

• 论著 •

人皮肤成纤维细胞的培养和鉴定

李海红 周岗 付小兵 屈振亮 孙同柱 顾绍峰

【摘要】 目的 探索和建立人皮肤成纤维细胞体外分离、培养及鉴定的技术方法。**方法** 通过酶消化法分离人皮肤外分泌汗腺,在外分泌汗腺生长的同时,成纤维细胞也在生长;用质量分数为 0.25%的胰酶和 0.02%的乙二胺四乙酸(EDTA)消化分离汗腺细胞和成纤维细胞;以 Dulbecco 改良的 Eagle 培养液(DMEM)为基础培养基,添加胎牛血清(体积分数 10%)、青霉素(100 kU/L)和链霉素(100 mg/L),置 37℃、体积分数为 5%CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养。倒置相差显微镜和苏木素-伊红染色,观察成纤维细胞形态,并对培养细胞行波形蛋白免疫组化及染色体鉴定。**结果** 分离的成纤维细胞可在体外快速贴壁生长、增殖,波形蛋白免疫组化染色为阳性,染色体分析为 46 条。**结论** 该方法所获得的皮肤成纤维细胞可在体外稳定培养,为在细胞水平上研究伤口愈合的机制提供了充足、可靠的靶细胞。

【关键词】 成纤维细胞; 细胞培养; 细胞分离; 鉴定

Culture and identification of human skin fibroblasts LI Hai-hong*, ZHOU Gang, FU Xiao-bing, QU Zhen-liang, SUN Tong-zhu, GU Shao-feng. * Key Research Laboratory of Wound Repair of PLA, Burn Institute, 304th Clinical Department of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China (LI Hai-hong is working on Taihe Hospital of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei, China)

【Abstract】 Objective To explore the method of isolation, cultivation, and identification of human skin fibroblasts in vitro. **Methods** By digesting human skin with collagenase type II to isolate human eccrine sweat glands. The fibroblasts grew along with the growth of eccrine sweat gland cells, and they were separated by digesting with 0.25% trypsin and 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was the basic culture medium, being supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin (100 kU/L), and streptomycin (100 mg/L). Fibroblasts were incubated at 37℃ in a humidified atmosphere of 5%CO₂ and 95% air in the incubator. Cellular morphologies were observed by inverted phase contrast microscopy and hematoxylin-eosin staining, and the cultured cells were identified by vimentin immunostaining and chromosome analysis. **Results** The isolated fibroblasts could grow and proliferate in vitro, and immunostaining of vimentin was positive in cultured fibroblasts and the number of chromosome was 46. **Conclusion** Acquired human skin fibroblasts can be cultured in stable condition in vitro, and sufficient and reliable target cells can be obtained for the study of the mechanisms of wound healing at molecular level.

【Key words】 fibroblast; cell culture; cell isolation; identification

成纤维细胞是皮肤组织受损后的主要修复细胞。正常条件下,其处于相对静止状态,当皮肤组织受损后,细胞则被激活并进入增殖及代谢旺盛期,同时产生多种组织修复因子。本实验中通过获得及体外培养人皮肤成纤维细胞,观察总结了体外培养成纤维细胞的生长特征,为我们在细胞水平上研究伤口愈合的机制提供了有力工具。

1 材料与方法

1.1 材料:全层无烧灼皮肤取自外科手术患者腹部,

基金项目:国家重大基础研究规划项目(G1999054204);国家自然科学基金重点项目(30230370);国家自然科学基金面上项目(30170966)

作者单位:100037 北京,解放军总医院三〇四临床部全军创伤修复重点实验室(李海红,周岗,付小兵,屈振亮,孙同柱,顾绍峰);442000 十堰,湖北省郧阳医学院附属太和医院(李海红)

