DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.043


原发性聚集性增高为主,所形成的血小板容易解聚。

脑缺血患者血小板聚集功能增强,本实验证实脑干缺血时血小板聚集功能亦加强,这为临床应用抗血小板聚集药物防治脑血栓形成具有现实意义。

关键词 脑缺血;脑干;血小板;聚集功能

中图法分类号 R743.31

## 参考文献

1 何 英,王东武,邓志宽等.犬脑干缺血后细胞内钙含量和超微结构的改变.第三军医大学学报,1996;18(2):135

2 何 英,王东武,邓志宽等.犬脑干缺血后脑干听觉诱发电位的研究.临床脑电学杂志,1996;5(3):160

3 Joan C. Basilar artery occulation in rats. Stroke, 1990; 22(2): 247

4 Siesjo B K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part I: Pathophysiology. J Neurosurg, 1992; 77(2): 169

5 刘晓勤,季晓鹏,苗 莉等.抗钙和抗血栓素 $A_2$治疗急性缺血性脑卒中的疗效观察和生化研究.中风与神经疾病杂志,1994;11(1):72

6 Kochanek P M, Dutka A J, Aumaroo K K *et al*. Effects of prostacyclin indornethacin and heparin on cerebral blood flow and platelet adhesion after multifocal ischemia of canine brain. Stroke, 1988; 19: 693

7 孙荣华,秦建新,李华林等.高血压病和脑血栓形成患者血小板聚集性的变化.第一军医大学学报,1993;13(2):128

(收稿:1997-10-10;修回:1998-01-07)

(编辑 刘 鹏)

# 人胚腱细胞体外培养及其生长特性观察

# *In vitro* culture of human embryo tenocytes and its growth characteristics

康庆林* 蒋祖言 王爱民 冀振亮** (第三军医大学附属大坪医院骨科)重庆,400042

提 要 目的:建立肌腱生物学研究的体外模型。方法:贴块培养人胚腱细胞,观察原代及传代腱细胞生长、形态及遗传学特征,用 Vimentin及 Fn免疫组化法鉴定腱细胞。结果:腱细胞生长汇合后呈平行致密排列并表现为接触抑制,传至16代仍保持稳定的遗传特征,原代腱细胞 Vimentin阳性而 Fn呈阴性反应。结论:培养的人胚腱细胞为研制新型人工肌腱提供了实验生物材料。

如何最大限度激发由腱细胞参与肌腱愈合是解决肌腱粘连的关键。体外培养是研究腱细胞生理生化特征的重要手段,国外早在70年代就用酶解离法分离培养了鸡胚腱细胞[1],但有关人腱细胞培养一直少有报告,我们成功地用贴块法培养了人胚腱细胞,并观察了其生长特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 原代细胞培养

无菌条件下切断引产胎儿鞘内屈指肌腱,将其从鞘内快速抽出,D-Hanks液漂洗3次,0.25%胰蛋白酶+0.1%胶原酶混合消化整段肌腱40 min,D-Hanks液再次漂洗后,眼科剪将肌腱段剪至1 $mm^3$大小碎块,用吸管将腱块均匀接种于培养瓶,行贴块培养,培养条件为5% $CO_2$、95%空气、饱合湿度、37℃。培养基用 DMEM。

### 1.2 细胞传代培养

原代细胞生长融合成单层后,进行传代[2]。

### 1.3 生长曲线及分裂指数曲线绘制

取第3代细胞,按鄂征[2]方法绘制细胞生长曲线及分裂指数曲线。

### 1.4 细胞遗传学检测

取原代、7代及16代细胞,按鄂征[2]方法检测染色体众数。

### 1.5 细胞免疫组化染色

取长有原代腱细胞的小玻片,进行 Vimentin和 Fn免疫组化染色(ABC法)。

### 1.6 细胞形态学观察

倒置显微镜下观察细胞生长及形态学特征,透射电镜观察细胞超微结构。

## 2 结果

### 2.1 原代细胞培养

组织块置入第4天,倒置镜下见,其周边即有腱细胞呈放射状迁移萌出,方向与组织块边缘垂直,常很快脱离腱块,向远处

* 康庆林,男,28岁,主治医师,硕士,现在解放军第107医院骨科 烟台,264002

** 解放军第256医院骨科 正定,050800

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

生长,见图 1

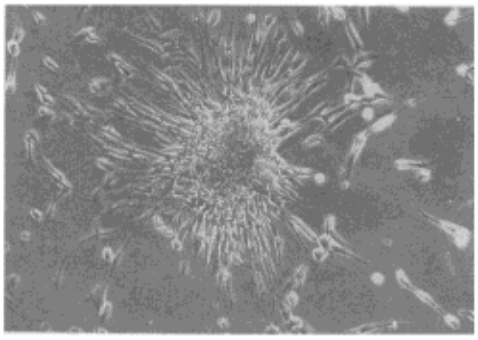


图 1　腱细胞从肌腱块周边长出　(× 200)

