

是否与实验条件或受某些因素影响所致有待研究。

值得指出的是由于卵黄囊造血属血管内造血,成熟红细胞不需经过血管壁进行脱核,故本文观察到人卵黄囊血岛中的红细胞均为有核红细胞,这与动物造血相同。另外,此期有核红细胞形态呈现巨幼样改变的机理是否与造血环境中叶酸和维生素 B₁₂代谢或其他因素有关尚未明了。

人卵黄囊造血研究无论是从造血的发生学角度还是从血液、遗传等疾病的治疗方面都具有十分重要的意义。

摘 要

采用卵黄囊组织切片、涂片的形态学、细胞化学染色、造血干/祖细胞体外培养及 CD₃₄单克隆抗体免疫荧光检测等方法研究表明:人卵

黄囊中存在造血岛,造血岛内由于造血微环境的特点致使此期造血主要向红系分化。血岛中检测出 CD₃₄⁺细胞,比例高于胎肝及成人骨髓,干/祖细胞于体外培养形成红系集落。结论:人胚胎期造血源于卵黄囊。

关键词: 卵黄囊 造血岛 造血干/祖细胞

参 考 文 献

- [1] 邢佩霓等,1992,临床血液学杂志,5:63-65.
- [2] Tavassoli M. 1991, *Blood Cells*, 1: 269-281.
- [3] 施斐曼,1986,细胞生物学杂志,8:168-170.
- [4] Palis J. et al. ,1995, *Blood*, 86:156-163.
- [5] Moore A. S. et al. ,1970, *British Journal of Haematology*, 18:279-296.
- [6] Fennie C. et al. , 1995, *Blood*, 86: 4454 - 4467.
- [7] Zon L I. ,1995, *Blood*, 86:2876-2891.
- [8] Huang H. et al. ,1994, *Exp Hematol*, 22:19-25.

STUDY ON HUMAN YOLK SAC HEMATOPOIESIS

XING Pei Ni HAN Xiu Rui YANG Di Di WEI Xu Cang LI Mei Sheng

(Department of Hematology, Shaanxi Provincial Hospital Xian 710068)

ABSTRACT

The hematopoiesis of human yolk sac and the biological characteristics of hemopoietic stem/progenitor cells are investigated by using morphological analysis of histological sections, smears, culture of hemopoietic stem/progenitor cells in vitro and detecting of CD34⁺ cells by monoclonal antibodies. It is found that there are many blood islands in human yolk sac. The yolk sac hematopoietic cells are restricted to the erythroid lineage due to characteristics of the hematopoietic microenvironment. The stem/progenitor cells can form erythropoietic colonies in vitro. There are CD34⁺ cells in blood islands and the percentage is higher than cells from embryonic liver and adult bone marrow. It is concluded that the human yolk sac is the original site of hematopoiesis.

Key words: Yolk sac Blood island Hemopoietic stem/progenitor cells

利用气液界面无血清培养原代兔气管上皮细胞的研究*

黄 宁 吴 琦 李胜富** 唐 彬 王伯瑶

(华西医科大学病理生理教研室 成都 610041)

体外培养的气管上皮细胞广泛应用于呼吸道上皮电生理、跨膜离子转运、毒理学实验、细胞癌变机制等许多重要领域的研究^[1-3]。然而采用传统方法培养的呈单层生长的气管上皮细

胞仅能有限表达其生理功能,这使得体外实验

*国家自然科学基金资助项目(39670305)。

**现在附一院移免中心工作。

的结果难以完全反映出体内的真实情况。90年代以来,有学者报道采用气液界面与无血清培养相结合,尽可能模拟气管上皮细胞的天然生长环境,可培养出呈复层生长且分化更趋成熟的的气管上皮细胞,已先后建立起狗、人等气管上皮的培养方法^[1,4]。这对于研究气管上皮细胞的生长、代谢、分化和病理变化机制等都具有重要的意义。迄今尚未见国内呼吸道粘膜上皮细胞气液界面培养的报道,我们参照 Kondo^[4]和 Wu^[5]的经验,建立了兔气管上皮细胞气液界面培养的方法,下面作一介绍。

