

# 新生小鼠皮肤成纤维细胞的分离培养与鉴定

胡素贤<sup>1</sup>,倪晓妍<sup>2#</sup>,王嘉逊<sup>2</sup>,高丰光<sup>2\*</sup>

1.厦门大学附属第一医院呼吸内科,福建厦门 361003;2.厦门大学医学院基础医学部免疫学实验室,福建厦门 361005

**[摘要]** 目的:建立一种简单易行的自新生小鼠皮肤分离培养成纤维细胞的方法,并对分离细胞进行鉴定。方法:无菌取新生 Balb/c 小鼠背部皮肤,剪碎呈 1 mm<sup>2</sup> 大小,组织块均匀放置于培养皿并以 DMEM(含 10%胎牛血清)培养基对组织块进行培养;以胰蛋白酶消化分离细胞-重新贴壁法对分离培养细胞进行纯化;以 NIH3T3 细胞为对照,免疫荧光、流式细胞术、Western blot 检测波形蛋白表达情况以对培养的成纤维细胞进行鉴定。结果:新生小鼠背部皮肤组织培养 3 d 时可见细胞呈细长梭形或呈多角形,组织培养 5 d 后可见大量细胞自组织块游离生长,组织培养 7 d 后可见细胞呈单层漩涡状排列或纵横交错,贴壁细胞团呈放射状生长。免疫荧光、流式细胞术、Western blot 检测发现分离细胞和 NIH3T3 细胞均表达波形蛋白;流式细胞术证实分离的成纤维细胞波形蛋白表达阳性率和平均荧光密度分别为 13.33% 和 9.89,而 NIH3T3 细胞波形蛋白阳性率和平均荧光密度分别为 28.11% 和 14.16。结论:分离培养的细胞具有成纤维细胞的形态学特征,并表达成纤维细胞的特征分子波形蛋白。以组织块直接培养法成功自新生小鼠皮肤分离培养成纤维细胞,为建立肿瘤体外模拟微环境提供实验材料和研究基础。

**[关键词]** 新生小鼠;成纤维细胞;体外培养;波形蛋白

**[中图分类号]** R392.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1673-7210(2011)10(b)-005-04

## Fibroblasts separation and identification from newborn mice skin

HU Suxian<sup>1</sup>, NI Xiaoyan<sup>2#</sup>, WANG Jiayun<sup>2</sup>, GAO Fengguang<sup>2\*</sup>

1.Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Fujian Province, Xiamen 361003, China; 2.Department of Immunology, Basic Medicine Science in the Medical College of Xiamen University, Fujian Province, Xiamen 361005, China

**[Abstract] Objective:** To establish a simple method of separating and culturing fibroblasts from newborn mice skin.

**Methods:** Firstly, skin was taken from newborn Balb/c mice and made into 1 mm<sup>2</sup> tissues with scissors sterilely. Secondly, tissues were explanted into culture dishes in equilibrium manner with DMEM (including 10% fetal bovine serum) medium. Thirdly, the purification of fibroblasts was completed by digesting cells with trypsin and re-explanting cells into dishes. Lastly, the vimentin expression of fibroblasts was identified by immunofluorescence, flow cytometry and Western blot. **Results:** Several cells near the tissues could be visible as thin spindle or polygons 3 days after tissues were explanted. More and more thin spindle or polygons cells were visible with the extension of tissues culture 5 days after tissues were explanted. The cells were growing in swirling arrangement, crisscross or radiate manner when tissues were cultured for 7 days. After cells were digested with trypsin and re-explanted, the cells were grown as layer of cell rapidly. Both of fibroblasts and NIH3T3 cells were found to express vimentin by immunofluorescence, flow cytometry and Western blot respectively. Flow cytometry assays showed that 13.33% and 28.11% cells were vimentin positive in cultures fibroblasts and NIH3T3 cells respectively. When geometric mean fluorescence was considered to assess vimentin expression, the geometric mean fluorescence of vimentin in fibroblasts and NIH3T3 cells were 9.89 and 14.16 respectively. **Conclusion:** Fibroblasts can be separated and cultured by economic and convenient tissues explantation method from newborn mice. The cells have typical fibroblasts morphology and have actually vimentin expression which may be useful to establish and mimic tumor microenvironment in vitro.

