

- 2 McGuire E J, Woodside J R, Borden T A, *et al.* Prognostic value of urodynamic testing in myelodysplastic patients. J Urol, 1981, 126 (2): 205 - 209
- 3 McGuire E J, Woodside J R, Borden T A. Upper urinary tract deterioration in patients with myelodysplasia and detrusorhypertonia: a followup study. J Urol, 1983, 129 (4): 823 - 826
- 4 宋波,熊恩庆. 男性膀胱下尿路梗阻//:金锡御,宋波. 临床尿动力学. 北京:人民卫生出版社,2002:217
- 5 李艳芹,张亚琼,张晓春. 按需夹管排尿法训练膀胱功能. 护理学杂志(外科版),2008,23(16): 18 - 19
- 6 应燕萍,廖明珍. 脊髓损伤后痉挛性膀胱患者的康复训练. 护理学报, 2008,15 (6):46 - 47
- 7 陈维秀,陈雨历,朱兰洁. 膀胱高压和上尿路功能损害. 中华小儿

- 外科杂志,2000,21(3): 167 - 169
- 8 吴士良,杨勇,段继宏,等. 良性前列腺增生导致肾积水的尿动力学机制. 中华泌尿外科杂志,2001,22(5):296 - 298
- 9 杨勇,吴士良,那彦群,等. 脊髓栓系病人的尿动力学评估和治疗对策. 中华泌尿外科杂志,2002,23(5):267 - 269
- 10 刘奎,文建国,张鹏,等. 女性充盈性尿失禁上尿路扩张患者尿动力学分析. 郑州大学学报(医学版),2006,41(2):212 - 214
- 11 Edward J McGuire, Jeffrey R Woodside, Thomas A Borden, *et al.* Prognostic value of urodynamic testing in myelodysplastic patients. J Urol,2002, 167(2): 1049 - 1054

(收稿:2010 - 03 - 15)

(修回:2010 - 05 - 27)

两种培养液对 Beagle 犬牙龈成纤维细胞生物学活性的影响

钟 泉 闫福华 李艳芬

摘 要 **目的** 探讨两种常见培养液:DMEM 和 RPMI1640 对 Beagle 犬牙龈成纤维细胞生物学活性的影响。**方法** 使用半消化 + 改良组织块法原代培养 Beagle 犬牙龈成纤维细胞,了解两种培养液下 Beagle 犬牙龈成纤维细胞游出成功率的差异;使用 MTT、流式细胞仪检测两种培养液下细胞增生的情况;使用免疫细胞化学的方法检测两种培养液下 Beagle 犬牙龈成纤维细胞体外表达 I 型胶原的差异。**结果** DMEM 和 RPMI1640 对 Beagle 犬牙龈成纤维细胞的游出成功率、增生以及 I 型胶原的表达均无显著性差异。**结论** DMEM 和 RPMI1640 两种培养液均适合 Beagle 犬牙龈成纤维细胞的培养。

关键词 DMEM RPMI 1640 牙龈成纤维细胞 生物学活性

Effects of Tow Media on Bioactivities of Gingival Fibroblasts of Beagle Dog. Zhong Quan, Yan Fuhua, Li Yanfen. Department of Periodontology, Affiliated Stomatological Hospital of Fujian Medical University, Fujian 350002, China

Abstract Objective To observe the effects of tow media, DMED and RPMI 1640 on bioactivities of gingival fibroblasts of Beagle dog. **Methods** The gingival fibroblasts of Beagle dog were isolated, cultured and purified by half - digestion and improved tissue block culture. The difference of successful rate of gingival fibroblasts' emigration under the two media was detected by repeated experiments. The differences of proliferation and expression of collagen I were investigated by MTT (flow cytometry) and immunocytochemistry respectively. **Results** There was no significant difference between DMEM and RPMI1640 in successful rate of emigration, proliferation and expression of collagen I. **Conclusion** The two media, DMEM and RPMI1640 were both fit for the culture of gingival fibroblasts.

