DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.031
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
1690 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)18-1690-03

小鼠皮肤器官培养模型的建立及存活状况的研究

Establishment of the mouse skin organ culture model and the study of the viability of cells in the cultured skin piece

崔志鸿,杨 恬,高强国 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 检测皮肤器官培养模型中细胞的生长及存活状况,建立稳定的小鼠皮肤体外培养模型。方法 将小鼠皮肤培养于transwell的内室,培养液加至皮肤的表真皮交界处,于培养后的2,4,8 d取皮片固定、切片后于光镜、共聚焦显微镜及透射式电镜下进行观察。结果 培养2,4 d的皮片与未经培养的皮片在形态结构与细胞的存活数量上没有显著差异;培养8 d的皮片光镜下的形态结构没有发生明显改变,但共聚焦显微镜下,细胞存活数量有所下降,透射式电镜下细胞的超微结构显示胞质及线粒体肿胀,溶酶体增多等退化性改变。结论 体外培养4 d以下的皮肤与在体生长的皮肤在形态结构及细胞生长方面没有显著差异,可以作为体外研究的良好模型。

器官培养(organ culture)是指从供体取得器官或器官组织块后,不进行组织分离而直接在体外的一定环境中培养,保持其原有器官中细胞的结构和联系并生存[1]。器官培养的目的和技术与单层细胞培养不同,器官培养主要强调器官组织的相对完整性,可以利用器官培养对器官组织的生长、变化进行体外观察,并可以通过改变体外条件研究外加因子对器官组织的影响。皮肤的器官培养最早开始于1954年,Li等[2,3]于20世纪90年代初对皮肤的器官培养方法进行了改进,确立了一系列鉴定皮片生存状况的指标,如判定皮片中细胞活性的共聚焦显微镜观察方法、判断皮片中细胞增殖状况的^{3}H-TdR掺入等方法,从而使皮肤的器官培养成为一项稳定的培养技术,从此得到较为广泛的应用[4~6]。皮片的存活状态是皮肤器官培养的重要指标,但目前仍缺乏切实有效的检测手段。本研究利用共聚焦显微镜结合透射式电镜及光镜的观察确定培养皮片的存活状况,期望建立稳定的小鼠皮肤器官培养模型,以用于进一步的皮肤学研究。

1 材料及方法

1.1 小鼠皮肤的器官培养

4 d昆明小鼠(第三军医大学实验动物中心提供),75%乙醇充分消毒全身,D-Hanks液反复冲洗数次,用锋利的剪刀剪下背部皮肤,修去皮下结缔组织,D-Hanks液反复冲洗数次,用锋利的刀片将剪下的皮肤修剪成2 mm×3 mm大小的皮片,将皮片接种在器官培养专用的Tanswell(Felcon)的内室中,从Transwell的外室中加入培养液,培养用液为RPMI1640培养基(Giebco),内含2%胎牛血清(Hyclone),4 U/ml胰岛素,0.4 μg/ml氢化可的松,20 mmol/L Hepes(Amersco),2 mmol/L L-谷氨酰胺,培养液应加至皮片的表真皮交界处,将Transwell置于5% CO_2、37 ℃培养箱中培养,每48 h换液1次,于培养的0、2、4、8 d分别取3块皮片,常规石蜡切片,HE染色,于光镜下观察皮肤及毛囊的结构。

1.2 培养皮片的共聚焦显微镜观察

取培养2、4、8 d的小鼠皮片各3个标本,PBS洗3次,于37 ℃温箱中用5 μmol/L BCECF(2′,7′-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein)(Sigma)及5 μmol/L PI(propidium iodide)(Sigma)于pH9.6共同孵育30 min,PBS洗3次,立即进行连续冰冻切片,切片厚度为50 μm,于共聚焦显微镜CLSM(confocal laser scanning microscope)上进行观察,未培养的皮片做对照。

1.3 培养皮片的透射电镜观察

取培养2、4、8 d的小鼠皮片各3个标本,置于预冷的蜡板上,用预冷的锋利刀片切成1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块,立即投入新鲜的预冷3%戊二醛中4 ℃固定2 h,0.1 mol/L PBS 4 ℃洗3次,再用1%锇酸4 ℃固定30 min,0.1 mol/L PBS 4 ℃洗3次,梯度丙酮脱水,环氧树脂618包埋,超薄切片,醋酸铅及枸橼酸铅染色,透射电镜下观察,未培养的皮肤切片做对照。

