

低浓度一氧化碳和缺氧气体处理培养细胞容器的研制及其应用

王关嵩, 钱桂生, 陈维中

(第三军医大学新桥医院呼吸内科研究所, 重庆 400037)

[关键词] 一氧化碳; 缺氧; 内皮, 血管; 细胞培养/方法

[摘要] 为建立低浓度一氧化碳和缺氧气体处理培养细胞的装置并观察两种气体对培养细胞——大鼠主动脉内皮细胞的效应。采用气体置换法建立细胞处理模型, 并用透射电镜观察细胞之变化。结果发现, 1) 建立的装置能够在较短时间内达到所需的一氧化碳浓度和氧浓度, 维持所需浓度时间 12 h 内未明显变化; 2) 处理培养的 RAEC 的结果比较满意。缺氧 12 h, RAEC 部分细胞仍具有完整的线粒体和内质网, 核和细胞膜完整, 但部分细胞出现线粒体肿胀, 破裂以及内质网轻微肿胀; 且胞内空泡和脂质体均明显增加, 核内染色质边集; 细胞间连接分离明显。低浓度 CO 12 h 组的 RAEC 细胞细胞连接经度分离, 胞浆内有少量空泡状结构; 胞核出现少许切迹。此结果提示, 建立的低浓度一氧化碳和缺氧气体处理细胞模型可靠, 低氧损害血管内皮细胞结构和细胞间的连接, 低浓度 CO 可以减轻低氧的损害。

[中图分类号] R361.3

[文献标识码] A

Application and Construction of Cell Cultured Container in Carbon monoxide and Hypoxia Condition

WANG Guan- Song, QIAN Gui- Sheng, and CHEN Wei- Zhong

(Research Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

MeSH Carbon Monoxide; Anoxia; Endothelium, Vascular; Cell Culture/ methods

ABSTRACT **Aim** To establish a cell cultured container with the condition of carbon monoxide (CO) or hypoxia (H) and to explore the effects of CO and hypoxic on rat aortic endothelial cell (RAEC). **Methods** By the use of drawing- charging method to obtain desired gas concentration in the container in a relatively short time, and ultrastructural features of RAEC was observed by transmission electron microscopy. **Results** 1) The concentration of CO and O₂ in container can reach the necessary level, the typical constituents of mitochondria, vesicles, endoplasmic reticulum, nuclei and cytomembrane was seen in RAEC.

But there are large vacuoles increased, swollen and broken mitochondria occurred only some of cells. Many lipid bodies formed in cells. Cell surface blebbing and many vacuoles could be seen in some cells. Chromatin was located to the rim in the nuclei.

Intercellular connection was obviously separate. After 12 h of low- density carbon monoxide (1% CO) compound hypoxia, intercellular connection was lightly solitary, a few vacuoles architecture was seen in cytoplasm, and few chromatin rimmed in the nuclei. **Conclusion** The cell architecture and connection was injured in hypoxia, And cell injured level decreased in low- density CO compound hypoxia. It suggest that low- density CO can partly protect RAEC from being damaged by hypoxia.

目前, 一氧化氮(Nitric oxide, NO) 处理临床病人和培养细胞均有报告^[1,2]。但对一氧化碳(carbon

monoxide, CO) 的研究还比较少, 现在人们正逐渐认识到 CO 在疾病的发生过程中也具有重要作用。如何对外源性 CO 进行实验, 尚是难题。为此, 我们摸索建立了低浓度 CO 和缺氧气体处理培养细胞的容器, 并利用该容器处理培养细胞。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

培养基 DMEM、培养瓶(Hyclone, USA), H- 300

[基金项目] 国家自然科学基金(39700057)资助

[作者简介] 王关嵩, 男, 生于 1967 年 12 月, 河南省平顶山人, 博士, 任讲师、主治医师。现从事博士后的研究工作。研究方向, 低氧肺动脉高压的防治研究, 血管舒张因子的生物学效应。已获得军队科技进步三等奖 1 项。钱桂生, 男, 生于 1956 年 12 月, 上海人, 博士研究生导师, 博士后指导教师、呼吸内科学教授、主任医师。现从事慢性阻塞性肺病的机制及防治、酸碱失衡的基础和临床研究。已获得国家科技进步三等奖 1 项(第一作者), 军队科技进步二等奖 5 项。

