

# 人皮肤成纤维细胞培养方法的研究

孙玉珍 李璞

(哈尔滨医科大学医学遗传学研究室)

细胞培养是细胞生物学、分子生物学、免疫学及遗传工程等领域广泛应用的一种技术。皮肤是培养成纤维细胞最丰富又最容易获取材料,既可从手术中获取,也可从前臂的疼痛非敏感区或大腿内侧面剪取<sup>[1,2]</sup>。

## 材料和方法

我们在几个医院共取材 42 例。分别取自头、颈、背、腹、四肢、臀部、眼睑、包皮和腋窝等处。患者的年龄从新生儿到 64 岁老人,男性 27 例、女性 15 例。均做短期培养,其中两例失败、两例污染、成活率达 90.25%。

手术中取下的皮肤块立即在无菌的条件下置入 199 培养液中,尽快接种。常温下不宜超 24 小时,4℃ 保存不宜超 72 小时。接种时先用 Hank's 液或培养液冲洗皮肤块 2 次,再将其置于表面皿上,经适当处理后剪成 1mm<sup>3</sup> 左右的小皮块,用培养液冲洗一次碎皮块,吸净培养液,加两倍于皮块体积的小牛血清。用吸管将浸在小牛血清中的小皮块移植到培养瓶壁上,置于 37℃ 培养箱中,30—36 小时后一次性加入 5ml 含小牛血清 20% 的 199 培养液,静置培养 3—4 天后换液。

## 结果与讨论

接种 4—8 天后,在小皮块周围常有排列紧密的上皮样细胞长出,逐渐增多形成生长晕,继而在其外围先长出一些散在而后很快连成片的成纤维样细胞,有的小皮块一开始在其周围长出来的就是成纤维样细胞。

新生儿皮肤块生长迅速,常在加入培养液后 2—3 天就有新细胞长出。以后每隔 3—4 天换液一次,每次保留 1/3 原液。接种 15—20 天后成纤维细胞即可铺满瓶壁,可进行传代或收获制备染色体标本。

1. 人体不同部位的皮肤结构不全一样,头颈、躯干和四肢部位的皮肤,真皮层中含有大量纤维成分,皮下有脂肪组织。接种前应将冲洗过的小皮块铺在表面皿上,用解剖刀尽力剔除皮下组织和真皮部分,否则小皮块难以生长。

如果皮肤块取自眼睑或包皮处,因真皮层薄皮下又是疏松结缔组织,而疏松结缔组织恰是培养成纤维细胞的绝好材料,所以这些皮块冲洗后即可剪碎接种。且因这些小皮块一开始长出的就是成纤维细胞,所以可以较其他部位皮块早 5—10 天传代或收获。

2. 容量 25ml 的培养瓶接种 10—15 个小皮块为宜。块太多长出的新细胞会很快连成片出现密度抑制,而影响细胞增殖。若少于 10 块则会因同化环境的能力弱而不易成活。

实验中发现那些在原代培养时成活的皮块,传代后比散在的细胞更易贴壁且生长旺盛。

3. 为减少皮块脱壁和污染机会,我们采用在接种后 30—36 小时一次性加入培养液的方法,可保证 90% 小皮块不脱壁。

4. 为做诊断用所取的皮块一般不超过 4—5mm<sup>2</sup>,剪碎后不宜再用胰酶消化。否则,不但会有细胞丢失,且一旦消化过度将严重影响细胞的贴壁和生长。

实验发现,经 0.25% 胰酶溶液或 0.5mg/ml 的胶原酶溶液消化与未经消化的小皮块对比(6 例),其贴壁及生长速度均相差无几,部分消化过的皮块生长反而慢,还有些随着培养而脱壁。

如果适时传代(即细胞处于对数生长期,且刚刚铺满瓶壁<sup>[8,9]</sup>),也不宜用消化液,而用 10ml 注射器安上 9 号长针头,吸取培养液冲洗细胞 7—8 次,可使 90% 以上细胞脱壁,且能快速贴壁、生长。若制作染色体标本,可用胰酶将细胞消化下来,可提高标本质量。

## 参 考 文 献

- [1] J. H. 普里斯特(刘权章等译): 1985. 医学细胞遗传学和细胞培养, 科学出版社, 第 132—144 页。
- [2] 鄂 征: 1982. 组织培养技术, 人民卫生出版社, 第 87—114 页, 第 130—139 页。
- [3] 大星章一(吴政安等译): 1979. 人癌细胞培养, 科学出版社, 第 30—34 页; 第 36—37 页。
- [4] 李连达: 1982. 细胞生物学杂志, 4(3): 29。
- [5] 陈惠英: 1986. 细胞生物学杂志, 8(1): 30—33。
- [6] 罗士伟: 1983. 细胞生物学杂志, 5(1): 1—7。
- [7] 范保荣: 1984. 细胞生物学杂志, 6(2): 77—79。
- [8] Heckman, C. A., L. Vroman, and A.: Pitlick. 1977., *Tissue and Cell*, 9(2): 317—334.
- [9] Kruse, P. F. and M. K.: Potterson. 1973. *In: Tissue Culture Methods and Applications Academic Press, New York and London. pp. 39—40.*

Sun Yuzhen et al.: Study of the Culture Method of Human Skin Fibroblast  
本文于 1986 年 12 月 18 日收到。