文章编号:1000-5404(2006)13-1363-04

论著

培养细胞牵张损伤装置及测试系统的研制与应用

尹志勇,王正国,蒋建新,杨志焕,周 萍,王克万,麻晓林 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,车辆/生物碰撞安全重庆市重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 为从细胞水平直接观察应力、应变作用后细胞形态和功能的改变,研制计算机控制的培养细胞牵张损伤装置和相应的测试系统。**方法** 应用空气动力学原理,采用微型空气压缩机、电磁阀、压力传感器、程控放大器和模数转换多功能卡研制了体外培养细胞牵张损伤装置,用于实验研究。其致伤参数由计算机精确控制,并采用压力法获取细胞在致伤过程中的应变规律。对培养的新生大鼠大脑皮层星型胶质细胞应用本致伤装置采用不同的条件致伤,检测乳酸脱清酶(LDH)活性和台盼蓝含量,并观察其形态学的改变。**结果** 采用不同的致伤参数可复制出轻、中、重度的细胞损伤模型。**结论** 培养细胞牵张损伤装置及测试系统的各项性能指标均达到设计要求,致伤过程简便、重复性好、结果稳定。新的乳胶膜变形规律检测方法和装置,明显优于国外文献报道的图像处理检测法,满足实验研究的需要。

关键词: 培养细胞; 牵张损伤; 模型
中图法分类号: R-331; R312; R329.2 **文献标识码:** A

Development and application of a device for stretch-induced injury to cultured cell and testing system

YIN Zhi-yong, WANG Zheng-guo, JIANG Jian-xin, YANG Zhi-huan, ZHOU Ping, WANG Ke-wan, MA Xiao-lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing Key Laboratory of Vehicle/Boilogy Crash Worthiness Safety, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To develop a device for stretch-induced injury to cultured cells and measure the injury parameters. It makes possible to observe the changes of cell configuration and function directly after injury. Methods The device was developed based on aero-dynamical principle, and consisted of mini-type air compressor, electromagnetic valve, pressure transmitter, PGA amplifier, A/D converter and computer. The computer can accurately control the injury parameters. A new method and device were first introduced to measure the deformation rate and deformation degree of silastic membrance in the stretch induced cultured cell injury process. The device controlled by the computer was used to cause the astrocyte injury. The degree of cell injury was assessed qualitatively by electron microscopy, and quantitatively by lactate dehydrogenase (LDH) enzyme release and trypan blue staining. Results The experiment results showed that the injury of different levels could be reproduced by our device under the injury parameters we set. Conclusion The injury device and the measuring system meet the requirements of our design. The results suggested that the new device and the method were much better than those reported in foreign literature. It has the advantages of simple and convenient manipulation, high precision and real-time processing. It can be used for the cell-level experiment research.

Key words: culture cell; stretch injury; model

长期以来,许多科技工作者致力于机体损伤机制的研究。为此,建立了多种动物模型,并取得了大量有价值的研究成果。然而在体研究不能排除体内损伤过程中各种复杂因素的作用,也不能区分原发损伤和继发损伤,使观察单因素对某种细胞的影响受到限制。体外培养细胞损伤模型为人们提供了解决这些问题的手段,可获取一些在体研究无法获得的信息[1,2]。近年来不少体外创伤模型的建立,能够在细胞水平直接观察应力、应变作用后细胞形态和功能的改变,对更好地阐明创伤发生机制有重要意义[3]。对致伤参数的测试,国外多采用电荷耦合器件(CCD)及图像处理法以及激光位移检测装置。这些设备存在价格昂贵、测试过程繁琐等问题。本研究在国内率先建立了一种由

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39630330)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(39630330)
作者简介:尹志勇(1963-),男,四川省叙永县人,博士,研究员,主要从事生物医学工程和交通医学方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68757885, E-mail: zyyin@cta.cq.cn
收稿日期:2005-04-14;修回日期:2005-07-15