透射电镜(Hitachi, 日本), 细胞室净化台(苏州净化仪器厂), 低浓度 CO 和缺氧混合气体(0.3% CO + 5% CO₂ + N₂ 和 5% CO₂ + N₂, 重庆仪表九厂), 血气分析仪(IL1303, USA), CO 检测报警仪(重庆煤炭科学分院), 过滤器(0.45 μm 滤膜, 上海), 真空干燥缸, 真空泵, 抽气表, 37℃恒温箱, 水浴锅。

1.2 处理容器的装配

取出真空干燥缸上的玻璃盖, 代之自制的三管橡皮塞, 三管分别接进气孔、出气孔及检测孔(或真空表)。

1.3 实验条件的设置和处理方法

容器内放好培养细胞后, 在缸盖和缸体的接触面上涂少许凡士林, 将缸盖推上, 接好管道后打开真空泵开关, 将容器内气体抽出至缸内压力为 60 mm Hg (该值可根据泵的功率调控), 然后通过混合气体平衡至 750 mm Hg, 如此反复操作 3 次, 即可保证缸内气体浓度接近混合气瓶内气体的浓度(其中 O₂ ≤ 1%)。依据下述公式 $Y = (60/760) X \times 20.94$ 计算, 式中, Y 代表缸内最终氧浓度, X 代表抽气次数, 20.94 为空气中的氧的百分含量。待缸内混合气体符合实验条件(1% O₂)时, 关闭进气开关, 再把干燥缸移至 37℃恒温箱里。

分别在 0、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、18 h 和 24 h 于检测孔用医用注射器(一次性; 先在液体石蜡中浸泡)抽取 10 mL 缸内气体, 立即到本研究所血气分析室进行测定。

1.4 大鼠主动脉内皮细胞的形态观察

先采用简易贴块法培养大鼠主动脉内皮细胞(rat aortic endothelial cell, RAEC)^[3], 经鉴定纯化后, 3~6 代细胞用于实验。分为缺氧组(1% O₂ + 5% CO₂ + N₂) 和低浓度 CO 组(0.3% CO + 1% O₂ + 5% CO₂ + N₂) 各 6 瓶, 分别处理, 将生长在 50 mL 培养瓶内的细胞清洗, 3% 戊二醛 4℃固定 2 h, 用橡皮刮子将贴壁细胞刮下, 2 000 r/min 离心弃上清后, 至学校中心实验室用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗涤, 1% 锇酸固定 2 h, 梯度乙醇丙酮脱水, 常规包埋聚合, 超薄切片, 铅染, 透射电镜观察。

