

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.09.020

原代人尿道狭窄成纤维细胞的体外培养及鉴定^{*}

陈 渴¹, 张会波^{2△}, 武昌学²

(1. 陕西中医药大学, 陕西咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学第一附属医院泌尿外科, 陕西咸阳 712000)

摘 要: **目的** 对原代人尿道狭窄成纤维细胞的体外培养及鉴定, 了解其增殖能力及生物学特性。**方法** 人尿道狭窄成纤维细胞通过细胞的提取、传代、冻存与复苏获得。采用倒置显微镜观察、HE 染色及波形蛋白免疫染色的方法鉴定细胞。以人胚肺成纤维细胞为对照组, 以原代培养人尿道狭窄成纤维细胞的第 2、4 代及复苏后的第 2、4 代为试验组, 通过对比试验组与对照组的细胞生长曲线、噻唑蓝(MTT)及流式细胞仪的检测结果了解细胞的增殖能力。**结果** 倒置显微镜观察发现试验组与对照组细胞的形态相似, 细胞 HE 染色及波形蛋白免疫染色鉴定细胞为成纤维细胞。通过比较试验组与对照组的细胞生长曲线、MTT 及流式细胞仪的检测结果, 发现各组间差异无统计学意义($P>0.05$), 表明试验组与对照组的细胞具有相似的增殖能力。**结论** 该试验确立了人尿道狭窄成纤维细胞的原代培养。

关键词: 尿道狭窄; 原代培养; 成纤维细胞; 细胞鉴定

中图分类号: R318.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)09-1225-03

In vitro culture and biological characteristics of primary human urethral stricture fibroblasts^{*}

CHEN Ke¹, ZHANG Huibo^{2△}, WU Changxue²

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712000, China; 2. Department of Urology, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: **Objective** The primary cultured human urethral stricture fibroblasts were cultured in vitro to understand their proliferative capacity and biological characteristics. **Methods** Extraction and passage of cells, cryopreservation and resuscitation, can obtain fibroblasts. Cells were identified by inverted microscope observation, HE staining and vimentin immunostaining. The human embryonic lung fibroblasts were used as the control group, and the second and fourth generations of the primary culture and the second and fourth generations after the resuscitation were used as the experimental group. By comparing the cell growth curve of the experimental group with the control group, MTT, and flow cytometry results, the cell proliferation ability was understood. **Results** The morphology of the cells in the experimental group and the control group was similarly observed by inverted microscope. The cells were identified as fibroblasts by HE staining and vimentin immunostaining. By comparing the cell growth curve, MTT, and flow cytometry results between the experimental group and the control group, it was found that there was no statistical difference between the groups ($P>0.05$), indicating that the cells in the experimental group and the control group had the same proliferation ability. **Conclusion** The method for primary culture of human urethral strictures fibroblasts in vitro is successfully established.

Key words: urethral stricture; primary culture; fibroblast; cell identification

细胞培养是一项科学实验技术, 在现代生物科技中发展迅速, 越来越多地被人们用于更广泛的领域。近年来随经尿道泌尿系腔内操作技术的进步、公共交通方式的改变、炎症及术后尿道感染, 导致尿道狭窄的发病率逐渐升高^[1]。尿道狭窄形成的本质是异常瘢痕增生, 其组织学特点是大量成纤维细胞增生^[2]。为研究尿道狭窄的发病机制, 必须培养人尿道狭窄成纤维细胞。本试验选取 1 例尿道狭窄患者的病变部位组织, 通过贴壁培养法行体外成纤维细胞培养, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 人尿道狭窄组织 2 块, 由陕西中医

药大学第一附属医院泌尿外科提供。人胚肺成纤维细胞株 1 株, 购于武汉普诺赛生命科技有限公司。已获得患者的知情同意, 患者无全身器质性疾病。本试验已获得陕西中医药大学伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 CO₂ 培养箱、倒置显微镜、酶标分析仪、流式细胞仪由陕西中医药大学实验室提供; 胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、二甲基亚砜(DMSO)、多聚甲醛、噻唑蓝(MTT)、抗波形蛋白抗体、DMEM、青-链霉素、RNA 酶等, 均为以色列 BI 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 原代细胞的提取及传代 在无菌操作中, 切

