维普资讯 http://www.cqvip.com

中国局解手术学杂志 2001年第10卷第4期
Chin J Regional Anat & Operative Surg,2001,Vol. 10,No.4

成年大鼠心脏成纤维细胞的分离培养

严 俊* 高钰琪* 谢增柱*

【摘 要】**目的** 建立成年大鼠心脏成纤维细胞的离体培养模型。**方法** 以组织块消化法分离细胞，以差数贴壁法去除其它细胞，常规培养、传代，免疫组化染色进行细胞鉴定并绘制生长曲线观察细胞传代后成纤维细胞的基本特征及生长特性的变化。**结果** 第2～4代细胞生长良好、稳定，波形蛋白染色阳性，VIII因子相关抗原及肌动蛋白染色阴性。**结论** 组织块消化法是一种适用于成年大鼠心脏成纤维细胞分离培养的简便方法，第2～4代细胞适于实验。

【关键词】心脏成纤维细胞；细胞培养；大鼠

Culture and observation of cardiac fibroblasts from adult rats *Yan Jun, Gao Yuqi, Xie Zengzhu (Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)*

【**Abstract**】**Objective** To establish a model of culture cardiac fibroblasts(CFs) from Wistar adult rat ventricule of in vitro and observe the growth properties of CFs in vitro. **Methods** Ventricular tissue was minced into small pieces and then subjected to digestion. Dispersed cells were plated onto tissue culture dishes and incubated for 0.5 h at 37℃ under 5% CO_2. At the end of this period, the unattached cells were discarded, and attached cells(CFs) were cultured coutinaously. The fibroblastic nature of cell lines was determined by immunohistochemical methed and cell growth curve was plotted. **Results** Immunocytochemical staining showed that the cells in culture at passage two~ passage four were stained positive for vimentin and negative for muscle actin and factor Ⅷ. And the cells in culture at passage two~passage four also displayed stable growth feature.**Conclusion** This technique is suitable for culturing cardiac fibroblasts of adult rat and the 2nd~4th passage of culture is suitable for experimental work.

【**Key words**】Cardiac fibroblast; Cell culture; Rat

体外培养的心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)是研究心肌纤维化相关因素的作用及机制的重要材料。新生大鼠CFs的离体培养模型已被广泛应用，而关于成年大鼠CFs的分离培养及生长特点国内尚未见报道。CFs是具有一定分化能力的细胞，不同种属和不同发育阶段来源的细胞其表型不尽相同[1]。在利用离体(in vitro)模型的实验结果说明在体(in vivo)情况的问题时应使离体模型尽可能与在体情况相似，因此有必要根据不同的问题对离体模型有所选择。我室在成年Wistar大鼠慢性缺氧的模型上观察到心肌纤维化的组织和生化改变，为进一步研究在此过程中参与调节CFs功能的因素及机制，我们参考一些国外学者的方法[2,3]分离培养了成年Wistar大鼠CFs，并对其生长特性进行了初步的观察。

一、材料和方法

1．主要试剂及器材

胶原酶(IV型，Sigma)，胰蛋白酶(1:250，Sigma)，DMEM(Hyclone)，新生小牛血清(Hyclone)，兔抗人VIII因子相关抗原多克隆抗体及鼠抗人肌动蛋白单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司)，免疫组化染色SP试剂盒(北京中山生物技术有限公司)，小鼠抗波形蛋白(vimentin)单克隆抗体及免疫组化染色SABC-AP试剂盒(武汉博士得生物工程有限公司)，培养皿(Costar)。

2．分离培养方法

雄性Wistar大鼠(200 ± 10)g麻醉、抗凝，无菌条件下手术开胸取心脏。经PBS冲洗后，分离去除心房和大血管，将心室剪碎，于恒温水浴振荡器中37℃振摇消化(150次/分，消化液为含0.1%胰酶和0.1%胶原酶的DMEM)10分钟，吸取收集消化所得的细胞悬液，另加消化液再次消化，如此重复7～8次，消化过程中可取少许悬液镜下观察消化效果。首次消化所得的细胞悬液因混杂较多的红细胞而弃去，以后的细胞悬液收集至离心管，加入等量的

* 作者单位：400038 重庆市第三军医大学高原军事医学系高原医学研究室病理生理教研室

维普资讯 http://www.cqvip.com

DMEM（含20%新生小牛血清），离心（1000rpm，10min）、去上清、360目不锈钢筛网过滤，再次离心、去上清，加入20%小牛血清DMEM吹打成悬液、接种（一般接种至两个6孔培养板），于CO_2孵箱中37℃、5% CO_2、95%湿度孵育30分钟后PBS轻柔冲洗、换液，以后每2天换液1次。常规培养、传代。

3．细胞鉴定

取第2、4代的细胞分别作肌细胞肌动蛋白（鼠抗人肌动蛋白单克隆抗体为抗心肌和平滑肌细胞肌动蛋白的抗体）染色排除心肌细胞和平滑肌细胞、血管内皮细胞Ⅷ因子相关抗原染色排除内皮细胞以及vimentin的免疫组化染色，方法参照试剂盒说明。以新生Wistar大鼠心肌细胞作为肌动蛋白染色的阳性对照，新生小牛冠状动脉内皮细胞作为Ⅷ因子相关抗原染色的阳性对照。