2 结果

2.1 低浓度 CO 和缺氧气体处理细胞的容器概况

该容器包括四个部分, 主体为干燥缸改制的气体处理室(A) 以及气瓶(B), 抽气泵(C), 真空表(D)。详见示意图 1 (Figure 1)。

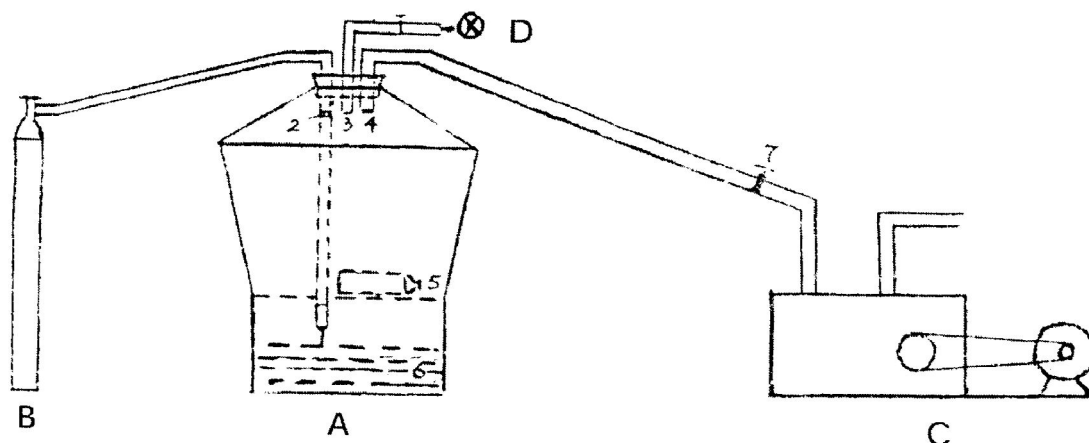


图1 低浓度 CO 和缺氧气体处理培养细胞的装置。A: 处理细胞容器, 包括 1. 进气孔 2. 过滤器 3. 监测孔(换气时接真空表) 4. 抽气孔 5. 细胞培养瓶 6. 1% CuSO₄ 溶液 7. 为单向阀门。B 气瓶(缺氧气体, 或低浓度 CO 气体)瓶; C 抽气泵; D 真空表

2.2 处理细胞的装置运转情况

该装置运转后状态良好。CO₂ 比较稳定, 12 h 时 CO₂ 下降为 4.8%, 而 O₂ 浓度也才上升 1.1%。同时用 CO 报警监测仪(精度为 1 ppm)测定 CO 的浓度, 12 h CO 降为 2 760 ppm (表 1, Table 1), 和抽气完成时比较有明显差别($P < 0.01$)。

在不抽气进行连续监测, 处理 12 h 以后 CO₂ 和

CO 气体的浓度比上列表中数据可能更小, 但是超过 12 h 则各气体浓度的下降是明显的, 此时若要继续处理培养细胞, 应当重新换气。

2.3 低浓度 CO 和缺氧气体处理 RAEC 的超微结构观察

电镜下, 观察正常的大鼠主动脉血管内皮细胞呈长椭圆形, 细胞核内染色质较密, 细胞质和细胞核

的膜比较完整,具有丰富的细胞器,包括线粒体,内质网,溶酶体,高尔基体和内质网。缺氧 12 h 时,细胞连接明显分离,有大量细胞出现线粒体肿胀、破裂内质网轻微肿胀,细胞内空泡化严重,脂质体明显增多,核有切迹,核内染色质聚集。低浓度 CO 处理 12 h 后。细胞连接轻度分离,胞浆内有空泡状结构,胞核出现切迹(图 2、图 3 和图 4; Figure 2, 3, and 4)。

表 1 换气前后及处理过程中容器内气体的含量

Table 1 The contents of CO, O₂ and CO₂ in the container (%)

Time	O ₂	CO ₂	CO
Base	21.0	0	0
0	1.0	5.00	0.300
30 min	1.0	5.00	0.290
1 h	1.0	4.95	0.285
2 h	1.0	4.92	0.283
4 h	1.0	4.90	0.280
8 h	1.1	4.88	0.279
12 h	1.1	4.86 ^a	0.276 ^a
18 h	1.1	4.83 ^a	0.273 ^a
24 h	1.2 ^a	4.74 ^a	0.26

a: $P < 0.01$, 与抽气完成时(0)比较

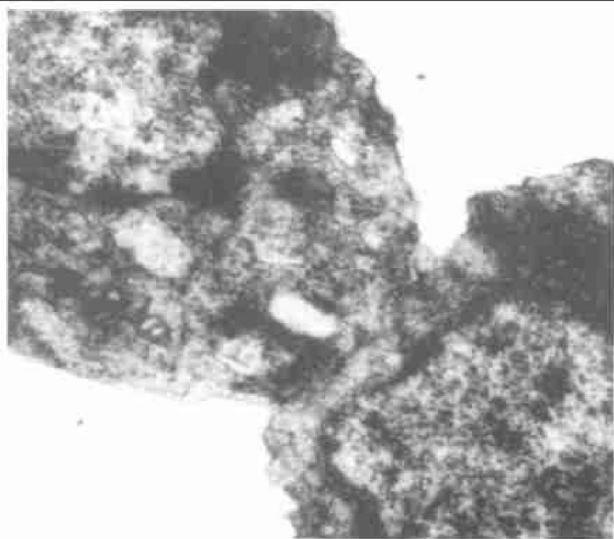


图 2 常氧状态下 RAEC 的超微结构(TEM × 8000)

