进,使之更方便实用。下面总结的是有关封接前的两个关键技术环节与我们的做法。

3.1 电极位置显示

“盲法”技术目前国内成功开展的尚不多,究其原因主要是电极在推进过程中电极位置显示方法与技术尚不成熟,电极接触神经元的成功率低,导致记录成功率不高。我们的工作采用了经过一定程度改进的电极定位显示方法,使成功率保持在令人基本满意的水平。这项技术的特点是:电极周围环境的较小变化即可通过电阻值变化又可同时通过电流曲线的变化来指示,精确而直观。在实验中我们体会到,电阻与电流曲线的任一微小变化,都可反映出电极所处的位置。一旦电阻突然变大,将电极再推进少许,电阻值又不发生明显变化,此时即可认为电极已与细胞膜处在理想的接触位置上。

3.2 脑片准备

脑片无论是来自胎鼠还是来自成年鼠,其实验成功率并无明显差别,但在实验设计许可的情况下,尽量选择 3~5周龄的大鼠较好,这样可减少脑片准备的难度。进入浴槽的脑片,最好先在显微镜下观察大体结构是否完整、清晰。另外,为避免无谓地在同一脑片进行反复的封接尝试,随时确定脑片神经元是否处在良好的生理状态非常必要。我们发现如电极在接近胞膜过程中,电阻增大不明显,且又较快变小,细胞的状态可能不是最佳。接连出现这样情况,应考虑更换脑片。要保持细胞的状态,必须减少不必要的损害,注意准备和记录过程中 ACSF的灌流。我们采用了自己设计的浴槽,其特色是:整体容积小,网底容积更是控制在最小限度;网连同脑片可任意调整位置。优点是脑片得到有效灌流的同时,脑片稳定性好,ACSF更换速度快,操作方便。

关键词 脑片;封接;膜片钳方法
中图法分类号 R33-33 文献标识码 B

参考文献

[1] Blanton M G, Lo Turco J J, Kriegstein A R. Whole-cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex[J]. J Neurosci Meth, 1989, 30(3): 203-210.

[2] Chen W R, Midtgaard J, Shepherd G M. Forward and backward propagation of dendritic impulses and their synaptic control in mitral cells[J]. Science, 1997, 278(10): 463-467.

[3] Malinow R, Tsien R W. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recording of long term potentiation in hippocampal slices[J]. Nature, 1990, 346(8): 177-180.

[4] Manabe T, Renner P, Nicoll R A. Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents[J]. Nature, 1992, 355(12): 50-55.

[5] Kato K, Clifford D B, Zorumski C F. Long-term potentiation during whole-cell recording in rat hippocampal slices[J]. Neuroscience, 1993, 53(4): 39-47.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(1999)12-0935-02

毛囊真皮鞘成纤维细胞的培养

Culture of fibroblasts in dermal sheath hair follicle

钟白玉,吕中法,刘荣卿,伍津津 (第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

【提要】 目的:为了解真皮鞘成纤维细胞的生物学特征。方法:采用酶消化法、组织块法分别进行毛囊真皮鞘成纤维细胞培养。结果:2种方法均获成功。培养的真皮鞘成纤维细胞具有聚集生长的特征,胞体较大,一般有 2个突起;酶消化培养法操作简便、省时,但容易混有其它成纤维细胞;组织块法培养的细胞虽然培养速度较慢,但纯度较高。结论:组织块法是进行毛囊真皮鞘成纤维细胞研究较理想的培养方法。

脱发在临床上十分常见,一些难治性脱发如早秃目前尚无有效的治疗方法。一些研究显示毛乳头细胞在诱导毛囊再生和毛发生长周期的调控中起重要作用,已有报告毛乳头细胞在体内条件下可诱导出完整的毛囊,并且长出毛干[1]。真皮鞘是围绕毛囊最外层的真皮源性组织,有研究认为真皮鞘细胞是毛乳细胞的

作者简介:钟白玉,男,1958.09.25生,四川省邻水县人,主管技师,主要从事皮肤病理方面的研究,发表论文 11篇。电话:(023)68754114-73108

收稿日期:1999-05-01;修回日期:1999-07-15

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

储备细胞[2]。本文用酶消化法、组织块法分别对真皮鞘成纤维细胞进行培养,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 头皮标本的采集和处理

全层头皮(死后 6 h内)取自肾移植尸体,存放于 D-Hank's液中,在净化工作台中剃除头发,75%酒精擦 2遍,D-Hank's液反复冲洗 3遍,每次 3~5 min,去除皮下筋膜后剪成 0.3~0.5 cm宽的皮条,从真皮与皮下组织交界处剪开。

1.2 真皮鞘成纤维细胞的培养

1.2.1 酶消化法 把上述皮下组织部分置入 0.5%(PBS配制)的分离酶(Sigma产品)中,4℃消化 18 h D-Hank's液冲洗 2遍,用镊子挤出毛囊的上皮部分,置入 0.2%(DMEM配制)胶原酶 D(DMEM、胶原酶均为 Sigma产品)消化,37℃直至真皮鞘消化成游离细胞,而毛乳头尚未开始消化时为止,约需 6~8 h,用 D-Hank's液 2 000 r/min离心 3次,每次 3 min,然后加入 DMEM,低速离心 200~300 r/min 3 min,取上清计数,按 1×10⁵瓶,接种到 25 ml培养瓶中进行真皮鞘成纤维细胞的培养。

