

体外培养细胞原位包埋电镜样品的制作方法

钱晶晶,管怀进,朱昌来*

(南通大学附属医院眼科,江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:探讨一种快速简单的单层细胞原位包埋及电镜样品的制作方法,避免离心法等对细胞造成伤害以致影响电镜下细胞结构的观察。方法:将细胞培养在盖玻片上进行原位包埋,通过置入液氮冷却的方式迅速彻底分离树脂与玻片上的细胞层。结果:此方法所得细胞的超微结构清晰,损伤明显减少。结论:体外培养细胞原位包埋电镜样品的制作方法快速简单,对细胞伤害少,完全可以满足科研和临床病理诊断的需要。

[关键词] 原位包埋;透射电子显微镜;电镜样品制作(超薄切片)

[中图分类号] R361.3

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2013)05-707-02

doi: 10.7655/NYDXBNS20130532

利用电子显微镜观察培养细胞的超微结构是鉴定细胞、了解细胞形态以及研究各种因素对细胞影响的重要手段。一般游离细胞的透射电镜样品制备是消化离心或刮取离心将细胞聚集成团,然后按照常规方法制备。但消化离心法的缺点是所观察细胞外形、表面结构、内部结构均会发生极大变化,严重影响细胞超微结构的观察。刮取离心法虽可保留部分细胞原有形态特征及细胞间关系,但仍对细胞形态有不同程度的影响。原位包埋法可以最大程度还原细胞在不同生长期或外界因素影响下的超微结构变化。本研究就采用原位包埋法对经变色人工晶状体(intraocular lens, IOL)保护的可见光照射的人视网膜色素上皮细胞进行包埋、切片、电镜观察,获得了理想结果,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

人视网膜色素上皮细胞株 ARPE-19^[1],购自美国模式培养物保存所。变色 IOL(20 D, $\Phi_B=6.0$ mm, BV-60A)购自苏州六六视觉科技股份有限公司。

ARPE-19 细胞分为 3 组。阴性对照组:无光照,无 IOL;阳性对照组:照光,无 IOL;IOL 组:照光,有 IOL。

1.2 方法

1.2.1 细胞制备

24 孔培养板中放入洁净盖玻片,以 5×10^5 个/孔接种 ARPE-19 细胞 0.5 ml(所用培养液为 DMEM/F12 + 100 μ g/ml 链霉素 + 100 U/ml 青霉素 + 10%灭活胎牛血清),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱。待铺满玻片 90%时,弃上清液, PBS 清洗 2 次,加无血清培养液 0.5 ml 培养 24 h。将 IOL 置于 24 孔板盖板上正中位置,可见光(380~780 nm,照度为 60 000~61 000 lux)通过 IOL 照射细胞 2 h。照后继续培养 24 h。

1.2.2 原位包埋法电镜样本制备

将光照处理的 ARPE-19 细胞弃去培养液, PBS 漂洗 3 次, 2.5%~4.0% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h, 1% 锇酸固定 1~2 h。30%、50%、70%、80%、95%、100%乙醇逐级脱水,环氧丙烷置换及常规包埋树脂浸透。将盖玻片放于载玻片上,显微镜下选择待观察的细胞区域,用蜡笔圈封。在细胞表面覆盖 1~2 mm 厚的胶状包埋树脂,分别放于 37 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 烘箱各 24 h。用包埋剂将常规已成形的树脂托(约 10 mm \times 3 mm \times 2 mm)粘于爬片中央的树脂一侧。待聚合后将标本放于液氮中约 1 min,树脂与爬片即分开。常规包埋块修整,超薄切片,铀-铅双重染色。透射电镜(JEM-1230,日本 Jeol 公司)观察、拍照。

2 结果

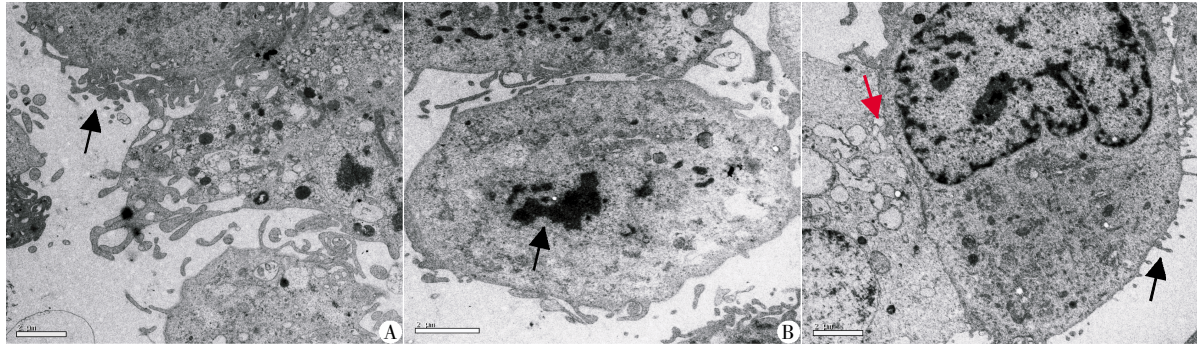
培养 24 h 后,各组细胞经透射电镜观察,结果表明阴性对照组 ARPE-19 细胞微绒毛多且细长,胞浆内可见黑色素颗粒和丰富细胞器,细胞核内染色质分布均匀(图 1A)。光照后,阳性对照组 ARPE-19