2 结果

2.1 培养皮片的光镜观察

皮片在培养8 d后仍保持良好的皮肤及毛囊结构,毛囊有显著增长,与未培养的正常皮片相比,整体结构并无明显破坏,结缔组织也十分完整。

2.2 培养皮片的共聚焦显微镜观察

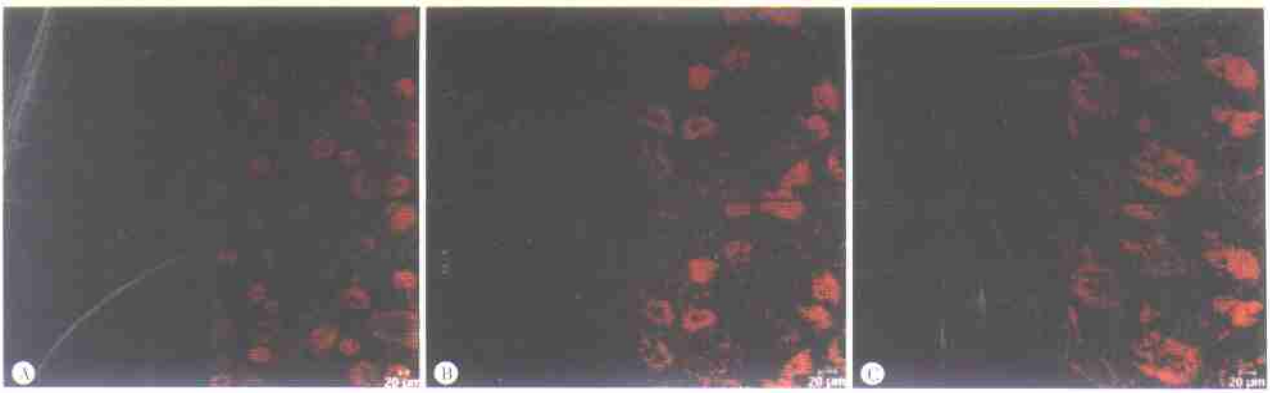
BCECF和PI是两种荧光染料,其中,BCECF专染活细胞,在共聚焦显微镜下它将活细胞染为红色,而PI不能将活细胞着色,但它可以穿透死细胞的细胞膜,将死细胞的核着色,在共聚焦显微镜下死细胞呈绿色。

共聚焦显微镜图像显示:在未经培养的皮片上,细胞大多是染为红色的活细胞,染为绿色的细胞极少,分布在皮片边缘及毛囊的髓质部位(图1A);培养2、4 d的皮片的存活状况良

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870390)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39870390)
作者简介:崔志鸿(1974-),女,山西省神池县人,博士,讲师,主要从事上皮生物学方面的研究。电话:(023)68752259
通信作者:杨 恬,电话:(023)68752260
收稿日期:2003-07-03;修回日期:2003-09-20

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

好, 皮片中的大部分细胞都被染为红色, 染为绿色的死细胞分布部位与未培养皮片相同, 也集中在皮片边缘及毛囊的髓质(图 1B)。活/死细胞的比例与未培养的皮片的比例相当。培养 8 d 的皮片细胞存活率仍然很高, 死细胞大多仍集中在皮片边缘及毛囊髓质部位, 但毛囊的毛母质及外根鞘等部位出现少量死细胞(图 1C), 死/活细胞的比值上升。



A: 4 d 小鼠在体皮肤; B: 培养 4 d 的皮片; C: 培养 8 d 的皮片

图 1　培养小鼠皮片的激光共聚焦扫描观察(bar: 20 μm)

2.3　培养皮片的透射电镜观察

未经培养的正常皮肤的毛囊外根鞘细胞表现出典型的快速增殖的细胞的形态(图 2A): 细胞核大, 占据了整个细胞 80% 以上的空间, 细胞质的量很少, 膜相结构不明显, 胞间连接清晰, 有些细胞处于有丝分裂期; 培养 2 d 及 4 d 的皮肤的毛囊外根鞘细胞的电镜下的形态与未培养的皮肤超微结构相近(图 2B), 细胞核仍然占据了细胞空间的很大比例, 膜相结构没有明显破坏, 但与正常皮肤相比胞间连接变得较模糊; 培养 8 d 的皮肤毛囊外根鞘细胞与正常细胞相比则有了很大变化(图 2C), 表现出一些退化性变化: 胞质出现肿胀, 线粒体肿胀, 溶酶体增多, 少量质膜结构破坏, 有些细胞内还出现少量脂滴, 这些都是细胞即将死亡的标志。



