

· 基础研究 ·

乙酰胆碱对人表皮细胞冷存的影响

张云涛¹, 傅洪滨², 霍孟华¹

【摘要】 目的 探讨乙酰胆碱(Ach)对人表皮细胞冷存活力的影响。方法 应用人表皮细胞的分离、培养技术,并进行 MTT 检测、病理切片以及电镜检测等手段进行观察。结果 不同浓度的 Ach 对冷存的表皮细胞均有一定的保存活力作用,其中以 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ mol/L 的浓度为最佳。结论 认为 Ach 对冷存中的人表皮细胞有一定的保护作用,它可提高表皮细胞的保存活力。

【关键词】 乙酰胆碱;人表皮细胞;细胞保存

【中图分类号】 R971.91; R329.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726(2001)01-0030-03

The Effect of Acetylcholine (Ach) on Preservation of Human Keratinocytes ZHANG Yun-tao, FU Hong-bin, HUO Meng-hua. Dept. of Burn and Plastic Surgery, Shandong Provincial Hospital, Ji-nan. Shandong 250021

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effect of acetylcholine (Ach) on the preservation of human keratinocytes. **Method:** Use tissue engineering technology to separate and culture human keratinocyte in vitro and observe them using MTT method and histological and electron microscopic methods. **Result:** Different concentration of Ach can preserve more viability of human keratinocytes. The best concentration is 10^{-8} to 10^{-10} mol/L. **Conclusion:** Ach can preserve more viability of human keratinocytes during preservation.

【Key words】 Acetylcholine; Human keratinocyte; Cell preservation

【CLC number】 R971.91; R329.2 **【Document code】** A **【Article ID】** 1001-0726(2001)01-0030-03

人表皮细胞的培养与保存、直接或间接与其他材料共同组成复合皮肤应用于临床始终是烧伤工作者的一个研究热点^[1]。但人表皮细胞培养不能无限增殖,临床应用又有时间限制,故冷存细胞必不可少,而冷存细胞时活力的保存是关键^[2]。本文试图通过 Ach 对细胞冷存活力的影响的研究,以探求提高表皮细胞冷存活力的方法。

材料与方 法

实验人体皮肤分别来源于人包皮、烧伤病人正常皮肤及胎儿皮肤。

1. 人表皮细胞的分离及培养方法^[3] 将手术时无菌取下的全层或断层皮肤组织予 0.125% Dispase 消化酶 4℃ 冷消化 15 hr ~ 18 hr 后直接分离下表皮,再经 0.25% 胰酶—0.01% EDTA 液短时消化吹打成细胞悬液。经计数,台盼蓝染色测定活细胞百分率在 90% 以上时,置无血清培养液 K-SFM 中进行常规培养及传代。

2. 培养细胞的鉴定 SABC 免疫酶染色法(按免疫组化试剂盒说明方法进行),阳性部分呈棕褐色。

当 90% 以上细胞呈阳性结果时,证明培养的细胞为人表皮细胞。

3. MTT 比色分析法检测^[4] Ach 对人表皮细胞的冷存活力 取 2~4 代对数生长期表皮细胞,按每孔细胞量为 10^5 个/孔加入 96 孔培养板,共加 27 孔。分 9 组,每组 3 个复孔,其中有一组为正常对照组,余 8 组分别加入按浓度梯度配置的 Ach ($10^{-10} \sim 10^{-3}$ mol/L)^[5]。另备一组冷存管,各管内细胞量达 2×10^6 /ml, Ach 浓度梯度同上。将上板及冷存管分别按常规冷存方法^[6] 冷存于 -80℃、-196℃ 各 40 天后常规方法复温(冷冻液中均含 10% DMSO 抗冻保护剂),直接用 MTT 比色分析法检测 Ach 对表皮细胞活力的影响。

4. 组织学检查 取新鲜皮片,分为三等份。一份做正常对照,一份做 -196℃ 冷冻对照,一份加 10^{-8} mol/L Ach 后于 -196℃ 冷冻处理。分别对三组标本行包蜡切片、HE 染色,观察其大体结构变化。

5. 电镜检查 取新鲜皮片经 D-Tr 法分离后,得新鲜细胞悬液,计数后,分三等份。一份(1号)作正常对照,一份(2号)常规 -196℃ 冷冻对照,一份(3号)予加 10^{-8} mol/L Ach 后同 2 号冻存处理后,分别用 3% 戊二醛固定,送电镜室,经酒精脱水、树

【作者单位】1 山东医科大学,山东 济南 250021

2 山东省立医院,山东 济南 250021

脂包埋、超薄切片及染色等处理后,在 JEOL100CX 透射电镜下观察结果。

6. 统计方法:SAS 统计软件方差分析,检验水准为 $P \leq 0.05$ 。

结 果

1、MTT 比色分析法检测结果:在表皮细胞悬液中加入不同浓度的 Ach,从 $10^{-10} \sim 10^{-4} \text{mol/L}$ 不等,慢速冷冻法置于 -80°C 深低温冰箱 40 天后,快速复温,用 MTT 比色分析法检测 Ach 对表皮细胞活力的影响。结果发现,与对照组比较 10^{-10}mol/L 浓度的 Ach 有显著保存表皮细胞活力的作用 ($P < 0.05$,附图 1),随着 Ach 浓度的升高,作用减弱,但仍明显强于对照组(图 1);同法置于 -196°C (液氮)条件下 40 天,快速复温后,MTT 比色分析法检测结果发现,与对照组比较 10^{-8}mol/L 及 10^{-9}mol/L 浓度的 Ach 有显著保存表皮细胞活力的作用 ($P < 0.05$,附图 2),Ach 浓度升高,作用减弱。实验结果

