文章编号:1000-5404(2007)13-1289-04

论著

多功能医学实验平台的研制及在体外细胞温度效应观察中的初步应用

王贵波[1,2],王晓芹[3],罗高兴[1,2],贺伟峰[1,2],陈希炜[1,2],吴 军[1,2],卞修武[4] (第三军医大学:[1]西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]西南医院重庆市疾病蛋白质组学重点实验室,[3]基础医学部药理学教研室,[4]西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研制一种多功能医学实验平台。**方法** 选用氧气、二氧化碳、湿度、温度传感器、控制器及效应器构建多功能医学实验平台并用于293细胞、PK15细胞受温度效应影响的试验。**结果** 该多功能医学实验平台可对温度、湿度、氧气浓度和二氧化碳浓度进行调节和控制,温度调控范围-20~+60 ℃,二氧化碳浓度调控范围0%~20%,氧气浓度调控范围0%~100%;湿度调控范围室温湿度至98%。采用该实验平台观察不同温度对293细胞、PK15细胞影响时发现,在10 ℃和20 ℃时,细胞出现胞体皱缩、突起变长等特征,细胞停止增殖。**结论** 该多功能医学实验平台可调节温度、湿度、氧气浓度和二氧化碳浓度,可用于细胞低温保存等移植相关实验。

关键词: 移植;多功能医学实验平台;细胞低温保存
中图法分类号: R197.39; R329.24; R363.123 **文献标识码:** A

Design of a multifunction medical experiment platform and its temperature regulation in cell *in vitro* culture

WANG Gui-bo[1,2], WANG Xiao-qin[3], LUO Gao-xing[1,2], HE Wei-feng[1,2], CHEN Xi-wei[1,2], WU Jun[1,2], BIAN Xiu-wu[4] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [2]Chongqing Key Laboratory for Proteomics of Diseases, [4]Institute of Pathology, Southwest Hospital, [3]Department of Pharmacology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To design a multifunction platform for medical experiments. Methods Sensors and controllers of temperature, humidity, oxygen and carbon dioxide concentration were used to make the platform for medical experiments. The relative criteria of this machine were tested. The cell lines 293 and PK15 were used to test the potential usage of the platform. Results The temperature, humidity, oxygen concentration, carbon dioxide concentration in this medical experimental platform were well controlled. The range of temperature control was from -20 to +60 ℃, the range of carbon dioxide concentration control from 0% to 20%, the range of oxygen concentration control from 0% to 100%. The range of humidity control was from the humidity at room temperature to 98%. The morphological changes of 293 and PK15 cell lines could be found when temperature went down as designed. Conclusion The temperature, oxygen concentration, carbon dioxide concentration and humidity of storage chamber can be intellectually controlled. This apparatus can be used for graft storage-related test.

Key words: graft; preservation; apparatus

在器官保存相关研究中,不同条件下(尤其是温度条件)的器官保存效果无疑是不一样的[1]。研究表明,器官氧耗量的下降与保存温度之间呈指数关系,在30 ℃时约降至正常的40%,20 ℃时降至15%,10 ℃时降至5%[2]。另外,从器官保存的基础研究上考虑,不同种类的细胞在不同温度下其代谢率有何区别、细胞形态有何变化均需要进行深入的探讨[3];不同配方的保存液对离体细胞的保存效果研究也需要稳定的实验条件,但目前为止并没有一个实验设备可稳定地调节多种实验参数(如温度、湿度、氧气浓度和二氧化碳浓度)并用于离体器官保存相关研究。本课题旨在研制一个多功能实验平台,控制实验平台内温度、湿度、氧浓度和二氧化碳浓度,并进行初步试用。

基金项目: 重庆市市级重点实验室专项基金(2004);中国博士后科学基金(2005037166);重庆市发改委重大产业化前期关键性技术开发项目(2004)
Supported by the Key Plan of Proteom of Chongqing (2004), the Funds for Postdoctoral Researchers of China (2005037166) and the Key Foundation of New Technology Conversion of Development and Reformation Committee of Chongqing (2004)

作者简介: 王贵波(1969-),男,安徽省涡阳县人,博士,主治医师,主要从事器官保存及移植免疫方面的研究。电话:13212424869, E-mail:wgbwsh@163.com
通讯作者: 吴 军,电话:(023)68754006
卞修武,电话:(023)68752247

