DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.008

成纤维细胞胶原凝胶培养研究*

伍津津** 刘荣卿 叶庆俏 唐书谦 钟白玉 (第三军医大学附属西南医院皮肤科)重庆,400038

提 要 目的:建立一种成纤维细胞的三维培养方法。方法:将胶原、成纤维细胞、血清和培养基在正确的比例下混合,便可形成凝胶。结果:在凝胶中成纤维细胞具有良好的活力,使之形成有一定弹性和抗拉伸能力的凝胶块。结论:真皮替代物培养是研究成纤维细胞与细胞外基质间相互作用的良好模型。

关键词 成纤维细胞;胶原;真皮替代物

中图法分类号 R329.2

细胞三维培养的建立,是细胞培养技术的一场革命,开创了一门崭新的学科,即组织工程学。活性皮肤替代物(Aliving skin equivalent)对研究细胞的生长、分化、增生及真表皮间的相互作用具有重要意义[1],也是研制大面积创面覆盖物——复合皮的一条重要途径。而成纤维细胞胶原凝胶(即真皮替代物)是这种器官型培养的基础[2]。

1 材料与方法

1.1 胶原

实验所用胶原为酸溶性鼠尾胶原,其主要成分为Ⅰ型胶原。参照文献[1]的方法稍有改良进行提取。离心后冻存于-20℃冰柜备用。另取少量用751紫外分光光度计测得蛋白浓度为1.0~1.5 mg/ml。

1.2 包皮成纤维细胞的培养

应用组织块培养法进行正常包皮成纤维细胞的原代培养。用含10%新生牛血清DMEM(Sigma)进行培养,每3天换液1次。3~4周后原代培养细胞生长成细胞单层,用0.25%胰蛋白酶消化后,按1∶2或1∶3的比例分种传代培养。

1.3 细胞胶原凝胶的制作

①将第5~12代处于指数生长期的细胞用0.25%胰蛋白酶消化后制成悬液,计数,取6×10^5个细胞离心,加入新生牛血清0.5 ml。②吸4 ml鼠尾胶原溶液放入冰浴中的青霉素小瓶中,加0.5 ml浓缩10倍的DMEM培养基,及时混匀,平衡温度后加入0.1 ml 1 mol/L NaOH以中和醋酸,快速混匀,确定pH为7.4后立即加入新生牛血清细胞悬液,快速混合,然后吸到24孔板中,每孔0.8 ml,共6孔。静置10 min内便很快形成细胞凝胶,加入10%新生牛血清DMEM培养基行培养,每周换液2次,每日观察细胞的形态和收缩情况。

1.4 组织学检查

培养1~3周,用Bouin's液固定24 h,常规组织切片,切片4μm厚,HE染色,镜下观察。

2 结果

2.1 细胞的形态与分布

成纤维细胞胶原凝胶形成后呈半透明状,约2 h后经胰酶消化后呈圆形的成纤维细胞表面逐渐伸展延长,形成2个以上的胞质突起,有的似星状,表明成纤维细胞已存活生长,开始与胶原纤维发生粘着。随着细胞密度的增加,透明度稍降低,其质地与颜色近似真皮组织,有一定的弹性和抗拉性,不易脆。当凝胶与培养皿壁分离后则凝胶块收缩如园盘状飘浮在培养基的液面下,在倒置显微镜下可清楚地看到凝胶中各个层次的细胞及形态。接种后成纤维细胞在凝胶中的位置是相对固定的,其突起在细胞的两极逐渐伸展延长,但突起数目逐渐减少,最后在细胞的两极形成两个较长的突起而成梭形,见图1而且随着细胞凝胶的收缩,平行排列的细胞变得愈加致密,有时互相交织呈网络状。当细胞密度达到其极限后(大约培养2~3周后),成纤维细胞可以象组织块中的成纤维细胞一样从胶原凝胶中迁出,导致细胞凝胶的贴壁生长。