计算机精确控制的培养细胞牵张损伤模型，并可直接对损伤过程中的致伤物理参数进行测试。

1 材料与方法

1.1 系统实现

1.1.1 系统硬件原理 在细胞牵拉损伤模型中，采用 Ellis 6 孔培养皿，培养皿底部为一乳胶膜，将细胞直接贴壁培养在乳胶膜上，当乳胶膜两侧有压力差存在时，乳胶膜发生牵张变形，在乳胶膜上贴壁生长的细胞因牵张效应而受到损伤，基质的应变可达 0.72。这种模型的优点是培养皿商品化，致伤条件易控制，重复性好[4]。影响细胞损伤的两个主要参数：一是牵张时的最大变形量；二是牵张的速率，即应变率。当细胞受到牵张作用时，其变形量超过一定限度时必然引起细胞的损伤。而当应变率超过一定的范围时，由于细胞来不及变形，也同样会导致细胞的损伤。应变的幅度与施加的压力差有关，而应变率主要取决于所施加的压力上升时间和下降时间。因此，可通过控制压差来获取所需的最大应变量，通过节流阀改变进气孔和排气孔的大小来获取所需的应变率。

1.1.2 系统硬件组成 系统硬件由微机、小型空气压缩机、储气罐、阀门、培养皿、致伤头、压力传感器、放大器、控制器、A/D多功能控制卡等组成。

1.1.3 测试原理 制作一圆柱形测试装置（测试皿），在其底部安装一微压传感器，其上部能与培养皿紧密配合以保持相对的密闭。测试皿的初始容积 V_0（$V_0=\pi R^2H$，R 为半径、H 为高度）、初始压力 P_0（标准大气压力）和初始温度 T_0 为已知量，在弹性膜发生变形后的任一时刻 t，由于弹性膜的变形必然导致测试皿容积发生改变，记测试装置此时的容积为 V(t)、气体温度为 T(t)，由于测试装置的容积发生了改变，因此装置内的气体压力也必然发生相应的改变，记此时测试装置内的压力为 P(t)。根据理想气体的状态方程有以下公式成立：

$$P_0V_0/T_0=P(t)V(t)/T(t) \quad (1)$$

由于在致伤过程中，气体温度几乎没有变化，可近似认为 $T(t)=T_0$，所以有

$$V(t)=V_0P_0/P(t) \quad (2)$$

在整个弹性膜的变形过程中，由于初始参数 P_0V_0 为一已知常量，而 P(t) 可通过压力传感器检测，因此，将压力传感器输出的信号经放大器后送入计算机 A/D 卡，即可记录和计算出在整个乳胶膜的变形过程中，测试装置容积的改变过程。由于所采用的乳胶膜是一各向同性介质，在压力差的作用下其变形规律可看作一球冠（当 $0\leqslant h\leqslant r$ 时），根据球冠表面积计算公式：

$$S_{球冠}=2\pi Rh=2\pi h(r^2+h^2)/2h=\pi(r^2+h^2) \quad (3)$$

式中：$R=(r^2+h^2)/2h$

乳胶膜的应变（%）$=(S_{球冠}-S_0)/S_0=(h/r)2$

式中：S_0 为乳胶膜变形前的初始面积

而球冠所包容的球缺的体积计算公式为

$$V_{球缺}=\pi h^2(R-h/3)=\pi h(h^2+3r^2)/6 \quad (4)$$

在测试系统中，r = 12.5 mm 为已知量，若根据球缺的体积求其高度，须根据（4）式求解一元三次方程，其解析解 h = f(V) 是比较困难的。为此，我们采用计算机求其方程的数值解，在本实验中 h 的取值范围为 $0\leqslant h\leqslant r$。在求出数值解后采用曲线拟合的方法求乳胶膜变形时其高度和变形后球缺体积之间的关系式：

$$h=-3\times10^{-7}\times V_{球缺}^2+4.2\times10^{-3}\times V_{球缺}\ (R^2=1) \quad (5)$$