**[Key words]** Newborn mice; Fibroblasts; In vitro culture; Vimentin

肿瘤发生是一个环境多因素、机体内多系统、外因通过内因交互作用的系统性疾病过程。肿瘤微环境指在肿瘤生长过程中,由肿瘤细胞和内皮细胞、免疫细胞、成纤维细胞等基质细胞构成的肿瘤细胞生长的特殊环境<sup>[1]</sup>。作为肿瘤基质细

胞重要组分的成纤维细胞是一个异质性和组织特异性的细胞群体,被细菌产物、细胞因子等激活后可分泌新的细胞因子、趋化因子,招募白细胞聚集,启动炎症反应而参与肿瘤的发生和迁移过程<sup>[2]</sup>。但现有研究多以肿瘤细胞为研究重点,关注肿瘤细胞的基因突变、增殖凋亡、信号通路改变等方面,而忽略了肿瘤组织中的基质细胞也对肿瘤的发生、发展发挥着重要作用。这一微环境因涉及多种细胞成分的相互作用及具有血供不足、间质压力高、营养相对缺乏等特点成为研究肿

**[基金项目]** 福建省自然科学基金计划资助项目(编号:2008J0112);福建省厦门市自然科学基金(编号:3502Z20104002)。

<sup>#</sup> 共同第一作者

<sup>\*</sup> 通讯作者

瘤发生发展机制的瓶颈<sup>[3]</sup>。简便快速分离培养成纤维细胞对是否能在体外成功建立模拟肿瘤微环境具有重要意义。成纤维细胞是疏松结缔组织的主要细胞,属生长与裂殖迅速的细胞族群,在适当的体外培养条件下,能迅速增长繁殖。同时,成纤维细胞不仅能提供完整的遗传物质,而且培养方便,对动物的生长和繁殖都无影响。本研究以新生小鼠皮肤作为材料探讨一种简单有效的成纤维细胞体外培养方法,从形态学、免疫荧光、流式细胞术、Western blot 等方法鉴定成纤维细胞波形蛋白的表达情况,为成功建立体外模拟肿瘤微环境打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新生小鼠 Balb/c 由厦门大学医学院实验动物中心提供,动物中心定期进行致病原检测以确保动物符合实验要求。DMEM(低糖)培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素、胰蛋白酶均由 GIBCO 公司提供。兔抗小鼠波形蛋白单抗、FITC 标记羊抗兔二抗、Western blot 抗体购自 Abcom 公司,流式细胞术胞内染色试剂盒购自 eBioscience 公司,Western blot 常规试剂购自厦门鹭隆生物科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 新生小鼠皮肤成纤维细胞组织块培养法 新生小鼠成纤维细胞组织块培养法在已有文献<sup>[4-5]</sup>基础上优化进行。将刚出生的小鼠处死,75%酒精浸泡消毒后,放入生物安全柜内进行消毒。先取其背部皮肤,放入 75%酒精中浸泡消毒,以无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS 漂洗皮肤。其次,将皮肤剪成  $1\text{ mm}^2$  大小,均匀平贴于无菌平皿中,加入适量 DEME 完全培养基,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h,使皮肤能够牢固平贴于平皿上。24 h 后再加入足量的培养基  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养,1 周后将组织块去除,即可见成纤维细胞生长(在这 1 周内除了中间换 1 次培养基,尽量勿动培养平皿)。此后,每 2 天换 1 次培养液,8~10 d 后可见细胞铺满皿底,消化传代。

1.2.2 成纤维细胞传代 当去组织块后的成纤维细胞在培养平皿中长成片可传代时,吸去旧培养液,用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS 漂洗 1 次,加入 0.05% 胰蛋白酶,覆盖皿底细胞,在室温下轻轻吹打。将平皿在倒置显微镜下观察,消化 5 min 左右后,发现成纤维细胞变圆时,立即加入等体积的 DEME 完全培养基终止胰酶反应,用吸管轻轻吹打,吹打结束后,将细胞悬液移入离心管,  $1\ 200\ \text{r/min}$  离心 8 min,弃上清液后加入 DEME 完全培养液,吹散混匀按 1:2 浓度传代,以后每 2~3 天传代 1 次。