收稿日期: 2006-06-05;**修回日期:** 2006-09-18

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

320 W 万胜压缩机(郑州三力制冷设备工程有限公司),1.7 MHz 超声雾化器(宁波市鄞州塘溪洪达电器配件厂),PT100 温度传感器、ST100 湿度传感器、温度智能显示调节仪、氧气浓度显示调节仪、湿度智能显示调节仪、二氧化碳浓度显示调节仪(浙江余姚温度仪表厂),PTB1810 氧气浓度传感器、IP50 二氧化碳浓度传感器(瑞典 SenseAir),氧气、氮气、二氧化碳(重庆三峡医用气体厂)。DP70 日本 Olympus 图像采集系统,DMEM 细胞培养基(美国 GIBCO BRL),四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma),293 细胞、PK15 细胞(美国 ATCC)。

1.2 主要参数控制原理

采用反馈控制原理作图 1 和表 1。

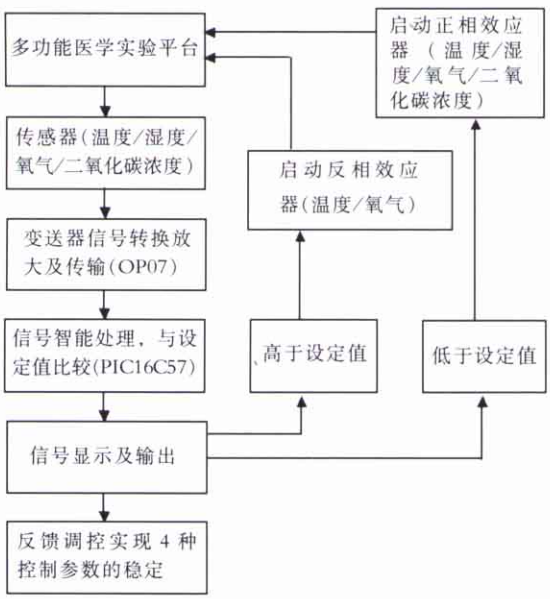


图 1 仪器参数控制原理

表 1 参数控制相关仪器构件

参数	传感器	正相效应器	反相效应器
温度	铂电阻	加热电阻	压缩机制冷
湿度	湿度双相传感器	超声雾化器	…
氧浓度	电化学氧气传感器	电磁阀(氧气)	电磁阀(氮气)
二氧化碳浓度	红外二氧化碳传感器	电磁阀(二氧化碳)	…

1.3 制作方法

将压缩机、蒸发器和降温电扇固定在角钢上,将发泡剂倒入冷冻箱和箱体之间的空间作隔热层。检查整个制冷系统无泄漏后加入制冷剂,在冷冻室和实验箱气套层之间的上下部各开一 10 cm × 10 cm 大小的通道,下部通道中间安装同样口径的直流风扇,风向为自冷冻室吹向实验箱与整个箱体之间的隔层,气体经过上部通道回流完成循环。在实验箱底部将电阻丝在绝缘柱上固定,电阻丝一边安装 15 W 同步交流电扇,风向对准电阻丝。控制箱的面板上安装 1 个电流表、1 个电压表和 6 个显示仪表,同时设稳压指示灯、欠压指示灯。另外,设控制手动开关及指示灯各 8 个,分别控制电源、压缩机、氧气电磁阀、氮气电磁阀、二氧化碳电磁阀、降温风扇、加热电阻丝、超声波加湿器。控制箱内部安装电源稳压电路、控制电路、效应器传导元件(交流接触器、时间继电器、气体控制电磁阀等),温度、湿度、氧气和二氧化碳浓度传感器均安装在实验箱箱体的后壁。实验箱体前门开两个 20 cm × 25 cm 的观察窗口,用于观察实验箱体内的情况,观察窗采用双层 8 mm 玻璃隔热。

1.4 仪器参数标定与精度确定

以冰水混合物为 0 ℃标准进行温度标定,以水为 100 % 标准进行湿度标定,以空气氧浓度为 21% 、纯氧为 100% 进行氧气浓度标定,以空气二氧化碳浓度为 0% 进行二氧化碳浓度标定。