2.2 组织切片

培养2周后细胞凝胶做组织学观察,发现胶原呈较均一的淡红色,而成纤维细胞均匀地分布于胶原中,呈梭形,大多数细胞两极为两个较长的突起,极少数细胞有较多的突起,细胞较小,胞核呈椭圆形,胞浆少,见图2。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 30500131

** 伍津津,男,34岁,副主任医师,副教授,博士,现在附属大坪医院皮肤科 重庆,400042

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



图 1　成纤维细胞胶原凝胶培养　(× 100)
A: 1 d后在例置显微镜下观察,可见不同层面的成纤维细胞,一般可见 2 个以上的细胞突起,部分细胞为星状突起 B 培养 一周后成纤维细胞交织成网状,一般可见 2 个长突,少数细胞有 2 个以上的突起

Fig 1　Fibroblasts cultured in collagen gel　(× 100)
A: Fibroblasts in different layers could be seen, showing 2 processes, some in radiated form (After 1 d Inverted microscope×)
B Fibroblasts showing network form, usually with 2 processes(After 1 week)



图 2　成纤维细胞胶原凝胶培养一周后常规组织切片,成纤维细胞均匀分布于凝胶中,一般为 2 个突起　(HE× 100)

Fig 2　Fibroblasts evenly distributed in the gel, usually with 2 processes　Cultured in collagen gel for 1 week (HE× 100)

3　讨论

在胶原凝胶中正常皮肤成纤维细胞的形态改变过程充分反应了细胞与胶原纤维相互作用过程。在凝胶形成初期,胶原纤维排列是无序的,成纤维细胞的胞质沿这些纤维运动并产生多向性突起,细胞呈星状。随着成纤维细胞与胶原纤维的相互作用,胶原纤维排列发生改变,纤维的排列逐渐变为单向性,成纤维细胞的胞质突起也随之逐渐表现为双极性,从结构上来看它是组织样 (Tissue-like)的,有一定的弹性和抗拉伸能力[3]。

培养好的细胞凝胶称之为真皮替代物,是进行皮肤器官型培养和制作复合皮的关键与基础,无菌要求严格。我们的体会是:① 真皮成纤维细胞、胶原和 NaOH的比例一定要合适。② 胶原应预置于 0℃冰浴中。在常温下 NaOH中和胶原醋酸溶液后很快形成凝胶,给混合细胞带来了困难,而预置于冰浴中便能显著延缓凝胶的形成时间。一般先将胶原溶液预置于冰浴中,加浓缩培养基混合,然后去离心细胞,用新生牛血清混悬,再用 NaOH快速中和混匀胶原,最后加入成纤维细胞悬液,这样便可将细胞均匀地混合于胶原凝胶中。③ 成纤维细胞的增生能力要强,应选择传代次数较少的处于指数生长期的细胞。④ 渗透压要在正常范围内。⑤ 胶原浓度不能过低,一般应在 1 mg/ml以上较好,形成的凝胶厚度较厚,有利于以后接种表皮细胞。

参考文献

1　Bell E, Ivarsson B, Merribl C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(3): 1274

2　Limat A, Breitkreutz D, Hunziker T, *et al*. Restoration of the epidermal phenotype by follicular outer root sheath cells in recombinant culture with dermal fibroblasts. Exp Cell Res, 1991, 194(2): 218

3　Bell E, Sher S, Hull B, *et al*. The reconstitution of living skin. J Invest Dermatol, 1983, 81(1 Suppl): 2S

(收稿: 1998-01-12;修回: 1998-09-04)

(编辑　冯崇英)

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

Establishment of dermal equivalent culture model*

Wu Jinjin, Liu Rongqin, Ye Qinyu, Tang Shuqian, Zhong Baiyu (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To establish a 3D culture model of fibroblasts. Methods: Fibroblasts were mixed with collagen, serum and medium to form a gel called the dermal equivalent. Results: The dermal equivalent was tissue-like in its component and consistency. Conclusion: The model is useful for basic studies on the epidermal-mesenchymal interaction, cell growth, cell differentiation, wound healing and scar formation.

