· 论著摘要 ·

纤维蛋白凝胶细胞培养模型的建立

韩军涛 陈璧 汤朝武

创伤后的组织修复过程，在早期可表现为伤口收缩、肉芽组织形成及细胞外基质过度沉积等，在后期则表现为瘢痕形成及其异常增生，这些现象均与组织中成纤维细胞的生物学活动密切相关。近年来国内外学者利用细胞培养技术，在体外可控条件下对成纤维细胞进行了一系列研究，进一步丰富了创伤愈合的现代概念[1,2]。细胞培养方法主要有单层培养和立体培养法，本实验旨在建立并探讨成纤维细胞的立体培养模式。

材 料 与 方 法

一、主要试剂

DMEM 培养基、胰蛋白酶及胃蛋白酶均购自美国 Gibco 公司，人纤维蛋白原（纯度 >90%）及 b - 氨基丙晴购自美国 Sigma 公司，人凝血酶购自珠海生物技术公司，小牛血清购自杭州四季青公司，^{3}H - TdR 及 ^{3}H - 脯氨酸购自中科院原子能物理研究所。

二、细胞的原代培养及传代

利用组织块培养法对新鲜皮肤进行原代细胞培养，常规胰蛋白酶消化传代，实验选用第 3 ~ 6 代成纤维细胞。

三、纤维蛋白凝胶培养模型的建立

1. 将 1 ~ 5 g/L5 个浓度的纤维蛋白原各 1 ml 分别与 5 IU 人凝血酶混合，37℃ 孵育 30 min。15 000 r/min 离心 15 min，未结合的纤维蛋白原保留在上清液中，取上清液在 280 nm 波长下测 OD 值。未聚合纤维蛋白原少于 5% 即凝结力大于 95% 者可用于实验。

2. 制备单细胞悬液，与纤维蛋白原溶液混匀，使纤维蛋白原和成纤维细胞的终浓度分别为 2.5 g/L 和 10^5/ml。按每孔 100 μl 接种于 48 孔培养板，每孔同时加入人凝血酶 2 IU，接种后为一直径约 8 mm 的半球形液滴，并设不含细胞的空白孔作为对照。放入 CO_2 孵箱孵育 2 h 后，每孔加入 1 ml 含体积分数 10% 小牛血清的 DMEM 培养液继续培养，每 2 d 换液 1 次。

四、观测指标

1. 形态学观察：分别于接种后 2、4 h，1、4、8 d 在倒置显微镜下观察成纤维细胞形态变化。

2. 凝胶块收缩：设成纤维细胞凝胶组及空白凝胶对照组，分别于接种后 1 ~ 4 h 和 1 ~ 8 d 连续观察凝胶块厚度和直径的改变。用倒置显微镜（Olympus IX70 型）微调旋钮进行厚度和直径测量，将聚焦平面由凝胶块顶部调至板底，此间距离减去板底自身的厚度，即为凝胶块的厚度。凝胶块的收缩程度以其占最初厚度的百分率表示。

3. 细胞计数：设凝胶组及单层细胞培养组，种植细胞数均为 5×10^3，接种于 48 孔培养板。24 h 后开始消化细胞，台盼蓝染色并记数，连续测量 12 d，依所得数据绘制细胞生长曲线。此外，分别做 3 种不同供体相同代数（P5）及同种供体不同代数（P3、P6、P10）细胞的生长曲线。

4. 细胞 DNA 的合成代谢：设凝胶组及单层培养组，调整每孔细胞数为 1×10^4，接种 24 h 后吸弃培养液，每孔加入 ^{3}H - TdR 1 mci、DMEM 培养液 1 ml，孵育 12 h，吸弃培养基，用 37℃ PBS 冲洗培养板 10 次，风干后单层培养组加入质量浓度 1.25 g/L 胰蛋白酶 300 μl/孔，凝胶组加入质量浓度 10 g/L 胃蛋白酶及 1.25 g/L 胰蛋白酶各 150 μl/孔，4℃ 冰箱放置 24 h 后用多孔收集器收集溶液，于 Beckman 6500 型闪烁仪上测定各孔的 cpm 值。

5. 细胞胶原合成的测定：同上法接种细胞于 48 孔板，24 h 后吸弃培养液，每孔加入 100 μl ^{3}H - 脯氨酸混合液（b - 氨基丙晴 100 mg/L，L - 维生素 C 50 mg/L，^{3}H - 脯氨酸 10 mci/L）、DMEM 培养基 900 μl，孵育 24 h 后吸弃培养基，同上法收集并测定各孔的 cpm 值。

6. 统计学处理：所有实验数据用 Orign 软件进行统计分析，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间处理采用 t 检验。

结 果

1. 细胞形态与分布：纤维蛋白胶刚接种时呈半透明状，镜下可见圆形细胞分布于不同层次，2 h 后细胞伸展呈多角形，4 h 后伸展为多个突起。1 d 后细胞呈典型的梭形，培养至 2 ~ 3 d，细胞的层次模糊，密集呈网状交互排列。

2. 纤维蛋白胶的收缩：含成纤维细胞的纤维蛋白胶，其收缩表现在凝胶厚度的改变上，而直径基本保持不变。对照组纤维蛋白胶的厚度只有轻微变化（图 1，2）。

3. 细胞增殖情况：早期细胞在单层培养中生长较快，到第 5 ~ 7 d 后，凝胶组培养的细胞增殖速度逐渐超过单层培

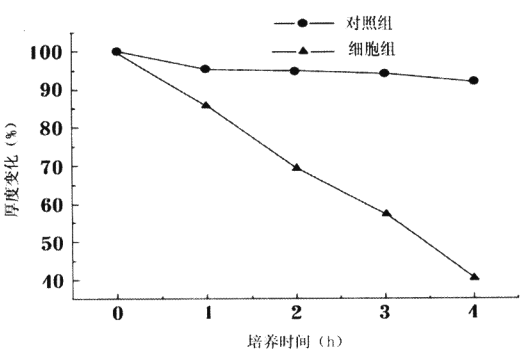

图 1 接种成纤维细胞后纤维蛋白凝胶的收缩情况

作者单位：710032 西安，第四军医大学西京医院烧伤科

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版權所有 Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