1.5 仪器初步应用及监测

1.5.1 低温状态下细胞的形态学观察及细胞活力检测 实验平台设定氧浓度为 21% 、二氧化碳浓度为 5% ,温度分别分次设为 10、20、30、37 ℃,实验对象为 PK15 细胞、293 细胞,进行低温状态下细胞形态学观察:将密度为 5×10^4/ml 的细胞液 10 ml 加入 200 ml 培养瓶,培养 24 h 待细胞完全贴壁后放入参数设定好的实验平台内,48 h 后取出观察细胞形态。MTT 法计细胞增殖活力:将 PK15 细胞和 293 细胞调整至 5×10^4/ml,取 96 孔板,选 12 个孔,每种细胞分别 6 孔,每孔加入 100 μl 稀释好的细胞混悬液,待移植器官保存实验平台内放置 48 h,每孔加 10 mg/ml 四甲基偶氮唑盐(MTT) 10 μl,孵育 4 h 后每孔加二甲亚砜 100 μl,混匀放置 1 h,轻轻振摇 10 min,使结晶物溶解,在酶标仪上测定 560 nm 的值[$D(560)$]。

1.5.2 仪器控制指标观察 观察仪器运行及参数控制情况。

1.6 统计学分析

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计程序进行组间方差分析。

2 结果

2.1 仪器外观与功能

该仪器由实验箱、冷冻箱、控制箱、实验平台支架等组成。具有开机自检、参数设定、超限报警、超温保护、参数控制(温度、湿度、氧气浓度、二氧化碳浓度)等功能(图 2)。



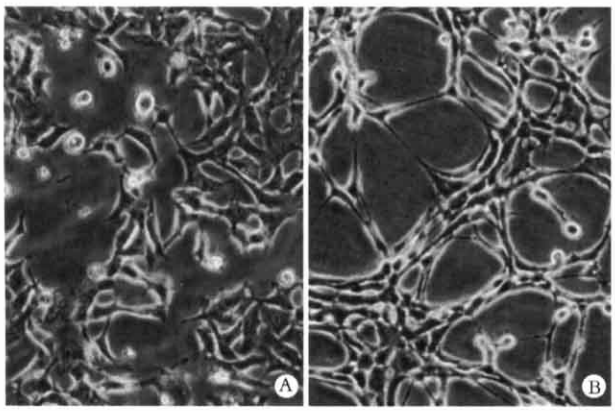
图 2 实验平台整体外观

2.2　仪器主要技术指标

温控范围 -20 ℃ ~ +60 ℃，控制偏差 ±0.2 ℃；二氧化碳浓度测量控制范围 0% ~20%，控制偏差 ±0.2%；氧气浓度控制范围 0% ~100%，控制偏差 ±0.2%；湿度控制范围室温湿度至 98%，控制偏差 ±0.5%。

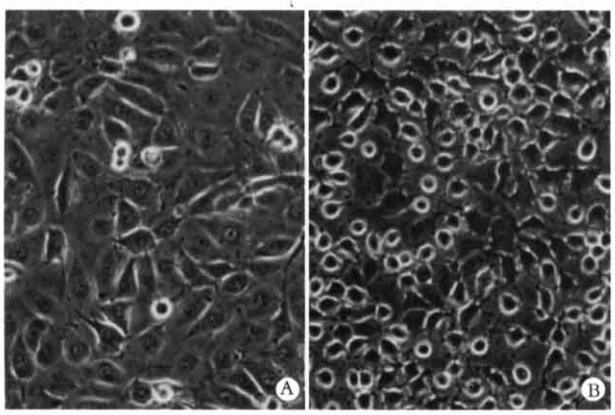
2.3　低温状态下器官保存相关实验结果

2.3.1　细胞低温状态下形态学观察结果　　正常 PK15 细胞、293 细胞胞体饱满、细胞贴壁良好，培养 48 h 后细胞密度显著增加。低温保存时，两种细胞均出现胞体皱缩、细胞体积缩小、细胞突起增加，温度越低，细胞变形越显著。见图 3、4。



A：37 ℃组；B：10 ℃组

图 3　293 细胞形态观察　（倒置显微镜 ×200）



A：37 ℃组；B：10 ℃组

图 4　PK15 细胞形态观察　（倒置显微镜 ×200）

2.3.2　低温状态细胞增殖活力测定结果　　低温条件下 293 细胞和 PK15 细胞增殖活力显著小于 37℃ 对照组（$P<0.01$），见表 2。

表 2　温度对细胞增殖活力影响[$D(560)$，$n=6$，$\bar{x}\pm s$]