A: 4 d 小鼠在体皮肤; B: 培养 4 d 的皮片; C: 培养 8 d 的皮片

图 2　培养小鼠皮片的透射式电镜观察　(TEM× 3 300)

3　讨论

由于离体组织没有血液系统供应养分, 要维持组织细胞的生长需要, 营养和氧气仅能靠自然渗透来维持, 为使器官组织正常生长, 而中心的细胞不发生坏死, 组织的厚度和直径不应太大, 对皮肤而言, Li 等[2,3]的报道称应在 2 mm× 5 mm 或更小。器官组织内部还需要有足够的氧气渗入, 一般采用两种方法达到这一目的: 一是将组织块放置在气液界面, 使组织块在吸收培养液养分的同时可以吸收氧气; 二是提高培养环境的氧分压, 某些研究者甚至推荐使用 95%O_2 和 5%CO_2 的气体环境[7]。在本研究中, 我们采用了 2 mm× 3 mm 大小的组织块, 并采用 Transwell 达到将组织块提高到气液界面培养的方法来满足器官培养的基本需要。

在本研究中, 我们在前人研究的基础上, 建立了光镜、电镜、共聚焦显微镜相结合综合评定皮肤器官培养的生存状况的方法。BCECF 和 PI 是两种荧光染料, BCECF 可以特异性地结合在活细胞的细胞表面, 而 PI 则可以穿透死细胞不完整的细胞膜, 与核物质结合。Li 等[2,3]首先应用这两种荧光染料通过共聚焦显微镜检测器官培养的组织块中细胞的存活状况。此后这种方法被普遍应用于器官培养物的检测, 成为一项重要的指标。

在本研究的结果中我们发现, 培养 8 d 的皮片在共聚焦显微镜下活细胞的比例仍然很高, 似乎存活状况良好。但在透射式电镜下可以看到, 虽然很多细胞

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

仍然存活，但其中的结构已发生一些变化，不能代表正常的皮肤细胞。我们提出，需要用共聚焦显微镜结合电镜的方法考察皮片培养中细胞的存活状况，共聚焦显微镜可以全面观察细胞的存活状况，电镜可以观察到局部细胞超微结构的变化。

通过共聚焦显微镜观察我们发现，未经培养的皮片中死细胞集中在毛囊的髓质和皮片的边缘，髓质的细胞在活体动物中已经角质化死亡，皮片边缘的死细胞是取材时被器具所伤。透射式电镜的观察表明，未经培养的皮片中的细胞活性良好，外根鞘细胞增殖旺盛，可以观察到分裂相。培养 2 d 和 4 d 的皮片的情况与未经培养的皮片类似，说明在培养的前 4 d，皮片存活状况几生长状况良好。共聚焦显微镜观察到培养 8 d 的皮片中死细胞比例有所增加，透射式电镜观察的结果发现培养 8 d 的皮片中细胞的超微结构发生了巨大的变化，线粒体体积增大，内有清晰的嵴，溶酶体增多，少量质膜结构破坏，有些细胞内还出现少量脂滴，这些都是细胞即将发生死亡特征[6]，所以培养 8 d 以上的皮肤已不能代表正常皮肤的状态，不应用做皮肤体外模型。

关键词：皮肤；器官培养；激光共聚焦显微镜；透射式电镜

中图法分类号：R-332；R322.99 文献标识码：B

参考文献：

[1] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司，1996. 72.

[2] Li L, Margolis L B, Paus R, *et al*. Hair shaft elongation, follicle growth, and spontaneous regression in long-term, gelatin sponge-supported histoculture of human scalp skin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(18): 8764－8768.

[3] Li L N, Margolis L B, Hoffman R M. Skin toxicity determined in vitro by three-dimensional, native-state histoculture[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 1908－1912.

[4] Moll I. Human skin organ culture[J]. Methods Mol Med, 2003, 78: 305－310.

