DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.033


体态”和“液晶态”，双分子膜从原来的紧密排列状态开始紊乱，膜刚性和膜厚度降低，膜通透性增加，从而使其理化稳定性发生很大的变化。另外冻干脂质体的制备工艺流程也会对其稳定性产生一定的影响，如冻干过程中的温度和降温速率都会对产生的脂质体产生很大影响[7]。

总之，冻干脂质体在适宜的温度条件下(－18、4、25 ℃)经过一定时间的储存，氧化和水解程度维持在较低的水平；重新水化后粒径分布比较稳定，是一种很好的脂质体制剂形式。由于冻干法制备的脂质体可单独制备、储存，使用时迅速地将相应药物包载进去，这样制备的载药脂质体可以有效地延长药品在体内的作用时间，降低药品的毒副作用，提高药品在体内的有效生物利用度，使脂质体原有作为药物载体的优点进一步扩大，为药物研发开辟了一个崭新的空间。

关键词：脂质体；冻干；稳定性；脂质氧化；水解
中图法分类号：R913 文献标识码：B

参考文献：

[1] Lasic D D, Papahadjopoulos D. Liposomes revisited[J]. Science, 1995, 267(5202): 1275－1276.
[2] Suggy S C, Murari R, Imran A. Liposomes(a review)[J]. Biopharm, 2001, 11(13): 10－14.
[3] Huang Y Y, Chung T W, Wu C I. Effect of saturated/unsaturated phosphatidylcholine ratio on the stability of liposome-encapsulated hemoglobin[J]. Int J Pharm, 1998, 172(5): 161－167.
[4] Panasenko O M, Evgina S A, Driomina E S, *et al*. Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid liposomes[J]. Free Radic Biol Med, 1995, 19(2): 133－140.
[5] Fomuso L B, Corredig M, Akoh C C. Metal-Catalyzed oxidation of a structured lipid model emulsion[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(24): 7114－7119.
[6] Tang D, Borchman D. Temperature induced structural changes of beta-crystalline and sphingomyelin binding[J]. Exp Eye Res, 1998, 67(1): 113－118.
[7] Crowe J H, Crowe L M. Factors affecting the stability of dry liposomes[J]. Biochim Biophy Acta, 1988, 939(2): 327－334.

(编辑 冯崇英)

# 技术方法

文章编号：1000-5404(2004)06-0554-02

## 血管内皮-平滑肌细胞双层联合培养模型的改进

## Modified co-culture model of vascular endothelial cells and smooth muscle cells

于学军，何作云，王晓燕，高凌云，牟 娇，杨生平，董琼兰 (第三军医大学新桥医院心血管内科，全军心血管内科中心，重庆 400037)

提 要：目的 建立并改进血管内皮和平滑肌细胞双层联合培养模型，为进一步研究血管内皮和平滑肌细胞间的信号传递奠定基础。方法 先分别单独培养大鼠主动脉血管内皮和平滑肌细胞，然后分别培养在聚乙烯细胞培养微孔滤膜两面，并以不同的比例重叠。结果 两种细胞重叠1/3、2/3和100%，以孔径分别为1.0或3.0 μm微孔滤膜对两种细胞进行双层联合培养后，对内皮细胞的影响不明显，但对平滑肌细胞的影响则十分显著，细胞形态以“收缩型”为主，肌纤维增多，生长速度较单独培养时慢，形成单层贴壁细胞的时间延长12～18 h，无明显“峰-谷”状态形成。结论 改进后的联合培养方法经济、简便，更适合于研究血管内皮和平滑肌细胞间的信号传递。

血管内皮和平滑肌细胞的培养，传统上多采用单种细胞培养或单层细胞联合培养的方法，这些方法与体内生理状态差异较大，且存在细胞鉴别的困难。20世纪90年代以来，有人利用双层细胞培养模型，较好地解决了这些问题[1,2]。这一方法比较符合体内的生理状况，既可以观察两种细胞间信号传递情况，又可分别收集细胞，检测其它指标。但用这一模型检测$[Ca^{2+}]i$在两种细胞间的运动情况时，因用于培养的微孔滤膜较薄，两层细胞的信号可能互相干扰；在进行细胞微注射时，可能刺破对面的细胞而造成伪像；此外，在上述实验中，采用牛主动脉或不同动物的血管内皮和平滑肌细胞，或取材比较昂贵，或与生理状态差异较大。为此，本实验在这些模型的基础上加以改进，采用大鼠主动脉的血管内皮和平滑肌细胞进行培养，并使两层细胞按不同比例重叠，使之更加简便、经济，并可以较好地实时检测两种细胞间$[Ca^{2+}]i$信号传递的情况。