Key words DMEM; RPMI 1640; Gingival fibroblasts; Bioactivities

组织工程中的三要素之一——种子细胞的培养至今仍然是组织工程技术中一个十分重要的研究领域^[1]。鉴于体外培养的条件与细胞在体内生长的微环境仍然具有很大的差异,因此,如何确保种子细胞

的存活、增生,并保留原来的生物学活性以及按照人为的设计,定向诱导、分化种子细胞,使其最终转化为人所需要的器官和组织一直是组织工程学研究中的重中之重。细胞培养在体外的基本条件就是培养液;不同细胞对培养液的要求和选择有所不同,而且在不同培养液中展示出的生物学活性也呈现差异。因此,本研究将讨论两种常见的培养液——DMEM(低糖型)和 RPMI1640 对 Beagle 犬牙龈成纤维细胞

基金项目:国家自然科学基金(30471892)、福建医科大学重点学科建设学术发展基金[闽医大口腔(2008)39号]

作者单位:350002 福州,福建医科大学附属口腔医院牙周科

生物学活性的影响。

材料与方法

1. 材料: DMEM 低糖型细胞培养基、RPMI1640 培养基 (Gibco, 美国), Hyclone 胎牛血清 (海克隆生物化学有限公司, 北京), 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (Sigma, 美国), 二甲基亚砷 (DMSO) (Invitrogen, 美国), 兔抗人 I 型胶原多克隆抗体 (博士德生物工程有限公司, 武汉), 羊抗兔 Ultrasensitive™ SP 超敏试剂盒以及 DAB 显色试剂盒 (迈新生物技术开发有限公司, 福州), HEAL FORCE 超净工作台 (力申科学仪器有限公司, 上海), 倒置相差显微镜 (广州光学仪器厂, 广州), 细胞培养箱 (Heraeus, 德国), Olympus 倒置相差荧光显微镜 (带摄影系统) (Olympus, 日本), HumanReader 酶标仪 (Human, 德国), CycleTEST™ Plus DNA Reagent Kit (BD, 美国), FACSCalibur 流式细胞仪 (BD, 美国)。Beagle 犬 5 只, 源于四川省医学科学院实验动物研究所, 许可证号: SCXK (川) 2004-15。12 个月龄, 体质量 10~13kg, 雄性。实验动物购买后, 圈养于中国人民解放军南京军区福州总医院比较医学科。

2. 方法: (1) 细胞原代培养的方法见文献 [2], 从 5 只 Beagle 犬的磨牙和前磨牙区取游离龈, 于无菌的培养皿内剪碎成 0.5~1.0mm 大小的, 随后按每孔 3~4 块进行接种, 共接种 90 孔。随后分别使用两种培养液进行培养, 计算培养游出成功率。(2) 待大量传代后, 取相同代次的细胞, 在倒置相差显微镜下进行观察。相同的放大倍率以及色彩下观察两种培养液下细胞的外形。(3) 细胞的增生: 两组细胞各取生长良好且相同代次的细胞 (第 4 代)。使用 0.25% 的胰酶和 0.1% 的 EDTA 进行消化, 以每孔 3000 个细胞接种到两个 96 孔板, 每孔体积 200 μ l。以单纯的培养液组作为空白对照, 从培养第 2 天开始, 连续观察 8 天, 每天每组平行测定 3 孔, 结果取平均值。每孔中加入 5mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l, 培养 4h 后取出, 小心弃去上清液, 每孔加 150 μ l DMSO, 充分溶解蓝紫色结晶物, 放 37℃ 孵箱内 10min, 振荡 3min, 酶标仪上选取 492nm 波长测定各组的吸光度值 (OD 值)。(4) 流式细胞仪观察细胞周期: 各取两组第 3 代细胞, 按 CycleTEST™ Plus DNA Reagent Kit 说明书观察两种培养液下细胞周期的差异。(5) 免疫细胞化学法检测两组细胞在表达 I 型胶原上的差异性: 各取相同代次的细胞 (第 4 代), 接种于 2.5cm $\times$ 2.5cm 的玻片上, 接种的密度为 10000 个/张, 分别使用两种培养液进行连续培养 5 天, 待玻片上的细胞长满, 取出玻片, 使用 PBS 小心洗涤玻片表面, 随后使用 95% 的乙醇进行固定 30min, 固定完毕后, 进行免疫细胞化学染色。每组培养液取 4 张玻片, 每张玻片上于染色中心四角在相同倍率和色彩度下拍摄 4 张图片。确保每张照片上细胞均占满整个图像区。使用 ImagePro Plus 6.0 软件, 以 IOD/Area (integrated optical density, IOD, 累及光密度; Area, 面积) 作为平均光密度值, 比较两组玻片中棕色 (其中 HSI 值, H=29, S 及 I 值为 0~155) 平均光密度的差异。

