DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.024
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0431-03

论著

原代培养乳鼠窦房结细胞的形态学研究

钟 理,宋治远 (第三军医大学附属西南医院心血管内科,重庆 400038)

提 要:目的 通过对原代培养乳鼠窦房结细胞进行光、电镜观察,了解培养窦房结细胞的形态结构特征。方法 取新生24 h Wistar乳鼠的窦房结组织,用差速贴壁结合BrdU处理进行原代细胞纯化培养。结果 在培养的窦房结细胞中观察到有3种不同形态的细胞,即梭形细胞、三角形细胞与不规则形细胞,其中梭形细胞最多,搏动频率最快,肌原纤维稀疏排列紊乱,细胞器不发达;三角形细胞与心房肌三角形细胞特征相似。结论 在培养的乳鼠窦房结细胞中,细胞体积小搏动频率快的梭形细胞即是窦房结的起搏细胞。

关键词:窦房结;细胞培养;乳鼠
中图法分类号:R322.11;R329.24 文献标识码:A

Morphologic study on primary cultured sinoatrial cells isolated from newborn rats

ZHONG Li, SONG Zhi-yuan (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the morphologic characters of primary cultured sinoatrial cells (SAN cells) under light microscope and transmission electron microscope with HE staining. Methods The SAN cells isolated from neonatal Wistar rat were cultured and purified with the method of differential attachment and BrdU-treatment. Results Three distinctly different types of cells were observed among the cultured cells of SAN, that is, spindle, triangle and irregular cells. The spindle cells covered the greatest proportion of the cultured cells of SAN. The frequency of spontaneous contraction of spindle cells was the highest among the contracting cells. The results of ultrastructure observation showed that myofibrils and other organelles in spindle cells were poorly organized and significantly decreased in number compared to triangle cells. There was no significant difference between triangle cells isolated from SAN and from atrial muscle. Conclusion Among the cultured cells from neonatal rat SAN, the spindle cells are the pacemaker cells of SAN.

Key words: sinoatrial node; culture; rats

窦房结是心脏传导系统的重要组成部分,窦房结病变临床常见,但由于研究方法的限制,目前有关窦房结病变发病机制的研究报告较少。最近我们已用纯化培养技术成功地对乳鼠窦房结细胞进行了培养[1]。通过对培养的乳鼠窦房结细胞进行形态学观察,研究窦房结单细胞的形态结构特征,为从细胞水平深入研究窦房结细胞的病理生理特性奠定实验基础。

1 材料与方法

取出生24 h Wistar乳鼠20只,剖胸,暴露心脏,在解剖显微镜下,于界嵴中部静脉窦侧、前腔静脉根部取0.7 mm×0.7 mm×0.7 mm组织块。在组织块中加入0.08%胰酶和0.02% EDTA,37 ℃水浴5 min,吹打1 min,自然沉淀,吸取上清液,用400目金属滤网过滤后移入10 ml离心管,离心管中加等体积DMEM培养液。重复消化5次至组织块基本自然沉淀,弃上清;加入0.025%胶原酶,置于37 ℃水浴中振荡15 min,再吹消化成单细胞为止。而后加入DMEM培养液(含15%胎牛血清),打散细胞团为单细胞悬液。调整细胞数为1×10^5/ml,将单细胞悬液接种于培养板中。并将培养容器置于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养90 min后,采用差速贴壁分离技术[2],吸出培养孔中的细胞悬液,收集至另一培养板中,滴入BrdU使其终浓度为0.1 mmol/L,并继续培养。每天换液1次,前5天均使用BrdU。而后对培养细胞进行形态学观察。①倒置显微镜观察培养细胞:在倒置显微镜下观察培养窦房结细胞的形态大小、搏动频率(用手按计数器计数)。②培养细胞的光镜观察(HE染色):将生长于盖玻片上的培养细胞酒精固定后进行常规HE染色后置于光镜下观察。③培养细胞的透射电镜观察:用0.08%胰酶将培养细胞消化成单细胞悬液后,以2.5%戊二醛固定后送电镜室脱水、包埋、切片,置于透射电镜下观察。

另取乳鼠左心房壁心肌细胞,按上述方法进行培养及观察,以作对照。

文中数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用医用统计程序包SPLM软件,做t检验。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察

培养至第5天,经倒置显微镜观察,见培养的窦房结细胞有3种形态,即梭形、三角形与不规则形,见图1。其中梭形细胞最多,同期对照培养的心房肌细胞主要为三角形及不规则形,而无梭形细胞。培养细胞的形态大小及搏动频率详见表1。