养，并持续到第 12 天。不同供体相同代数细胞之间、同种供体不同代数细胞之间差异无显著性意义（图 3）。

4. 细胞的 DNA 合成代谢及胶原合成：实验结果显示，在单层培养和凝胶培养两种条件下，细胞的 DNA 合成及胶原合成情况无明显差异（$P > 0.05$）。

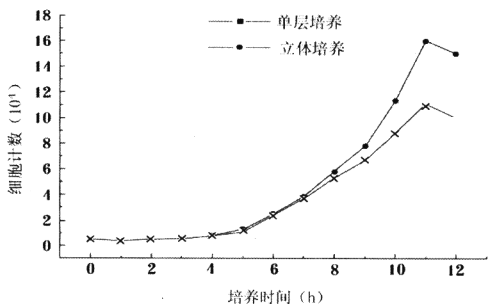

图 2　立体培养与单层培养条件下成纤维细胞的生长曲线

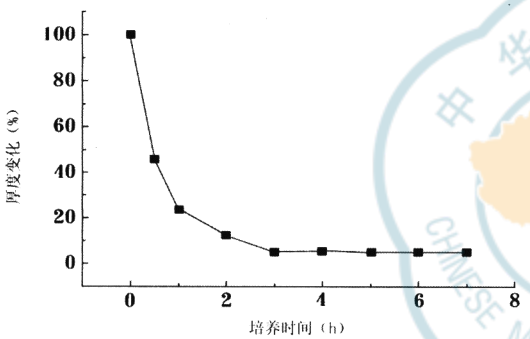

图 3　接种成纤维细胞后纤维蛋白凝胶的收缩情况

讨　论

目前有关伤口收缩机制的解释主要有两种：一种是伤口组织内的成纤维细胞通过加速胶原合成，重新组织细胞外基质，从而引起伤口的收缩和细胞外基质的沉积。另一种认为组织受伤后产生肌成纤维细胞，生物学特性介于成纤维细胞和平滑肌细胞之间，它的生物学活动导致了伤口的收缩[3]。随着细胞培养技术的建立和改进，使人们能够在体外可控条件下培养观察细胞，为在细胞水平上研究伤口愈合的机制提供了有利条件。

培养细胞目前常用的是单层培养法，但这种方法不能满足对成纤维细胞在体环境的研究。因为机体内的成纤维细胞被细胞外基质所包围，其中 80% 是细胞分泌的胶原。纤维蛋白亦是细胞外基质的主要成分，在伤口愈合初期，纤维蛋白可帮助细胞迁移、促进细胞增殖，彼此关系密切。因此人们利用人或动物的 I 型胶原制备凝胶作为支架，或用人的纤维蛋白凝胶作为支架，建立了不同的成纤维细胞立体培养模型[4]。

在纤维蛋白凝胶培养模型中，成纤维细胞可保持正常的细胞形态且具有稳定的生长增殖能力，可以引起凝胶块的明显收缩，这表明细胞与纤维蛋白之间存在着相互作用，这种作用能改变纤维蛋白凝胶的密度及结构。笔者还观察到，随着时间的推移，纤维蛋白被逐步降解，细胞的胶原合成量逐步增加并在细胞外沉积下来，提示该模型可能具有模仿伤口愈合过程中成纤维细胞生物学活动的作用。

参　考　文　献

1　V. Moulin, G. Castilloux, A. Jean, et al. In vitro models to study wound healing fibroblasts. Burns, 1996, 22: 359 - 362.
2　Tai - Tan Tuan, Andrew Song, Stella Chang, et al. In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. Experimental Cell Research, 1996, 223: 127 - 134.
3　McGrath MH. Petide growth factors and wound healing. Clin Plast Surg, 1990, 17: 421 - 425.
4　Robert F. Diegelmann Cellular and Biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. The Journal of Urology, 1997, 157: 298 - 302.

（收稿日期：1999 - 12 - 13）
（编辑：王　旭）

· 经验交流 ·

婴幼儿烧伤治疗床

黎世纯

婴幼儿烧伤治疗过程中存在的主要问题有：（1）不配合治疗。（2）不方便大小便护理。（3）皮肤附件发育不完善，处理不当，易致创面加深。因此，我科研制了婴幼儿烧伤治疗床，经临床应用 45 例，疗效满意。

材料：采用木料制成一长 130 cm，宽 73 cm，高 140 cm 的框架，床周安装活动式护栏，底部安装四个轮子，制成筛状床板并形成便于大小便孔道，上置一开孔的布包海绵床垫，下置一大小便器，床板上下均安装热能灯泡，顶角装一输液支架，四周用移动式布围防止散热。

特点：（1）上下均有热能，便于创面及物件干燥；（2）不再单独使用输液架；（3）便于随时大小便而不污染创面与物件；（4）活动式护栏可防止坠床和便于医疗处置；（5）可像小儿车一样推出病房活动；（6）造价低廉，经济实用，适用于普通烧伤病房。

作者单位：421002　衡阳，解放军第一六九中心医院烧伤科

（收稿日期：2000 - 09 - 27）
（编辑：张　宁）

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?