作者简介：于学军(1968－)，男，河北省承德市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事高血压、冠心病方面的研究，发表论文10余篇。电话：(023)68774767

收稿日期：2003-12-30；修回日期：2004-02-26

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

20周龄Wistar大鼠10只，体质量180～220 g，雌雄不拘(购自第三军医大学实验动物中心)。每次原代细胞培养取5

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

只大鼠。

### 1.2　血管内皮细胞的培养及鉴定

采用酶消化法进行培养[3]。无菌取出大鼠主动脉, 放入含有 100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素 PBS 的平皿中, 将血管外的脂肪组织分离干净并冲洗后, 用细丝线扎住一端血管, 用镊子轻轻夹住结扎的血管末端, 再用一根铁丝将扎住的末端捅进血管, 将血管翻过来, 使内皮细胞面朝外, 扎住另一端。然后将血管放入盛有 0.1% 胶原酶(Sigma)的离心管内, 37 ℃消化 15 min, 并不时震荡, 使细胞脱落, 离心洗涤后应用 DMEM 培养液(GIBCO 公司), 加入 10% 胎牛血清(GIBCO 公司)培养于 10 cm 培养皿内, 细胞生长融合后, 用 0.25% 胰蛋白酶(Sigma)消化传代。将内皮细胞贴于盖玻片上, 以 1% 的多聚甲醛固定 5 min, 免疫细胞化学染色检查抗Ⅷ因子相关抗原抗体阳性染色(羊抗鼠 IgG 单克隆抗体及其免疫组化药盒, 购自北京中山公司)。

### 1.3　血管平滑肌细胞的培养及鉴定

采用贴块法培养[3]。上述 Wistar 大鼠胸主动脉被 0.1% 胶原酶消化后, 放于另一平皿中, 纵向剪开血管壁, 用眼科弯镊钝性刮除残余的血管内膜, 用含有抗菌素的 PBS 反复冲洗, 将中膜剪成 1 mm× 1 mm 大小, 贴片于培养皿底部, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养细胞。细胞生长融合后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。细胞在光镜下呈典型的峰-谷状表现, 免疫细胞化学染色检查抗 α-actin 抗体染色阳性(鼠抗人 α-actin 单克隆抗体及其免疫组化药盒, 购自北京中山公司)。

### 1.4　血管内皮与平滑肌细胞的联合双层培养

根据文献[1, 2, 4]方法进行改良。制作培养小室, 取 2 个 1.5 ml Eppendrf 管, 切成 0.5 cm 直径圆管, 管口重叠 1/3、2/3 或 100%, 中间夹特制的聚乙烯细胞培养微孔滤膜(孔径分别为 1.0 和 3.0 μm, 1.0× $10^5$ 孔/$cm^2$ 或 0.4× $10^5$ 孔/$cm^2$, 厚度为 5.0 μm, Bector-Dickinson 公司), 以使两层细胞以不同的比例重叠。用粘胶粘上, 漂洗消毒后 37 ℃保存备用。培养时, 先将 3~4 代内皮细胞(4× $10^5$/$cm^2$)置于 Eppendrf 管内的滤膜上面。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养细胞。培养 2 d 待单层细胞刚刚形成时(经常用相差显微镜观察), 将小室翻转, 把平滑肌细胞置于背面 Eppendrf 管内的膜上, 后将培养膜倾斜 45°, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行共培养(图 1)。待平滑肌细胞融合后用于细胞生物学检测。

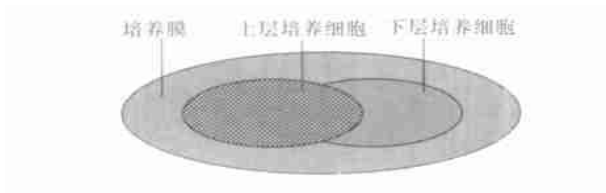



图 1　双层联合细胞培养示意图

## 2　结果

### 2.1　血管内皮细胞的生长与鉴定

内皮细胞培养 2 h 后可见细胞贴壁。过夜后贴壁细胞明显增多。早期呈多角形或梭形, 形成致密的单层细胞时, 呈"铺路石"状排列(图 2)。Ⅷ因子相关抗原免疫组织化学染色, 可见胞浆呈阳性, 胞核呈阴性, 证明培养的细胞为内皮细胞。