1.2.3 冻存与复苏 ①冻存:细胞长满为细胞单层时,吸干培养液,以无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS 漂洗后加入 0.05% 胰蛋白酶室温消化,细胞变圆时,加 DEME 完全培养液终止。将细胞悬液移入离心管,  $1\ 200\ \text{r/min}$  离心 8 min,弃上清液后将细胞悬浮于含 10% 二甲亚砜(DMSO):10% 胎牛血清的 DEME 完全培养液中,细胞密度为  $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$ 。分装于冻存管中。经梯度降温后冻存于液氮中备用。②复苏:自液氮取出细胞,快速放入  $37^\circ\text{C}$  水浴,融化后加入 5 倍左右的 DEME 完全培养液,离心( $1\ 200\ \text{r/min}$ )8 min,弃上清后,加入 DEME 完全培养液,使细胞浓度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养过夜,细胞贴壁后更换培养液。

1.2.4 免疫荧光 成纤维细胞免疫荧光显微镜检测波形蛋白表达方法按公司产品说明书并按参考文献[6]进行。先以无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS 漂洗细胞,加入预冷 4% 多聚甲醛固定 15 min 并用 PBS 漂洗 2 遍;次以预冷的 PBST 孵育细胞 30 min,无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS 漂洗 3 遍;继以预冷的 1% 牛血清白蛋白(BSA)封闭细胞 30 min,1:20 稀释兔抗小鼠波形蛋白单抗湿盒孵育细胞,  $4^\circ\text{C}$  过夜后以兔抗小鼠波形蛋白单抗 PBS 漂洗 3 遍;再以 1:50 稀释 FITC 标记羊抗兔二抗湿盒孵育细胞,室温下避光 1.5 h;最后以 PBS 漂洗 3 遍,DAPI 染色细胞后,荧光显微镜观察拍照。

1.2.5 流式细胞术 流式细胞胞内染色按照试剂盒说明书并参考文献[7]进行。收集细胞,先以 CD16/CD32 抗体按照  $1\ \mu\text{g}/1 \times 10^6$  细胞的用量室温孵育 15 min 以封闭细胞表面的 Fc 受体,冷 PBS 洗涤 2 次,每次洗涤后  $1\ 200\ \text{r/min}$  离心 5 min,弃上清;其次,加入  $100\ \mu\text{l}$  的固定液,室温避光固定细胞 20 min,以  $1.0\ \text{ml}$  的穿膜缓冲液洗涤 2 次,每次洗涤后  $1\ 200\ \text{r/min}$  离心 5 min;最后,重悬细胞于  $100\ \mu\text{l}$  的穿膜缓冲液中,加入相应的兔抗小鼠波形蛋白单抗 PBS 漂洗 3 遍;再以 FITC 标记羊抗兔二抗荧光抗体,室温避光染色,经  $1.0\ \text{ml}$  的穿膜缓冲液洗涤 2 次,每次洗涤后  $1\ 200\ \text{r/min}$  离心 5 min,以 FACSCalibur 检测细胞的表面分子并以 CellQuest 软件分析数据。

1.2.6 Western blot 检测 Western blot 检测参考文献[6]报道方法进行。首先,分离培养的成纤维细胞和 NIH3T3 细胞经 PBS 漂洗后以细胞裂解液  $400\ \mu\text{l}$  冰上裂解 30 min,  $13\ 000\ \text{r/min}$  离心 15 min 提取蛋白;其次,蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜,2% BSA 室温封闭 2 h 后加入兔抗波形蛋白一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜;再次, TBST 漂洗一抗 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,室温孵育 2 h;最后, TBST 洗膜后加入 ECL 发光液,暗室曝光。