将上式带入乳胶膜应变的计算公式可得

乳胶膜应变 $=(h/r)^2=(-3\times10^{-7}\times V_{球缺}^2+4.2\times10^{-3}\times V_{球缺})^2/12.52$

$$=2.88\times10^{-15}\times V_{球缺}^4-8.06\times10^{-11}\times V_{球缺}^3+5.64\times10^{-7}\times V_{球缺}^2 \quad (6)$$

由此，可归纳出具体的测试和计算步骤如下：

（1）采集致伤过程中测试皿内压力数据 P(t)。

（2）根据 P(t) 按照（2）式计算测试皿的体积改变 V(t)。

（3）根据 $V_{球缺}=V_0-V(t)$ 求球缺体积的变化规律。

（4）根据乳胶膜应变与 $V_{球缺}$ 之间的关系式（6），直接求解其对应时刻的应变量。根据上述步骤和计算公式，编制相应的计算机软件，从而可得到乳胶膜在整个致伤过程中的应变规律。

1.2 乳胶膜的静态特性测定方法

为了探讨乳胶膜的力学特性，有必要从其静态特性的测试入手。在乳胶膜两侧逐渐施加一压差，检测乳胶膜的变形高度和变形量。

1.3 培养皿乳胶膜的动态特性测定方法

在实际使用中，细胞的牵张损伤不可能在静态情况下实施。因此有必要对其动态特性进行研究，将致伤装置中的流量调节阀均调到最大，分别用不同的驱动压作用，观察膜的最大变形量和最大变形率。

1.3.1 新生大鼠大脑皮层星形胶质细胞的培养及纯化 取出生后 1～2 d 的 Wistar 大鼠（大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供），无菌条件下取脑，置于 D-Hanks 液中，在解剖显微镜下去除脑膜及血管组织，分离大脑皮层。用 0.125% 的胰蛋白酶消化 15 min（37 ℃），用含血清的培养基终止消化。分散细胞后，1 000 r/min 离心 10 min。吹散细胞用培养基稀释先行贴壁处理，以除去纤维细胞。然后以 2×10^6 接种于 75 cm^2 的塑料培养瓶中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。培养基为 DF，10% 新生牛血清。生长 8～10 d 待细胞融合后，置于 37 ℃ 摇床中，250 r/min 离心 14～16 h，用以除去少突胶质细胞和小胶质细胞，然后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代，接种于直径为 35 mm 的 6 孔乳胶膜培养皿中，待细胞融合后进行实验[5]。

1.3.2 培养细胞牵张损伤方法 在致伤前吸除培养皿中的培养液，立即将致伤头置于培养皿上方并与培养皿相联保持相对密封。用计算机控制驱动压力，压缩空气在计算机的作用下经致伤头直接作用于乳胶膜。其方向是从上到下，作用于培养皿后，其受力方向与膜的法线相同，对照组只在同样的环境下吸除培养液。牵张损伤后，立即在每皿中加入 1 ml 无血清 DF 培养液，室温下 15 min 后留取样本用以检测损伤所致的乳酸脱清酶（LDH）的释放量。然后在每皿中加 0.5 ml 0.2% 的台盼蓝染液，室温下染色 15 min，吸除染色液，0.01 mol/L（pH 7.4）PBS 冲洗 2 次，用 0.8% Triton X-100 裂解细胞 10 min，留取细胞裂解液进行台盼蓝定量和蛋白定量。

LDH 的检测方法：

取 75 μl 样本迅速加 30 ℃ 预温的 LDH 检测试剂 1 ml，立

即用 Beckman DU- 640 分光光度计在 340 nm 处连续监测 A_{340} $D(340)$值的变化。测量间隔时间为 5 s，温度 25 ℃，连续测量 50 次，根据下式得出 LDH 的活性。

$$LDH(U/L)=\frac{\Delta A/MIN}{\varepsilon}\times\frac{V_t}{V_s}\times 1\,000 \qquad (7)$$