### 2.2　血管平滑肌细胞的生长与鉴定

原代平滑肌细胞 72 h 后以出芽方式从组织块周边长出, 早期呈三角形、梭形、多角形或不规则形, 以后逐渐以梭形为主。原代细胞胞体较小, 随着传代次数增加, 胞体有所增大。细胞生长至低、中密度时为单层状贴壁, 对数生长期则可见部分区域细胞呈重叠方式生长, 镜下观察细胞厚薄不均, 形成"峰-谷"生长状态(图 3)。

用平滑肌细胞特异性抗体进行免疫组织化学染色, 可见细胞胞浆内大量肌动蛋白的阳性染色, 呈丝状沿细胞长轴平行排列, 细胞核不着色。

### 2.3　联合双层培养细胞的生长情况

进行双层联合培养后, 对内皮细胞的影响不明显, 形成致密的单层细胞时, 仍呈"铺路石"状排列。但对平滑肌细胞的影响则十分显著, 细胞形态以"收缩型"为主, 肌纤维增多, 生长速度较单独培养时慢, 形成单层贴壁细胞的时间延长 12~18 h, 无明显"峰-谷"状态形成(图 4)。两种细胞重叠 1/3、2/3 和 100% 时, 以及应用孔径分别为 1.0 或 3.0 μm 微孔滤膜时, 对细胞的生长和形态无明显影响。

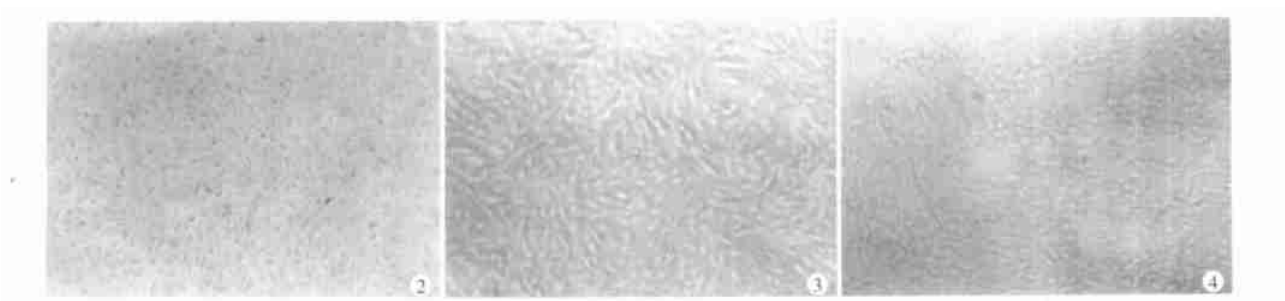


图 2　培养的内皮细胞, 呈"铺路石样"排列　(× 100)

图 3　单层培养的平滑肌细胞, 呈"峰-谷"生长状态　(× 100)

图 4　双层培养的平滑肌细胞, 以"收缩型"为主, 无明显"峰-谷"状态形成　(× 100)

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

## 3 讨论

血管内皮与平滑肌细胞的联合双层培养，是国外 20 世纪 90 年代发展起来的一种方法，它对探讨两种细胞之间的旁分泌功能发挥了重要的作用[1,2,4]。他们均采用两种细胞完全重叠的方法，主要用于检测两种细胞间的旁分泌功能。我们对其进行改进的目的，是为了探讨缝隙连接介导的信号（尤其是 $Ca^{2+}$ 信号）在这两种细胞间的传递情况。因为在应用激光共聚焦技术实时检测[ $Ca^{2+}$ ] i 的变化时，尽管激光共聚焦技术具有“细胞 CT”的功能，但由于培养膜很薄，两种细胞间的信号可能产生干扰，我们采用将两种细胞按不同比例重叠的方法，可应用不重叠部分可对其信号进行矫正[5]。此外，在不重叠部分进行细胞内微注射，可防止刺破对面的细胞。本实验采用孔径分别为 1.0 或 3.0 μm 微孔滤膜，是为了检测这两种孔径对缝隙连接形成的数目及通信能力的影响，我们准备在进一步的实验中对其进行检测。进行联合双层培养的关键，在于单层内皮细胞刚刚形成后，翻转小室及种植平滑肌细胞于背面时，动作要轻柔，种植后将培养膜倾斜 45°，以防止内皮细胞脱落，待细胞完全融合后，则不易脱落。此外，同时应用大鼠胸主动脉培养血管内皮和平滑肌细胞进行共培养，经济、简便，同时也更接近生理状态。