## 2 结果

### 2.1 小鼠成纤维细胞分离培养结果

原代培养的细胞经光镜观察,发现组织块贴壁 3 d 后就可于组织块周围看到明显的成纤维细胞的生长,此时游离出来的细胞呈纺锤形或者不规则三角形,周围有少量上皮细胞,胞核清晰,除贴壁的细胞团外,一般不形成集落,如图 1A 所示。培养第 5 天,组织块周围有大量的成纤维细胞,成纤维细胞群开始向外分裂生长,此时细胞呈典型的长梭形,如图 1B 所示。培养第 7 天,组织块中基本不再游离出细胞,原游离的细胞呈现群体依赖性生长,呈典型的梭形,此时细胞可生长成单层,漩涡状排列或纵横交错,贴壁的细胞团呈放射状生长,如图 1C 所示。去掉组织块,10 d 左右由组织块移出的单层细胞铺满瓶底,可消化传代,进行传代培养。传代时可离心弃上清后重悬细胞,以弃去多余的组织碎片,传代后 48~72 h,细胞可铺满皿底。细胞经冻存复苏后,可见细胞生长旺盛,形态无异常,如图 1D 所示。见图 1(封三)。

### 2.2 小鼠成纤维细胞免疫荧光鉴定结果

原代培养的成纤维细胞以其表达的波形蛋白行免疫荧光鉴定,结果发现:诱导的细胞均表达成纤维细胞特有的波形蛋白,呈绿色荧光,DAPI 染料可非特异性地染色细胞核,呈蓝色。以成纤维细胞系 NTH3T3 为阳性对照,3T3 细胞也

表达波形蛋白,但表达强度有所降低。见图2(封三)。

### 2.3 小鼠成纤维细胞流式细胞术鉴定结果

小鼠皮肤成纤维细胞会特异性地在细胞内表达波形蛋白,因而利用兔抗小鼠波形蛋白单抗和 FITC 标记羊抗兔荧光抗体,经细胞胞内染色后行流式细胞术即可对分离的小鼠成纤维细胞表达波形蛋白情况进行定量分析。结果发现:与只加 FITC 标记羊抗兔荧光抗体的细胞比较,分离培养的成纤维细胞波形蛋白表达阳性率达 13.33%,作为阳性对照的 NIH3T3 细胞波形蛋白表达阳性率为 28.11%,见图3。以细胞平均荧光密度测定成纤维细胞波形蛋白的表达情况,分离的成纤维细胞平均荧光密度为 9.89,而阳性细胞 NIH3T3 波形蛋白平均荧光密度则为 14.16,波形蛋白平均荧光密度与阳性率所反应的表达趋势一致。

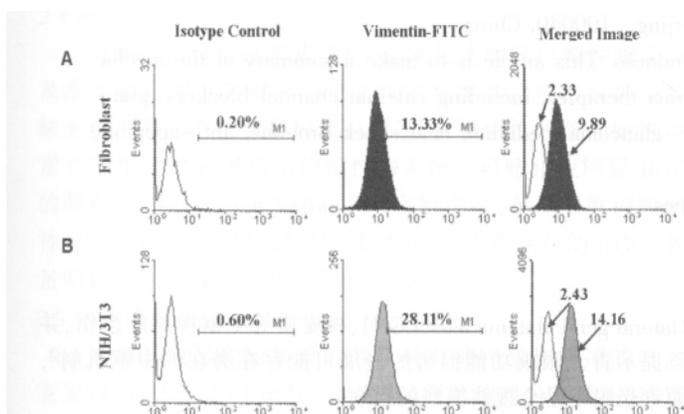


图3 流式细胞术鉴定波形蛋白表达  
A为成纤维细胞表达波形蛋白检测;B为NIH3T3表达波形蛋白检测;无颜色填充曲线为抗体同种型对照,有填充曲线为波形蛋白检测结果,同时有无填充曲线和填充曲线为叠加图,叠加图中数字为细胞平均荧光密度

### 2.4 小鼠成纤维细胞波形蛋白 Western blot 检测结果

为避免免疫荧光和流式细胞术高灵敏性所可能导致的实验误差,笔者继以 Western blot 检测分离培养的成纤维细胞波形蛋白的表达情况。结果发现:在细胞蛋白内参 GAPDH 基本一致的前提下,分离培养的小鼠成纤维细胞和 NIH3T3 细胞均有波形蛋白的表达,从而证实自小鼠皮肤分离培养的细胞具有成纤维细胞的特性。见图4。