作者简介:李海红(1972-),女(汉族),湖北省十堰市人,博士,讲师,主要从事创伤修复基础与临床方面的研究。

经患者同意,由解放军总医院三〇四临床部提供。秋水仙碱购自 Sigma 公司,Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(Dulbecco modified Eagle medium,DMEM)、DMEM/F₁₂(1:1)、Hank 平衡盐溶液(HBSS)、胰酶、胎牛血清、胶原酶Ⅱ型为 Gibco BRL 公司产品,波形蛋白购自北京中山生物技术有限公司,免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物有限公司,硫酸链霉素、青霉素产自华北制药股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人体皮肤成纤维细胞的获得、分离以及体外培养:手术切取患者腹部全层皮肤约 0.3 cm × 2.0 cm,将其置于含有青霉素(100 kU/L)和链霉素(100 mg/L)的 HBSS 中反复漂洗后,去除皮下脂肪。在 60 mm 培养皿中用眼科剪将皮肤剪成 1 mm²左右的小块,加入含有Ⅱ型胶原酶(2 mg/ml)、胎牛血清(体积分数为 5%)、青霉素(100 kU/L)和链霉

素(100 mg/L)的 DMEM/F₁₂(1:1)液 3 ml, 37 °C 下置于体积分数为 5%的 CO₂、95%空气、饱和湿度孵箱中过夜。次日挑取汗腺腺体, 37 °C 下置于 5% CO₂、95%空气、饱和湿度条件下的汗腺培养液中培养。在汗腺生长的同时, 成纤维细胞也在生长, 且生长速度快于汗腺细胞, 待成纤维细胞生长明显时, 吸弃旧培养液, 用无 Na⁺、Mg²⁺的 HBSS 洗 2 次, 加入含有质量分数为 0.25%胰酶和 0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)的 D-Hank 消化液约 1 ml, 37 °C 下置于 5% CO₂、95%空气、饱和湿度条件下孵育 2 min, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 约 2 ml 终止消化, 1 000 r/min 离心 6 min 并收集细胞, 测定细胞活性(苔盼兰排斥实验), 用含胎牛血清(10%)、青霉素(100 kU/L)和链霉素(100 mg/L)的 DMEM 分散细胞, 细胞以 1×10⁴/ml 接种 4 ml 至 25 cm² 的培养瓶中, 在 37 °C、5% CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养, 经过连续几次传代培养后, 可得到纯化的成纤维细胞, 按上述方法消化稀释, 细胞以 1×10⁴/ml 接种于放有消毒盖玻片的 12 孔培养板, 每孔接种 1 ml, 于 37 °C、5% CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养。

1.2.2 细胞形态学观察及鉴定:待细胞铺满盖玻片的 40%~60%时, 取出盖玻片, 用 0.01 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次, 每次 5 min, 用冰冻丙酮: 甲醇(1:1)室温固定 30 min。部分进行常规苏木素-伊红(HE)染色后光镜观察; 另一部分用体积分数为 3%的过氧化氢室温孵育 5 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性; 用 0.01 mmol/L 的 PBS 漂洗, 滴加即用型鼠抗人波形蛋白一抗, 置 4 °C 冰箱过夜; 0.01 mmol/L PBS 漂洗后加入羊抗鼠二抗, 室温 30 min; 0.01 mmol/L PBS 漂洗后 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色 1 min, 苏木素复染。

1.2.3 生长曲线绘制:将成纤维细胞消化稀释, 以 2×10⁴/ml 个细胞接种于 12 孔培养板, 每孔接种 1 ml, 于 37 °C、5% CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养, 每隔 24 h 收集 3 孔细胞并计数, 取平均值, 每 3 d 换液 1 次, 连续计数 7 d 后绘制生长曲线。

1.2.4 成纤维细胞染色体的核型分析^[1]:取传代后 2 d 的细胞, 加入含有 0.25%胰酶和 0.02% EDTA 的 D-Hank 消化液, 细胞全部脱落后, 转移到离心管, 1 000 r/min, 室温离心 10 min, 弃上清, 收集细胞约 5×10⁵ 个, 加入新鲜的培养液; 在培养液内加入终浓度为 4 μg/L 的秋水仙碱, 混匀, 于 37 °C、5% CO₂、95%空气、饱和湿度条件下继续培养 2 min, 室温下离心(1 000 r/min) 8 min; 弃上清, 然后加入

