

# 介绍细胞共培养的两种方法\*

王培勇 刘 健 许蜀闽 孙秉庸

(第三军医大学高原医学研究室病理生理教研室 重庆 630038)

同一类型或不同类型的细胞是通过旁分泌可溶性因子或直接接触而进行相互作用。这种细胞间通讯是维持正常器官、组织及细胞功能和结构的重要环节。细胞间正常调节关系的破坏是导致异常分化、肿瘤发生的原因之一。因此,细胞间相互关系的研究是当今医学和生物学的一个重要方向。要进行这方面的研究往往离不开细胞培养,特别是细胞共培养(coculture)。本文报道我们采用国产材料摸索出的两种易于观察细胞相互作用的共培养方法:套皿(insert)培养法和培养液循环灌注法,具有普通实验室均易实现的特点。

## 材料与方 法

### 1. 主要器材与试剂

单组份室温硫化硅橡胶粘合剂(晨光化学工业公司)、混合纤维素酯微孔滤膜(上海新亚净化器件厂)、5 ml 聚碳酸酯塑料注射器、恒流泵、硅胶管等材料,以及明胶、培养液、 $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶核苷( $^3\text{H}$ -TdR,北京原子核研究所)、小牛血清等试剂均属国产。

### 2. 微孔底膜套皿的制备

混合纤维素酯微孔滤膜采用文献介绍的方法进行处理<sup>[1]</sup>,略作改动,即先用0.1%冰乙酸溶液浸泡30分钟,双蒸水浸泡30分钟,然后用0.5%明胶溶液煮

30至60分钟,将上述处理过的滤膜烤干备用(80℃,1至2小时)。将5 ml 一次性注射器套管切成12 mm高的圆环,用硅橡胶粘合剂将备用滤膜粘于圆环一端作为底部,并用少许硅橡胶在底部边缘做三个小支脚,室温倒置数小时待硅橡胶完全固化后即可高压灭菌(15磅,15分钟)备用。用时与24孔塑料培养板配套使用,如图1所示。

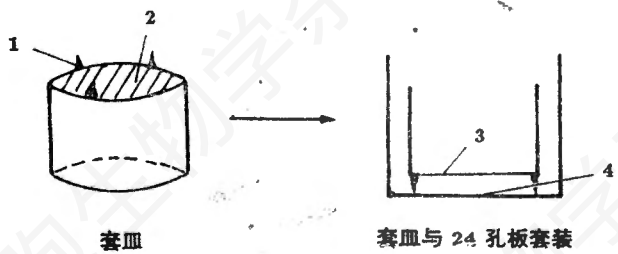


图1 微孔底膜套皿的制备及使用方法

1. 支角 2. 滤膜 3. 细胞A 4. 细胞B

### 3. 培养液循环法

装置组成及原理如图2所示。循环管道选用无毒医用硅胶管及不锈钢管连接,末端加400目尼龙筛网,以防两种细胞混杂,整套管道及培养瓶(玻璃培养瓶)可以从恒流泵上拆下进行高压灭菌。利用泵的作用使培养液在两个培养瓶之间不断循环,并可根据需要调整流量。通过三通可施以药物干预或取样分析。整套装置可置于37℃恒温箱内。

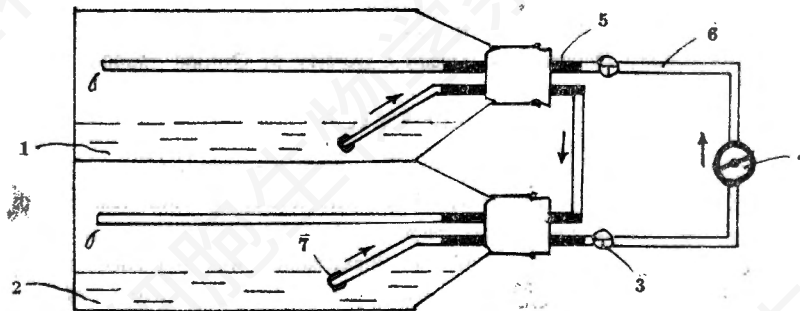


图2 培养液循环培养装置

1. 细胞A 2. 细胞B 3. 三通 4. 恒流泵 5. 不锈钢管(16号针头) 6. 硅胶管 7. 尼龙筛网

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39270316)。

#### 4. 细胞培养

新生小牛肺动脉内皮细胞(pulmonary artery endothelial cells, PAECs)和肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASM)按以往的方法培养鉴定<sup>[2,3]</sup>。培养成功后进行下列实验,以观察上述装置培养细胞的可行性。