材料和方法

1. 试剂和药品

蛋白酶 XIV 型、内皮细胞生长支持物(EGCS)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素(INS)、转铁蛋白(TF)、甲状腺素(T₃)、氢化可的松(HC)、抗角蛋白抗体、人胎盘胶原(HPC)均为 Sigma 产品,LSAB 免疫组化试剂盒为 Dako 产品, MEM、DMEM/F₁₂ 培养基、胎牛血清(FCS)为 Gibco 产品,L-谷氨酰胺为 Merck 产品,余为国产分析纯。

2. 培养器皿

24 孔板为 Corning 产品,套皿(Millicell-CMø12mm)为 Millipore 产品。套皿用 HPC 按 20 μ g/cm² 涂膜,置室温 18h,弃去多余 HPC,室温干燥,临用前 PBS 洗涤。24 孔板同上涂膜。

3. 培养液配制

在 DMEM/F₁₂ 中加入 10 μ g/ml INS、0.4 μ g/ml HC、5 μ g/ml TF、20ng/ml T₃、25ng/ml EGF、7.5 μ g/ml ECGS、1mmol/L 谷氨酰胺、100IU/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素为无血清培养基。

4. 气管上皮细胞分离和培养

日本纯种大耳白兔,体重 2—3kg,我校实验动物中心提供。抽心血致死,无菌条件下,取出气管,置于 PBS 中备用。

气管喉端插入直径 4mm 塑料插管并结扎固定,用冰冷 PBS 冲洗数次,注入蛋白酶 XIV(0.075mg/ml)少许,结扎支气管端,继续注入酶溶液至充盈,插管封口。将整段气管浸没在冷的 MEM 培养基中,4 $^{\circ}$ C,18h 消化。随后用 MEM 冲洗出消化液,加 FCS 至终浓度为 2.5% 时终止酶反应。1 000rpm/min 离心 10min,弃上

清,同上洗涤一次。

用含 5%FCS 的 DMEM/F₁₂ 培养基配制成细胞悬液,台盼蓝拒染法检测细胞活力,按 2.5 \times 10⁶ 活细胞/cm² 加入套皿,5%CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养,24h 后换为无血清培养基,隔日换液一次。设置含 5%FCS 的 DMEM/F₁₂ 培养基和常规 24 孔板无血清培养为对照。

5. 形态学检查

①在倒置显微镜下活体观察气管上皮细胞生长状态,形态变化。②用 4%多聚甲醛固定套皿膜,常规石蜡包埋切片,HE 染色,镜检。

6. 免疫组化检查

石蜡包埋切片采用 LSAB 法行气管上皮细胞角蛋白免疫组化染色,按药盒说明书操作。

结 果

1. 气管上皮细胞的分离

酶低温消化获得的气管上皮细胞,台盼蓝拒染法显示细胞成活率为 92%—95%,细胞得率为 1.2 \times 10⁶/条气管。倒置显微镜下观察可见细胞呈圆形、多角形及柱状并可见活动的纤毛。

2. 气管上皮细胞生长状态和形态特征

套皿接种细胞 24h 后,贴壁率约为 40%—60%,细胞体积明显增大,3 天后细胞增殖旺盛,呈现重叠生长,上层为较大的圆形细胞,下层为较小的圆形细胞(图版图 1),7 天后可见“穹隆”(dome)形成(图版图 2),14 天后,切下套皿膜,按常规固定、包埋、切片、HE 染色,镜下可见细胞呈现复层生长(图版图 3)。而在对照含 5%FCS 的 DMEM/F₁₂ 培养基中,72h 前,细胞增殖生长与无血清培养无明显差异,72h 后,细胞增长缓慢,但仍有 dome 形成。在 24 孔板中,无血清培养的气管上皮细胞呈单层生长,为多角形镶嵌状,未见 dome 形成(图版图 4)。