显示常氧状况下 RAEC 含有完整的典型的线粒体、内质网、核糖体和细胞核

Figure 2 Ultrastructural features of RAEC under normoxia (TEM × 8000). The normoxia RAEC contained typical constituents of mitochondria, vesicles endoplasmic reticulum, Golgi bodies and nuclei

3 讨论

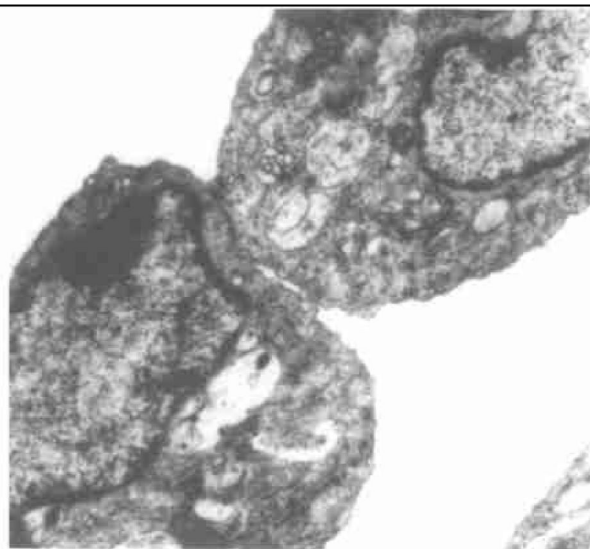


图 3 低氧 12 h 时 RAEC 的超微结构(TEM × 6000)

显示细胞连接分离,大量空泡上升,大量细胞中线粒体肿胀、断裂,染色质边集

Figure 3 Ultrastructural features of RAEC after 12 h in hypoxia (TEM × 6000). Obvious separation in cell conjunction. Large vacuoles increased, but swollen and broken mitochondria occurred in a part of cells, insection in nuclei.

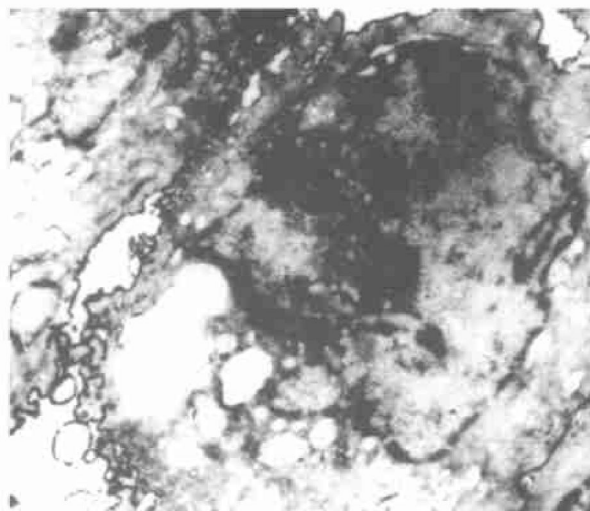


图 4 低浓度 CO 复合低氧 12h 的 RAEC 超微结构

可见细胞间连接轻度分离,部分细胞线粒体肿胀、断裂,少量细胞边集。

Figure 4 Ultrastructural features of RAEC after 12h 0.3% CO (TEM × 6000). Light separation in cell conjunction, vacuoles, endoplasmic reticulum swollen and mitochondria swollen and broken were seen in some cells.

我们建立的低浓度 CO 和缺氧气体处理培养细胞的容器具有方便经济实用的优点。同国内外同样的处理装置相比经济,无需氧气和一氧化碳的自动监测设备。同国外已有的设备相比^[4,5],更易于控制容器内的气体浓度,节约充气量。而且充分利用

