较小的细胞则沉降到离心管的底部。大细胞培养48 h后给予有丝分裂抑制剂,使得神经元的纯度达到85%左右。用这种方法分离的神经细胞生物活性基本未受到影响,生长状态稳定,可用于神经生理、神经病理、神经药理、神经营养因子家族等的研究。另外,体外培养的神经元在细胞行为和形态上都发生了一定的变化,使得神经元与非神经元很难区别,因而要借助神经元分子标志物才能鉴定。神经丝蛋白(Neurofilament proteins,NFPs)是神经元特异的蛋白,属于中间丝蛋白家族成员之一,为细胞骨架组分[9],它主要分布于核周及突起内,可用作神经元的分子标志物。

3.3 神经元的生长规律

原代培养胎鼠脊髓前角神经元接种24 h部分神经元已长出突起,细胞由圆形变成多角形,72 h突起增多延长,胞体长大,培养的第5~7天时突起粗大,并交织成网,7 d后突起逐渐萎缩,胞体面积变化不大。因此体外脊髓前角神经元在培养的第5~7天是神经元形态及功能测试的最佳时期。

关键词:神经元;组织培养;胎鼠
中图法分类号:R322.81 文献标识码:B

参考文献:

[1] Camu W, Henderson C E. Purification of embryonic rat motoneurons by panning on a monoclonal antibody to the low-affinity NGF receptor[J]. J Neurosci Methods, 1992, 44(1): 59-70.
[2] 窦月梅,鲍 旋.神经细胞培养中关于取材动物的年龄问题[J].解剖学杂志,1992,15(2):126.
[3] 吴希如.哺乳动物胚胎神经细胞的原代分离性单层培养及其应用[J].生理科学进展,1984,15(3):208-213.
[4] Altman J. Programmed cell death: the paths to suicide[J]. Trends Neurosci, 1992, 15(8): 278-280.
[5] Oppenheim R W. Cell death during development of the nervous system[J]. Annu Rev Neurosci, 1991, 14: 453-501.
[6] 严恒林,沈磬亚,刘才栋,等.人胎儿雪旺氏细胞的体外培养及其纯化研究[J].神经解剖学杂志,1994,10(2):289-293.
[7] 沈磬亚.神经培养基本技术[M].上海:上海医科大学出版社,1990.52-55.
[8] 苏拔贤 主编.生物化学制备技术[M].北京:科学出版社,1986.173-177.
[9] 米瑞发,范 明,周长满.神经丝磷酸化及其生理病理作用[J].神经解剖学杂志,1998,14(2):199-202.

(编辑 汪勤俭)

技术方法

文章编号:1000-5404(2000)05-0498-03

培养细胞牵张刺激装置的建立及初步应用

Establishment and preliminary application of a strectch device for cell culture

冯 兵[1],何作云[1],王德文[2],罗惠兰[1] ([1]第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要:目的 为进一步探讨细胞机构感受机制,建立一套实用的培养细胞牵张刺激模拟装置。方法 用有机玻璃和可变形膜设计制作一套培养细胞牵张刺激模拟装置,并用同位素标记氨基酸和核苷酸掺入法作初步应用评价。结果 应用自行设计制作的两个模型,对培养细胞进行较强的牵张刺激,发现20%的拉长或12 kPa负压的球面牵张对培养心肌细胞的数量和乳酸脱轻酶释放均无影响;但可显著刺激培养心肌细胞^{3}H-亮氨酸及成纤维细胞^{3}H-TdR的掺入。结论 初步应用说明该装置结构简单实用。

1979年Vanderburg等[1]首次应用弹性基底膜(Elastic substrate)培养骨胳肌细胞获得成功,并证实肌细胞可直接感受静态牵张引起的机械刺激,引起细胞蛋白质合成速率显著增加。90年代初期,Banes等[2]首先建立了一套计算机控制的循环牵张模型,较好地解决了自动控制及力学参数量化难题,但其售价昂贵。我们建立了一套培养细胞牵张刺激装置,初步应用,证明其简单实用,现报告如下。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600041)
作者简介:冯 兵(1967-),男,四川省遂宁市人,博士,主治医师,主要从事心肌肥大方面的研究,发表论文20篇。电话:68755114-74603
收稿日期:1999-06-30;修回日期:2000-03-20