0.075 mmol/L KCl, 混匀, 低渗 20 min; 加入 1 ml 新鲜配制的固定液(甲醇: 冰醋酸=3:1), 预固定 2 min, 1 000 r/min, 室温离心 8 min; 弃上清, 加固定液 6 ml, 混匀, 室温放置 30 min, 1 000 r/min, 室温离心 8 min; 弃上清, 加固定液 6 ml, 混匀, 室温放置 20 min, 1 000 r/min, 室温离心 8 min; 弃上清, 加上相当于细胞体积约 10 倍的固定液, 混匀; 取干净、冷藏于-20 °C 的载玻片, 滴细胞悬液 100 μl 于载玻片上, 吹散, 空气干燥, 吉姆萨染色。

2 结果

2.1 成纤维细胞的获得、分离及培养:消化得到的汗腺外植块接种 24 h 内贴壁生长, 成纤维细胞生长在最边缘(彩色插页图 1), 细胞伸展呈梭形和多边形, 多次传代培养后成纤维细胞呈优势生长。苔盼兰排斥实验测定成纤维细胞的活性为 90%以上。

2.2 人成纤维细胞形态学观察及鉴定:HE 染色后光镜观察显示细胞为多角形或长梭形, 胞核为淡蓝色, 胞浆为粉红色(彩色插页图 2)。波形蛋白免疫细胞化学染色显示成纤维细胞胞浆染成深棕色(彩色插页图 3), 为阳性。染色体核型分析显示有 46 条染色体(彩色插页图 4), 为人源性。

2.3 成纤维细胞的生长曲线:本实验中成纤维细胞以 2×10⁴/ml 接种于 12 孔培养板, 细胞于第 5 d 长满。生长曲线结果见图 5。潜伏期、指数分裂期、平台期分别为 0~1 d、1~5 d 和 5~7 d。

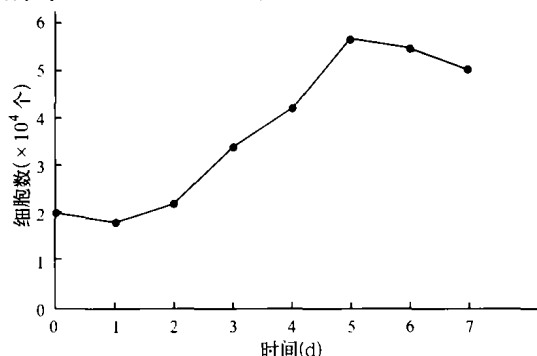


图 5 皮肤成纤维细胞生长曲线

Figure 5 Growth curves of skin fibroblasts

3 讨论

成纤维细胞具有较强的分裂、增殖能力, 适应性强, 易培养、性状稳定, 很难发生转化, 在培养其他组织细胞时, 成纤维细胞也常常混杂其间, 而且生长速度快, 我们在培养汗腺细胞的同时, 也获得成纤维细胞。利用成纤维细胞对酶性分离比汗腺细胞敏感, 并且能选择性地分离而大部分汗腺细胞仍然贴附的特点, 用胰酶消化来分离成纤维细胞。成纤维细胞中间丝的结构蛋白为波形蛋白, 不同于上皮细胞的角蛋

白,也不同于肌细胞的桥连蛋白,成为不同种类细胞分类鉴定的相对特异性标志^[1]。组织创伤后的修复过程在早期可以有伤口的收缩、肉芽组织的形成及细胞外基质的过度沉积等,后期可表现为瘢痕的形成及其异常增生,而这些均与组织中成纤维细胞的生物学活动密切相关^[2,3];同时在伤口愈合初期,创面周围的纤维蛋白则是修复细胞、炎症细胞迁移及增殖的主要支架。

参考文献:

- 1 杨志明,主编.组织工程学(M).北京:化学工业出版社,2002. 155-158.
- 2 付小兵,程飏,盛志勇.有关创伤修复与组织再生的现代认识[J].中国危重病急救医学,2002,14:67-68.
- 3 程飏,付小兵,盛志勇,等.成纤维细胞生长因子对烫伤大鼠原癌基因和抑癌基因蛋白的影响[J].中国危重病急救医学,2002, 14:397-399.