Key words fibroblast; collagen; dermal equivalent

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30500131

原发性胆囊癌转移到双侧卵巢 1例报告

A case report of carcinoma of gallbladder transfer to ovary

王 琳* 史常旭 (第三军医大学附属西南医院妇产科) 重庆, 400038

原发性胆囊癌多转移至肝、胆总管、胰腺[1]。我们遇到 1例原发性胆囊癌患者,其邻近脏器无转移,却在双侧卵巢形成巨大转移性癌,现报告如下。

1 临床资料

患者王某,女,47岁,发现上腹部包块 3月入院。检查:下腹部扪及实质性包块约 6月孕大,无压痛,肝脾未扪及。B超提示双侧卵巢实性肿瘤,子宫正常大小。术前诊断为卵巢癌。于 1998年 7月 20日在全麻下行剖腹探查术,术中发现子宫大小正常,吸出淡黄色腹水 800 ml,左卵巢肿瘤 19 cm× 13 cm× 8 cm,右卵巢肿瘤 17 cm× 9 cm× 7 cm,双侧卵巢表面光滑,包膜完整,与盆腔无粘连。术中送小块卵巢组织作冰冻切片检查,病理报告为卵巢腺癌。探查上腹部时发现胆囊肿大呈实性,请肝胆科医师会诊取右上腹部斜切口行胆囊切除,未发现肝及胆总管转移病灶,下腹部行双侧附件及全子宫切除,并切除阑尾及大网膜。术后 8 d拆线出院。

病理检查提示:胆囊壁内见癌细胞呈乳头状排列,并与周围粘膜有移行过渡。双卵巢见癌组织呈乳头状、腺管状、实团状分布,癌细胞复层柱状,核大泡状,易见分裂像,有大片坏死。双输卵管组织内均见癌组织,大网膜充血水肿,宫内膜呈增生改变,宫颈慢性炎,阑尾慢性炎。免疫组化染色:ER弱阳性,PR弱阳性。病理诊断:胆囊乳头状腺癌伴双侧卵巢输卵管转移。

2 讨论

卵巢的转移性癌中原发部位多为胃肠道、乳房及子宫肿瘤,来自胆囊者罕见[2]。本例符合转移性卵巢癌的特点,即双侧卵巢肿瘤均增大呈长圆形,表面光滑,包膜完整,组织学特点与其原发癌一致,均为乳头状腺癌。卵巢转移癌早期多无临床症状,晚期以腹部包块及腹胀为主诉,原发癌的表现并不明显,术前诊断率低。原发性胆囊癌的转移途径以直接扩散至邻近脏器为主,本例可能为经淋巴转移,癌细胞转移至腹膜后淋巴结,阻塞淋巴导管的上行通道,造成淋巴引流逆向,将癌细胞带到腹主动脉旁和盆腔淋巴结,而卵巢的淋巴管和这些淋巴结的位置非常接近,形成卵巢的转移[2]。当术中怀疑卵巢癌是继发的,就应尽力寻找原发灶,对卵巢癌患者应常规探查上腹部,以免遗漏原发或继发癌灶。转移性卵巢癌预后极差,术中应尽可能切除原发癌及双附件及全子宫,术后辅以化疗以延长患者的生命。

关键词 卵巢肿瘤;肿囊;肿瘤转移

中图法分类号 R737.31

参考文献

1 陈 平,韩本立,蔡景修,等.原发性胆囊癌 30例诊治体会.普外基础与临床,1997,4(3):155

2 连利娟,林巧稚.妇科肿瘤学.第 2版.北京:人民出版社,1993.640~649

(收稿:1998-08-31;修回:1998-11-24)

(编辑 王 红)

* 王 琳,女,34岁,主治医师,博士研究生

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