DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.02.019

技术与方法

肺泡表面活性物质的电镜组化染色

刘大维 赵 敏 王正国（野战外科研究所）

肺泡表面活性物质（Pulmonary Surfactant）是由肺泡Ⅱ型上皮细胞分泌的1种脂蛋白，其主要功能是维持肺泡稳定，调节肺顺应性以及防止肺毛细血管内体液渗出至肺泡内[1]，目前对肺泡表面活性物质的研究日益深入，其超微结构的研究受到了人们的重视[2][3][4]。但国内这方面的工作开展得较少，西南地区则未见报道。我们根据Stratton Luft等人的方法[3][4]加以修改，摸索了进行肺泡表面活性物质染色的较为稳定可靠的方法，现简要报告如下：

1 材料和方法

1.1 固定液的配制

1.1.1 前固定液：a. 4.5mg钌红/ml

b. 0.15mol/L的二甲胂酸钠（pH7.3）

c. 9%戊二醛

将a、b、c 3种液体储存于4℃冰箱中备用，临用时按1:1:1的比例配制混匀即可。此固定液的pH为7.2～7.4，渗透压为350mmol/L左右。

1.1.2 后固定液：a. 4.5mg钌红/ml

b. 0.3mol/L二甲胂酸钠（pH7.2～7.3）

c. 3%锇酸（临用时配制）

将a、b、c 3种溶液储存于4℃冰箱中备用，需用时按1:1:1的比例配制混匀即可。

1.2 取材、前固定

正常家犬活杀后，迅速取出2 mm×2 mm×4 mm的组织，立即投入蜡板上的冷固定液中，然后用双刃刀片，将组织切成1 mm^3的小块，用镊子轻轻挟入盛有2 ml～3 ml冷固定液的青霉素瓶中进行前固定，并将小瓶放入真空泵中，抽真空，以排除组织内残留气体，待组织块升至液面并再次沉底时，即可取出。置4℃冰箱中3 h。

1.3 后固定

用0.15mol/L的二甲胂酸钠缓冲液，将固定好的组织冲洗3次共10min，然后放入后固定液置4℃冰箱中2 h～4 h，用0.15mol/L的二甲胂酸钠缓冲液冲洗1次～2次。

1.4 常规脱水、包埋、切片、染色

经后固定及冲洗后的标本逐级丙酮脱水，环氧树脂618包埋，切成超薄切片，醋酸铀、柠檬酸铅染色，H-2000透射电镜观察。

2 结果

经上述方法处理的肺组织，电镜下可见肺泡腔中内衬连续的表面活性物质（图1）。高倍观察，可见这一表面活性物质层由肺泡到肺泡Ⅰ型上皮细胞可大致分为呈绒毛状的游离缘，再向下为电子密度较高的界面层，这一层较宽，与Ⅰ型上皮相邻则为电子密度较低的“下相”（图2）。按常规方法取材固定，未

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

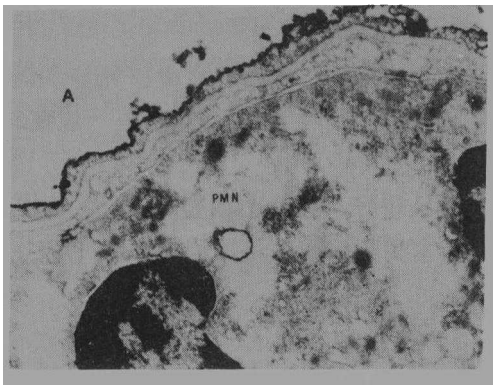


图 1　经钌红－锇酸复合染色的肺组织 A示肺泡腔，PMN示肺泡毛细血管内白细胞。可见血气屏障肺泡腔面电子密度增高的表面活性物质层。（×10 000）

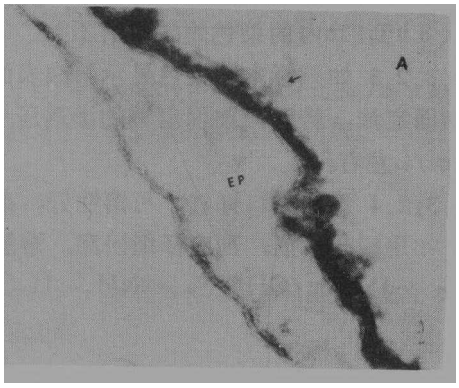


图 2　高倍放大，可见染色的表面活性物质层电子密度增高（△）（×150 000）

进行钌红-锇酸复合染色的肺组织，肺泡表面无此种电子密度较高的结构（图3）。除肺泡表面活性物质层染色外，肺泡Ⅰ型上皮内的板层体并未见有电子密度增高现象。为检验该方法的重复性，分别选用了来自4个动物的肺脏，分4批用相同的染液染色。结果显示绝大部分肺泡表面均可见到电子密度高的表面活性物质层。各批组织间差异不大。