(1) 细胞单独培养 将 PAEC 和 PASM 分为 24 孔培养板对照组、套皿培养组及灌注培养 3 组,分别单独以  $10^4/\text{cm}^2$  的密度接种于上述装置。接种培养 3 天后用 0.125% 的胰蛋白酶消化,将细胞分散后镜下计数,以观察细胞生长密度;另设分组实验观察细胞单独培养长成致密单层的时间。所用培养液为含 20% 小牛血清的 RPMI-1640。

(2) 细胞共培养实验 先将 PAEC 和 PASM 以  $4 \times 10^4/\text{cm}^2$  密度分别接种于 24 孔板及套皿中,在含 20% 小牛血清的培养基中培养 24 小时待细胞贴壁后,换以不含小牛血清的培养基,并将 PAEC 和 PASM 配

对组共培养 24 小时,然后每孔加入  $2 \mu\text{Ci}$  的  $^3\text{H-TdR}$ ,继续培养 6 小时后收集细胞进行  $\beta$ -液闪计数。平行设置 PASM 和 PAEC 单独培养对照组。

#### 5. 统计处理

所得数据采用单因素方差分析,并进行差异显著性检验。

## 结 果

### 1. 细胞单独培养的生长情况

以  $10^4/\text{cm}^2$  细胞密度接种于微孔滤膜、灌注装置和 24 孔板上的 PAEC 和 PASM 的生长情况无明显差别。内皮细胞约 3—4 天可长成致密单层,平滑肌细胞则需 5—6 天长成致密单层。培养 3 天后同种细胞密度在不同组之间也无明显差别(表 1)。

表 1 培养在不同装置的细胞计数 ( $10^4/\text{cm}^2$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

	24 孔板	套 皿	灌注装置
PAEC	$7.468 \pm 0.884$	$7.033 \pm 0.771$	$7.595 \pm 1.083$
PASM	$4.345 \pm 0.658$	$4.670 \pm 1.059$	$4.615 \pm 1.718$

### 2. 两种细胞共培养的结果

采用套皿共培养法将 PAEC 和 PASM 共培养 24 小时后,PAEC 的  $^3\text{H-TdR}$  掺入明显降低,与单独培养组相比差异显著( $p < 0.05$ );但是 PASM 的  $^3\text{H-TdR}$  掺入明显增加,与单独培养组相比也有显著性差别( $p < 0.01$ , 表 2)。

表 2 套皿法共培养对 PAEC 和 PASM 的  $^3\text{H-TdR}$  掺入的影响 (cpm/ $10^4$  cells,  $\bar{x} \pm s$ )

	单独培养	共培养
PAEC	$1287.21 \pm 228.62$	$973.50 \pm 279.68^*$
PASM	$1285.54 \pm 99.79$	$1518.73 \pm 228.03^{**}$

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  与单独培养组相比。

## 讨 论

通过细胞共培养的手段观察两种不同类型细胞之间的相互作用,目前见于文献报道的有下述三种方法<sup>[1,4,5]</sup>:(1) 混合培养(mixculture),将所研究的不同种类细胞混合在同一