3. 统计学方法: 使用 SPSS 13.0 进行统计学分析处理。两种培养液培养下, 牙龈成纤维细胞最早游出成功率使用 χ^2 检

验, MTT 法测得的 OD 值、细胞周期比率以及 IOD/Area 采用独立样本成组 t 检验。以 $P < 0.05$ 作为显著性标准。

结 果

1. 两培养液组牙龈成纤维细胞最早游出的天数及培养成功率: 两组培养液一共培养了 90 个孔 (DMEM 48, RPMI1640 42), 污染 15 个孔 (DMEM 8, RPMI1640 7), 游出细胞孔数为 67 个。其中, DMEM 组 35 孔, RPMI1640 组 32 孔。DMEM 组最早游出的时间为 6 天, 最迟游出的时间为 18 天。而 RPMI1640 组最早游出的时间为 9 天, 最迟游出的时间为 18 天。通过 χ^2 检验检测二者游出成功率, $P = 0.722 > 0.05$, 认为两者在游出成功率上并无差别, 仅认为 DMEM 组较 RPMI1640 组略先游出。

2. 两种培养液培养下牙龈成纤维细胞在倒置相差显微镜下的形态: 两种培养液培养下, Beagle 犬的牙龈成纤维细胞在形态上均呈梭形, 倒置显微镜下, 细胞胞体较长, 胞质内透明。当细胞生长到一定密度时, 两种培养液培养的细胞生长均呈现一定的方向性 (第 140 页彩图 8)。

3. MTT 法检测两种培养液培养下细胞的增生曲线。图 1 中见两者在增生速率上基本一致, 仅在第 4 天换液后, DMEM 组增生略快。使用独立样本成组 t 检验检测两者 8 天的 OD 值, $P = 0.772 > 0.05$ 。认为两者在增生速率上无差异性。

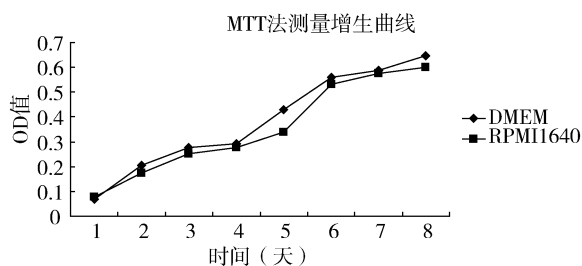


图 1 两种培养液对 Beagle 犬牙龈成纤维细胞增生的影响

4. 流式细胞仪检测两组细胞的增生周期。DMEM 组和 RPMI1640 组两组的 S 期所占的比例分别为 6.34% 与 5.46% (图 2), 多次测量两组细胞, 两者的 S 期细胞所占比例无统计学差异 ($P > 0.05$, 数据未显示)。

5. 免疫细胞化学检测两种培养液对牙龈成纤维细胞表达 I 型胶原的影响 (第 140 页彩图 9)。使用独立样本成组 t 检验检测两组玻片的 IOD/Area 值, $P = 0.327 > 0.05$, 两者在表达 I 型胶原上无显著性差异 (图 3)。

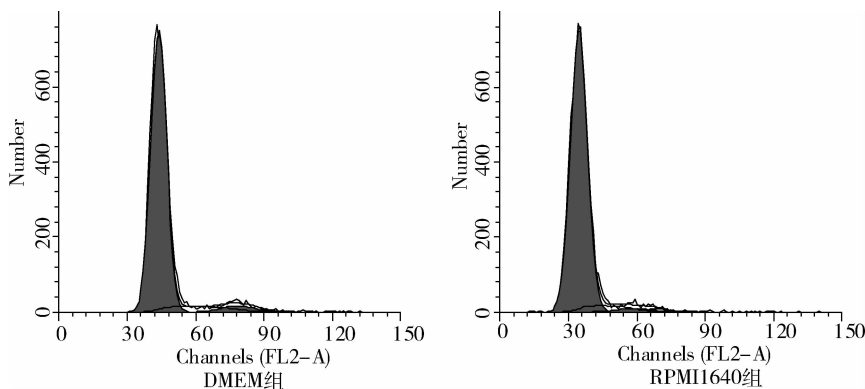


图2 两种培养液下的细胞增生周期

DMEM 组: Diploid: 100.00%, Dip G_1 : 89.94% at 43.79, Dip G_2 : 3.72% at 78.32, Dip S: 6.34%, G_2/G_1 : 1.79%; CV: 7.83%; RPMI1640 组: Diploid: 100.00%, Dip G_1 : 92.24% at 34.59, Dip G_2 : 2.30% at 58.55, Dip S: 5.46%, G_2/G_1 : 1.69%; CV: 10.69