### 3 讨论

肿瘤微环境因包含肿瘤细胞与多种基质细胞的相互作用而成为近年肿瘤研究的热点领域。作为构成肿瘤微环境的重要基质细胞,成纤维细胞与肿瘤细胞的相互作用也逐渐被肿瘤研究者所关注<sup>[8-9]</sup>。Tjomsland等<sup>[10]</sup>将胰腺癌细胞(PDAC)系与肿瘤相关成纤维细胞共培养,发现PDAC与成纤维细胞系的共培养可增加成纤维细胞分泌炎症因子IL-1 $\alpha$ 、IL-6、CX-CL8、VEGF-A、CCL20和COX-2,而临床患者的IL-1 $\alpha$ 水平显著影响其生存期;而Jouppila-Matto等<sup>[11]</sup>的研究发现肺癌基质中成纤维细胞基因表达谱系的变化也显著影响肺癌的进程。但上述关于肿瘤细胞与基质细胞间相互作用的研究多以肿瘤细胞和自肿瘤组织分离的基质细胞共培养为主要研究手段,无法深入探讨肿瘤细胞与正常成纤维细胞间相互作用

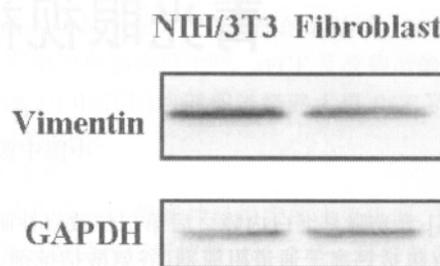


图4 波形蛋白 Western blot 检测结果

用在肿瘤发生最初阶段中功能与效应。自正常组织分离培养原代的成纤维细胞与肿瘤细胞共培养,以替代被肿瘤影响过的成纤维细胞,则有利于深入理解肿瘤发生的最初阶段的机制,为更好地寻找肿瘤预防和治疗的靶点提供依据。

动物细胞培养有单细胞接种培养法和组织块贴壁培养法。组织块培养法因细胞诱导时间较短、细胞产出率高而得到较为广泛的应用。周结学等<sup>[4]</sup>以胰酶消化小鼠胚胎成纤维细胞并对培养条件进行了探讨,李盛等<sup>[5]</sup>用成年小鼠皮肤为材料以无胰酶消化法成功诱导成纤维细胞并对培养基糖浓度对成纤维细胞增殖分化的影响进行探讨。胰酶消化法实验过程较长、操作繁杂,大量胰酶的使用也增加实验成本;若用成年小鼠皮肤无胰酶消化法培养成纤维细胞,则较难将皮肤上的毛发分离干净,而带有毛发的皮肤不易有效培养成纤维细胞,同时自成年小鼠分离成纤维细胞活性也受影响。综合实验的易操作性、经济性及成纤维细胞的活性等因素,笔者尝试自新生鼠皮肤以组织块直接贴壁法分离成纤维细胞,免疫荧光、流式细胞术、Western blot 检测均验证分离细胞表达波形蛋白,即自新生鼠皮肤组织直接贴壁法分离的细胞具有成纤维细胞的特征,主要体会:首先,注意将皮下血管清除干净,这样既有利于成纤维细胞自皮肤游离出来,也可尽量避免血管内皮细胞的污染;其次,组织块贴壁最初24h所加培养液要适量,过量的培养液影响组织贴壁,过少的培养液则因蒸发作用而导致实验失败,待组织紧密贴壁24h后即加入足量培养液;再次,组织块大小以1mm $\times$ 1mm大小为宜,组织块过大不利于细胞游离,过小则不利于组织块贴壁操作,均匀分布的组织块也更有利于缩短形成单层细胞的时间;最后,组织培养的最初3d应保持静置培养,尽量减少培养液流动,以免液体晃动使组织块漂浮,影响培养效果。

### [参考文献]

- [1] Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010,107(50):21677-21682.
- [2] Zigrino P, Nischt R, Mauch C. The disintegrin-like and cysteine-rich domains of ADAM-9 mediate interactions between melanoma cells and fibroblasts [J]. J Biol Chem, 2011,286(8):6801-6807.
- [3] Dutsch Wicherek M. RCAS1, MT, and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling [J]. Am J Reprod Immunol, 2010,63(3): 181-188.
- [4] 周结学,刘东,郑克立,等.鼠胚成纤维细胞的培养条件及滋养层制备[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(34):6607-6611.