3. 免疫组化检查

气液界面复层生长的气管上皮细胞,细胞角蛋白染色呈阳性,采用阴性血清对照细胞染色为阴性(图版图 5A,B)。

讨 论

在一般培养条件下,气管上皮细胞贴壁性

差,生长期短,呈单层生长,分化成熟低,生理功能较天然状态差^[4-6]。因此建立一种尽可能接近体内生长方式的细胞培养模型以研究其生理和病理改变尤为重要。迄今,国外气管上皮细胞培养的研究主要集中在用各种激素替代胎牛血清,促进气管上皮细胞的生长及分化成熟,减少成纤维细胞的污染;用各种胶原提高上皮细胞的贴壁性;用气液界面培养方式模拟其生长的天然状态,促进细胞的分化成熟及生理功能的表达^[1]。

本实验用低温酶消化法分离气管上皮细胞,气液界面结合无血清培养,成功培养出呈复层生长兔气管上皮细胞。低温酶消化法较37℃酶消化法分离上皮细胞具有细胞损伤小,活力及纯度高的优点,成纤维细胞污染极低。我们在实验中几乎未见成纤维样细胞的生长,台盼蓝拒染法显示细胞的成活率可高达95%。成纤维细胞生长需要血小板生长因子(PDGF),而无血清培养基缺乏PDGF,限制了成纤维细胞的生长,这也有利于提高培养细胞的纯度^[4]。气管上皮细胞贴壁性较差,有学者报道在无胶原涂膜情况下,贴壁细胞约为12%^[7]。常用的胶原有牛皮胶原、鼠尾胶原以及人胎盘胶原等,我们在实验中发现,人胎盘胶原较鼠尾胶原等更宜于兔气管上皮细胞的贴壁。血清含有玻璃结合体和纤维结合素有促进细胞贴壁的作用,因此用含5%FCS的DMEM/F₁₂培养24小时,也是促进气管上皮细胞贴壁的一个有效的方法,但血清中的一些未知因子使细胞对生长因子和激素的应答受到抑制,不利于上皮细胞生长和分化^[5]。故用5%FCS DMEM/F₁₂培养24—48小时后应及时更换为无血清培养。无血清培养基中所含的ECGS、INS、TF可促进细胞的扩增,而EGF、HC、T₃能促进细胞的分化、成熟以及功能表达^[6]。在5%FCS DMEM/F₁₂培养条件下,3天后细胞增殖明显低于无血清培养,与文献报道相似^[5]。套皿中培养基的液面高度对细胞的生长及分化有明显影响,在0mm、1.4mm、8mm液面高度条件下培养,5天

内1.4mm高度的培养基对细胞的增殖较为有利,此后0mm条件对细胞的分化成熟以及复层形成较佳,而8mm液面高度较前两者差。这或许与低液面高度改善了细胞O₂的摄入和CO₂的排除有关^[8,9]。dome^[7]是气管粘膜上皮细胞离子跨膜转运功能活跃的一种表现,水随离子的主动转运而在上层细胞与底层细胞之间积聚形成“穹隆”。在原代细胞培养7天后便可见dome形成,并随培养时间延长而增大,且可维持1月以上。

气管上皮细胞的鉴定常用光镜、电镜及免疫组化检查。我们培养的气管上皮细胞在光镜下呈复层生长,上层为较大的,底层为较小的圆形细胞并有dome形成;用免疫组化检查,细胞角蛋白染色呈阳性,与文献报道一致^[2,5],可确认为气管上皮细胞。

气液界面培养更接近气管上皮细胞的天然生长环境,已有文献证明用该方法培养的细胞其离子转运功能较单层培养远接近于正常生理情况。这一方法的建立无疑为研究气管上皮细胞的功能、代谢和病理变化提供了一个很好的实验模型。此外,气管上皮是呼吸道防御机制的重要屏障,呼吸道反复慢性感染与粘膜上皮异常密切相关,近两年有学者利用气液界面模型研究呼吸道上皮抗感染防御机制已取得重大突破^[10,11]。我们用该模型进行呼吸道内源性抗生素基因转染的实验研究,也已获初步结果。