了一般实验室均具备的干燥缸, 比较简便。但是, 操作该容器时也应注意: (1) 操作者要有无菌观念。容器放入细胞培养瓶前应用 75% 消毒酒精反复擦拭内外壁, 通气管浸泡消毒, 而后全部设备放在细胞室内紫外灯照射 2~4 h。(2) 容器内底层应放 1% CuSO_4 溶液 1 000 mL, 杀菌并有利于容器内气体浓度的恒定。(3) 充气—抽气的过程应当经过 3~5 次练习, 2 人配合操作, 加快速度, 保证在 15 min 左右完成, 以尽量缩短细胞在缺少 CO_2 的环境下的生长时间。(4) 排气管必须伸出房间以外, 出口应在通风的地方。因为 CO 有毒且有臭味, 在密闭环境下反复换气, CO 浓度急骤升高, 对人体健康不利。(5) 充气量一定要适度, 使缸内气压 ≤ 750 mm Hg。充气过程应熟练, 速度应适中。过快, 气瓶内的气压往往 ≥ 5 个大气压, 会冲起干燥缸盖, 使前功尽弃。(6) 充气—换气操作过程在 37℃ 的水浴锅里进行, 以保证细胞在合适的温度和所需的气体条件下生长。

运用该容器研究缺氧和低浓度 CO 对大鼠 RAEC 作用。结果表明, 随着缺氧时间的延长, 细胞超微结构的损伤也渐渐加重, 最明显的特点是脂质体和空泡的增加。与陈灵红等^[6]的研究结果一致。他们还研究了急性低氧后再复氧, 发现细胞死亡和超微结构损伤程度进一步加重。认为当低氧还未造成大部分细胞不可逆损伤时, 继低氧后的复氧可引起细胞更严重的损伤, 而且主要出现在复氧早期。我们研究时, 在低氧的情况下加入低浓度 CO 后细胞超微结构损伤程度没有进一步加重, 而是有所减轻。说明低浓度 CO 对内皮细胞具有一定的保护作用。其具体机制包括: (1) 超氧化物歧化酶(SOD) 的作用。因为有研究者发现复氧时用加 SOD 的溶液孵育牛主动脉内皮细胞, 能减少复氧引起的细胞

死亡^[6,7]。(2) 推测低氧和复氧引起的脂质体和空泡的增加, 可能与细胞器膜成分的降解有一定的关系。低氧可活化膜磷脂酶, 造成膜磷脂的降解, 引起胞内脂肪酸积累和溶酶体降解。复氧时产生的大量自由基, 可造成膜的脂质过氧化, 加速了膜成分的降解, 这些变化均能导致胞内脂肪酸的积累。低浓度 CO 对这些病理变化可能具有抑制作用。(3) 推测低氧和复氧对细胞间连接的受体和酶具有损害作用。至于低浓度 CO 的作用机制, 以及 CO 进入培养基后, 产生的物质对培养细胞有何作用, 是否参与了对培养细胞的损害还有待深入研究。

参考文献

- [1] Hayward CS, Rogers P, Keogh AM, et al. Inhaled nitric oxide in cardiac failure: vascular versus ventricular effects [J]. *J Cardiovas Pharmacol*, 1996, **27** (1): 80-85
- [2] 何建国, 程显声, 熊长明, 等. 吸入一氧化氮治疗肺动脉高压的量-效关系 [J]. *中华医学杂志*, 1998, **78**(2): 105-106
- [3] 王关嵩, 钱桂生, 杨晓静, 等. 大鼠肺微血管及肺动脉内皮细胞和肺动脉平滑肌细胞的培养鉴定 [J]. *当代地方科技杂志*, 1997, **12** (Suppl): 79
- [4] Kourembanas S, Morita T, Liu Y, et al. Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature [J]. *Kidney Int*, 1997, **51** (2): 438-443
- [5] Michiels C, Arroult T, Houbion A. Human umbilical vein endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation in vitro: implication of free radicals, xanthine oxidase, and energy deficiency [J]. *J Cell Physiol*, 1992, **153** (1): 53-61
- [6] 陈灵红, 周兆年. 急性低氧和复氧对牛主动脉内皮细胞损伤的研究 [J]. *中国应用生理学杂志*, 1998, **14**(1): 17-21
- [7] McCord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance [J]. *Clin Biochem*, 1993, **26**(5): 351-357

(此文 2000-03-06 收到, 2001-01-04 修回)

(此文编辑 文玉珊, 胡必利)