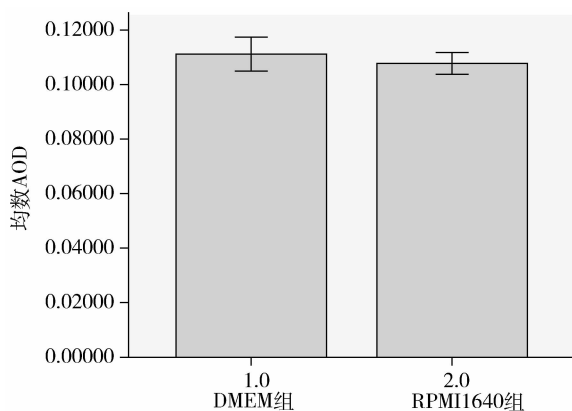


图3 两组培养液下的 IOD/Area 值

讨 论

DMEM 和 RPMI1640 是目前体外培养哺乳动物细胞最为常见的培养液。DMEM 是在最低必须培养液 (Eagle's minimum essential medium, MEM) 基础上改良而来的一种培养液。其在 MEM 的基础上添加了许多营养成分,可分为高糖型和低糖型。高、低糖型分别含葡萄糖 4500mg/L 以及 1000mg/L。高糖型适合生长较快,附着性差的肿瘤细胞,如杂交瘤中的骨髓瘤细胞, DNA 转染的细胞等培养。RPMI1640 特别适合于悬浮细胞的生长,早期主要作为淋巴细胞的体外培养。当然很多正常细胞也可使用其进行体外培养,它是目前应用最为广泛的培养液之一^[3]。DMEM 与 RPMI1640 间的主要区别在于:两者在某些氨基酸、缓冲对、维生素以及微量元素上存在比较显著的差异^[3]。关于不同培养液对牙周相关细胞生物学活性上的差异,更多的研究似乎集中在具有成骨能力的细胞系上,而且不同学者的研究不尽相同。有学

者认为,DMEM 和 RPMI1640 的主要区别在于其钙、磷的相对含量不同,0 ~ 4mmol/L 钙浓度的增加可促进成骨细胞的增生,而 RPMI1640 组分中恰好缺少氯化钙这一成分^[4]。本实验室其他研究也发现:DMEM 组分中高浓度的钙可能是提高骨膜细胞的增生、碱性磷酸酶的表达以及矿化结节形成率的主要原因^[5]。李谨等^[6]研究发现, RPMI1640 比 DMEM 更适合人牙周韧带细胞的培养(高游出率);白忠诚等^[7]研究也发现, RPMI1640 比 DMEM 更适合成纤维样细胞的生长,而 DMEM 则适合上皮样细胞的生长。另外,在选择其他培养基作为对比的文献中,研究者认为,与 DMEM 相比, α -MEM 除能显著提高人牙周韧带细胞碱性磷酸酶的活性外,还能显著增强细胞的贴壁率^[8,9]。研究者的回顾性研究发现,牙龈成纤维细胞培养基的选择正逐步从 RPMI1640 向 DMEM 发生转变。仅以国内维普数据库为例,以“牙龈成纤维细胞”作为关键词对 1989 ~ 2009 的所有文献进行检索,发现使用 DMEM 进行培养者占 74.23%,而使用 RPMI1640 者占 21.65%,且使用 RPMI1640 者集中于 2003 年以前(具体数据未给出)。国外文献的检索结果也与此基本一致。但是,证实 DMEM 在牙龈成纤维细胞培养上优于 RPMI1640 的文献尚未见报道。

本实验研究发现,就两种培养液而言,在培养成功率、细胞增生速率以及 I 型胶原合成方面,两者并无显著性差异。其主要差异集中在细胞游出的最早时间上(具体的机制有待进一步研究)。在进行组织块原代培养的过程中,贴壁细胞游出越早、其培养成功率也就越高^[6]。因此研究者认为,早期细胞的游出可能是 DMEM 逐步取代 RPMI1640 的主要因素之