1 材料与方法

1.1 牵张刺激装置的制作

如模式图1、2,制作模型1,模型2。所用材料为有机玻璃,真空橡胶,不锈钢板、管及蝶型螺丝。

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

1.2　细胞培养

参照 Simpson[3] 方法进行心肌细胞和成纤维细胞的培养。硅酮膜事先涂上 0.25 mg/ml 的鼠尾胶原作为粘附基质。

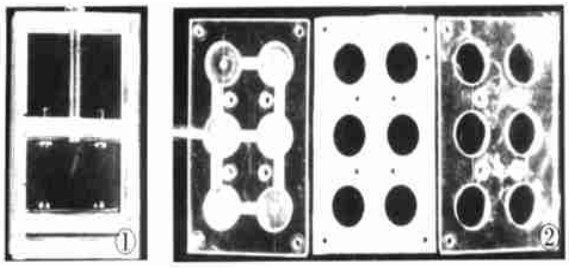


图 **1**　平面牵张模型
图 **2**　球面牵张模型

1.3　牵张实验

使用模型时, 先精确测量出静止状态下两夹板间硅酮膜的长度, 在按 20% 牵张拉长[3]。使用模型 2 时, 用三通管一端与不锈钢管连接, 一端与水银血压计连接, 一端与 50 ml 注射器连接, 反复抽气达到负压 12 kPa[2], 使硅酮膜呈半球形均匀伸长 20%。

1.3.1　乳酸脱氢酶测定　　分别在牵张后 24、48、72、96 h 收集培养上清, 按常规生化方法测定乳酸脱氢酶活性。

1.3.2　^{3}H-亮氨酸掺入实验　　原代培养第 4 天的心肌细胞换以无血清 DMEM 培养 24 h 后, 按 1 μCi/ml 培养基加入^{3}H-亮氨酸。分别牵张培养 24、48、72、96 h 后, 用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 冲洗去游离同位素, 加 0.1% 胰酶-0.02% EDTA 混合消化液使细胞脱离培养膜, PBS 洗涤后计数, 再用 1% SDS 破碎细胞, 20% 三氯醋酸沉淀蛋白, 将此混悬液抽滤在玻璃纤维滤膜上, 取下膜于 80°C 30 min 烘干。然后进行液闪测量。

1.3.3　^{3}H-TdR 掺入实验　　同上述程序测定成纤维细胞制成细胞^{3}H-TdR 掺入能力。每时相点重复四次实验。

1.4　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 t 检验作组间显著性检验。

2　结果

2.1　牵张对培养心肌细胞数量和代谢的影响

用涂贴附基质胶原的方法限制细胞生长范围, 实验发现相同培养面积, 牵张组与对照组比较, 不仅心肌细胞数量差异无显著性(2.13×10^5/ml:2.12×10^5/ml), 而且培养上清中乳酸脱氢酶活性差异也不显著, 见图 3。提示, 模拟生理状态的牵张参数对培养心肌细胞无明显损伤。

2.2　牵张刺激对培养心肌细胞形态的影响

硅酮膜涂以鼠尾胶原显著增加细胞贴壁能力, 提高接种成活率。非牵张对照组培养的心肌细胞与普通培养瓶培养的形态基本一致即成纤维细胞型, 排列方向各异。20% 牵张后, 顺牵张方向细胞明显被拉长、宽度变窄, 同时垂直牵张方向的细胞长度变短、宽度增大。牵张 2~3 d 的细胞排列方向趋向于顺牵张方向生长。