[基金项目] 南通市科技项目(KZ010018)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhuchanglai@ntu.edu.cn

细胞损伤明显,细胞周围微绒毛减少甚至消失,胞体变小、变形;胞浆内可见线粒体肿胀、粗大,脊间隙增宽;细胞核内异染色质边聚、固缩,呈驼峰状改变(图1B)。而变色IOL组ARPE-19细胞虽可见损

伤的表现,但程度明显较阳性对照组轻。细胞膜上可见的短指状微绒毛数量较阴性对照组;胞膜内侧可见有空泡样改变,线粒体丰富;胞核呈圆形或椭圆形,可见散在分布的小斑块状异染色质(图1C)。



A:阴性对照组 ARPE-19 细胞周围微绒毛多且细长(箭头),胞浆内细胞器丰富,见黑色素颗粒($\times 8\ 000$);B:阳性对照组光照 2 h 后 ARPE-19 超微结构,细胞周围微绒毛显著减少、变短,染色质固缩呈驼峰状(箭头),胞浆内细胞器减少($\times 10\ 000$);C:IOL 组光照 2 h 后 ARPE-19 超微结构,细胞周围微绒毛变短,数量减少(黑箭头),胞膜内侧出现空泡(红箭头)($\times 8\ 000$)。

图1 ARPE-19 细胞的超微结构

3 讨论

细胞超微结构检查技术的应用已日益广泛,其中电子显微镜的检查结果更被视为金标准。常用的固定包埋是电镜研究的基本方法,但不适用于单层细胞的原位电镜观察。虽然单层细胞原位包埋的方法已有文献报道^[2-4],但在修块时将细胞与包埋块分离是较为困难的步骤。许多研究者尝试采用胶原、硅酮、聚酯薄膜等不同材料作为培养细胞的支撑物,取得了一定效果。但上述技术操作复杂且成本较高,因此文献报道较少^[5-6]。本研究采用将细胞培养在盖玻片上进行原位包埋,通过置入液氮冷却的方式迅速彻底分离树脂与玻片上的细胞层。

本研究中将细胞种于 24 孔培养板内的玻片上,IOL 置于盖板上正中心位置,玻片上周边部分的细胞不能被 IOL 遮盖到,故在包埋树脂后,将常规用已成形的树脂托(约 10 mm \times 3 mm \times 2 mm)粘于爬片中央的树脂一侧,保证修块时树脂托内含有经变色 IOL 保护的细胞。还应特别注意漂洗、固定、逐级脱水等步骤动作要轻,尽量减少这些过程中细胞的丢失。

综上所述,本研究通过盖玻片上培养细胞的原

位包埋法来制备透射电镜观察的样品,操作简单便于重复,最关键的是能真实反映培养细胞经各种因素处理后的位置、形态特征及细胞间的相互关系。本方法能为相关科研及临床工作提供良好技术支持,具有较好的实用价值,值得推广。

[参考文献]

- [1] DunnKC, Aotaki AE, Putkey FR, et al. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties[J]. *Exp Eye Res*, 1996, 62(2): 155-169
- [2] 赵刚, 曾嘉, 杨海贤. 培养细胞的超薄切片技术探讨[J]. *天津医科大学学报*, 2004, 10(2): 168-172
- [3] 于向民, 野田亨, 房丽华, 等. 盖玻片在培养细胞免疫电子显微术中的应用[J]. *电子显微学报*, 2004, 23(1): 94-96
- [4] 徐晶, 田香勤, 李新娟, 等. 培养细胞超薄切片制备方法改进[J]. *新乡医学院学报*, 2009, 26(1): 31-32
- [5] 苏树芸, 刘裕, 王瑞瑜, 等. 单层培养细胞的原位固定与显示酸性磷酸酶(ACP)的电镜方法[J]. *中华物理医学杂志*, 1981, 3(3): 1701
- [6] 朱永德, 雷建章, 李淑荣, 等. 单层细胞原位固定包埋简易法[J]. *中华物理医学杂志*, 1981, 3(3): 2251

[收稿日期] 2013-01-08