

^3H -TdR 掺入定量分析在体动脉内皮 细胞损伤的方法研究^①

山东医科大学病理生理学教研室 李 莉 刘玉梅 胡维诚 李锦红 王韶山

摘 要 本文报告一种暴露内皮细胞腔面的铺片制备技术,结合放射自显影方法在光镜下显示 ^3H -TdR 掺入的内皮细胞核,计算整条动脉内皮细胞的标记率,定量显示内皮细胞再生活动情况,并以此对在体动脉内皮细胞损伤进行定量分析。通过对高胆固醇血症的鹌鹑内皮细胞损伤的研究,证明可以满足定量分析内皮损伤的需要。

关键词 内皮细胞损伤; 动脉粥样硬化; 内皮铺片制备; 放射自显影

目前,在动脉粥样硬化(As)发病机理研究中,影响最大的是 Ross 提出的损伤—反应假说(Response-to-Injury Hypothesis)^①。该假说认为内皮损伤是 As 病灶形成的始动环节。常规的组织切片(包括电镜)难以对细胞损伤进行定量分析,而离体细胞培养技术不能反映在体动脉内皮细胞受损的生物学特性改变。我们在 Schwartz 方法基础上^②,利用制备内皮细胞铺片和放射自显影技术,研究定量分析在体动脉内皮损伤的方法,并对高胆固醇血症鹌鹑主动脉内皮的损伤进行了测定,取得成功。

1 材料和方法

1.1 实验动物及造型

45 只雄性日本鹌鹑,开始喂养时为 7 周龄,体重 130~150g,随机分为 2 组:对照组 15 只,喂以市场购买的基础饲料,蛋白质含量为 23%。任意进食,于 50 天处死。高脂喂养组 30 只,在基础饲料中加入 10%猪油和 0.8%胆固醇,任意进食,于 50 天处死。

1.2 血脂测定

动物处死前 2 天,于颈静脉取空腹血(禁食 14 小时),用邻苯二甲醛法测定血清总胆固醇(TC),用乙酰丙酮显色法测定三酸甘油酯(TG)。

1.3 细胞标记

在动物处死前 17、9 和 1 小时,分别腹腔注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)0.5 $\mu\text{Ci/g}$ 体重。

(由中国原子能科学研究院同位素研究所提供)。这一设计是基于许多动物细胞生长周期中的 DNA 合成期(S 期)大约为 6~10 小时,以此反映在 24 小时内进入 S 期细胞的总数。

1.4 标本处理

在第三次注射 ^3H -TdR 后 1 小时,腹腔注射苯巴比妥钠,于左无名动脉插管灌注由 0.1M 磷酸缓冲液配制的 4%多聚甲醛, pH7.2。剥离出左右无名动脉和胸主动脉,置于上述固定液内 1~2 天。沿纵轴剖开血管,按顺序切成长 1cm 左右段,内皮面朝上用细胞钢针固定于特氟隆片上。经 35%~100%酒精系列脱水后,将标本内膜面朝下压贴在火棉胶片上(图 1-1)。放入 35%酒精溶液内 1 小时后,剥离动脉外膜和中膜(图 1-2)。将保留在火棉胶片上的内膜标本及转压贴在明胶片上(图 1-3),置中性缓冲固定液内 1~2 天,再用醇/醚溶液溶解火棉胶,便得到一层腔面朝上的内皮细胞铺片(图 1-4)。在暗室内在内皮细胞表面涂一层核-4 型原子核乳胶(由中国原子能研究院同位素研究所提供)曝光后,通过 D-72 显影液和酸性定影液处理,苏木素轻染细胞核。

1.5 计数 ^3H -TdR 标记细胞和计算标记率

在显微镜目镜下装一刻有 100 个正方格的玻片,这些正方格复盖镜下 2/3 视野,用 10 \times 目镜和 40 \times 物镜观察内皮细胞铺片。计数每个视野(共

① 国家自然科学基金资助项目,项目号 3880395

100个方格)中10个方格内细胞总数。将该数 $\div 10 \times 100 \times$ 视野数便为该段内皮细胞总数。在一个着色的细胞核表面,有10个以上的显影颗粒,便被认定为 ^3H -TdR标记的阳性细胞,计数每段全部视野内阳性细胞数。每段标记细胞率=全部视野内阳性细胞数 \div 该段内皮细胞总数。以反映在24小时内,该段动脉进入S期的内皮细胞占该段动脉全部内皮细胞数的比例。根据每段细胞标记率算出该动物的动脉内皮细胞标记率的平均数。