由表1可知,在培养的窦房结细胞中,梭形细胞数目最多,体积较三角形细胞小,但搏动频率较三角形细胞快($P<0.01$)。而同期培养的心房肌细胞中无梭形细胞,其三角形细胞的形态、大小及搏动频率与培养窦房结的三角形细胞相似。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770324)
作者简介:钟 理(1972-),男,四川省简阳市人,硕士,医师,主要从事心脏电生理方面的研究,共发表论文6篇。电话:(023)68754000-73050
收稿日期:2001-05-09;修回日期:2001-07-09

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

表1 培养细胞的形态、搏动频率及所占比例

Tab 1 Morpholgy, spontaneous contraction frequency and percentage of cultured cells

Tisuues	Cell type	Contraction Frequency		Length(um)	Diameter(um)	%	n
		Range(/min)	Mean±SEM(/min)				
SAN	Spindle	100~210	166±7	62.5±9.1	18.3±3.0	68±5	85
	Triangle	85~140	110±5★	80.7±12.0◆	30.1±8.0◆	23±3	72
	Inregular	...	...	53.8±6.5	50.3±6.3	9±1	30
Atrium	Triangle	80~145	107±6★	81.2±10.1◆	31.7±9.0◆	85±5▲	75
	Ingular	...	...	56.1±5.8	51.2±4.9	15±3	70

★: $P<0.01$, ◆: $P<0.05$ *vs* Spindle; ▲: $P<0.01$ *vs* Triangle from Atrium

2.2 HE 染色 光镜观察及透射电镜观察

对培养的窦房结细胞进行 HE 染色光镜观察及透射电镜观察，见三种不同形态细胞的特征如下：① 梭形细胞：胞体呈梭形，胞核中等大小，呈椭圆形，位于胞体中央，胞浆染色较深。电镜下核仁明显；线粒体少；内质网、高尔基复合体不发达；糖原颗粒不丰富；肌原纤维不发达，于核周散在分布，无肌节；未见电子致密颗粒，见图2。② 三角形细胞：胞体呈三角形或不规则三角形，核椭圆，中等大小，位于中央。线粒体丰富；内质网、高尔基体发达；电子致密颗粒丰富；肌原纤维发达，与长轴平行，有完整肌节和Z线，见图3。③ 不规则形细胞：胞体呈不规则多边形，胞浆深染。线粒体、高尔基体发达，未见电子致密颗粒和肌原纤维。

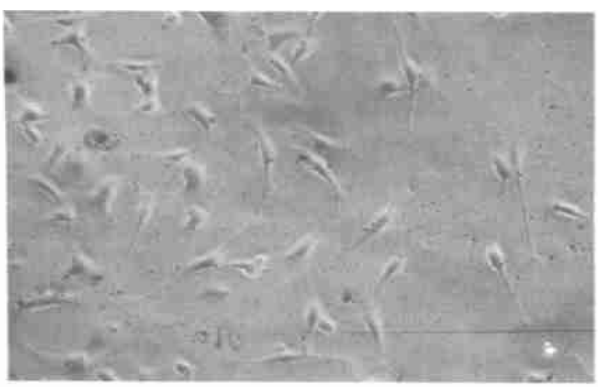


图1 培养 **5 d** 的窦房结细胞，可见较多的梭形细胞，少量三角形及不规则形细胞 （×200）

Fig 1 Much spindle cells and few triangle and irregular cells seen in the 5-day culture medium （× 200）

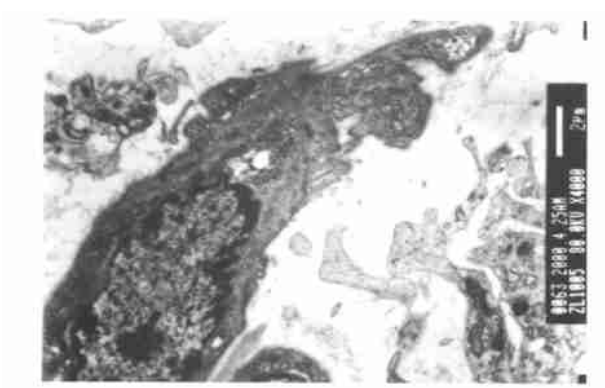


图2 培养 **5 d** 的窦房结细胞中梭形细胞电镜观察，可见少量肌原纤维，其他细胞器不发达 （TEM×4 000）

Fig 2 Undeveloped myofibrils and other organelles seen in cultured spindle cells in 5-day culture medium （TEM×4 000）

