DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.041
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1791-02

个案与短篇

高原现场家兔肝细胞体外培养气相条件初探

Study on the *in vitro* culture of rabbit hepatic cells at high altitude areas

张明森,李素芝,王学凯,黄文超,姚文兴 (西藏军区总医院干部病房,拉萨 850003)

动物细胞体外培养在医学、生物学等研究领域中已成为一种基本实验技术。高原由于低大气压等特定物理条件,体外细胞培养可能有其特殊性。本研究拟通过家兔肝细胞的体外原代培养,初步探索在高原现场进行体外细胞培养的培养方式及气相条件。

1 材料与方法

1.1 肝细胞来源、分离及纯化

选取雄性成年健康家兔数3只,购自西藏自治区药物研究所,体质量2 000~2 200 g。采用体外两步灌流法稍加修改方案进行肝细胞分离[1],以差速离心进行肝细胞纯化。台盼蓝染色,显微镜下观察肝细胞的活细胞率及纯度均>95%者用于实验。

1.2 实验分组及肝细胞培养

本实验共分4组,将上述分离肝细胞用含10%新生牛血清的RPMI1640培养基(闭瓶组$NaHCO_3$浓度为4 mmol/L,开瓶组为23 mmol/L)[2]调整细胞浓度为2×10^5/ml后接种于50 ml塑料培养瓶内,5 ml/瓶,分别置于37 ℃、饱和湿度及不同气相条件(Ⅰ组密闭培养瓶,气相为空气;Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组开放培养瓶,气相分别为含3%、5%及8.5%CO_2浓度的空气)的培养箱中进行培养。每2 d更换相应新鲜培养基1次,总体培养时间为2周。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 培养细胞形态 采用倒置相差显微镜于37 ℃条件下观察培养细胞形态,了解肝细胞生长及增殖情况。细胞接种后12 h内,每6 h观察培养细胞1次,以后为每天观察培养细胞1次。

1.3.2 培养上清pH值测定 采用笔式pH计检测培养液中pH值,每次使用前对pH计行3点校正。及时检测每组加入和取出培养液的pH值,了解培养上清中酸碱度的改变情况。

2 结果

2.1 细胞形态

细胞接种6 h后,Ⅰ、Ⅳ组可见大多数细胞贴壁,约10%细胞已开始增殖;Ⅲ组可见约半数细胞贴壁,个别细胞开始增殖;Ⅱ组约10%细胞贴壁,未见细胞增殖。2 d后,Ⅰ、Ⅳ组生长细胞面积约占培养瓶底部面积的60%;Ⅲ组约占30%,培养上清中漂浮细胞较多见;Ⅱ组培养上清中可见大量漂浮细胞,换液后培养瓶中几乎无细胞,弃本组。6 d后,Ⅰ、Ⅳ组细胞已生长满瓶;Ⅲ组培养上清中可见大量漂浮细胞,换液后培养瓶中仅见极少数细胞,弃本组。10 d后,Ⅰ组个别部位出现细胞脱壁现象,培养上清中漂浮细胞增多。12~14 d,Ⅰ、Ⅳ组均见明显细胞脱壁现象。

2.2 培养上清pH值变化

各组培养上清中pH值检测结果见表1。

表1 培养液中pH值变化

时间(d)	Ⅰ组(培养前/培养后)	Ⅱ组(培养前/培养后)	Ⅲ组(培养前/培养后)	Ⅳ组(培养前/培养后)
2	7.35/7.35	7.38/8.12	7.38/7.82	7.38/7.41
4	7.36/7.33	-	7.39/7.81	7.38/7.39
6	7.36/7.32	-	7.40/7.84	7.41/7.42
8	7.35/7.30	-	-	7.40/7.38
10	7.36/7.28	-	-	7.42/7.38
12	7.36/7.29	-	-	7.44/7.38
14	7.35/7.32	-	-	7.43/7.40

培养前pH值是指每组即将更换的新鲜培养液中的pH值

3 讨论

细胞培养液中通常使用的缓冲系统为CO_2-$NaHCO_3$系统,这种缓冲系统要求在培养液上面对流空间中加入CO_2以防止其丢失而增加羟基离子。$NaHCO_3$浓度决定培养液的缓冲能力,对流空间所采用的CO_2浓度依$NaHCO_3$多少而定,两者必须保持平衡,即为了提高培养液的缓冲能力,除需增加其$NaHCO_3$浓度外,同时还需提高培养液上面对流空间中的CO_2浓度。此外,在含有CO_2-$NaHCO_3$缓冲系统的培养液中加入Hepes也可明显提高其缓冲能力。但由于Hepes不是动物体内正常存在的一种缓冲剂,对机体有无其他作用尚不清楚,故不适于与活体有关的研究。

培养液中稳定的酸碱度是动物细胞进行体外培养时生长、增殖所必需的基本条件。为了维持培养液的pH值稳定,不同培养方式要求采用含有不同$NaHCO_3$浓度的培养液和不同气相条件。本研究表明在我院驻地的海拔高度条件下,采用含低$NaHCO_3$(4 mmol/L)的培养液以空气为气相进行闭瓶培养或含高$NaHCO_3$(23 mmol/L)的培养液以含8.5% CO_2的空气为气相进行开瓶培养均可行。我院驻地海拔高度为3 658 m,大气压

基金项目:西藏自治区"十五"重点课题(2001-99)
Supported by the Key Research Project of Tibetan Autonomous Region (2001-99)
作者简介:张明森(1964-),男,四川省广安市人,硕士,副主任医师,主要从事重型肝炎发病机制及治疗方面的研究,发表论文13篇。电话:(0891)6253184
收稿日期:2003-08-18;修回日期:2004-06-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

