文章编号:1000-5404(2005)04-0359-02

技术方法

连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用

Preparation of hypoxic surroundings with sodium dihionite for cell culture

许蜀闽,王培勇,马红英　(第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提　要:目的　无氧环境是我们在用细胞进行研究的过程中经常会需要的。利用连二亚硫酸钠清除氧的能力,我们希望得到简便适用的方法制造培养细胞的无氧气、液相环境。**方法**　2 mmol 的连二亚硫酸钠可完全清除溶液里的氧气,我们用血气分析的方法检测连二亚硫酸钠溶液的性质,以及装有连二亚硫酸钠溶液的密闭容器内的气体成分的变化。**结果**　2 mmol 的连二亚硫酸钠溶液可保持无氧状态 1 h 左右,溶液的 pH 值并无变化。含 2 mmol 的连二亚硫酸钠的溶液可消耗密闭容器内的氧气,使容器内的氧含量接近与零。**结论**　连二亚硫酸钠可帮助我们得到简便使用的方法制造培养细胞的无氧气、液相环境。

在进行培养细胞的缺氧实验研究中,如何使细胞迅速处于低氧环境(尤其是无氧环境)是始终困扰着我们的一个问题。无氧气体自动平衡替换细胞所处的气体环境、以及无氧气相与细胞所处的液相环境之间的自动平衡都需要较长时间,如采用调氧式二氧化碳孵箱,不仅价格昂贵,而且每次操作开关箱门后平衡至所需要的低氧浓度的时间长达数小时,不利于实验条件的准确调控。要达到完全无氧则需要更长时间。连二亚硫酸钠是一种氧清除剂,它能迅速清除融入培养基质中的氧,并不会损伤细胞膜。利用它的这一特性,经过多次摸索,我们得到简便适用的方法制造培养细胞的无氧气、液相环境。

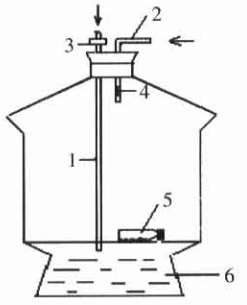
1　主要器材

真空干燥器、真空泵、过滤器(配 0.45 μF 型滤膜,上海新亚净化器件厂),无氧混合气(5%CO_2 + 95%N_2),37 ℃恒温箱,细胞培养用品。连二亚硫酸钠(重庆无机化学试剂厂)、DMEM 培养液。

2　无氧环境的建立方法

2.1　无氧气相环境的制备

该环境设置在真空干燥器内,干燥器配以进气和出气管道。进气管由橡皮软管接混合气体瓶,进入容器的混和无氧气体由 过滤器过滤除菌,过滤器每次使用前均经高压灭菌。出气管的一端接一单向阀,以防外部空气倒流,并有利于温育时容器内与外界大气压平衡,另一端接真空泵。干燥器底部加入含 2 mmol 连二亚硫酸钠的水溶液,该溶液可吸收容器内微量的氧气,此外,通过溶液的蒸发可保持容器内的湿度,见图 1。



1: 进气管; 2: 出气管; 3: 气体过滤器; 4: 单向阀门; 5: 培养的细胞; 6: 2 mmol 连二亚硫酸钠溶液

图 1　缺氧培养装置示意图

使用该装置时先将容器内壁用 75%乙醇擦洗后,把带有细胞的培养瓶或培养板置入;接好通道后启动真空泵,将容器内气体抽出至容器内压力为 200 mmHg,然后通入无氧气体平衡至 760 mmHg,如此抽气-充气反复数次,在实际应用中,若抽气-充气次数≥5,即可使容器内气体浓度接近通入气的浓度[1],残留的氧气由连二亚硫酸钠清除。为了检测清除的效果,我们比较了抽气-充气 5 次刚结束时和平衡 1、3、6 h 后容器内的氧含量,结果见图 2。可见随着时间的延长氧含量逐渐降低达到理想的无氧状态。

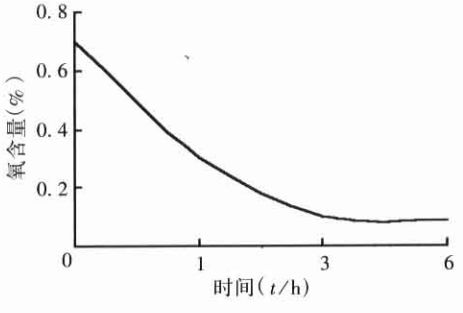


图 2　容器内氧含量变化

基金项目:国家自然科学基金资助面上项目(30300147)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (General Progeram, 30300147)