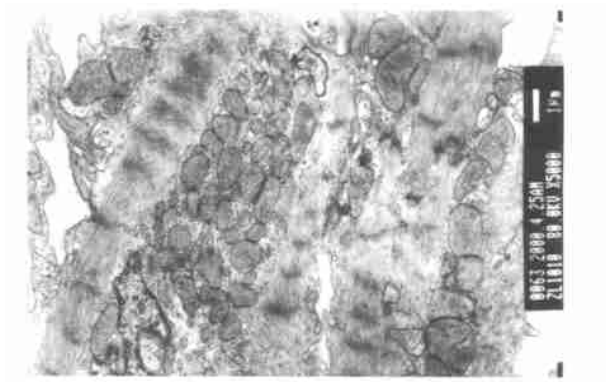


图3 培养 **5 d** 窦房结细胞中三角形细胞电镜观察，可见丰富肌原纤维，其他细胞器发达 （TEM×5 000）

Fig 3 Developed myofibrils and other organelles seen in cultured triangle cells in 5-day culture medium （TEM× 5 000）

3 讨论

有关窦房结细胞的形态学特征，国外已有少量文献报告，Marvin 等[3] 认为窦房结细胞是一种体积小而搏动频率快（185±8/min）的梭形细胞，而心房肌细胞呈多边形、较大、搏动频率较慢（112 ±5/min）。Nathan[4] 观察到培养兔窦房结细胞主要有两种，呈纺锤状的Ⅰ型细胞可能来源于窦房结的起搏中央区，呈球形的Ⅱ型细胞最初呈棒状，在培养 1~2 d 后，“圆聚”（Rounding up）成球形，该细胞可能来源于窦房结外周区。Denyer 等[5] 应用一种可维持窦房结细胞正常形态的酶解分离法，所获得的窦房结细胞也呈长棒状（长 100 μm，宽 10 μm）。我们在培养的窦房结细胞中观察到3种不同形态的细胞，其中以梭形为主，其次是三角形细胞及少量的不规则形细胞，且以梭形细胞搏动频率最快（166±7/min），三角形细胞虽有搏动，但频率慢于梭形细胞，此外，培养窦房结细胞中的三角形细胞与培养心房肌三角形细胞的形态大小及搏动频率均无显著差异。此结果与国外报道相似，故认为培养窦房结细胞中的梭形细胞可能是窦房结起搏细胞。对完整窦房结的组织学研究提示窦房结细胞的形状呈梭形[6]，也支持我们的推测。

本实验结果表明，梭形细胞肌原纤维不发达，仅可见少量成束肌原纤维于核周散在，无完整肌节；未见电子致密颗粒；线粒体不丰富，嵴少；内质网、高尔基复合体不发达，而此结果与 Marvin 等的实验结果相似。Marvin 等比较了原位窦房结细胞和培养窦房结细胞的电镜观察结果，发现两种条件下梭形细胞的超微结构近似。梭形细胞最具特征性的结构特点是这些细胞的肌原纤维稀疏与排列紊乱。这一结构特征可以解释倒置镜下发现梭形细胞的搏动强度一般弱于心肌细胞的搏动强度。本实验发现梭形细胞的细胞器少，也符合原位观察到的窦房结细胞的结构“空虚”的特点[7,8]。透射电镜观察窦房结三角形细胞与心房肌三角形细胞

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

结构相似，细胞的肌原纤维发达，多与长轴平行，有完整肌节和 Z 线；细胞器发达；有丰富的电子致密颗粒，由此推测培养窦房结细胞中的三角形细胞可能系取材时附带的心房肌细胞。

综上所述，在培养的乳鼠窦房结细胞中，细胞形态呈梭形、搏动频率最快、肌原纤维稀疏排列紊乱、细胞结构空虚等特点可作为鉴定窦房结细胞的形态学依据。

参考文献：

[1] 钟　理，宋治远. 乳鼠窦房结细胞取材与纯化培养方法的探讨[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2000，3(4)：174－176.
[2] Hyde A, Blonde B, Matter A, *et al*. Homo－ and heterocellular junctions in cell cultures: an electrophysiological and morphological study[J]. Prog Brain Res, 1969, 31(6): 283－294.
[3] Marvin W J, Jane K. The isolated sinoatrial node cell in primary culture from the newborn rat[J]. Circ Res, 1984, 55(9): 253－260.
[4] Nathan R D. Two electrophysiologically distinct types of cultured pacemaker cells from rabbit sinoatrial node[J]. Am J Physiol, 1986, 250(2): H325－H329.
[5] Denyer J, Brown H. A methol for isolating rabbit sinoatrial node cells which maintains their natural shape[J]. Jap of Physiol, 1987, 37(7): 963－965.
[6] Lrisauwa H, Brown H F, Ghes W. Cardiac pacemaker in the sinoatrial node [J]. Physiol Rev, 1993, 73(9): 197－227.
[7] Masson P M, Bleeker W K, Blesseen E, *et al*. Pacemaker cell types in the rabbit sinus node. A correlative ultrastructure and electrophysiological study [J]. J Mol Cell Cardiol, 1984, 16(11): 53－63.
[8] Bouman L M, Jongsma H J. Structure and function of the sino-atrial node: A review[J]. Eur Heart J, 1986, 7(1): 94－104.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2002)04-0433-01