[5] Lindner G, Menrad A, Gherardi E, *et al*. Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling[J]. FASEB, 2000, 14(2): 319－332.

[6] Kivinen P K, Nilsson G, Naukkarinen A, *et al*. Mast cell survival and apoptosis in organ-cultured human skin[J]. Exp Dermatol, 2003, 12(1): 53－60.

[7] Agren U M, Tammi R H, Tammi M I. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture[J]. Free Radic Biol Med, 1997, 23(7): 996－1001.

（编辑 薛国文）

（上接 1689 页）

脱出、穿刺部位出血、导管堵塞、局部感染各 2 例，长程置管病例出现的静脉炎、导管部分脱出、穿刺部位出血、导管堵塞、局部感染各 1 例。从 PICC 主要应用目的与并发症的关系分析可以看到，71 例用于肠外营养的置管病人出现静脉炎、导管部分脱出各 2 例，穿刺部位出血 1 例、导管堵塞和局部感染各 3 例；20 例用于联合化疗的置管病人出现静脉炎 3 例，穿刺部位出血和局部感染各 1 例。

3 讨论

对本组 110 例行 PICC 的患者所发生的并发症进行分析，发现每一种并发症的发生都各有特点，并有自身的一些主要诱发因素。

静脉炎：静脉炎是 PICC 使用过程中主要的并发症之一[1]，从置管时间看在置管近期静脉炎的发生高于置管后期静脉炎的发生，从 PICC 主要应用目的分析可看出静脉炎在 PICC 应用于化疗病人中的发生率较高。就其原因，可能是在穿刺送管过程中用力过猛或长期使用化疗药物的化学性、高浓度及酸碱性刺激血管内膜，从而导致静脉炎的发生。还有报道表明静脉炎还可能与病人的特殊体质及导管材料有关[2]。所以在穿刺送导管的过程中动作一定要轻柔，不可强行插入，以免造成错位、机械性损伤和静脉阻塞。

导管阻塞：导管阻塞主要发生在 PICC 用于肠外营养中，因营养液较粘稠，如输入后没有及时冲洗管道或冲洗不完全就容易引起导管阻塞。并且封管技术不过关也可能造成凝血堵塞。对这 5 例导管堵塞的患者，我们采用了尿激酶溶栓方法进行处理，3 例堵塞的导管重新疏通，其余 2 例效果不佳，予以拔管。所以对于导管堵塞，尿激酶溶栓方法是一种较为有效的挽救方法，但必须是及早发现堵塞情况，并尽快给予处理，才能取得较好效果。

导管部分脱出及穿刺部位出血：责任护士必须充分掌握病人的身体状况，如有心脏病、高血压、出凝血异常等应慎行 PICC。对已经置管的病人应坚持精心护理，并加强健康教育，教会病人如何进行自我护理。

感染：文献[3]报道，皮肤的污染是诱发感染的主要因素。因此，必须注意穿刺点皮肤的清洁和消毒，注重操作过程中的无菌观念。在置管后必须密切观察穿刺点皮肤局部情况，如有穿刺点局部红肿等应立即予以处理，并尽量选用透气性好的透明敷料。

其它问题：在使用过程中还发现 PICC 导管具有自身的一些缺点：PICC 管腔细，进入中心静脉途径长，其输液速度较慢。文献[3]报道 5-French 导管最大平均流速为 325 ml/h，4-French 导管最大平均流速为 275 ml/h，因此不适宜急救过程中的快速补液。即使对输液量较大的非危重患者也需借助输液泵加快流速，否则由于输液时间过长而影响患者休息。

关键词：PICC；并发症；护理对策

中图法分类号：R197.39 文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈小红，骆惠玉，孙陈芬. 恶性肿瘤患者应用 PICC 和 CVC 置管的临床观察与护理[J]. 现代护士，2001，7(11)：4－5.

[2] 蒋朱明，王秀容. 金属针、聚四氟乙烯留置针经周围静脉中心静脉插管的临床对比性研究(270 例)[J]. 中华临床营养杂志，2000，8(3)：181－183.

[3] 谭海梅，伍美鹃，陈秀强，等. 肿瘤病人行 PICC 置管的临床观察与护理研究[J]. 实用护理杂志，1999，15(11)：37－38.

（编辑 薛国文）

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