

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

收稿日期:1994-06-15,修回日期:1994-08-09