仅为标准大气压的 60%[3], CO_2 分压也仅为标准大气压条件下的 60%。含 8.5% CO_2 空气中的 CO_2 分压计算值约等于在标准大气压条件下含 5% CO_2 空气中的 CO_2 分压计算值, 因而两者要求在培养液中所含有的 $NaHCO_3$ 浓度基本相同, 所以本实验中 8.5% CO_2 开瓶培养组的培养液 pH 值较稳定。而含 3% CO_2 或 5% CO_2 空气中的 CO_2 分压计算值明显较低, CO_2 张力不能与 $NaHCO_3$ 浓度保持平衡, 所以培养液中的 pH 值很快升高。因此提示, 在高原进行体外细胞开瓶培养时, 为了保持某种培养液的 pH 值稳定, 气相中采用的 CO_2 浓度可能应等于使用该培养液在通常情况下所采用的 CO_2 浓度除以所在地大气压占标准大气压的百分比。

虽然采用含低 $NaHCO_3$ 的培养液进行闭瓶培养不受高原环境条件的影响, 但由于其缓冲能力较弱, 因而要求培养细胞的生长密度不能太高, 换液的间隔时间不能太长, 否则难以保持培养液的 pH 值稳定。本实验结果表明, 闭瓶培养组后期的培养液 pH 值有所下降, 细胞生长情况稍差, 细胞脱壁现象早于 8.5% CO_2 开瓶培养组。

此外值得注意的是, 已配制含高 $NaHCO_3$ 的培养液不能在普通容器中放置时间太长, 否则其中 CO_2 将逸出而致培养液变碱。

关键词: 高原; 细胞培养; 气相; 二氧化碳
中图法分类号: R329.2 文献标识码: B

参考文献:

[1] 张明森, 李素芝, 郭灵常, 等. 高原体外肝细胞分离方法的研究[J]. 西南国防医药, 2002, 12(5): 391-394.
[2] R. I. 弗雷什尼 编著. 潘李珍 等译. 实用动物细胞培养技术[M]. 北京: 世界图书出版公司北京公司, 1996. 9-64.
[3] 西藏军区总医院编. 高原病学[M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 2001. 1-9.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)19-1792-02

OK 镜矫治近视 153 例 296 眼疗效观察

Therapeutic efficacy of ortho-keratology for correction of myopia: a report of 296 eyes

周素君, 王 科, 陈 莉, 陈红雨, 万兴芳 (第三军医大学西南医院全军眼科中心, 重庆 400038)

角膜塑形术(ortho-keratology)是用角膜接触镜将角膜重新塑形, 增大曲率半径、减少角膜屈折力, 从而降低近视屈光度、提高远视力的方法, 简称 OK 镜。1999 年 8 月至 2001 年 3 月我院引进美国 CONTEXT 公司的 OK 镜片对 153 例近视患者进行了近视治疗, 并对其进行了跟踪观察, 报告如下。

1 材料和方法

1.1 对象

153 例近视患者, 其中男 169 眼, 女 127 眼, 共 296 只眼, 平均年龄 15 岁。所有眼睛皆为健康眼, 未戴过角膜接触镜。分组, A 组: 117 只眼, 屈光度 < -3.00 D; B 组: 113 只眼, 屈光度 ≥ -3.00 D ≤ -5.00 D; C 组: 66 只眼, 屈光度 > -5.00 D。

1.2 材料

美国 CONTEXT 公司设计的夜戴型 Orth-K CI, Dk151, 已经美国 FDA 检定, RGP 材质稳定, 不易变形, 有抑制沉淀物的特性。

1.3 方法

扩瞳验光, 角膜地形图检查, 测角膜直径、眼压、眼底、裂隙灯检查, 最后小瞳复查验光以决定镜片度数, 然后向美国订制角膜塑型镜片。指导患者配戴及保养镜片方法, 并嘱咐严格遵守配戴时间, 夜间配戴 8~12 h。第 1 次夜戴者, 次日复诊, 以后不论是白天配戴或夜间配戴均是第 1 周复诊 1 次, 第 2 周复诊 1 次, 2 个月后改为 1 个月复诊 1 次, 3 个月后每 3 个月到半年复诊 1 次, 如果眼睛有异常症状要随时复诊。复诊项目包括: 裸眼视力、主觉验光试片、裂隙灯下角膜荧光染色以确定角膜健康以及镜片与角膜的接触状况, 检查镜片清洁度, 异常情况处理。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均用 SPSS 软件包进行。

2 结果

2.1 治疗前, 治疗间情况(表 1~3)

表 1 治疗前各组眼数、裸视及屈光状态和角膜屈光力

组别	眼(只)	术前裸视	球镜(D)	柱镜(D)	轴(度)	角膜垂直 k 值(D)	角膜水平 k 值(D)
A 组	117	0.223±0.169	2.071±0.73	0.670±0.269	138.000±63.574	43.770±1.284	42.391±1.239
B 组	113	0.091±0.035	3.768±0.574	0.828±0.413	130.253±68.960	44.084±1.412	43.833±1.399
C 组	66	0.050±0.022	6.236±1.068	0.869±0.460	122.046±75.015	44.376±1.257	43.158±1.255

作者简介: 周素君(1964-), 女, 四川省遂宁市人, 主管护师, 主要从事临床视光学及青少年近视的临床方面的研究。电话: (023)68754674
收稿日期: 2003-07-17; 修回日期: 2003-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net