



复温温度对低温处理过的体外培养正常人成纤维细胞的形态、功能的影响,探讨不同复温温度在成纤维细胞低温损伤恢复过程中的作用,旨在了解冻伤条件下组织的修复过程,为预防治疗伤后瘢痕增生提供必要的理论依据。

### 材料与 方法

1. 主要试剂与仪器:人 I 型胶原酶免疫检测试剂盒(上海森雄科技公司),I 型胶原免疫组织化学染色试剂盒(天津 TBD 科技公司),酶联免疫分析仪(深圳晶美生物工程有限公司),X170 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),低温循检仪(笔者单位自行研制),细胞冻存盒(美国 Gibco 公司)。

2. 人成纤维细胞的体外培养:经患者知情同意,取手术剩余的正常皮肤,采用组织块法<sup>[1]</sup>分离成纤维细胞并按种于培养皿中,用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。冷冻处理前 2 d,采用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞 3 次。

3. 冻伤模型:将温度循检探头置于温度循检培养皿中,并与细胞以塑料封装好后一起放入冻存盒中,拟定细胞培养液温度为细胞温度,置于 -80℃ 低温冰箱中。调整冷冻液配方,使细胞的环境温度下降速度为:(1.00 ± 0.10)℃/min。电脑记录降温曲线<sup>[2]</sup>。

4. 实验分组:取第 4 或 5 代体外培养的人成纤维细胞,经胰蛋白酶消化后制成悬液,以  $5 \times 10^4$  ml 的密度接种于培养皿中,随机分为对照组、37℃ 复温组及 20℃ 复温组。对照组细胞不作处理;后两组培养皿内细胞,按冻伤模型造成冻伤,当温度达到 -10℃ 时,迅速取出冻存盒,立即将培养皿置于 20、37℃ 恒温水浴锅中复温<sup>[3]</sup>,温度达到各自水浴锅温度后取出,再与对照组一起继续培养。两个复温组分别于伤前及伤后即刻、24、48、72、96 h 进行观察,每组各时相点取 9 个培养皿(另设 1 个培养皿的细胞用于温度循检)。

5. 观察指标:(1)细胞活力测定:参照噻唑蓝(MTT)法<sup>[4]</sup>进行,于波长 570 nm 下读取两个复温

组吸光度(A)值。(2)于倒置相差显微镜下观察各组细胞形态的变化。(3)胶原含量的测定:收集各组细胞培养上清(除伤后即刻的细胞外,其余均为换液后 24 h),于 -20℃ 保存,上清标本采用双抗夹心亲和素-生物素酶联免疫吸附测定(ABC-ELISA)法<sup>[5]</sup>测定细胞外胶原含量,以 A 表示。取各组细胞,用 I 型胶原免疫组织化学染色试剂盒染色并照相,以二氨基联苯胺(DBA)显色,采用 IMAGE-J 图像分析软件(美国国立卫生研究院免费共享软件)计算细胞内胶原含量 = 细胞内的灰度值与细胞面积之比。

6. 统计学处理:数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行配对 t 检验和重复测量分析。

### 结果

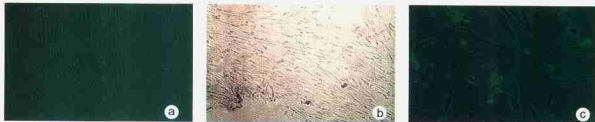
1. 细胞活力的测定:20℃ 复温组伤后 A 值迅速降低,随后逐渐恢复,但与伤前值比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $0.01$ );37℃ 复温组伤后各时相点 A 值与伤前值相近( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 两个复温组的人成纤维细胞活力变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	皿数(个)	伤前值		伤后时间(h)				
		即刻	24	54	72	96		
20℃	54	0.95	0.30	0.44	0.43	0.50	0.79	
复温组			$\pm 0.16$	$\pm 0.07^*$	$\pm 0.06^*$	$\pm 0.08^*$	$\pm 0.06^*$	$\pm 0.06^*$
37℃	54	0.95	0.88	0.97	0.89	0.96	0.10	
复温组			$\pm 0.16$	$\pm 0.11$	$\pm 0.10$	$\pm 0.11$	$\pm 0.08$	$\pm 0.07$

注:数据以 A 值表示;与伤前值比较,\* $P < 0.05$ ,# $P < 0.01$

2. 细胞形态学变化:对照组细胞正常排列,胞体较大,呈长梭形(图 1a)。20℃ 复温组伤后即刻细胞大量死亡,成活细胞不足 40% 且呈脱水样改变,胞浆大量丢失,细胞缩小,核浆比例明显增大(图 1b);伤后 72 h,细胞出现过度增生,核分裂相明显(图 1c),部分细胞漂浮后出现再次贴壁现象(图 1d);伤后 96 h 细胞排列杂乱(图 1e)。37℃ 复温组细胞排列基本正常,除少量细胞死亡外,其余情况与对照组相似(图 1f)。



注:a. 对照组细胞正常排列,呈长梭形( $\times 100$ ); b. 20℃ 复温组细胞伤后即刻大量死亡,细胞脱水,核浆比例明显增大( $\times 40$ ); c. 20℃ 复温组伤后 72 h 细胞出现增生,核分裂相明显( $\times 300$ )