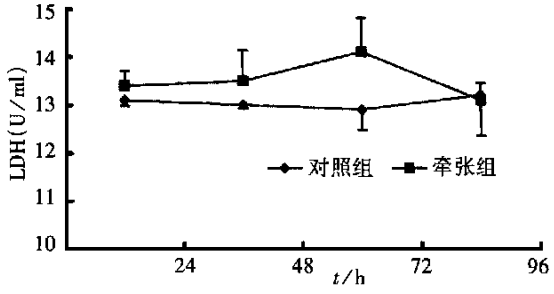


图 **3**　牵张刺激对心肌细胞乳酸脱氢酶释放的影响

2.3　心肌细胞^{3}H-亮氨酸掺入变化

20% 牵张后, 心肌细胞^{3}H-亮氨酸掺入逐渐增多, 24、48、72、96 h 时点与对照组比较差异均有显著性, 见图 4, 即表明心肌细胞蛋白质合成速率显著提高, 提示牵张刺激可快速诱导心肌细胞肥大。

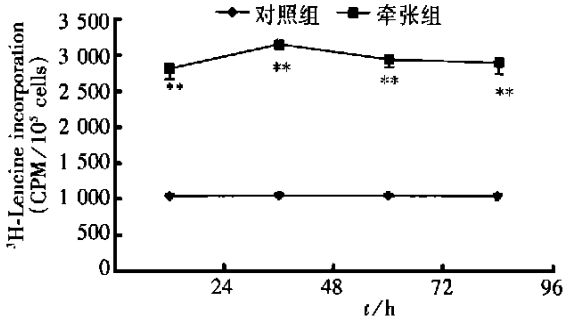


图 **4**　牵张刺激对心肌细胞亮氨酸掺入的影响
**: $P<0.01$ 与对照组比较

2.4　成纤维细胞^{3}H-TdR 掺入实验

成纤维细胞在受到牵张刺激后, ^{3}H-TdR 掺入逐渐增多, 牵张后 24、48、72、96 h^{3}H-TdR 掺入率均显著高于对照组, 细胞计数也提示牵张刺激能显著诱导成纤维细胞增殖, 见图 5。

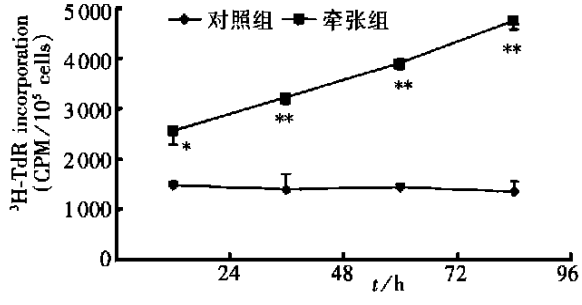


图 **5**　牵张刺激对成纤维细胞^3**H-TdR** 掺入的影响
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ 与对照组比较

3　讨论

随着细胞生物力学的发展, 人们逐渐发现许多哺

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

乳动物细胞均具有机械感受功能——即将力学刺激转变为细胞内的电化学信号的机制[4]，但目前对于细胞机械感受器或称机械受体的本质了解甚少。90 年代以来，国外在模拟装置研究方面有较大进展[2]，但其仪器价格昂贵。

我们参照国外报道自行设计建立了一套培养细胞牵张刺激装置，即可作细胞线性拉长实验，也可作球面牵张。与国外装置比较，该装置结构简单，制作方便，不仅价格低廉，而且操作定量化。初步应用表明，模拟心脏生理情况的 20%牵张对培养细胞贴壁及存活均无影响，而且证实这种牵张刺激可显著诱导心肌细胞蛋白质合成(即 心肌细胞肥大反应)和成纤维细胞的增殖反应。该装置为一次性静态牵张，若需进一步改为循环牵张，只需加装一个负压发生器和时间控制电路即可达到目的。

关键词：牵张刺激；细胞培养

中图法分类号：R－331 文献标识码：B

参考文献：

[1] Vandenburg H H, Kaufman S. *In vitro* model for stretch-induced hypertrophy of skeletsl muscle[J]. Science, 1979, 203(4 377): 265－268.