4．细胞生长观察及生长曲线

绘制第2、4、6代细胞生长曲线。生长良好的原代和第3、5代细胞经胰酶消化后制成细胞悬液，按$1.0 \times 10^4/cm^2$的密度接种于24孔培养板，每24h消化3孔细胞、计数取均值。以时间为横坐标、细胞数为纵坐标，在半对数坐标纸上绘制生长曲线。

二、结果

1．细胞生长观察

刚消化分离下来的细胞呈亮球形，轮廓清晰，单个或聚集成细胞团。接种30min后即有大量细胞贴壁，其中部分已开始伸展，表现为轮廓渐模糊，有小的细胞突起。换液时一般可用PBS轻柔冲洗1～2次再加DMEM。1～2h后大多数贴壁细胞已伸展呈梭形。1～2d后细胞散在生长，呈细长梭形或多角形，胞核清晰，可见大量的分裂像细胞，除贴壁的细胞团外，一般不形成集落。4～5d可生长成细胞单层，漩涡状排列或纵横交错，贴壁的细胞团呈放射状生长。接种在两个六孔培养板（接种面积为$9.6cm^2 \times 6 \times 2=115.2cm^2$）的原代细胞约6～7d可长满、传代。

传代细胞贴壁、伸展速率更快，多数细胞在30min即开始伸展。在大于$1.0 \times 10^4/cm^2$的接种密度及20%新生小牛血清的条件下，约3d基本长成细胞单层。随着传代次数的增加，细胞生长开始变慢，并出现一些体积较大、扁平伸展的细胞，另有一些细胞所表现出的形态与神经元相似，由胞体发出细长的细胞突起。

2. 细胞生长曲线

第二代细胞与第四代细胞的生长特性无明显差别，二者的生长曲线基本一致。以$1.0 \sim 1.2 \times 10^4/cm^2$的密度接种，约24h后进入对数生长期，4d基本长满融合成细胞单层，6～7d后出现接触抑制。而第6代细胞生长已明显缓慢（图1）。



图1 CFs波形蛋白免疫组化染色（BCIP/NPT染色）

3．细胞鉴定

免疫组化染色结果表明由上述组织块消化结合差速贴壁的方法可得到理想的成纤维细胞（见图2～图3），第4代的细胞虽然在形态上已有部分呈多角形，但染色的结果与第2代相同。



图2 Ⅷ因子相关抗原染色呈阳性 ×100

维普资讯 http://www.cqvip.com



图3 新生大鼠心脏细胞肌动蛋白染色呈阳性 × 200

三、讨论

1．关于离体培养的心脏成纤维细胞

心肌纤维化(myocardial fibrosis)是心肌重塑(myocardial remodeling)过程中心功能由代偿发展为失代偿的关键环节，其基础是CFs的增殖和/或细胞外基质(extracellular matrix，ECM)蛋白(主要是I、III型胶原)沉积异常增加。利用离体培养的CFs考察心肌重塑相关因素对其功能的调节是深入了解心肌纤维化发生机制的重要手段[1]。

新生和成年大鼠CFs的离体培养是两种常用的心脏成纤维细胞培养模型。目前的研究表明不同种属和不同发育阶段来源的CFs其表型不尽相同[1]，它们对刺激因素的感受性也就有所差异，因此有必要针对不同的问题选择适当模型，以尽可能模拟体内的情况。

2．消化取材方法

关于新生大鼠CFs的分离培养，国内外已有较多报道，基本上都是采用组织块消化法，而且利用差速贴壁可同时分离培养心肌细胞和心脏成纤维细胞[3](即接种0.5～1h后冲洗换液，此时贴壁的细胞为CFs，而2～3h后仍未贴壁的细胞主要是心肌细胞)。对于成年大鼠，国外的报道除采用组织块消化法外，也有一类方法采用心脏灌流(Langendorff灌流装置)消化[4,5]，后者可同时分离培养成年大鼠的心肌细胞。本实验利用组织块消化法成功分离培养了成年Wistar大鼠的CFs，一个约200g大鼠的心脏按照上述消化方法，接种在两个六孔培养板(接种面积115.2 cm^2)的原代细胞约6～7d可完全长满、传代。此外，我们用同样的消化方法，在接种后2～3h换液，保留尚未贴壁的细胞进行培养，未得到贴壁生长的细胞，表明此法并不适用于成年Wistar大鼠心肌细胞的分离。

3．成年Wistar大鼠心脏成纤维细胞的鉴定及生长特点

CFs不是终末分化细胞，虽然胶原主要由CFs表达、分泌，但其过程复杂，包括前-á肽链的表达、在内质网中加工成球状的前胶原蛋白分子(procollagen)、细胞外加工形成原胶原蛋白分子(tropocollagen)并最终聚合程胶原原纤维、胶原纤维等步骤，市售抗体多为抗胞外胶原蛋白形式的抗体；且平滑肌细胞也可以较慢的速率表达胶原，因此对于心脏成纤维细胞的鉴定缺乏一种比较理想的特异性抗原，而是多用排除法，即在证明细胞来源于间充质的基础上(波形蛋白阳性)，排除心肌组织中的主要细胞(心肌和平滑肌细胞、内皮细胞)[2,3]。