注:d.20℃复温组伤后72h细胞出现再次聚集现象( $\times 100$ );e.20℃复温组伤后96h细胞排列杂乱( $\times 100$ );f.37℃复温组伤后即到96h,除少量细胞死亡外,与对照组无明显变化( $\times 300$ )

图1 正常组及两复温组大鼠纤维细胞形态学观察 倒置相差显微镜  
Fig 1 The morphological observation of the fibroblasts in each group IM

3. 胶原合成变化:免疫组织化学染色示20℃复温组细胞内外胶原代谢高于对照组。与伤前值比较,20℃复温组内胶原含量呈现先降低后升高的趋势,胞外胶原含量呈现先升高后降低,再逐渐升高的趋势,经重复测量分析,20℃复温组与对照组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ),37℃复温组与对照组相近( $P > 0.05$ )。见图2,表2,3。



对照组 20℃复温组伤后96h细胞内胶原浓度高于对照组

图2 两组大鼠纤维细胞免疫组织化学染色 DAB  $\times 200$

Fig 2 The immunohistochemical staining of the cells in the two groups DAB  $\times 200$

表2 各组大鼠纤维细胞胞外胶原含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Change in the extracellular collagen content in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	组数(个)	伤前值	伤后时间(h)				
			即刻	24	72	96	
对照组	54	93.9 ± 3.3	95.4 ± 6.5	100.2 ± 5.1	97.6 ± 3.1	103.4 ± 6.6	102.6 ± 4.0
20℃复温组	54	96.4 ± 2.9	138.3 ± 10.6	60.2 ± 3.3	70.1 ± 18.2	96.6 ± 10.6	99.9 ± 7.6
37℃复温组	54	94.6 ± 4.2	119.0 ± 5.7	102.0 ± 3.3	98.7 ± 5.6	96.2 ± 4.2	100.9 ± 6.9

注:各组数据用4值表示;为了避免批间差异,伤后各时相点下均检测了对照组的4值;经重复测量分析,20℃复温组与对照组比较, $P < 0.01$

表3 各组大鼠纤维细胞胞内胶原含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Change in the intracellular collagen content in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	组数(个)	伤前值	伤后时间(h)				
			即刻	24	72	96	
对照组	54	0.045 5 ± 0.005 2	0.045 8 ± 0.003 8	0.045 6 ± 0.004 8	0.043 4 ± 0.003 1	0.044 9 ± 0.005 8	0.048 4 ± 0.006 7
20℃复温组	54	0.047 9 ± 0.002 7	0.019 9 ± 0.002 0	0.024 4 ± 0.005 0	0.034 0 ± 0.006 4	0.058 3 ± 0.008 7	0.062 0 ± 0.011 6
37℃复温组	54	0.0472 5 ± 0.005 7	0.043 8 ± 0.004 0	0.051 8 ± 0.009 8	0.044 5 ± 0.006 1	0.047 4 ± 0.004 5	0.047 9 ± 0.005 2

注:各组数据用灰度值表示;为了避免批间差异,伤后各时相点均检测了对照组的灰度值;经重复测量分析,20℃复温组与对照组比较, $P < 0.05$

## 讨论

冻伤是高寒地区<sup>[6]</sup>战时最易发生的损伤之一,近年关于冻伤后复温及创面愈合机制的研究较少。研究表明,胶原过量沉积是瘢痕形成的基本环节,成纤维细胞合成与分泌胶原能力的增强或成纤维细胞的大量增殖,均可能导致胶原总量增加<sup>[7]</sup>。本研究应用低温生物学的方法,阐明不同复温温度对低温处理后人成纤维细胞增殖和胶原代谢状况的影响,可以从一个侧面了解冻伤后创面愈合及瘢痕形成的机制,有一定意义。

细胞内水结冰,低温导致细胞膜损伤,细胞外结冰导致细胞脱水引起细胞内蛋白结构改变等,是冻伤后细胞损伤的主要原因<sup>[8]</sup>。与快速复温相比,冻伤后慢速复温使细胞损伤更严重,复温过程中细胞内水的再次结晶是主要因素<sup>[9]</sup>。近来也有学者认为,降温 and 复温过程中细胞内冰晶是一种抗低温损伤的保护因素<sup>[10]</sup>。本实验采用20、37℃复温,其中20℃复温更接近自然复温。成纤维细胞经降温处理后,20℃复温由于共结晶损伤,细胞外胶原含量呈现先升高后降低继而逐渐升高的趋势。细胞外胶原含量立即出现升高,与降温 and 复温过程中冰晶及渗透压变化对细胞膜完整性的改变密切相关<sup>[11]</sup>。冻伤后成纤维细胞胶原合成分泌的改变较烧伤后变化要小<sup>[12,13]</sup>,这和临床上观察到的冻伤后瘢痕增生较烧伤瘢痕轻微的现象一致。通过对不同复温温度的比较,在细胞水平证实了快速复温(37℃)有利于冻伤后细胞结构、功能的恢复,这和以往的报道<sup>[14]</sup>。