作者简介:许蜀闽(1972-),女,四川省广安市人,硕士,实验师,主要从事肺动脉高压方面的研究。电话:(023)68752340

收稿日期:2003-11-05;**修回日期**:2004-01-13

2.2 无氧液相环境的制备

我们知道2 mmol浓度的连二亚硫酸钠可以很快清除缓冲液里的氧，使溶液氧含量为零。但是不知道溶液性质是否改变，无氧状态能维持多久。所以我们用DMEM培养液配制2 mmol浓度的连二亚硫酸钠溶液，使溶液处于常氧环境中，分别抽取1、10、30、60、120、240 min后的溶液做血气分析。结果见表1，可见溶液很快达到无氧并可在短时间内保持无氧状态，溶液pH值没有变化。

表1 培养液的血气指标变化

血气指标	时间(min)					
	1	10	30	60	120	240
pH	6.791	6.769	6.751	6.779	6.978	7.068
PCO_2(mmHg)	21.3	21.6	19.6	14.8	9.1	5.4
PO_2(mmHg)	0	0	0	0	40	59

3 讨论

将图1中所示装置放入37 ℃恒温箱内保持容器内温度和气体的恒定，可进行细胞的无氧培养。与缺氧培养箱相比较，我们的方法经济、适用，容器及培养液的氧迅速平衡，实验条件得到控制。为了观察抽气-充气是否对培养的细胞有影响，我们将培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞置于上述装置内，按上述条件反复抽气-充气5次，然后用台盼蓝溶液检查细胞活力，未观察到细胞活力下降。经如此处理过的细胞进一步培养未发现异常变化。因此，该装置可用于细胞、离体器官的缺氧，也可以用于高氧或缺氧-复氧损伤的实验研究。

通过2.2中的实验我们得到短时的无氧液相环境，可用于培养细胞的急性缺氧。这种缺氧方式细胞处于开放的环境中，便于用一些特殊的仪器对细胞作及时的观察。比如用激光共聚焦扫描显微镜，我们可及时观察缺氧时荧光标记好的离子的移动、膜电位的变化等[2]。当然，如果需要更长时间的无氧环境，可持续通入无氧气体，使其封住液体表面即可。可见连二亚硫酸钠的应用对细胞的缺氧研究很有帮助。

关键词：缺氧；细胞培养；连二亚硫酸钠

中图法分类号：R-331 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 王培勇，许蜀闽. 一种简易实用的缺氧培养细胞装置[J]. 第三军医大学学报，1997，19(2)：s88.

[2] 刘 健，何作云，王培勇. 新生大鼠心肌细胞内Ca^{2+}的空间分布及调控的离体研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(7)：806.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)04-0360-01

晚孕穿透性胎盘植入致子宫破裂1例

A case report of placenta percreta with spontaneous rupture of intact uterus in the tertiary trimester

吴晓华，陈 勇，熊光武 (第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038)

患者，32岁，因"间断性右侧腰部疼痛1年，加重1 d，伴尿频尿急，停经29+1周。"诊断以"右输尿管结石"入住本院泌尿外科。患者入院前无外伤史，无阴道流血流液，未诉阵发性下腹痛。无尿痛及肉眼血尿。

入院查体：体温36.9 ℃，脉搏83次/min，呼吸20次/min，血压124/73 mmHg。中度贫血貌；心肺无特殊；右上腹轻压痛，无明显肌紧张及反跳痛；右肾区叩击痛；移动性浊音(-)。

产科情况：宫底脐上2指，无宫缩，有胎动。胎心138次/min。阴道排液。B超提示"右输尿管结石"，胎儿及附属物未见异常。血常规：WBC 8.13×10^9/L，N 0.7831，RBC 3.24×10^{12}/L，Hb 66.2 g/L。尿常规无异常。

予杜冷丁、异博定、青霉素、消炎痛等对症治疗。于次日夜间诉右侧腹痛加重，腹部彩超提示"腹腔少许积液"；复查血常规：WBC 10.8×10^9/L，N 0.899，RBC 2.96×10^{12}/L，Hb 60 g/L。考虑"妊娠合并急性阑尾炎"行急诊手术。术中发现腹腔大量积血，探查子宫约7个月孕大，右侧宫角约12 cm×12 cm×10 cm面积向外突起，紫红色，壁薄，其顶部可见2 cm破口，少量活动性出血。作体部纵切口取出胎儿，新生儿重度窒息，经抢救无效死亡。胎盘不能自剥，行人工剥离至右侧宫角时发现胎盘植入，面积约11 cm×10 cm×3 cm。予切除右侧宫角及植入部分胎盘。清理腹腔积血及血凝块约4 500 ml，输血2 800 ml，血浆1 600 ml，补液5 500 ml，术中生命体征平稳。术后予抗炎、止血等治疗，10 d后痊愈出院。病检报告示"子宫肌壁胎盘植入"。

讨论

子宫破裂是严重的产科并发症，病情危急，多发生于外伤或临产后。而孕中晚期自发性破裂极少见，尤其穿透性胎盘引起的子宫破裂更是罕见。

(下转368页)

作者简介：吴晓华(1973-)，女，重庆市人，硕士研究生，医师，主要从事女性不孕症方面的研究。电话：(023)68754412

收稿日期：2004-09-13；修回日期：2004-12-05