^{*} 基金项目: 陕西中医药大学校内基金资助项目(2016QN17)。

作者简介: 陈渴, 女, 研究生, 主要从事泌尿外科疾病的基础与临床研究。△ 通信作者, E-mail: 63595073@qq.com。

取病变组织,用盐水、PBS 冲洗,将组织剪成大约 0.5 mm^3 的组织块,接种在培养瓶壁上,加入 0.25% 胰蛋白酶,放进 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 的细胞培养箱内孵育 $5\sim 10\text{ min}$,待大块组织消失后消化液浑浊时,吸出少许消化液在镜下观察,若已分散^[3],加入按比例配置的完全培养基 5 mL ,终止消化, $1\ 000\text{ r/min}$ 离心 5 min ,弃上清液,加入 PBS 缓冲液,重新悬浮细胞沉淀,离心,加培养基重悬细胞,放入细胞培养箱内。在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况及生长变化,并及时拍照。每 3 天换液 1 次,待长满瓶壁 $80\%\sim 90\%$,处于对数生长期时则可传代,用 PBS 清洗瓶壁,后加入胰酶消化后取出,镜下观察,若细胞变为单个类圆形,终止消化。离心,弃上清液,加入完全培养基,按 $1:2$ 比例传代。在培养瓶侧面标记好细胞名称,代数及传代日期。

1.3.2 细胞冻存与复苏 当细胞处于对数生长期时,在冻存前 1 d 更换培养基。取 $10\%\text{ DMSO}$ 和 90% 胎牛血清配制成细胞冻存液。将细胞离心后弃上清液,加 2 mL 冻存液,吹打使细胞混匀于冻存液中,再加入 3 mL 冻存液,移入多个冻存管中,标记细胞名称和日期。将冻存管先置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱 30 min ,后移入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱静置 2 h ,在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜,最后移至液氮中保存。细胞复苏时,将冻存的细胞于液氮罐中取出,快速置于约 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中轻轻晃动冻存管,约 90 s 后细胞溶解,快速把细胞移入装有 10 倍培养液的离心管中离心,弃上清液,加入培养液使细胞均匀,标记好细胞名称及日期,放入培养箱,复苏后第 2 天及时更换培养液。

1.3.3 细胞 HE 染色及细胞波形蛋白免疫染色 取生长状态良好的细胞,用胰酶消化,调整细胞浓度为 $1\times 10^5/\text{mL}$,将细胞培养于载玻片上,置于 6 孔板中,培养 24 h 后,取出细胞爬片,PBS 清洗后, 95% 乙醇固定 20 min ,再次清洗,进行 HE 染色,晾干细胞爬片后中性树胶封片。成纤维细胞含有特异的波形蛋白,利用其特异标志蛋白,可以成功鉴定成纤维细胞^[4]。所以本试验行波形蛋白免疫染色。同 HE 染色步骤培养细胞爬片,取出后用 4% 多聚甲醛固定,PBS 清洗,按试剂盒操作说明进行波形蛋白免疫染色。

1.3.4 MTT 法测定细胞的存活和生长 将浓度调

整为 $5\times 10^4/\text{mL}$ 的第 2、4 代及冻存复苏后的第 2、4 代人尿道狭窄成纤维细胞(试验组),对照组选人胚肺成纤维细胞,将细胞消化离心制成细胞悬液接种于 96 孔板中,培养 24 h 。取 5 个孔为调零孔,加入培养液、MTT 及 DMSO。每组设 5 个重孔,3 d 后将 MTT 在避光下加入待测孔,放入培养箱 4 h ,将待测孔内液体吸除加入 $0.1\%\text{ DMSO}$ $150\text{ }\mu\text{L}$,震荡 10 min ,参考波长选 490 nm 下测定光密度值(OD)值,测定细胞的增殖能力^[5]。

1.3.5 测定细胞生长曲线判定细胞活力 试验组选生长良好的人尿道狭窄成纤维细胞,对照组仍选人胚肺成纤维细胞,消化离心后制成细胞悬液,计数,将细胞接种于 24 孔板中,放入培养箱。每隔 1 d 取 3 孔细胞计数,每隔 3 d 给未计数的细胞换液。将计数的结果记录并绘制成坐标图,即为细胞的生长曲线图。