也正因为CFs尚有一定的分化能力，细胞在传代过程中要发生增殖性老化(proliferative ageing)和一些不确定的表型改变，因此体外培养的CFs不宜反复多次传代地使用。但是关于适合实验的传代次数(passages)国外学者的报道并不一致[2,4,5]。在本实验中，我们观察到第4代细胞开始出现一些非典型CFs(长梭形)的形态表现，但是第2、4代的细胞在生长特性和免疫组化的鉴定结果均一致，而从第6代细胞的生长曲线可看出其生长特性已发生明显改变。因此我们认为利用上述方法建立的成年Wistar大鼠CFs培养模型，用第2～4代的细胞进行试验较为理想，而不宜使用第4代以后的细胞。同时对于每一代的细胞，为避免在细胞生长过程中多次的细胞分裂所引起的表型变化，接种密度不宜过小，以1.0～1.2 × 10^4/ cm^2的密度较为合适，第4～5d是实验的最佳时期。

参考文献

1. Booz G.W. Baker K.M. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. Cardiovasc Res 1995, 30(4):537-43.
2. Lee A.A. Dillmann W.H. Mcculloch A.D. et al. Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-β1 in adult rat cardiac fibroblasts. J Mol Cell Cardiol 1995, 27:2347-2357.
3. Gray M.O. Long C.S. Kalinyak J.E. et al. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-

维普资讯 http://www.cqvip.com

beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. Cardiovasc Res 1998. 40(2):352-63.

4. Brilla C.G. Zhou G. Matsubara L. et al. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone [J]. J Mol Cell Cardiol 1994,26:809-820.

5. Simm A. Nestler M. Hoppe V. PDGF-AA, A potent mitogen for cardiac fibroblasts from adult rats. J Mol Cell Cardiol 1997,29 (1):357-68.

(收稿：2001-09-17)

·个案与短篇·

尖锐湿疣两种治疗方法疗效比较

关丽艳* 刘 丽* 李佩瑜*

尖锐湿疣又称尖主湿疣或性病疣。是由乳头瘤病毒感染引起，主要是通过性接触而好发于生殖器或肛门部位。其治疗方法基本采用化学药物、免疫制剂、生物疗法及手术三大类。本文于1998年10月至1999年8月对70例女性尖锐湿疣患者，采用50%三氯醋酸局部烧灼加用迪恩安(α-2α注射用基因工程干扰素)和单纯采用50%三氯醋酸局部烧灼两种方法进行随机治疗对照。并进行连续复诊评定疗效。

一、资料与方法

(一)一般资料：1998年10月～1999年10月，本文治疗了经临床及病理证实为尖锐湿疣的患者70例。年龄20～45岁，平均年龄31岁。均为女性。发病部位：外阴(大、小阴唇、会阴部)、阴道壁及宫颈。病程1周至3个月。

(二)治疗方法：根据患者自愿随机分成两组。第一组40例，以50%三氯醋酸加迪恩安治疗。即：用棉签蘸取50%三氯醋酸涂于病变部位，再取迪恩安100～200万IU溶至1～2ml注射用水后注射于疣的基底部，每周3次，至疣体脱落消失后每两周复查1次，连续复查2个月。第二组30例，单纯以50%三氯醋酸局部烧灼治疗，隔日1次，直至疣体完全脱落，复查方法同第一组。

二、结果

(一)疗效判定标准：显效1～2周，用药1～5次，疣体完全脱落，皮损消失；有效：治疗2～3周，用药6～9次，疣体完全脱落，皮损基本消失；无效：治疗3周，用药9次以上，仍有少量疣体和皮损残留。

(二)治疗结果(见附表)

附表 两种方法疗效比较

组别	例数	显效（例）	有效	无效（例）	总有效率（%）
第一组	40	32	6	2	95.00
第二组	30	7	12	11	63.33△

注：与第一组比较，△P<0.005

三、讨论

(一)第一组采用50%三氯醋酸局部烧灼加用迪恩安的疗效达95.00%，明显优于第二组单纯用50%三氯醋酸局部烧灼的效果(63.33%)。

(二)迪恩安(α-2α注射用基因工程干扰素)系采用重组DNA技术生产是一种无菌、稳定、高纯度的水溶性蛋白。具有抑制病毒繁殖、抗增生和免疫调解作用。首次用药初期可有轻度副反应，本组有27例用药后1～2d伴有头痛、乏力、关节酸痛等流感样症状，随后自然消失。

(三)为预防复发或不能采用局部注射患者，可采用肌肉注射。

(四)治疗期间应做好性生活隔离，防止交叉感染。

(收稿：2001-05-16)

*作者单位：110001 沈阳市中国医科大学第一临床学院妇科