式中 V_t为总体积，V_s为样本体积，ε 为 NADH 在 340 nm 处的毫摩尔吸光系数(=6.3)。损伤所致 LDH 的释放量以上清液中的含量/总量(上清量 + 细胞裂解液量)的百分率表示[6-8]。

台盼蓝的定量检测：

去细胞裂解液 250 μl 加入 96 孔酶标板中，用 Rainbow (Austria)全自动酶标仪以双波长检测每孔的光密度值(D 值)，同时每份样本用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 10.0 进行 t 检验。

2　结果

2.1　乳胶膜的静态特性和动态特性的测定结果

多次测量不同驱动压下乳胶膜变形量，统计其均值和方差，采用多种曲线拟合方式进行分析，筛选出最佳拟合方式。

乳胶膜变形高度与压差之间的关系(静态)为：

$$H=0.5613P_0 \quad (R^2=0.9917) \qquad (8)$$

乳胶膜变形量与压差之间的关系(静态)为：

$$S=0.3518P_0 1.8065 \quad (R^2=0.9953) \qquad (9)$$

乳胶膜变形高度与驱动压之间的关系(动态)为：

$$H=0.0845P-0.662 \quad (R^2=0.9878) \qquad (10)$$

乳胶膜变形量与驱动压之间的关系(动态)为：

$$S=0.0071P^2-0.755P+35.001 \quad (R^2=0.9976) \qquad (11)$$

2.2　形态学观察结果

细胞损伤后，融合的星形细胞间出现间歇，随着牵拉时应变量的增加，细胞间空隙也随之而增大，当(P = 250 kPa)以上时，培养皿中心几乎无融合细胞，但细胞仍附着于乳胶膜培养皿上并不脱落。在损伤最重的中心部位，也无明显的活细胞，遗留的少量细胞明显肿胀变性。

扫描电镜观察：生长已融合的未牵张损伤的细胞间连接紧密，间隙很小。当用 50 kPa 驱动压力进行牵张损伤时，细胞结构即有明显的破坏，表现为细胞间隙增宽，部分胞体和突起被撕裂。当以 250 kPa 牵张损伤是，绝大部分细胞被损伤，胞体和突起明显断裂，细胞间几乎没有连接存在。

透射电镜观察：培养细胞绝大多数为星形细胞。正常星形细胞结构完整，部分尚可见到细胞见正常连接，有大量微丝、微管。牵张损伤后的细胞表现为胞体致密、细胞器减少、线粒体致密、嵴减少。微丝、微管明显减少。

2.3　不同损伤程度下的 LDH 和台盼蓝值

从表 1 可见，25 kPa 的驱动压力即可造成细胞损伤，LDH 的释放和正常对照比较差异显著($P<0.01$)。随着驱动压力的增高，LDH 释放逐渐增高，当驱动压力达到 250 kPa 以上时，则不再明显升高，300 kPa 组与 250 kPa 组比较无显著性差异($P>0.05$)。曲线拟合的结果显示，当驱动压在 25 ~ 250 kPa 的范围内时，细胞损伤后 LDH 释放量和台盼蓝含量(TPB)与驱动压之间是一线形关系：

$$LDH(\%)=0.1203P_0+12.782 \quad (R^2=0.9751) \qquad (12)$$

$$TPB=0.0087P_0+0.9513 \quad (R^2=0.9916) \qquad (13)$$

上述结果表明，通过控制驱动压力可以调控损伤程度。台盼蓝定量显示结果与 LDH 结果一致，随驱动压力的增加，A/蛋白(mg)值增大，LDH 和台盼蓝检测的结果明显相关。