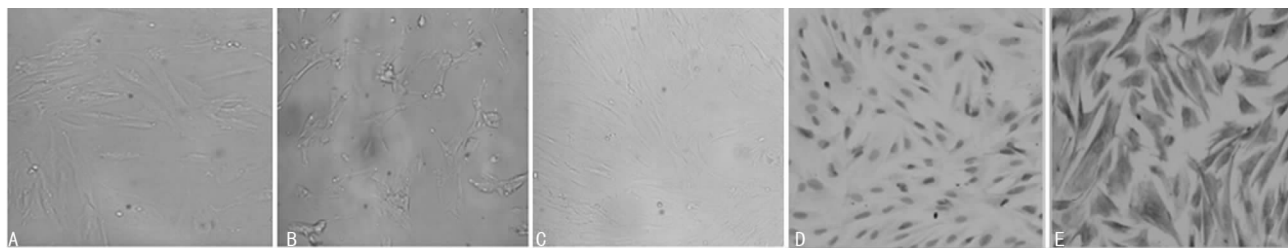
1.3.6 应用流式细胞仪检测细胞周期 试验组取原代培养的第 2、4 代及冻存复苏后的第 2、4 代的人尿道狭窄成纤维细胞,对照组选人胚肺成纤维细胞。将细胞浓度调整为 $2\times 10^7/\text{mL}$,消化、清洗、离心后,弃上清液,用预冷的 PBS 重悬细胞,加 75% 乙醇混匀后于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱固定 30 min ,取出后离心,吸除乙醇,再加入 PBS 混匀移入 1.5 mL 的尖底离心管内,再离心,加 PBS 和 RNA 酶,于培养箱内培养后加入碘化丙啶(PD)溶液室温下避光染色 30 min 。流式细胞仪上检测细胞周期。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 倒置显微镜下观察细胞生长情况 原代培养的人尿道狭窄成纤维细胞均呈贴壁生长,在第 1 天开始贴壁, $2\sim 3\text{ d}$ 时细胞生长繁殖, $3\sim 5\text{ d}$ 时生长旺盛, $5\sim 7\text{ d}$ 时细胞生长缓慢。倒置显微镜下观察细胞成扁平状、梭形、不规则形、排列成簇状。人胚肺成纤维细胞的生长及形态基本类似于试验组,见图 1。

2.2 HE 染色及波形蛋白免疫染色结果 HE 染色后,镜下观察,见细胞多为长梭形,细胞核近圆形,呈淡蓝紫色,细胞质为粉红色(图 1D)。波形蛋白免疫染色阳性,证明细胞是成纤维细胞(图 1E)。



注:A 为人尿道狭窄成纤维细胞第 2 代($\times 20$);B 为人胚肺成纤维细胞($\times 40$);C 为人尿道狭窄成纤维细胞第 4 代($\times 20$);D 为人尿道狭窄成纤维细胞第 2 代(HE, $\times 40$);E 为波形蛋白染色阳性($\times 400$)

图 1 倒置显微镜下细胞生长情况

2.3 MTT 检测结果 人尿道狭窄成纤维细胞的增殖能力很强,原代培养的第 2、4 代及冻存复苏后的第 2、4 代细胞的 OD 值分别为 1.080 ± 0.013 、 $1.077\pm$

0.013 、 1.068 ± 0.016 、 1.071 ± 0.02 ,原代培养人胚肺成纤维细胞的 OD 值为 1.065 ± 0.012 ,各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 测定生长曲线 见一段时间范围内,细胞生长与时间呈正相关,0~1 d 为潜伏期,1~3 d 为增殖期,4~5 d 为对数生长期,6~7 d 为平台期。试验组与对照组细胞的增殖能力均较强,见图 2。

2.5 流式细胞仪检测细胞生长周期 试验组与对照组细胞百分比和增殖指数(PI)值比较,差异无统计学

意义($P>0.05$);各试验组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。进一步说明原代培养的人尿道狭窄成纤维细胞第 2、4 代,以及冻存复苏后的第 2、4 代细胞均具有相似的增殖能力,试验组与对照组的细胞具有相似的增殖能力,见表 1。

表 1 试验组与对照组的尿道狭窄成纤维细胞及人胚肺成纤维细胞周期和增值指数($\bar{x}\pm s, n=5, \%$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI
试验组				
人尿道狭窄成纤维细胞第 2 代	23.75±0.33	46.05±0.19	30.20±0.17	76.25±0.33
人尿道狭窄成纤维细胞第 4 代	23.70±0.23	46.13±0.23	30.17±0.41	76.30±0.23
人尿道狭窄成纤维细胞冻存复苏后第 2 代	23.53±0.27	46.30±0.40	30.17±0.41	76.47±0.27
人尿道狭窄成纤维细胞冻存复苏后第 4 代	23.50±0.14	46.42±0.26	30.08±0.39	76.50±0.14
对照组	23.50±0.26	46.47±0.73	30.03±0.71	76.50±0.26