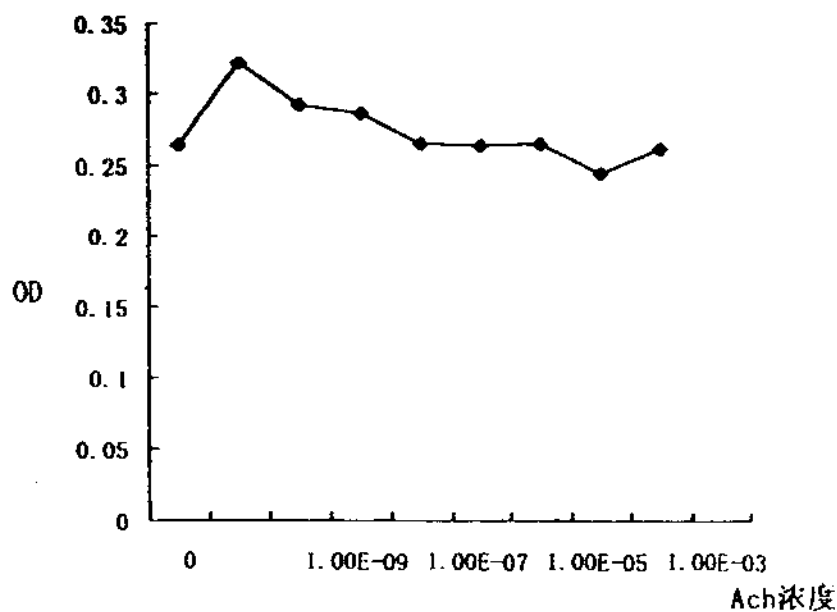


图 1 -80°C 条件下含不同浓度的 Ach 的表皮细胞悬液的 OD 值 ($F = 5.96$, $* P < 0.05$)

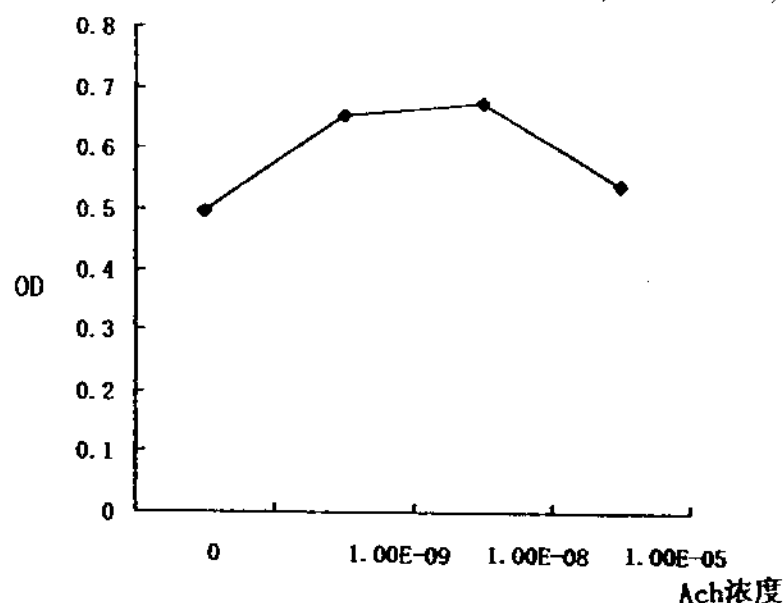


图 2 -196°C 条件下含不同浓度的 Ach 的表皮细胞悬液的 OD 值 ($F = 3.63$, $* P < 0.05$)

表明:在表皮细胞冷存中,低浓度($10^{-8} \sim 10^{-10} \text{mol/L}$)的 Ach 有一定的保存细胞活力作用。

2. 组织切片观察:对比冷冻前及冷冻后、冷冻后加药组皮肤组织 HE 染色结果显示,三者结构上未见明显差别。

3. 电镜结果:总印象差别不很大,但相互间有差别,细胞形态均不一致。经冷冻(-196°C)处理的正常对照组 2 组细胞溶解性坏死的细胞数量明显较冷冻(-196°C)加 Ach 组(3 组)多,且胞内空泡肿胀明显,微丝排列于近细胞膜周围,核周出现空隙,基质密度低;经冷冻加 Ach 组(3 组)细胞溶解性坏死的细胞数量明显减少,但比正常未冷冻处理的(1 组)要多,细胞内空泡肿胀较少,微丝排列于近核区,余未有明显改变。结论:1 组优于 3 组优于 2 组, Ach 确对冷冻细胞有一定的保护作用。