个案与短篇

PVP-I 治疗急性冠周炎的临床效果

The clinical effect of PVP-I on acute pericoronitis

游古莲，裘松波，周正贵，张　刚　（第三军医大学附属新桥医院口腔科，重庆 400037）

碘复（聚乙烯吡咯酮碘 Polyvinylpyrrolidone-iodine，PVP-I）作为一种性能优良的广谱消毒杀菌剂在国内外已被广泛应用于临床[1]。我科自 1998 年 9 月以来应用 PVP-I 冲洗智齿冠周盲袋治疗急性冠周炎，疗效满意，现报告如下。

一般资料：下颌智齿阻生伴急性冠周炎患者 105 例，男 50 例，女 55 例，年龄 18～37 岁，将病员随机分成 PVP-I 组 53 例和对照组 52 例。

病例选择：纳入标准，因下颌第三磨牙阻生引起冠周龈组织红肿、疼痛剧烈，张口受限，冠周盲袋溢脓，且病史长达 1 年以上，反复发作 5 次以上者；排除标准：伴有严重全身感染，系统性疾病，同时服用其他抗生素者，以及不能随诊病人。

方法：PVP-I 组：先用生理盐水冲洗盲袋，局部试干后，用 0.5%(g/ml)PVP-I 液 1 ml 缓慢冲洗冠周盲袋。对照组用生理盐水和 3% 双氧水反复冲洗盲袋，消毒棉球吸干多余药液后，用 2%碘甘油滴入盲袋。每日 1 次，连续 3 次，两组病例均给口服伊斯美胶囊（内含甲硝唑和无味红霉素）2 粒，3/d，连服 3 d。嘱病员 3 d 后复诊。

观察方法和指标：采用单盲法，病员初诊和复诊时均由同一医师进行诊查记录和治疗。

主观症状：疼痛、冠周红肿、面部肿胀、张口困难、发烧及进食困难等。客观检查：冠周牙龈红肿、盲袋溢脓、面部肿胀及张口度等。

疗效标准：显效：疼痛消失，局部红肿及面部肿胀明显减轻，盲袋内无溢脓，张口度正常；有效：疼痛减轻，冠周牙龈红肿仍存在，盲袋内分泌物减少，张口度有改善；无效：症状、体征都无改善或加重。

经统计学分析：$\chi^2 = 10.93$，$df = 1$，$P < 0.05$，相差显著，表明 PVP-I 组疗效满意，见表 1。

表 1　两组疗效比较

组别	n	显效		有效		无效	
		n	%	n	%	n	%
PVP-I 组	53	42	79.25	8	15.09	3	5.66
对照组	52	24	46.15	22	42.31	6	11.54

讨论

冠周炎是厌氧菌与需氧菌的混合感染。碘复是一种高效广谱消毒杀菌剂，对口腔内各种 G^+ 和 G^- 菌的厌氧菌或需氧菌都有着强烈的杀灭和抑制作用[2]，其作用机制为：PVP-I 中的表面活性剂并无抗菌作用，但表面活性剂可穿透细胞膜，从而使 PVP-I 进入细菌体内，释放出双原子游离碘（I_2）作用于胞浆和胞膜，使细胞内硫氢化物、蛋白质、酶、VitC、脂质及细胞素等物质被氧化而失去活性，从而瞬间杀灭细菌。PVP-I 对各种厌氧菌的最低有效浓度为 0.01%。0.5%(g/ml)PVP-I 用于冲洗冠周炎盲袋，显然有更强的杀菌、抑菌作用。

PVP-I 冠周冲洗，除机械冲洗作用外，药物可以潴留于冠周局部盲袋内，抑菌作用更持久，因而显效快，疗程短。此外，碘伏无毒，对组织无刺激，不易产生耐药性，使用安全简便，且价格低廉，患者易于接受。

关键词：碘复；急性冠周炎；冲洗
中图法分类号：R782.31　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 沈俊士，周云柏. 固体碘伏液消毒感染根管应用分析[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志，1998，8(3)：214.
[2] 唐子圣，尹仕海. 碘复的口腔临床研究与应用[J]. 国外医学：口腔医学分册，1998，25(1)：11－12.
[3] 邓惠姝，赵雪梅. 碘复和氢氧化钙对感受染根管内厌氧菌的药敏研究[J]. 华西口腔医学杂志，1992，10(3)：151－152.

（编辑　潘式文）

作者简介：游古莲（1964－），女，重庆市垫江县人，主管技师，主要从事口腔内科方面研究，发表论文 20 篇。电话：(023) 62530968

收稿日期：2001-05-15；修回日期：2001-07-05

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