细胞株	10 ℃	20 ℃	30 ℃	37 ℃
293	0.227 ±0.014[a]	0.223 ±0.014[a]	0.229 ±0.010[a]	0.361 ±0.021
PK15	0.206 ±0.010[a]	0.213 ±0.011[a]	0.215 ±0.010[a]	0.331 ±0.017

a：$P<0.01$，与 37 ℃组比较

2.3.3　仪器运行及控制观察结果　　实验平台运行情况稳定、温度参数（10、20、30、37 ℃）及二氧化碳浓度（5%）控制良好。

3　讨论

生物体本身是一个复杂而精确的调节系统，多变的环境条件需要生物体不断作出迅速而完善的调节，使之适应外界的变化，同时保持生物体内环境的稳定。在体器官就是处于这样一个稳定的内环境中[4,5]。基于机器灌注维持离体脏器的存活模式显然必须给离体器官提供稳定的生存环境[6,7]，现代控制系统就为生理条件的模拟提供了技术支持，如同生物体控制系统的核心（反射弧）由感受器、传入神经、神经中枢、传出神经、效应器组成一样，现代控制单元由传感器、变送器、显示调节器、执行器组成。

传感器是医学测量仪器的第一个环节，也是医学仪器与生物体直接耦合的关键环节，其选型和使用是仪器制作成功的关键。本实验中采用的热电阻温度传感器稳定性好，测温精度高，较热电偶输出灵敏度也高，适宜于高精度的温度测量控制系统。双铂电阻温差型湿度传感器是唯一可以与二次仪表共同进行精确度验收的传感器，其原理是在同一环境下，温湿的高低取决于蒸发量的大小，而蒸发量的大小又主要受环境空气湿度影响，故同时测出干湿值和温湿值就可以计算出湿度值，控制精度可达到 0.5%。氧气传感器采用的是电化学氧气传感器，传感器内部采用的弱酸性电解质使得氧气的测量应用范围更为广泛，能够应用于 CO_2、CO、H_2S、N_2、Ar、H_2、CH_4 等背景气体中的氧气含量测量，并且腐蚀性很强的气体如 Cl_2、SO_2、NH_3、HCl 对氧气的测量影响也非常的小。本实验中采用的氧气传感器测量范围为 0% ~100%，配以高性能的微处理器，使氧气浓度的测量更为可靠稳定。本实验中采用的红外线二氧化碳传感器通过散射或流过方式测量二氧化碳浓度，不受湿度变化的影响，准确度远远高于热传导传感器，寿命也较之长 4 ~5 倍。为了能对相应参数进行自动控制，就必须由中间继电器、可控硅、电磁阀等执行器执行对负载的调控，使自传感器起的整个系统闭环，最终完成稳定优质的自动化测量和控制使命。其中温度控制部分采用的是压缩机制冷、风冷式降温结合镍镉合金电阻丝加热方式，二氧化碳浓度和氧气浓度的控制则是采用配气式，通过电磁阀的通断控制气体的加入，湿度控制采用超声波雾化器，其原理是通过雾化片的高频谐振将水抛离水面进行雾化，产生自然运动的水微粒子，增加实验箱内的湿度。

该实验平台的目的就是用于器官保存相关实验。首先我们设计了低温保存离体细胞的形态学观察实验，先将培养细胞传代，待细胞贴壁后放入实验平台，然后观察不同温度下细胞形态变化。通过观察我们发

现，低温条件下，细胞形态发生较大的变化，表现为细胞皱缩、细胞体变瘦长。观察结果还提示，即使在只下降7 ℃的情况下，细胞的形态变化依然很大。有研究认为，细胞的钠钾泵在20 ℃以下才失去作用，导致细胞水肿[8]，这显然和我们的发现有所矛盾，虽然不排除离体细胞和在体细胞对同一实验条件出现不同的变化，然而这一观察结果具有继续深入研究的价值。细胞增殖活力实验结果表明，低温条件下细胞不发生增殖，与预想结果一致，既验证了我们对实验结果的预想，又有新的发现。

除进行不同条件下器官中某一种离体细胞的专门研究外（内皮细胞在不同低温温度下的生物特性研究及在器官保存中的作用等），在该实验平台上可进行整体器官的保存实验，如某一保存液在不同温度下的器官保存效果实验，在平台内应用灌注泵还能进行器官灌注保存实验。调节不同氧浓度可进行定量的缺氧实验，如细胞缺氧实验及小动物的缺氧实验。目前作为缺氧实验箱，我校多家单位已利用本实验平台进行了实验研究。