表 1　细胞在不同程度的牵张损伤下的乳酸脱清酶和台盼蓝值

压差(kPa)	乳酸脱氢酶(%，$\bar{x}\pm s$)	台盼蓝 (A/mg)
对照组	9.41 ±1.79	0.89 ±0.14
25	17.09 ±1.17[a]	1.17 ±0.16[a]
50	20.73 ±1.59[a]	1.37 ±0.14[a]
100	25.88 ±1.73[a]	1.89 ±0.14[a]
150	29.42 ±3.09[a]	2.28 ±0.19[a]
200	37.35 ±2.17[a]	2.63 ±0.11[a]
250	45.14 ±1.87[a]	3.27 ±0.21[a]
300	46.52 ±1.17[a]	3.42 ±0.13[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较

3　讨论

本研究在国内率先建立了体外培养细胞牵张模型和致伤参数测试系统。牵张损伤装置通过微机对致伤参数进行控制，可精确控制驱动压力，实时采集信号，具有操作简便、重复性好、结果稳定等优点。乳胶膜最大应变和致伤过程中应变率变化规律是非常重要的致伤指标。国外多采用 CCD 摄像和后期图像处理的方法或采用激光位移测试设备检测膜变形时高度的改变，再计算乳胶膜的应变。摄像法存在诸多缺点：其一是非实时测量，在致伤过程完成后，须将录制下的图像逐帧分析，工作量极大；其次由于电视摄像每两帧图像之间的时间间隔长达 33.3 ms(NTSC 制式，若为 PAL 制式则为 40 ms)，而通常膜的变形速度很快，因此这种测量方法很难准确地检测到膜变形的最大值。且操作和分析过程繁琐、对设备的要求也较高。如果需检测乳胶膜在整个变形过程中的变化规律，其工作量将成倍增长；由于普通电视图像在垂直方向上只有 480 线，因此其测量误差也不容忽视。此外，由于商品化的乳胶膜培养皿，其乳胶膜并非位于培养皿低部，距离培养皿底部大约 4 mm，因此当膜变形的高度小于 4 mm 时，采用电视摄像法无法记录乳胶膜的牵张过程。采用激光位移测试设备的方法较科学，但设备成本太高，在国内的应用受到限制。本研究建立的方法可连续记录乳胶膜变形过程。乳胶膜变形记录的精度由模数转换(A/D)的分辨率和采样频率及压力传感器的频率响应确定。在本测试系统中，采用 12Bit 100 kHz A/D，压力传感器的使用频率达 5 kHz。因此，本系统对乳胶膜应变和应变率的测试精度远高于国外的图像处理法。在空间分辨率和时间分辨率上其测试精度比国

外的图像处理法高一个数量级。且计算机控制的致伤过程完成后便可得到乳胶膜在整个致伤过程中的应变规律，是一种实时的测量方法。致伤过程完成后可直接对乳胶膜的变形情况进行分析，也可将数据保存到磁盘上。与国外文献中的检测方法相比较，具有操作方便、快捷、测试精度高等特点。

参考文献：

[1] ELLIS E F, McKINNEY J S, WILLOUGHBY K A, *et al*. A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(3): 325-339.

[2] PETRAS J M, BAUMAN R A, ELSAYED N M. Visual system degeneration induced by blast overpressure[J]. Toxicology, 1997, 121(1): 41-49.

[3] AHMED S M, RZIGALINSKI B A, WILLOUGHBY K A, *et al*. Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons[J]. J Neurochem, 2000, 74(5): 1951-1960.

[4] 廖克龙，朱佩芳，王正国，等. 培养大鼠肺泡巨噬细胞牵张损伤模型的建立[J]. 创伤外科杂志，2002，14(5)：317-318.

[5] 王克万，漆松涛，杨志焕，等. 培养大鼠星形胶质细胞牵张损伤后超微结构的变化[J]. 第一军医大学学报，2002，22(8)：687-690.