培养器皿中培养,观察细胞的直接接触,但很难将培养在一起的不同种类细胞分离观察。(2) 微载体培养法。即将一种细胞培养在微载体上,另一种细胞培养在培养皿中,随后将微载体细胞也加入培养皿中,过一定时间即可观察两种细胞相互作用,但这种方法一般应小于 4 小时,以防止细胞从微载体上迁移至培养皿中<sup>[5]</sup>。(3) 微孔底膜套皿培养法(micropore membrane insert well),这种培养套皿底部由无机或有机材料的微孔膜制成,因为可溶性物质可以自由通过,培养在套皿中的细胞可以通过膜与培养在培养皿中的细胞相互作用。这种套皿在国外已商品化,但价格昂贵。为解决这一问题,我们设计了本文所介绍的细胞共培养的两种方法。实验观察证明,PAEC 和 PASM 均能在这些装置上生长,其生长情况与培养在 24 孔板者无明显差别。特别需要注意的是,在制作套皿时必须用无毒硅橡胶做粘合剂,不能用环氧树脂或氯丁胶,因为我们观察表明后 2 种粘合剂对细胞有毒性作用,可使培养的细

胞脱落死亡。我们采用套皿共培养的方法观察了PAEC和PASM的相互作用,实验结果表明,共培养后的PAEC的DNA合成降低,而PASM的DNA合成增加。该种模型还可用于体外培养血管内皮细胞单层通透性的研究,以及用于培养细胞电镜制样的原位包埋。灌流培养法只适用于观察贴壁生长的细胞之间的相互作用,通过串联还可以同时观察更多的培养瓶,故特别适用于获取大量的细胞样本。

### 摘 要

本文设计了两种共培养装置:微孔底膜套皿和循环培养,观察了培养的小牛肺动脉内皮细胞(PAEC)和肺动脉平滑肌细胞(PASM)在上述装置中的生长情况,并用套皿法观察了两者共培养对<sup>3</sup>H-TdR掺入的影响。结果发现,PAEC和PASM在上述装置中生长良好,两者

共培养时,PAEC的<sup>3</sup>H-TdR掺入明显降低(与对照组相比 $p < 0.05$ ),而PASM的<sup>3</sup>H-TdR掺入明显升高(与对照组相比 $p < 0.01$ )。上述结果表明:本文设计的两种装置可用于细胞共培养,以研究细胞间的相互调节关系。

关键词: 共培养 套皿装置 灌流装置

### 参 考 文 献

- [1] Saunders KB, et al., 1992, *In Vitro Cell Dev Biol.*, 28 A(7-8): 521-528.
- [2] 王培勇等, 1995, 第三军医大学学报, 17(1): 11-14.
- [3] 王培勇等, 1995, 第三军医大学学报, 17(3): 212-213.
- [2] Xu CB, et al., 1991, *Pharmacol Toxicol.*, 69(3): 195-200.
- [3] Ganz P, et al., 1986, *Pro Nat Acad Sci USA.*, 83: 3552-3556.

## TWO IN VITRO COCULTURE MODELS FOR INVESTIGATION OF CELL-CELL INTERACTIONS

Wang PeiYong, Liu Jian, Xu ShuMin, Sun BingYong  
(Lab. of High Altitude Medicine, Department of Third Military Medical College, Chongqing 630038)

### ABSTRACT

Two coculture systems, micropore membrane insert well and medium circulating culture methods, were developed for investigating heterotypic cell-cell interactions. It was found that bovine pulmonary artery endothelial cells (PAECs) and pulmonary artery smooth muscle cells (PASM) grew well in the above systems. <sup>3</sup>H-thymidine uptake by PAECs decreased and that by PASM elevated significantly ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  respectively, compared with control). These results proved that the above methods are useful for the studies of cell-cell interactions. It also suggested that intercellular interactions between PAECs and PASM may be involved in the regulation of DNA synthesis by vascular cells.

Key words: Coculture Insert well Medium perfusion device

细胞生物学杂志 1996 年第 18 卷第 2 期  
国内统一刊号: CN 31-1487/Q

编辑 细胞生物学杂志编辑委员会  
上海岳阳路 320 号(200031)  
主编 左嘉客  
出版 上海科学技术出版社  
发行 上海市报刊发行局  
订阅 全国各地邮局  
印刷 中国科学院上海分院印刷所

ISSN 0253-9977



刊号 4-296 1996 年 6 月 定价: 2.50 元