### 2.2　细胞传代培养

腱细胞经消化后,1~ 3 min收缩变圆脱离瓶底,接种另瓶后 5 h陆续贴壁,先一端延展,变为不规则的椭圆形,随即两端逐渐形成细而长的突起,在 10% 小牛血清的 DMEM 中,6~ 7 d长满瓶底。细胞具有接触抑制特性,长成单层腱细胞呈平行致密排列。

### 2.3　细胞生长曲线及分裂指数曲线

细胞生长倍增时间为 4 d,第 5天生长达到高峰。第 4天时细胞分裂也最旺盛,接近融合时,细胞数虽然很大,分裂相反而降低,见图 2

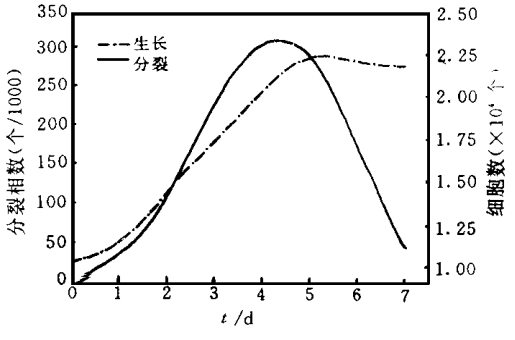



图 2　第 3代腱细胞生长及分裂指数曲线

### 2.4　细胞遗传学检测

分别计数 100个原代、第 7、16代腱细胞的染色体数,众数 2n = 46者分别占检测细胞 95% 以上,说明腱细胞遗传性状稳定。

### 2.5　细胞免疫组化

原代腱细胞 Vimentin染色呈阳性,而 Fn阴性。

### 2.6　细胞形态学观察

光镜下见细胞多呈梭形或三角形,两极突起长,细胞间相互突触成网,胞质均质透亮,核圆居细胞中央,其内 1~ 3个核仁,见图 3

透镜电镜下见细胞表面有伪足样突起,胞核不规则,核膜有较深切迹,核仁明显,胞内分泌小泡较多,细胞器不丰富。

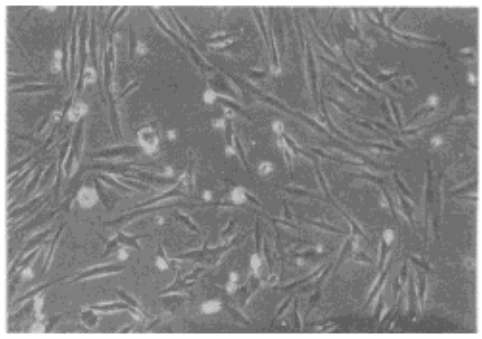


图 3　传代肌腱细胞呈梭形,单核,核仁明显　(× 200)

## 3　讨论

应用培养的细胞复合载体再造人工器官是修复重建外科的新热点。本实验培养的人胚腱细胞呈长梭形贴壁生长,长成单层后平行排列,表明腱细胞在体外仍保留其在体内的某些特性,从而为研制新型人工肌腱提供了理想生物材料。

在肌腱组织中,只有腱细胞和滑膜细胞两种成分,因而鉴定腱细胞关键是如何区分两者,一般认为,两者缺乏特异抗原标记物。Tsuzaki[3]发现鸡胚腱细胞分泌很少纤维连接素(Fn),滑膜细胞分泌大量 Fn。本实验采用快速抽取及复合酶短时消化肌腱段,保证了腱细胞来源纯洁。原代细胞 Fn阴性而 Vimentin阳性,电镜观察与文献报告腱细胞超微结构吻合,三方面结合,证实培养是成功的。

贴块法培养腱细胞应注意:① 供体胎龄以 15~ 22周为宜,过小取材困难,过大肌腱不易剪碎;② DMEM 培养基更适合腱细胞生长;③ 原代细胞需添加 10% 胎儿血清及 10% 小牛血清,传代培养只需 10% 小牛血清。

关键词　细胞培养;肌腱;人;胚胎

中图法分类号　R686.1

## 参考文献

1 Dehm P, Prockop D J. Synthesis and extrusion of collagen by freshly cell from chick embryo tendon. Biochem Biophys Acta, 1971; 240: 358

2 鄂　征.组织培养及分子细胞学技术.北京:北京出版社,1995: 155~ 178

3 Tsuzaki M, Yamauchi M, Banes A J. Tendon collagens: extracellular matrix composition in shear stress and tensile components of flexor tendons. Conn Tissue Res, 1993; 29(2): 141

(收稿: 1997-04-09;修回: 1997-09-18)

(编辑　王　红)

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