1.6 统计学处理

根据每只动物内皮细胞标记率计算两组动物标记率的平均值和标准差,进行两组均值间的t检验。以 $P < 0.005$ 为有显著性差异。对两组动物的总胆固醇(TG)和三酸甘油酯(TG)平均值亦进行同样的统计学处理。

2 结果

2.1 各组动物血脂和动脉内皮细胞24小时标记率:(表1) 表中显示高脂喂养组动物50天后血清总胆固醇、甘油三酯和24小时 ^3H -TdR标记率的增高显示显著性差异。

Table 1 Lipids of groups of quails and ^3H -TdR labelling rate/24h($\bar{X} \pm \text{SD}$)

groups	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	^3H -TdR labelling rate/24h
Control	6.14 \pm 0.69	1.16 \pm 0.33	0.81 \pm 0.87%
high fat	40.60 \pm 11.68*	1.77 \pm 0.93	2.05 \pm 4.85%*

* $P < 0.01$

2.2 形态学观察 空白对照组内皮细胞核呈椭圆形,核轮廓清晰,沿长轴排列,分布均匀。每一高倍镜视野(在计数方格内)平均有 1177 ± 195 个内皮细胞。在镜下偶可见细长的平滑肌细胞核,很容易和内皮细胞核鉴别(图2)。

高脂喂养组动物内皮细胞核排列不规则,细胞密度增加,每高倍视野内(在计数方格内)有 1544 ± 278 个内皮细胞,与对照组比较有显著性差异。 ^3H -TdR标记细胞在整条动脉内膜呈灶性密度增加(见图3)。此处还可以看到一些体积小,染色重的内皮细胞核。

3 讨论

动脉内皮损伤是As病灶形成的始动环节。所以,研究内皮损伤,特别是对内皮损伤进行定量分析对研究病灶形成的机理和冠心病的临床防治有极大意义。

Schwartz和Reidy^②,用尼龙丝环沿血管纵轴造成3~5个细胞宽度的损伤,在48小时,这一伤口便由周围细胞再生而修复。若造成1~2个内皮细胞宽度的环形损伤,在8小时内便可修复。可以想象,在任何形式的内皮损伤之后,内皮细胞再生情况依损伤程度而定。内皮损伤程度愈强,再生的

内皮细胞数愈多。这样通过 ^3H -TdR掺入,利用放射自显影技术便可显示出在一定时间内生长周期处于DNA合成期和有丝分裂期的细胞,“阳性”细胞多则说明内皮细胞损伤严重。

^3H 的 β 粒子射程短,用传统的铺片制备方法,在内皮细胞和核乳胶之间有一内皮下结缔组织层,便不能很好地记录到所有的“阳性”内皮细胞。我们采用二次翻转压片,暴露出内皮细胞的腔面,使其直接接触核乳胶,从而使阳性细胞得以很好的显影。

本方法另一优点是可以制备整条动脉的全部内皮细胞铺片,这样便可以全面分析整体动脉内皮受损情况,找出最易受损的部位(高标记区)在整条动脉内皮所占的比例。

高胆固醇血症是冠状动脉粥样硬化性心脏病的主要危险因素之一,血液中胆固醇浓度增高,对内皮细胞的损伤是轻微的,而又是持续的,必然存在着持续的再生活动增加的情况。我们发现高胆固醇组动物内皮细胞 ^3H -TdR标记率明显高于正常对照组,同时注意到高胆固醇组动物坏死内皮细胞增多,以及细胞密度增多,这说明 ^3H -TdR掺入这定量指标可以用来反映内皮细胞损伤的程度。