[2] Banse A J, Gilbert J, Taylor D. *et al*. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells *in vitro*[J]. J Cell Sci, 1985, 75(1): 35－42.

[3] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines[J]. Circ Res, 1982, 51(6): 787－801.

[4] 冯 兵. 心肌肥大的细胞外信号机制[J]. 心血管病学进展, 1997, 18(1): 24－26.

(编辑 薛国文)

技术方法

文章编号：1000-5404(2000)05-0500-02

大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外培养和鉴定

Culture and identification of rat alveolar type Ⅱ cell *in vitro*

郝 嘉[1]，李永旺[2]，肖颖彬[1] (第三军医大学附属新桥医院：[1] 心血管外科；[2] 麻醉科，重庆 400037)

提 要：目的 建立大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(简称 AT-Ⅱ)的改良体外原代培养法，并比较其鉴定方法的优劣。方法 AT-Ⅱ分离、用胰蛋白酶消化法并用 IgG 包被的培养瓶粘附纯化，原代培养后通过鞣酸多彩、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、肺表面活性物质相关蛋白 A(SP-A)免疫组化三种染色法和电镜鉴定 AT-Ⅱ。结果 胰酶消化加 IgG 粘附纯化后所得的 AT-Ⅱ纯度为 90%，AKP 染色鉴定最好。结论 采用 IgG 粘附纯化能提高 AT-Ⅱ纯度，AKP 染色简便实用。

AT-Ⅱ对维持正常的肺功能发挥着极重要的作用。体外培养 AT-Ⅱ是研究其特性的重要手段，由于它培养后表型丧失快，基本不传代，并且培养难度较大，不易获得较高纯度，故本研究采用一种改良方法培养并比较了四种鉴定方法的优劣。

1 材料和方法

1.1 原代培养

参照 Dobbs[1] 的方法加以改进。Wistar 大鼠麻醉、抗凝，气管插管，放血活杀。经肺动脉用溶液Ⅱ(液Ⅰ、Ⅱ配法见文献[1])灌洗肺，气管通气 8 次，用溶液Ⅰ、Ⅱ分别经气管插管灌洗肺，用溶液Ⅱ灌洗胸腔。取出心肺、气管，经气管插管注入 0.25%胰蛋白酶 20 ml，37℃水浴 20 min。去大气道、心脏，在含有 4 ml DNase 的小烧杯中剪碎肺。5 ml 小牛血清灭活胰酶，补足溶液Ⅱ20 ml 后倒入烧瓶，37℃水浴并晃动 5 min。120、200 目滤网过滤，离心后弃上清，细胞重悬并计数。将悬液加入已用大鼠 IgG 包被的培养瓶中培养。1 h 后倒出培养液，离心后弃上清，取少量细胞行电镜鉴定。培养 23 h 换培养液。

1.2 细胞鉴定

1.2.1 鞣酸多彩染色 参照 Mason 等[2] 的方法略加改进：取出培养有 AT-Ⅱ的盖玻片，PBS 冲洗，1.5%戊二醛固定 15 min，PBS(pH 6.8)冲洗 2 次，1%锇酸(校电镜室)固定 1.5 h，PBS(pH 6.8)冲洗 2 次，1%鞣酸中过夜，用 PBS(pH 6.8)和水各洗涤 2 次，将蓝染液(蓝染液和红染液配法见文献[2])与水按 1∶4 稀释后染色 8 s。1%NaOH 洗涤 30 s，红染液染色 2 s，酸乙醇液洗涤 3 次，用红染液染 2 s，水洗 3 次，干燥后封片。

1.2.2 AKP 染色 参照 Cunningham 等[3] 的方法略加改进：

作者简介：郝 嘉(1973－)，男，四川省荣县人，硕士研究生，医师，助教，主要从事体外循环肺保护方面的研究。电话：(023)65218768

收稿日期：1999-10-05；修回日期：2000-01-03

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