讨 论

表皮细胞的保存方法很多,但深低温(-80°C 或液氮)储存皮肤复温后活力普遍在 50% ~ 60% 左右^[2],而提高低温贮存皮肤的质量一直是受到关注的问题,现已证实慢速降温 and 液氮快速冷冻可减轻皮肤(主要是表皮细胞)的冷冻损伤^[7],而冷冻保护液的不同亦极大影响贮存皮肤尤其是表皮细胞的活力。现普遍应用含 10% ~ 20% DMSO 的冻存液, DMSO 可最大限度地减少细胞在冻存过程中微晶体的形成,从而减少其对细胞的损害;冷冻剂中其它添加剂包括模拟其在体时的生存环境(如各种营养成分的添加)^[8],以及保持细胞内外 pH 值的稳态^[9],氧气的供给^[10]等均对细胞的保护起到一定的作用,而对于一定量的植物性神经递质乙酰胆碱(Ach)是否会在冻存细胞过程中起到神经营养作用而更加模拟于在体时情况,从而减轻细胞由于环境变化而引起的损伤,目前为止国内外均无类似报道。国外曾有报道乙酰胆碱可提高精子的保存活力,故本文通过对表皮细胞冷存活力的检测来探讨 Ach 是否对表皮细胞的保存活力有影响。检测方法按邱一华^[5]方法略做改动,采用 MTT 法进行表皮细胞活性的检测是利用活细胞线粒体可将噻唑蓝(MTT)还原成紫蓝色 formazan 颗粒的原理^[11],死细胞没有这种能力,formazan 颗粒产生的量与细胞数成正比,从而可用比色法推测活细胞的浓度与数目,其最大优点为简便、快速、需细胞数量少、误差小、可在酶标仪上快速分析和大量测定样品^[12]。病理切片及电镜观察

发现不同浓度的 Ach 对 -80°C , -196°C 分别保存的表皮细胞各组均有一定提高保存活力作用,尤其是深低温时有明显的提高保存活力作用 ($P<0.05$, 以 $10^{-8} \sim 10^{-10}\text{mol/L}$ 浓度最佳。该改变病理切片大体观察无法发现,但通过电镜对细胞的超微结构的观测发现通过 Ach 作用的细胞冷存后,结构改变相对少一些,说明其在表皮细胞冻存中具有一定的保护细胞作用,从而在超微结构上进一步证实了 MTT 的结果。其保护机制有待进一步研究,或许与细胞上 M 受体结合,然后引起细胞内 cGMP 的浓度提高,从而使冷存细胞耐受力增强有关。

表皮细胞的分离、培养及保存技术的简化及活力提高,为将来进行组织工程学方面的继续深入研究提供了必要的前提条件并打下了坚实的基础,也是烧伤整形临床实验的基础研究不可缺少的重大组成部分。在此基础上,人工皮肤的研究成为可能,使烧伤及整形病人的手术治疗由“拆东墙补西墙”的单一模式转变为来源丰富的异体或异种皮肤封闭修补术区等多种模式成为可能,因此认为它有着广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 张涤生. 组织工程简介. 中华烧伤整形外科杂志, 1998, 14(3): 218-224.
- [2] Lawrence JC. Storage and skin metabolism. Br J Plast Surg. 1972, (25): 440.
- [3] 苏波, 等. 表皮细胞培养方法与移植研究. 表皮细胞分离技术. 中华整形烧伤外科杂志, 1996, 12(2): 159-160.

- [4] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immun, 1983, 127: 705-710.
- [5] 邱一华. 乙酰胆碱对培养 T 细胞的作用. 生理学报, 1995, 47(3): 275-280.
- [6] 司徒镇强等. 细胞培养. 北京: 世界图书出版公司, 1996, 79-82.
- [7] Zhu ZM, Jia XM, Chai JK. Clinical use of homograft stored by ritrification. Chin Med J, 1994, 107(8): 574.
- [8] Fahmy FS, Navsaria HA et al. Skin graft storage and keratinocyte viability. Br J Plastic Surgery, 1993, 46: 292-295.
- [9] 朱兆明. 4°C 储存皮肤中几个问题的研究. 中华整形烧伤外科杂志, 1989, 5(2): 139-140.
- [10] Chi L, Ku Y, et al. Successful 14-day preservation of rat skin using a two-layer cold-storage method. Burns, 1996, 22(1): 22-25.
- [11] 高新等. 噻唑蓝技术测定供移植大鼠 Leydig 氏细胞的活力. 中华实验外科杂志, 1997, 14: 372-373.
- [12] 郑永唐等. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266-269.

(收稿日期: 2000-10-16)

【作者简介】

张云涛(1970-), 女, 山西洪桐人, 山西医科大学毕业, 2000 年获山东医科大学烧伤硕士学位.

傅洪滨(1938-), 男, 山东高青人, 山东省立医院主任医师、教授、硕士生导师.

孟华(1963-), 山东曲阜人, 现在中国协和医科大学整形外科医院攻读博士学位.