

无血清培养鹌鹑胚胎骨骼肌细胞的光镜与电镜观察

王国杰 韩正康 陈伟华

(南京农业大学 动物医学系 210095)

摘要 用无血清、无胚胎抽提液培养液(Eagle's, MEM)培养孵育 8d 的鹌鹑胚胎骨骼肌细胞,接种后圆形的生肌细胞可发育、分化形成线状的肌管,历时 4—6d。对培养 72h 肌细胞苏木精—伊红染色光镜照相和电镜观察证明肌细胞在本实验条件下能分化形成肌细胞特有的横纹结构和肌丝结构。

关键词 鹌鹑 生肌细胞 肌管 无血清培养 肌丝

骨骼肌细胞的无血清培养始于 70 年代, Puri E. C.^[1] 等用无血清培养液培养鸡胚胸肌细胞,但在培养液中添加了胰岛素、氢化可的松、转铁蛋白、胎球蛋白、成纤维细胞生长因子等,国内周振华^[2] 用 Eagle's (MEM) 培养液在无血清、无胚胎抽提液条件下,培养鸡胚腿肌细胞获得成功,1990 年 9 月至 12 月作者用同样方法培养鹌鹑骨骼肌细胞,通过苏木精伊红(H. E)染色和电镜观察,从形态学上确定培养细胞的发育和分化程度。

1 材料和方法

1.1 骨骼肌细胞的分离和培养 孵卵 8d 后的鹌鹑(朝鲜龙城系)胚蛋由本校种鹌鹑场提供。取鹌鹑胚后腿,除去皮和骨头,用 Eagle's (MEM) 轻洗两次,在小烧杯中用眼科剪刀剪成糊状,加少许 Eagle's 液,用吸管吹打 3—4min,经双层擦镜纸和 160 目尼龙绢过滤,制成细胞悬液,按 4×10^5 / ml 细胞密度接种在玻璃培养瓶内,36℃ 密闭培养,每 24h 更换培养液一次。

1.2 骨骼肌细胞的形态学观察

1.2.1 H. E 染色 长有肌细胞的玻璃片,室温晾干,甲醇固定 10min,常规 H. E. 染色,光镜照相。

1.2.2 电镜观察 倾去培养瓶内培养液,用 Hank's 液轻洗两次,2.5% 戊二醛固定 4h (4℃),将肌细胞由瓶壁刮下,离心 3000rpm / min,再用 1% 的锇酸后固定(4℃)

3h。Epon 812 聚合、包埋, LKBV 型超薄切片机切片, Jeol 100 CXII 型透射电镜观察拍照。

2 结果

2.1 骨骼肌细胞发育和分化过程 接种后 24h,圆形的生肌细胞(Myoblast)已贴壁生长,部分分化成椭圆形;48h 多数形成杆状、多核、核排列成线状的肌管(Myotube);72h 纵横交错的肌管互相融合成分枝状的细胞,随着肌管的不断收缩活动,同方向排列的肌管越来越多(见图 1.1);96h 部分肌管开始从瓶壁上脱落。

2.2 骨骼肌细胞的 H. E. 染色 在玻璃片上生长 72h 的肌细胞, H. E. 染色,在光镜(X1000)下,肌管横纹结构清晰可见,肌管中的细胞核数目少则几个,多则 20—30 个(图 1.2A 和 B 见封 4,下同)有的彼此密集相连,有的则隔开一定距离。

2.3 骨骼肌细胞电镜观察 图 1.3 是培养 72h 细胞的电镜照片,排列成束的肌丝(Myofilament)结构,是肌细胞特有的收缩装置,说明生肌细胞在本实验条件下,能发育、分化,形成能合成肌丝的肌管。

3 讨论

本实验沿用周振华的肌细胞培养方法,在培

养液中未添加血清和胚胎抽提液条件下,培养鹌鹑胚胎骨骼肌细胞,通过活体观察、H. E. 染色光镜照相和电镜观察,从形态上证明在本试验条件下,骨骼肌细胞能正常生长和发育,形成肌细胞特有的横纹结构和肌丝结构。

血清中的成分复杂,有蛋白质(清蛋白、球蛋白、转铁蛋白等)、多肽生长因子(如血小板生长因子、成纤维细胞生长因子、上皮细胞生长因子、胰岛素样生长因子等)、激素(胰岛素、生长激素、氢化可的松等)及其他营养物、矿物质、代谢物和抑制物。某一类型的细胞培养是否需要添加血清,添加多少血清,与其在体内生活的内环境有关,绝大多数细胞在体内不和血清中的一些成分直接接触^[3]。1971年 Yaffe D.^[4]就发现血清浓度太高对肌细胞生长不利,抑制肌细胞融合,血清中的血小板生长因子能促进成纤维细胞的过度生长。

国外关于肌细胞的无血清培养的报道,均在化学培养液中添加血清中含有的胰岛素、氢化可的松、转铁蛋白、成纤维细胞生长因子等。本实验在培养液中未添加血清、激素或生长因子,但肌细胞却能正常生长和发育,其可能的原

因是:(1)机械性破碎和吸管吸打制成的细胞悬液,未经酶处理和离心分离,保留了肌细胞在体内生活的内环境中存在的少量活性成分和营养物质,在第一次更换培养液之前发挥促肌生长作用。(2)实验中未将肌细胞和成纤维细胞进行分离,成纤维细胞的存在对肌细胞贴壁、生长起着支持、保护和滋养等作用,而且成纤维细胞条件培养液对肌细胞生长有明显促进作用^[2]。

致谢 徐福南教授在电镜工作中给予指导和帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Purf E. C. and D. C. Tumer. Serum-free medium allows chicken myogenic cells to be cultivated in suspension and separated from attached fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 1978, **115**: 159—173.
- 2 周振华,成纤维细胞对体外培养的骨骼肌细胞早期发育的影响. *生理学报*, 1987, **39**(2): 190—196.
- 3 Barnes D. and G. Sato. Serum-free cell culture, a unifying approach. *Cell*, 1980, **22**: 649—655.
- 4 Yaffe D., Developmental changes proceeding cell fusion during muscle differentiation in vitro. *Exp. Cell Res.*, 1971, **66**: 33—48.