关键词：血管内皮细胞；血管平滑肌细胞；联合培养
中图法分类号：R329.2 文献标识码：B

## 参考文献：

[1] Fillinger M F, O'Conner S, Wagner S, *et al*. The effect of endothelial cell coculture on smooth muscle cell proliferation[J]. J Vas Surg, 1993, 17(6): 1058－1067.
[2] Di Luozzo G, Bhargava J, Powell R J. Vascular smooth muscle cell effect on endothelial cell endothelin-1 production[J]. J Vasc Surg, 2000, 31(4): 781－789.
[3] 张静波. 细胞生物学使用方法与技术[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1991. 59－76.
[4] Powell R J, Bhargava J, Basson M D, *et al*. Coculture conditions alter endothelial modulation of TGF-$\beta_1$ activation and smooth muscle growth morphology[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1998, 274(2): H642－H649.
[5] 李 楠，王凤翔，周春喜. 荧光探针应用技术[M]. 北京：军事医学科学出版社，1998. 127－133.

（编辑 王 红）

（上接 551 页）

上腹回输入腹腔，全过程为封闭式无菌操作[1]，一次液体超滤量为 3 000～7 000 ml，治疗时间 2～3 h，治疗中用腕式血压计监测心率和血压。

### 1.3 统计学分析

采用 *t* 检验。

## 2 结果

从表 1 可见，经腹水超滤浓缩后，病人体质量下降，腹围减小，24 h 尿量增加，腹胀及呼吸困难症状得到明显改善。治疗后患者血中的白蛋白，总蛋白浓度比治疗前增高，肌酐明显降低。而治疗前后血液中的尿素氮、钾、钠、氯无明显差异。治疗组 21 例腹水消退，占 70%，9 例腹水减少，占 30%。

表 1 治疗前后临床症状体征对比（$\bar{x} \pm s$）

| | 体质量（kg） | 腹围（cm） | 24 h 尿量（ml） |
|---|---|---|---|
| 治疗前 | 62.24±12.18 | 86.31±7.80 | 1 160±142 |
| 治疗后 | 57.35±13.37 | 77.47±5.81 | 1 676±172 |
| *P* | ＜0.05 | ＜0.05 | ＜0.05 |

## 3 护理方法

### 3.1 回输前护理

认真做好准备工作及心理护理，说明治疗的意义、原理，取得病人的合作，或请做过此治疗的病人现身说法，消除病人及家属的紧张情绪。

### 3.2 操作中的观察及护理

术前排空膀胱，穿刺后取半卧位，观察病人面色、心率、血压及腹痛情况。发现心率增快，主诉不适时，适当放慢速度，引流不畅时，可适当移动穿刺针位置或轻轻按压腹部使引流通物为止。注意穿刺点有无渗液、渗血，针头有无脱落，病人有无腹痛，机器运转是否正常，发现异常及时报告医生。

### 3.3 治疗后护理

腹围直径大于 100 cm 的患者，有时有腹水外溢[2]，拔针时用碘伏消毒局部针孔，盖上无菌纱布，用腹带加压包扎，若腹水污染腹带被服，应及时更换。治疗后患者少数可出现发热，本组病例有 3 例低热，体温在 37.5～38 ℃，占 10%，可能与腹水蛋白和血浆蛋白的交换吸收有关，未予特殊处理，3 d 以后恢复正常。治疗后患者可进半流质饮食，告诉病人腹水浓缩回输后各项症状改善明显，但仍然是姑息疗法，对肝脏或肾脏本身无明显作用[3]。应坚持低盐、高营养，易消化的饮食，禁忌粗纤维及过硬的食品摄入，以巩固疗效。

关键词：腹水；回输术；护理
中图法分类号：R442.5 文献标识码：B

## 参考文献：

[1] 周 霞，王春莲. 824 例腹水环注术的观察与护理[J]. 实用护理杂志，1999，15(11)：28.
[2] 池肇春. 新编实用肝病学[M]. 北京：中国医药科技出版社，1994. 253－254.
[3] 骆玉琼. 自体腹水超滤浓缩回输腹腔术观察护理[J]. 护士进修杂志，1997，12(9)：30.

（编辑 陈聪连）

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