(下转第26页)

表4 对照组中不同基因型幽门螺杆菌与冠心病传统因素之间的关系( $\bar{x}\pm s$ )

传统因素	性别 (男/女)	吸烟 (是/否)	年龄 (岁)	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	血糖 (mmol/L)	Fib (g/L)	CRP (mg/L)
cagA 基因型	3/2	13/7	53.6±5.8	126±8	72±9	21.8±3.2	4.56±1.22	1.72±0.28	1.10±0.43	3.46±1.04	5.26±0.94	3.14±0.70	3.68±1.02
非 cagA 基因型	6/7	9/4	51.4±6.2	125±9	73±7	20.1±3.4	4.51±1.13	1.81±0.36	1.01±0.32	3.40±1.10	4.92±0.44	3.01±0.64	2.06±1.00
$\chi^2/t$ 值	0.272	0.062	0.374	0.217	0.252	0.495	0.083	0.501	0.488	0.105	1.069	0.377	2.355
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05

Patel<sup>[4]</sup>等报道基本一致。这说明 Hp 感染是 CHD 发病的一个重要危险因素。

### 3.2 不同基因型 HP 感染与 HCY 水平的关系

Franceschi 等<sup>[5]</sup>发现,多克隆 cagA 抗体与人正常脐静脉组织和动脉硬化组织中的平滑肌细胞、内皮细胞表面抗原发生交叉反应,在动脉硬化形成过程中,内皮细胞功能受损,平滑肌细胞和成纤维细胞大量增殖,导致了动脉粥样硬化的发展。本研究亦发现冠心病组中 cagA 基因型 Hp 患者的检出率高于对照组,cagA 基因型患者血浆 HCY 水平显著高于非 cagA 基因型患者血浆 HCY 水平。Pasceri 等<sup>[6]</sup>通过对社会背景相似冠心病患者和相同年龄、性别的对照中,携带 cagA 抗原的、毒力更强的 Hp 感染发生率进行评估,结果发现,冠心病患者幽门螺杆菌的 IgG 抗体显著高于对照组。由此可见,在 Hp 感染中,以 cagA 基因型 Hp 感染与冠心病密切相关,这说明 cagA 基因型 Hp 感染是冠心病发病的一个重要危险因素。

### 3.3 不同基因型幽门螺杆菌与 CRP 的关系

血清 CRP 含量不但是预测未来心血管危险因素的炎症标志物,也是心血管疾病的直接致病因素<sup>[7]</sup>。左晶<sup>[8]</sup>和董立<sup>[9]</sup>等的研究表明 Hp 感染和 CRP 水平及冠心病危险事件发生率相关,对冠心病的病变程度有预测价值。本研究表明:不同基因型 Hp 组,冠心病传统因素之间差异无统计学意义,但是 cagA 基因型 Hp 感染患者血浆 CRP 水平显著高于非 cagA 基因型 Hp 感染患者,与吴钰燕等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。总之,cagA 基因型 Hp 感染与 CRP 水平和冠心病发生、发展相关。

### 3.4 cagA 基因型 Hp 感染致冠心病发生的机制

cagA 基因型 Hp 感染致冠心病发生的机制尚不明确,可能是通过:①cagA+Hp 感染诱导抗原模拟现象;②cagA+Hp 感染与自身免疫反应;③cagA+Hp 感染与全身性或动脉局部炎症反应<sup>[11]</sup>。本研究认为可能是 cagA 基因型 Hp 感染后通过