一。另外,正如前文所述,DMEM 更适合具有成骨能力的细胞增生和矿化,因此它能更为广泛地适用于牙周韧带细胞、成骨细胞、骨膜细胞、牙髓干细胞的培养。其通用性决定了它较宽的应用范围。再者,近些年来关于组织工程干细胞的培养,研究更多地集中于培养基中添加成分的作用,在基础培养基培养功效相似的情况下,研究侧重于诸如细胞因子(生长因子的定向诱导)、营养条件(血清的种类、糖的含量)等方面的研究^[10]。因此,作为一种通用型的培养基,DMEM 与上述添加成分的联合应用也就日渐广泛。本实验还发现,在培养成功率方面,血清的作用比培养基的作用似乎更大。使用国产的新生牛血清和澳洲胎牛血清的培养成功率均不高,而只有在使用高品质的 Hyclone 胎牛血清时,其培养成功率最为稳定。究其原因,可能是此类培养基中的生长因子以及其他营养成分浓度较高所致。I 型胶原是牙龈结缔组织中的主要成分,其主要由牙龈成纤维细胞合成,I 型胶原稳定的合成和代谢是健康牙龈组织的重要保障^[11]。本研究发现,两种培养基对细胞在体外 I 型胶原的表达无差异。因此,DMEM 和 RPMI1640 两种培养基均适合 Beagle 犬牙龈成纤维细胞的体外培养。

参考文献

- 1 Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, *et al.* In situ tissue engineering of periodontal tissue by seeding with periodontal ligament - derived cells[J]. Tissue Eng, 2004, 10(3-4): 537-544

- 2 钟泉,闫福华,李艳芬,等. Beagle 犬牙龈成纤维细胞的体外培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(50):9801-9805
- 3 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M],2 版,西安:世界图书出版西安公司, 2007:41-45
- 4 Leopez - Cazuax S, Bluteau G, Magne D, *et al.* Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp - derived cells; technical note[J]. Eur Cell Mater, 2006,11: 35-42
- 5 Wu X, Lin M, Li Y, *et al.* Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum - derived cells[J]. Cytotechnology, 2009, 59(2):103-111
- 6 李瑾,蒋春梅,孙卫斌. 人牙周膜成纤维细胞体外培养条件的优化[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(6): 333-335
- 7 白忠诚,司徒镇强,刘斌,等. RPMI1640, DMEM 及不同生长因子对大鼠颌下腺细胞生长作用的观察[J]. 口腔颌面外科杂志, 2003, 13(3): 196-199
- 8 Hou LT, Li TI, Liu CM, *et al.* Modulation of osteogenic potential by recombinant human bone morphogenic protein - 2 in human periodontal ligament cells; effect of serum, culture medium, and osteoinductive medium[J]. J periodontal Res, 2007, 42(2):244-252
- 9 须珏华,胡静波,周燕,等. 培养基对兔骨髓间充质干细胞扩增与分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(3): 467-470
- 10 Sant'Ana AC, Margues MM, Barroso TE, *et al.* Effects of TGF - β 1, PDGF - BB, and IGF - 1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro[J]. J Periodontol, 2007, 78(10): 2007-2017
- 11 Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva[J]. Periodontology,2000,2000,24(1):28-55

(收稿:2010-03-28)

(修回:2010-05-26)

α ENaC 基因 T663A 和 T3593C 多态性与新疆哈萨克族血压及血电解质相关研究

李南方 徐 红 周 玲 杨 进 罗文利

摘 要 **目的** 研究 α ENaC 基因 T663A 与 T3593C 多态性及联合基因型与哈萨克族人血压、电解质的关系。**方法** 采集 252 例原发性高血压(EH 组)、105 例血压正常(NT 组)哈萨克族牧民遗传标本,检测血清 K^+ 、 Na^+ 水平,用 PCR-RFLP 方法,鉴定 T663A 与 T3593C 多态。分析两多态基因型及联合基因型分布及其与该民族血压、电解质的关系。**结果** 该人群 T663A 多态 AA、AG、GG 基因型频率各为 15.7%、51%、33.3%,A、G 等位基因频率各为 41.18%、58.82%;T3593C 多态 TT、TC、CC 基因型频率各为 88.6%、10.6%、0.8%,A、G 等位基因频率各为 93.84%、6.16%。两组间上述基因型、等位基因频率均无统计学差异($P > 0.05$)。T3593C 基因型 TT 对象年龄水平低于 CC,T663A GG + AG + T3593C TT 基因型对象年龄水平低于其他联合基因型;而

基金项目:新疆维吾尔自治区科技攻关和重点科技项目[200633129(3)]

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院高血压科/新疆维吾尔自治区高血压研究所

通讯作者:李南方,电子信箱:lnanfang@yahoo.com.cn