此外，在该仪器上能实现高温高氧、低温低氧等多种实验环境。通过对整个实验过程的观察，我们可以认为：该仪器能保持实验条件的稳定，适用于多种条件下的医学实验。依据该仪器原理本院与重庆市机电设计研究院联合研制成功温湿控制三气生物医学实验箱并推向市场。该仪器采用触摸屏控制，可记录实验条件并进行程序化控制。

参考文献：

[1] Osaki S, Ishino K, Kotani Y, *et al*. Preservation of non-heart-beating cardiac donor using isolated myocardal perfusion: The importance of initial controlled reperfusion[J]. J Heart Lung Transplant, 2005, 24(2): S154.

[2] Tomasoni S, Benigni A. Gene therapy: how to target the kidney. Promises and pitfalls[J]. Curr Gene Ther, 2004, 4(1): 115-122.

[3] 张世昌，王英杰，陈 志，等. 28 ℃条件下短期培养新生广西巴马小型猪肝细胞的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(8)：707-709.

[4] Rega F R, Neyrinck A P, Verleden G M, *et al*. How long can we preserve the pulmonary graft inside the nonheart-beating donor? [J]. Ann Thorac Surg, 2004, 77(2): 438-444.

[5] Jindal R M, Joseph J T, Morris M C, *et al*. Noncompliance after kidney transplantation: a systematic review[J]. Transplant Proc, 2003, 35(8): 2868-2872.

[6] Kogan A, Sahar G, Orlov B, *et al*. Organ transplantation statistics in different countries: internet review[J]. Transplant Proc, 2003, 35(2): 641-642.

[7] St-Peter S D, Imber C J, Friend P J. Liver and kidney preservation by perfusion[J]. Lancet, 2003, 359(9306): 604-613.

[8] Koike N, Takeyoshi I, Ohki S, *et al*. The effect of short-term coronary perfusion using a perfusion apparatus on canine heart transplantation from non-heart-beating donors[J]. J Heart Lung Transplant, 2003, 22(7): 810-817.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)13-1292-01

妊娠合并急性肝功能衰竭1例

王 琳，常 青，陈 域 （第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038）

1 临床资料

孕妇33岁，孕3产1，因孕36^{+4}周，全身皮肤伴巩膜黄染4 d，下腹阵痛1 h，于2007年1月17日由外院转入我院。末次月经：2006年5月3日，预产期：2007年2月10日。入院查体：生命体征平稳，全身皮肤及巩膜重度黄染，右大腿见直径2 cm的大淤斑，双下肢水肿。宫高30 cm，腹围92 cm，先露头，腹部扪及规律宫缩，胎心136次/min。急查肝功：谷丙转氨酶（ALT）：64 IU/L，谷草转氨酶（AST）120 IU/L，谷氨酰转酞酶（GGT）160 IU/L。总蛋白（TP）58.2 g/L，白蛋白（ALB）28.6 g/L，白球比值（A/G）0.97，总胆红素（TBIL）232.2 μmol/L，直接胆红素（DBIL）133.0 μmol/L，间接胆红素99.20 μmol/L。总胆汁酸（TBA）119.5 μmol/L，碱性磷酸酶（ALP）725 IU/L，甘胆酸＞4 000.0 μg/dl。血甲、乙、丙、丁、戊肝抗体均阴性。EB病毒抗体阳性。血常规：WBC 26.39×10^9/L，NEUT 77.94%，HGB 87.2 g/L，PLT 62×10^9/L。凝血3项：PT 25.3 s，APTT 74.8 s，Fib 1.56 g/L。B超检查：宫内单活胎，部分型前置胎盘，肝实质回声密集，胆囊壁毛糙，胆道无扩张。入院诊断：急性肝功能衰竭，妊娠合并肝内胆汁淤积症，前置胎盘。入院4 h后出现胎心频繁晚期减速，阴道大量流血500 ml。急行剖宫产，腹水约1 000 ml，子宫及羊水黄染，取出一男活胎，体质量2 950 g，1 min评10分。术中胎盘剥离面活跃出血，考虑患者有凝血功能障碍，行子宫次全切除术，术中冲洗腹腔，安放引流管，术后转入

（下转1304页）

作者简介：王 琳（1964-），女，四川省巴中市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事高危妊娠方面的研究。电话：（023）68765399，E-mail：drwangl@yahoo.com.cn

收稿日期：2007-03-20；修回日期：2007-04-23