增高血浆 HCY 水平、增加血浆中 CRP 的浓度这一中间环节致动脉粥样硬化的发生、发展

本实验中由于样本容量有限,并未给予 Hp 感染对照治疗组,但是否冠心病伴 Hp 感染者一律给予抗 Hp 感染尚需进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Kullo U, Banantyne CM. Conditional risk factors for atherosclerosis [J]. Mayo Clin Proc,2005,80(2):219-230.
- [2] 贾爱堂,周雪莲,李振海,等.抗幽门螺杆菌治疗对急性冠状动脉综合征患者血清同型半胱氨酸及高敏 C-反应蛋白的影响 [J].河北医药,2009,31(18):2450-2451.
- [3] Ponzetto A, Sndrone N, Pellicano JR, et al. Helicobacter pylori infection with arterial obstruction [J]. Gastroenterology,1998,114(1):260.
- [4] Patel P, Mendall MA, Carrington D, et al. Association of helicobacter pylori and chlamydia pneumonia infections with contain heart disease and car-diovascular risk factors [J]. BMJ,1995,311(7007):711-714.
- [5] Franceschi F, Sepulveda AR, Gasbarrini A, et al. Cross-reactivity of anti-CagA antibodies with vascular wall antigens [J].Circulation,2002,106:430-434.
- [6] Pasceri V, Cammarota G, Patti G, et al. Associaton of virulent Helicobacter pylori strains with ischemic heart disease [J]. Circulation,1998,97:1675-1679.
- [7] Mayr M, Kiechl S, Willeit J, et al. Infections, immunity and atherosclerosis [J]. Circulation,2000,102:833-839.
- [8] 左晶,马春野.抗幽门螺杆菌治疗对冠心病患者血脂及炎症因子的影响[J].中国当代医药,2010,17(34):4-5.
- [9] 董立,刘成玉.超敏 C 反应蛋白和幽门螺杆菌感染与冠心病的关系[J].青岛大学医学院学报,2007,43(2):110-114.
- [10] 吴钰燕,黄冰生,程颖,等.Cag(+)-幽门螺杆菌感染对急性冠脉综合征患者冠状动脉病变的影响[J].岭南心血管病杂志,2010,16(4):304-307.
- [11] 许先进,金立军.幽门螺杆菌与冠心病的相关研究[J].医学综述,2010,16(2):244-248.

(收稿日期:2011-08-15)

(上接第7页)

- [5] 李盛,石汉平,孙冠青,等.不同糖浓度对体外培养小鼠成纤维细胞增殖、分化的影响[J].创伤外科杂志,2008,10(6):541-544.
- [6] Aicher A, Heeschen C, Mohanpt M, et al. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity-potential role for progression of atherosclerotic lesions [J]. Circulation,2003,107(4):604-611.
- [7] Gao FG, Wan DF, Gu JR. Ex vivo nicotine stimulation augments the efficacy of therapeutic bone marrow-derived dendritic cell vaccination [J]. Clin Cancer Res,2007,13(12):3706-3712.
- [8] Franco OE, Shaw AK, Strand DW, et al. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis [J]. Semin Cell Dev Biol,2010,21(1):33-39.

- [9] Somasundaram R, Herlyn D. Chemokines and the microenvironment in neuroectodermal tumor-host interaction [J]. Semin Cancer Biol,2009,19(2):92-96.
- [10] Tjomsland V, Spangeus A, Väilil J, et al. Interleukin 1 $\alpha$  sustains the expression of inflammatory factors in human pancreatic cancer microenvironment by targeting cancer-associated fibroblasts [J]. Neoplasia,2011,13(8):664-675.
- [11] Jouppila Matto A, Narkio Makela M, Soini Y, et al. Twist and Snai1 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma stroma is related to cancer progression [J]. BMC Cancer,2011,11:350.