[6] 赵梅兰，曹晓哲，王德文. 电磁脉冲对培养大鼠大脑皮层神经元细胞内和培养上清LDH及培养上清CHK、K^+、Na^+浓度的影响[J]. 西北国防医学杂志，2003，24(1)：10-12.

[7] MUKHIN A G, IVANOVA S A, KNOBLACH S M, *et al*. New *in vitro* model of traumatic neuronal injury: evaluation of secondary injury and glutamate receptor-mediated neurotoxicity[J]. J Neurotrauma, 1997, 14(9): 651-663.

[8] 安乙敏. 生化检验学[M]. 成都：四川科学技术出版社，1990：162-168.

（编辑 栾 嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)13-1366-01

还原型谷胱甘肽对硝酸甘油耐受性的抑制效应

徐中林，赵义发，吴兰兰 （重庆市第九人民医院心血管内科，重庆 400700）

硝酸甘油一直是被用于治疗高血压的常用药物之一。然而，其长期疗效受到产生快速耐受性的限制。硝酸甘油耐受性产生的机制目前仍不十分明确，但越来越多的研究表明硝酸甘油治疗过程中氧自由基产生明显增加，而这些过氧化物在硝酸甘油的耐受中起了关键作用[1]。本实验的目的是研究抗氧化剂是否对这一过程有抑制效应，以寻求临床解决硝酸甘油耐受的新途径。

1 对象与方法

1.1 试验对象

我院2003年1月至2004年10月住院的按WHO/ISH标准确诊的高血压患者58例，其中男性31例，女性27例，年龄35-74岁，平均(57±12.2)岁。入院时卧位平均收缩压(210±16.2) mmHg，舒张压(102±14.7) mmHg，平均血压(舒张压+1/3脉压差)(151±15.3) mmHg。

1.2 试验方法

58例患者分为两组，各29例，两组间年龄、性别及入院时平均血压等均无统计学差异。两组均在入院后立即给予持续静脉泵入硝酸甘油($1\ \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$)共96 h。对照组(A组)仅给予硝酸甘油治疗，试验组(B组)在硝酸甘油的基础上另外给予每日静脉滴注还原型谷胱甘肽(阿托莫兰，重庆药友制药)1.2 g。每组均每4小时监测卧位平均血压，取6次的平均值作为当日血压。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x} \pm s$表示，应用SPSS 10.0软件进行统计处理。组间差异应用成组设计样本均数的t检验。

2 结果

58例患者共54例完成试验(A组26例，B组28例)，另4例中3例因不能耐受硝酸甘油的副反应而退出试验，1例于入院4 h死于急性左心衰。96 h内两组患者平均血压变化见表1。

表1 两组患者96 h的平均血压变化（mmHg）

组别	例数	治疗前	治疗后(d)			
			1	2	3	4
A组	26	150±13.5	105±12.6	107±13.7	125±14.1	129±12.4
B组	28	151±13.1	103±13.8	105±14.0	110±12.5[a]	114±10.9[a]

a：$P<0.05$，与A组比较

B组与A组比较，在连续使用硝酸甘油的前48 h两组的降压效应基本相似，48 h后B组的降压效应明显强于A组($P<0.05$)，提示在连续使用硝酸甘油的过程中，随治疗时间的延长，由于耐受性的形成使硝酸甘油的治疗效应下降，而抗氧化剂还原型谷胱甘肽则能抑制耐受性的产生。

3 讨论

关于硝酸甘油的耐受性问题在20世纪初就已经被认识到，但并没有引起太多的重视。正是硝酸甘油的耐受性限制了其治疗效应，直到近10年来才引起众多的临床及科研工作者的重视，并进行了一系列有关硝酸甘油耐受性的研究。目前硝酸酯耐受性的确切机制仍不明确，可能涉及到多个独立的机

（下转1373页）

作者简介：徐中林(1973-)，男，重庆市人，硕士，主治医师，主要从事高血压、心衰等方面的研究。电话：(023)68219140

收稿日期：2005-06-07；修回日期：2005-09-05