1.2.2 组织块培养法 参照 Katsuoka法[3],略加改进。取部分上述分离的皮下组织,将毛囊从皮下组织中拔出,在解剖显微镜下机械分离出毛囊的上皮部分和真皮鞘,用 7号针头(将针尖变成 90°)将真皮鞘下部侧面切一小口,轻轻挤出毛乳头,从蒂部切断,把去毛乳头的真皮鞘剪成粟粒大小的组织块,或把整个真皮鞘直接涂布在 25 ml培养瓶(鼠尾胶原处理过)上进行真皮鞘成纤维细胞的培养。

1.3 细胞传代及计数

真皮鞘成纤维细胞融合后,用 0.25%胰酶消化传代、计数、并将其接种到 24孔板中,隔日计数,共 7个时相点,绘成生长曲线。

2 结果

2.1 酶消化法

胶原酶消化后的真皮鞘成纤维细胞,12 h后大部分细胞即贴壁,长出细胞突起,无明显的停滞期即进入指数生长阶段。

2.2 组织块法

组织块培养法细胞生长缓慢,有明显的停滞期,约需 10 d左右,细胞才开始从组织块中长出,随着生长细胞的增多,生长速率逐渐加快,在第 18天左右细胞进入指数生长阶段。

2.3 真皮鞘成纤维细胞的特征

真皮鞘成纤维细胞成以梭形为主,当细胞密度较低时呈聚集性生长的特征,一般有 2个胞质突起,少数可有 3~4个胞质突起,胞体狭长、胞浆较少,随后细胞向四周呈放射状生长,融合后呈平行排列,传代在 10代内细胞形态变化不明显。

2.4 生长曲线

根据各时相点测得的细胞数绘成生长曲线图,见图 1。

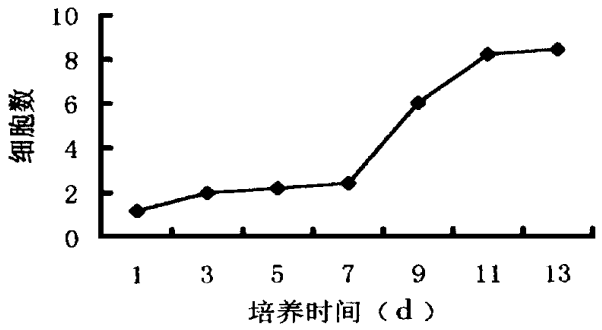


图 1 真皮鞘成纤维细胞生长曲线图

3 讨论

毛囊各种细胞成分的培养是进行毛囊细胞生物学研究的基础,我们用酶消化法和组织块法对真皮鞘成纤细胞的培养均获成功,酶消化法具有细胞生长速度快、培养时间短、工作量相对较小等优点,但容易有成纤维细胞污染,实验中我们发现,该法培养的真皮鞘成纤维细胞中,带 3~4个胞质突起的细胞较组织块法多,是否为头皮成纤维细胞污染尚需进一步鉴定。组织块法培养的真皮鞘成纤维细胞虽然速度较慢,但其生长的细胞形态、大小比较一致,与 Katsuoka等[3]报告的基本一致。

真皮鞘成纤维细胞在胚胎发育、形态学和生物学行为特征上与毛囊的毛乳头细胞是紧密相关的,它们都具有聚集生长的特征,胞体相对较头皮成纤维细胞者大,胞质突起较少,一般只有 2个。免疫组化发现这 2种细胞均有 α-平滑肌肌动蛋白表达,而其它成纤维细胞则没有[4],真皮鞘成纤维细胞和毛乳头细胞的这些特征很可能与其功能相关,有研究发现真皮鞘成纤维细胞在合适的条件下,可被诱导形成毛乳头,进而诱导毛囊形成,揭示真皮鞘成纤维细胞在毛囊细胞生物中起着重要作用[2]。

关键词 真皮鞘成纤维细胞;组织块培养法
中图法分类号 R322.99;R329.2 文献标识码 B

参考文献

[1] Reynolds A J, Jaoda C A. Hair follicle reconstruction *in vitro*[J]. J Dermatol Sci, 1994, 7(Suppl): 84-97.
[2] Messenger A G. The control of hair growth: An overview[J]. J Invest Dermatol, 1993, 101(1 Suppl): 4s-9s.
[3] Katsuoka K, Schell H, Hornstein O P, *et al*. Comparative morphological and growth kinetics studies of human hair bulb papilla cells and root sheath fibroblasts *in vitro*[J]. Arch Dermtol Res, 1986, 279(1): 20-25.
[4] Jahoda C A, Reynolds A J, Chaponnier C, *et al*. Smooth muscle α-actin is a marker for hair follicle demis *in vitro* and *in ivtro*[J]. J Cell Sci, 1991, 99(Pt 3): 627-636.

(编辑 薛国文)

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