摘 要

用低温酶消化法分离兔气管上皮细胞,具有细胞损伤小,活力及纯度高的优点,成纤维细胞污染极低。人胎盘胶原提高了气管上皮细胞贴壁性。无血清培养基能促进细胞增殖,分化和成熟。气液界面培养方式更好地模拟了气管上皮细胞的天然生长环境,在膜上呈复层生长,有利于细胞的分化成熟及功能表达。光镜下细胞形态及免疫组化细胞角蛋白染色阳性证实培养细胞为气管上皮细胞。本文所建立的兔气管上皮细胞体外气液界面无血清培养方法为研究气

管上皮细胞的生理和病理提供了一个十分有用的模型。

关键词：气管上皮细胞 无血清培养基
气液界面培养 兔

参 考 文 献

- [1] Yamaya. M. Finkbeiner WE, Chun SY, et al., 1992, *Am. J. Physiol.*, **262**:L713-724.
- [2] Armelle BS, Emmanuelle BU, Guiliandlli C, et al., 1994, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **30A**: 56-67.
- [3] Harris CC, 1987, *Cancer Res.*, **47**:1-10.
- [4] Kondo M, Finkbeiner WE, Widdicombe JH., 1991, *Am. J. Physiol.*, **261**: L106-117.
- [5] Wu R. Smith D, 1982, *In Vitro*, **18**: 800-812.
- [6] Scott MR Lee NP, Yankaskas, JR et al., 1988, *Am. J. Physiol.*, **255**:c237-245.
- [7] Widdicombe JH, Coleman DL. Finkbeiner WE, et al., 1987, *Cell Tissue Research*, **247**: 95-103.
- [8] Adler KB, Cheng PW, Kim DC, 1990, *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **2**:145-154.
- [9] Whitcutt MJ, Adler KB, Wu R. 1988, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **24**:420-428.
- [10] Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, et al., 1996, *Cell*, **86**:299-236.
- [11] Goldman MJ, Andersern GM, Stolzenberg ED, et al., 1997, *Cell*, **88**:553-560.

STUDIES ON PRIMARY CULTURE OF RABBIT TRACHEAL EPITHELIAL CELLS IN SERUM-FREE HORMONE-SUPPLEMENTED MEDIUM IN A BIPHASIC CHAMBER SYSTEM

HUANG Ning WU Qi LI Sheng Fu TANG Bin WANG Bo Yao

(Department of Pathophysiology, West China University of Medical Science Chengdu, Sichuan 610041)

ABSTRACT

In order to study the physiology and pathophysiology of tracheal epithelium, a primary culture of tracheal epithelial cells at air-liquid interface has been established in our laboratory. Rabbit tracheal epithelia were isolated by using low temperature protease digestion, which was not harmful to the cell viability and could almost eliminate fibroblastlike cells. Coating human placenta collagen was beneficial to the attachment of epithelial cells. Serum-free hormone-supplemented medium could promote cell multiplication and differentiation. Biphasic chamber system provided an air-liquid interface, an environment closely resembling to the in vivo situation, allowing multicellular layers of epithelium to grow. The nature of the tracheal epithelial cells was confirmed by morphology and immunocytochemistry. This culture system provided an ideal model for more sophisticated in vitro modelling of in vivo functions and thus would be useful in the study of physiology and pathophysiology of tracheal epithelium.

Key words: Tracheal epithelial cell Biphasic cultivation Serum-free medium Rabbit

鼠脑微血管内皮细胞的分离与长期培养

钱志远 黄强 周丽英 孙志方

(苏州医学院附属第二医院神经外科 苏州 215004)

近年来,关于大血管内皮细胞的体外培养已有大量报道,而对机体内含量最丰富,机能最复杂的微血管内皮细胞培养的研究却较少。本文报告对Rupnick^[1]法加以改进后建立的一种简便易行的鼠脑微血管内皮细胞(BMEC)的分离方法,长期进行细胞培养,对其生物学特性进行初步观察。

材 料 和 方 法

一、脑微血管内皮细胞的分离

取8-10只5-7日龄的SD鼠(苏州医学院实验动物中心提供),雌雄兼用。颈动脉放血处死后,随即置入75%的乙醇中浸泡3-5分钟,进入操净工作台无菌操作。沿鼠脑正中线剪开颅骨,剔除硬脑膜,取出两侧