(收稿日期:2004-12-20)

(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

中晚期下肢动脉栓塞的治疗体会

张秀军 李俊海 黄梅

【关键词】 下肢动脉栓塞,中晚期; 手术治疗; 保守治疗

急性动脉栓塞是血管外科的常见急性病,其发病急、进展快,若不及时正确处理,常可造成足趾部分坏死,甚至危及生命。我科于1998年1月—2004年12月共收治急性动脉栓塞伴足趾坏死患者42例,现将其诊治情况报告如下。

1 临床资料

1.1 病例:42例患者从不同医院转来,经不同时期、不同医生诊治过,患者入院后均行急诊动脉造影。其中男30例,女12例;年龄49~76岁,平均61.2岁;左侧19例,右侧22例,双侧1例;既往有风湿性心脏病、心房纤颤26例,脑栓塞6例;发病时间2~12d,平均7.9d。依治疗方式将患者分为手术组(24例)和保守组(18例);根据动脉栓塞的位置分为髂股组(21例,其中手术治疗14例,保守治疗7例)和腘动脉组(21例,其中手术治疗10例,保守治疗11例)。

1.2 治疗方法:①保守治疗患者均根据凝血4项检查及相关实验室检查、体重、年龄而给予不同剂量溶栓、抗凝、祛聚、扩张血管、细胞能量代谢、降纤、抗炎等药物治疗;坏疽足趾局部清洁换药,并敷以抗菌及生长因子纱布使坏疽部分干燥^[1,2]。②手术治疗患者入院后均行急诊导管取栓术,术后给予抗凝、祛聚、扩张血管、抗炎等药物治疗,坏疽足趾的处理同保守治疗组。

作者单位:300050 天津市天和医院血管外科

作者简介:张秀军(1964-),男(汉族),河北省保定市人,硕士研究生,副主任医师。

1.3 评价标准:经过1个疗程(14d)的治疗后,根据患者治疗前后坏疽范围大小的变化来评价,原有坏疽范围治疗前后不变为有效,坏疽范围加大为无效。

1.4 治疗结果:42例患者中有2例治疗未及14d,分别于治疗8d和11d已行截肢术(评定为失败),余患者均于1个疗程后评定疗效。手术组与保守组及不同栓塞部位的疗效比较见表1,表2。

表1 两组疗效比较 例(%)

组别	例数(例)	有效	无效
手术组	24	13(54.17)	11(45.83)
保守组	18	5(27.78)	13(72.22)

注:两组比较: $\chi^2=1.946, P>0.05$

表2 不同栓塞部位疗效比较 例

组别	例数	手术治疗		保守治疗	
		有效	无效	有效	无效
髂股组	21	11	3	0	7
腘动脉组	21	2	8	5	6
χ^2 值		5.874		1.439	
P值		<0.05		>0.05	

2 讨论

急性动脉栓塞起病多急骤,发展迅速,一经诊断,必须立即采用有效治疗,控制疾病的发展。急性动脉栓塞患者,无论是否行手术治疗,都要采用保守治疗,很多情况下它又是手术治疗的辅助疗法。溶栓剂的使用既可以替代手术治疗,也可以用于辅助手术治疗。但溶栓治疗不可能完全替代手术治疗,因为很多患者已有血管病变,易引起血栓再形成。另外,有些栓子对溶栓药物不敏感^[3]。对于中晚期急性动脉栓塞患者,我们的治疗原则是尽量多地挽救肢体,降低坏疽平