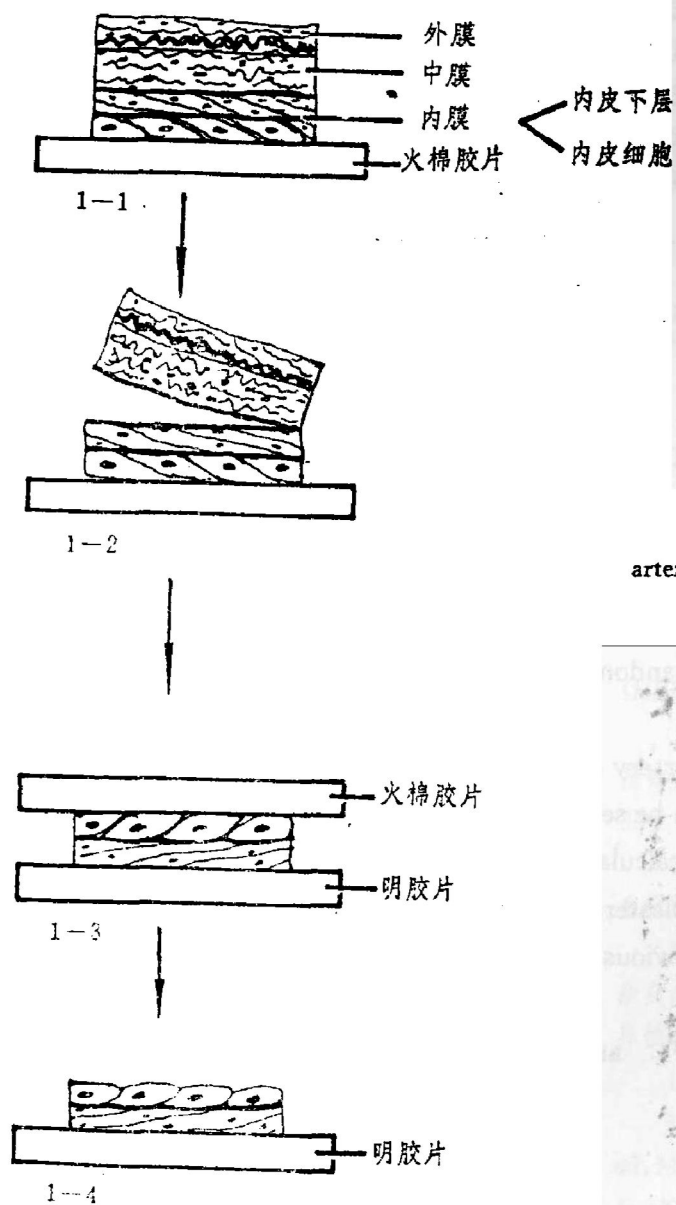


Figure 1 The model of endothelium stuck



Figure 2 Endothelial preparation of the artery of control group quails



Figure 3 Endothelial preparation of the artery of high fat diet quails

这种内皮铺片的制备方法,亦可与免疫组化方法结合,通过过氧化物酶联反应显色,显示细胞内待测抗原的存在。国外已有通过该方法显示内皮细胞浆内 IgG 和某些生长因子的存在^{④⑤}。

该方法的特点是观察在体动脉内皮细胞生物学的改变,这是离体细胞培养技术所不能完成的。该方法最重要的优点是可对内皮细胞损伤以定量的研究,这又是常规病理切片观察所不能完成的。因此我们认为本文介绍的方法可用于多种因素对血管内皮损伤的定量研究,适用于多种血管疾病的研究工作。

参 考 文 献

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—An update. *N Engl Med* 1986;314(8):488
2. Schwartz SM, et al. Cell replication in the aortic endothelium; a new method for study of the problem. *Lab Invest* 1973;28(6):699
3. Rerdy MA, et al. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. *Lab Invest* 1981;44(4):301
4. Hansson GK, et al. Evidence for cell death in the vascular endothelium in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 1983;112(3):278
5. Linder V, et al. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res* 1991;68(1):106

The Methodological Study on the Quantitative Analysis of Artery Endothelial Injury by ^3H —TdR Incorporation

Li Li, et al

Dept. of Pathophysiology, Shandong Medical University, Jinan, Shandong

A special technique for “en face” artery endothelium preparation is introduced, with which the nucleus labelled by ^3H —TdR can be seen with light microscopy. The endothelial regeneration can be quantitatively analysed by calculating the labelling rate of endothelial cells. The endothelial injury in quails with hypercholesterolemia was studied by this method. The more injury, the more cell regeneration. It is obvious that this method can be used in the study of any kind of endothelial injury.

Key Words endothelial injury; autoradiography; atherosclerosis; endothelial—preparation