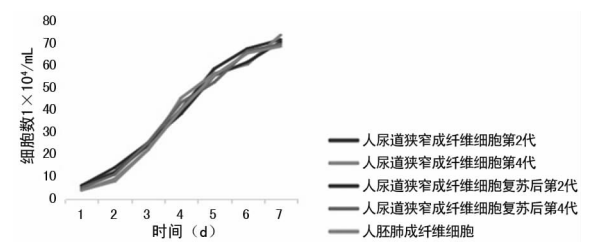


图 2 细胞生长曲线图

3 讨 论

尿道狭窄是泌尿科发病率比较高的疾病之一。无论是何种病因导致的狭窄,其实质都是炎症渗出和瘢痕过度增生的结果^[6]。成纤维细胞作为人增生性瘢痕形成过程中最主要的效应细胞,是增生性瘢痕形成的重要细胞学基础,其过度增殖及凋亡抑制是增生性瘢痕形成的中心环节^[7]。尿道狭窄复发与成纤维细胞的过度活化引发大量胶原组织形成有关^[8]。培养人尿道狭窄成纤维细胞,了解其生物学特性为研究尿道狭窄的发病机制及治疗方法提供生物学基础。

之前有人体的其他部位如人胚胸主动脉、皮肤等部位组织的成纤维细胞的相关文献或者大鼠、兔的尿道狭窄成纤维细胞的实验研究,并未查到关于人尿道狭窄成纤维细胞的培养的文献报道^[9]。在探索细胞培养方法时发现贴壁培养法能使细胞与培养液充分接触并且能够清楚地观察到细胞的状态,因此本试验使用贴壁培养法原代培养人尿道狭窄成纤维细胞。通过镜下观察细胞形态、HE 染色及波形免疫蛋白染色阳性结果鉴定细胞为成纤维细胞。细胞 HE 染色及波形免疫蛋白染色的预实验阶段,由于选取的细胞生长状态不稳定及操作失误造成细胞污染影响试验结果。第 5 代及第 5 代之后细胞出现生长速度慢,死细胞数量稍有增多,分析原因可能是传代次数多、细胞活力下降、细胞老化、分裂增殖缓慢、操作过程中污染等情况。选第 2、4 代及冻存复苏后的第 2、4 代细胞为试验组,健康人胚肺成纤维细胞作为对照组,测定 MTT 及细胞生长曲线,试验组与对照组的细胞增殖能力均较强,与细胞生长曲线的结果一致。根据 MTT 法的实验原理,它能间接反映活细胞的数量,及

全部细胞的存活能力^[10]。流式细胞仪检测细胞百分比和增值指数各组间相似。试验发现人尿道狭窄成纤维细胞增殖能力较强,可以通过抑制尿道成纤维细胞分裂增殖等相关特性进而抑制尿道瘢痕增生。

综上所述,本研究基本确立了人尿道狭窄成纤维细胞的原代培养,细胞有着较稳定的生物学特性,通过人不同组织来源的成纤维细胞对比研究为后续试验提供良好的细胞模型及生物学基础。

参考文献

[1] 刘宗来,杜丹,张志,等.尿道狭窄经直视下钬激光尿道内切开联合球囊扩张治疗的效果分析[J].微创泌尿外科杂志,2018,7(2):116-118.

[2] VIERA M H, AMINI S, VALINS W, et al. Innovative therapies in the treatment of keloids and hypertrophic scars[J]. J Clin Aesthet Dermatol, 2010, 3(5): 20-26.

[3] 王志强,梁锐,陈明清,等.胰蛋白酶消化法和组织块法原代培养人包皮成纤维细胞的比较[J].生命科学研究, 2012, 16(3): 242-247.

[4] 吴艳红,邓安彦,李晓红,等.人皮肤成纤维细胞的分离培养及鉴定[J].四川生理科学杂志, 2013, 35(4): 150-152.

[5] 杜启翠,肖文林,孙桂兰.原代培养人增生性瘢痕成纤维细胞的生物学行为[J].中国组织工程研究, 2013, 17(7): 1174-1179.

[6] 李建平,郑舜生,刘莹.雷帕霉素对大鼠尿道成纤维细胞增殖和胶原形成的影响[J].现代泌尿外科杂志, 2017, 22(1): 58-62.

[7] 郭亮. PTEN 调控增生性瘢痕成纤维细胞凋亡及相关功能的机制研究[D].重庆:第三军医大学, 2012.

[8] 谢弘,徐月敏,傅强.尿液 TGF-β1 对人尿道狭窄瘢痕成纤维细胞 CXCR3 表达的影响研究[J].临床泌尿外科杂志, 2013, 28(9): 697-701.

[9] 张啸环,段明华,闫玉礼,等.人羊膜成纤维细胞的分离和鉴定[J].吉林大学学报(医学版), 2018, 44(4): 845-848

[10] 陈冲,焦宁,徐瑞荣,等.台盼蓝拒染法、MTT 法、CCK-8 法在研究 As₂O₃ 细胞毒性作用中的意义[J].中国医药导报, 2013, 10(12): 24-26.