面,把疾病对患者的损害程度降到最低。

对于中晚期急性动脉栓塞的治疗,尚无比较理想、较成熟的治疗方法,有报道认为手术治疗加用溶栓、抗凝治疗效果较好,也有报道认为手术治疗效果较好^[4,5]。本组结果表明,对于中晚期急性动脉栓塞患者采取手术治疗或保守治疗的疗效在统计学上差异并无显著性。但手术组不同栓塞部位的手术疗效在统计学上差异有显著性;而保守组差异则无显著性。我们认为,对于选择手术治疗还是保守治疗,除了要考虑患者自身情况,尤其是心血管疾病及发病时间、坏疽程度外,应根据患者的发病部位来决定治疗方式,若患者栓塞位置较高(股动脉以上)应首选手术治疗,反之,则可选择保守治疗,根据病情变化,适时延长治疗时间或截肢(趾)处理。

参考文献:

- 1 刘强,柴家科.基因工程技术在创面修复中的应用[J].中国危重病急救医学,2003,15:636-638.
- 2 孙鹏,付小兵.基因改变与创面愈合[J].中国危重病急救医学,2003,15:245-247.
- 3 Barbaral, Alving C W, Francis W R, et al. Consultations on patients with venous or arterial diseases[J]. Hematology, 2003, 1: 540-543.
- 4 叶建荣,符伟国,蒋俊豪,等.取栓加溶栓联合治疗中期动脉栓塞[J].中华外科杂志,1994,32:152.
- 5 Bello Y M, Phillips T J. Recent advances in wound healing[J]. JAMA, 2000, 283: 716-718.

(收稿日期:2004-10-08)

(修回日期:2004-12-05)

(本文编辑:李银平)

人汗腺细胞的分离和纯化培养方法探讨

(正文见84页)



图1 从皮肤标本中分离出的汗腺,可见大量单个细胞散落于其中(x50)
Figure 1 Sweat gland separated from human skin sample with lots of cells scattered in (x50)



图2 原代培养的汗腺细胞贴壁增殖,周围散在少量成纤维细胞(x200)
Figure 2 Primary cultured gland cells surrounded a small quantity of fibroblast(x200)



图3 原代汗腺细胞向外周扩增(x200)
Figure 3 Primary cultured gland cells started proliferating (x200)



图4 汗腺细胞增殖并形成镜下如“铺石路”样多层细胞结构(x100)
Figure 4 Pebble like shapes of cultured sweat gland cells (x100)

人皮肤成纤维细胞的培养和鉴定

(正文见89页)



图1 成纤维细胞生长在上皮培养物周边(x100)
Figure 1 Fibroblast growth at the edge of epithelial cultures(x100)



图2 成纤维细胞的HE染色(HE, x100)
Figure 2 HE staining of fibroblast(HE, x100)

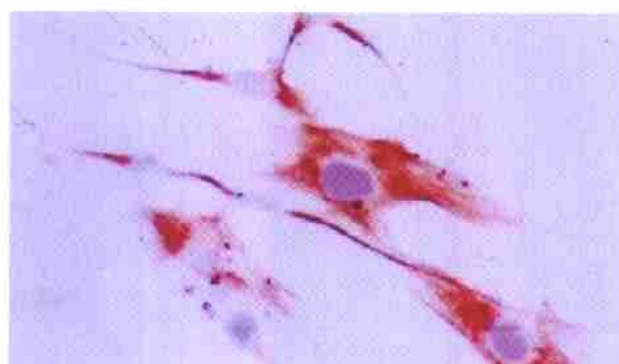


图3 成纤维细胞免疫细胞化学染色(DAB, x100)
Figure 3 Immunocytochemical staining of fibroblast(DAB, x100)



图4 成纤维细胞的染色体(吉母萨, x1 000)
Figure 4 Chromosomes of fibroblast(Giemsa, x1 000)