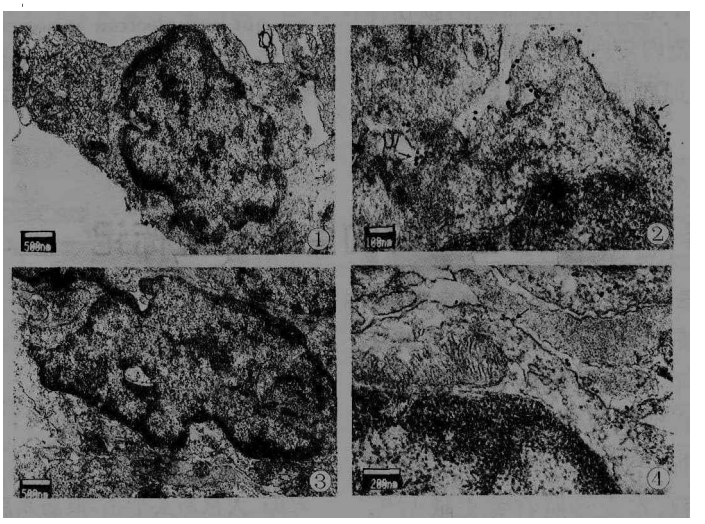


图1 OX-35阳性细胞(Th) 图2 图1局部放大,细胞表面胶体金颗粒大多呈簇状(↑)

图3 OX-19阳性细胞(Ts) 图4 图3局部放大,细胞表面胶体金颗粒较少,呈散在分布(↑)

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

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

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