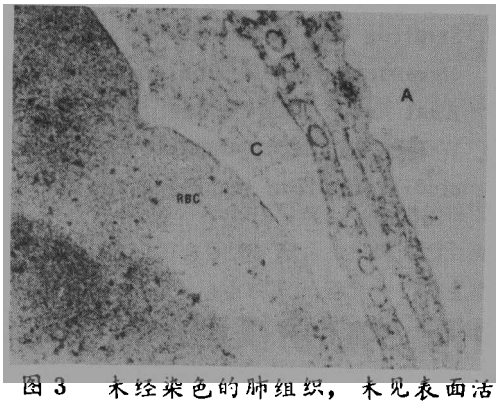


图 3　未经染色的肺组织，未见表面活性物质层。（×40 000）

3　讨　　论

3.1　**染色的原理**[3,4]钌红主要与粘多糖成分反应，形成沉积物，构成染色后所形成的“下相”。锇酸与表面活性物质层的双胞卵磷脂反应而增加电子密度，同时锇酸被结合在组织上的钌红还原而分解成锇黑。本实验结果表明：通过这一方法染色可以清楚地显示肺泡表面活性物质层（图1、2）。Stratton等[4]的前固定液不含钌红，染色是在后固定过程中引入的。表面活性物质层的固定是一个较为困难的问题，常规固定，染色的肺组织切片上不能见到表面活性物质层。在前固定过程中引入钌红，可以使钌红与粘多糖成分尽早形成沉积物，待后固定过程中的锇酸进入组织，则很容易形成锇黑，有助于早期保存表面活性物质层。

钌红分子较大，固定液未触及的地方则钌红分子不能与表面活性物质层接触并反应。我们在取材并放入前固定液后，即放入真空泵中抽出肺组织中残留气体，以便钌红能更好地与肺泡表面活性物质层接触并发生反应。染色效果更好。保证切片上的肺泡内表面基本上均可见到表面活性物质层。

3.2　**染色及固定的具体注意事项**

3.2.1　固定液a、b、c液的配制应在用前24h内配制，越新鲜越好。并置于4 ℃冰箱中储存备用。用时按1:1:1的比例混合，效果较好。储存较久的液体或混合后储存了一段时间再用的液体染色效果较差。特别是后固定液更是如此。

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

3.2.2 根据二医大内部资料，前固定时间一般选3 h，但从我们的实验结果来看，前固定从3 h到14h内的染色效果差别不大。

3.2.3 如果标本除染色显示肺泡表面活性物质层外，还需进行立体计量学研究等，则应控制固定液，特别是前固定液的渗透压[5]。本文的配方满足了这一要求，渗透压一般在350 mmol/L左右。

3.2.4 选用进口钌红，可溶性好，杂质少，染色效果较好，且易于调整固定液的渗透压。如用国产试剂，则应仔细研磨，溶解钌红并过滤。本实验采用的是德国产钌红（Ruthenium red）$Ru_2(OH)_2C_{l_4}\cdot 7NH_3\cdot 3H_2O$。

参考文献

1. 张洪泉。肺泡表面活性物质及其调节。国外医学：生理病理学分册 1982；2:181
2. Wiliams MC. Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. J Cell Biol 1977；72:260
3. Luft JH. Ruthenium red and violet (Ⅰ.Ⅱ) Anat Rec 1971；171:347
4. Stratton CJ, Wetzstein Hy, Handy T. The ultrastructural histochemistry and stereoscanning electron microscopy of the Rodent and amphibian surfactant systems. Anat Rec. 1980；197:49
5. Weibel ER. Morphometric and stereological methods in respiratory physiology including fixation techniques. Elsevior Scientific Publishes Ireland Ltd. 1984

（收稿：1990.09.20；修回：1991.01.11）

一种新的创伤模型的致伤方法

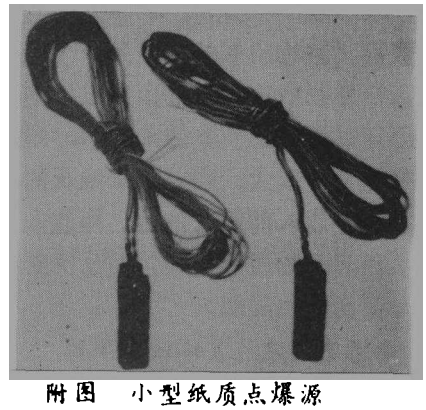
万 芪 刘荫秋 李曙光 蒋苏平 王大田（野战外科研究所）

在过去的创伤研究中，已建立了多种实验模型。然而，这些创伤模型主要的缺点是，致伤能量传递差异大，难以测量和标准化，不易相互比较。为此，我们试图建立1个适用的创伤实验模型以供深入探讨创伤后机体各种不同的病理、生理变化。

1 创伤模型的建立

1.1 小型点爆源的制作：研制了1种小型纸质点爆源（附图），长25mm，直径6 mm。装填火药为斯锑酚酸铅（THPC），药量、药型可根据需要调整。点爆源外涂防水胶，连接电引火头，用普通干电池即可引爆。爆炸时能量释放按下式计算：

$$E = 4.1868M\cdot Qr$$



附图 小型纸质点爆源

E为爆炸所释放的能量（j），M为火药质量（g），Qr为爆热（ka/g），指单位质量的火药爆炸所释放的热量。THPC的爆热为200ka/g，按上式可计算出不同装药量的点爆源所释放的能量（表1）。

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