(收稿日期:2011-09-06)

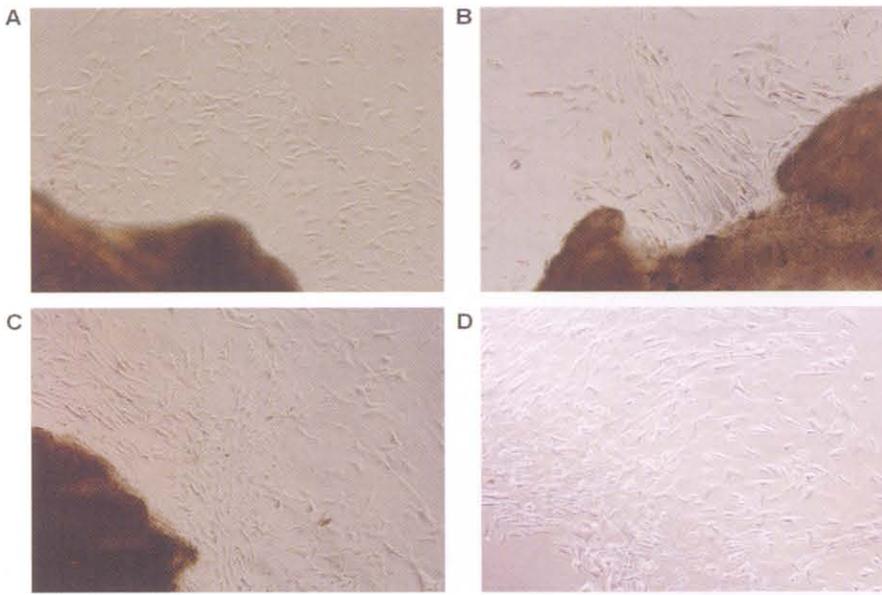


图1 原代成纤维细胞培养结果(见内文第6页)

A为培养第3天的成纤维细胞光镜观察( $\times 10$ );B为培养第5天的成纤维细胞光镜观察( $\times 10$ );C为培养第7天的成纤维细胞光镜观察( $\times 10$ );D为冻存复苏后的成纤维细胞光镜观察( $\times 10$ )

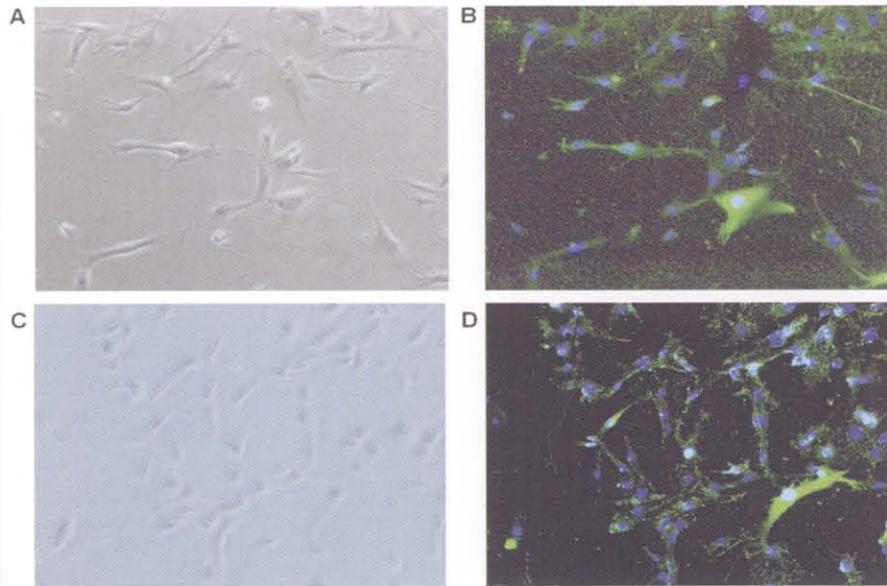


图2 成纤维细胞/NIH3T3波形蛋白免疫荧光鉴定(见内文第7页)

A为原代成纤维细胞光镜观察( $\times 20$ );B为原代成纤维细胞波形蛋白免疫荧光观察( $\times 20$ );C为NIH/3T3光镜观察( $\times 20$ );D为NIH/3T3波形蛋白免疫荧光观察( $\times 20$ );波形蛋白显示为绿色荧光,显示蓝色荧光的为DAPI染色的细胞核



图3 宫腔镜下宫腔内胚胎图像(见内文第181页)



图4 空斑(肉眼观察)

Fig.4 plaque(naked eye)  
(见内文第23页)

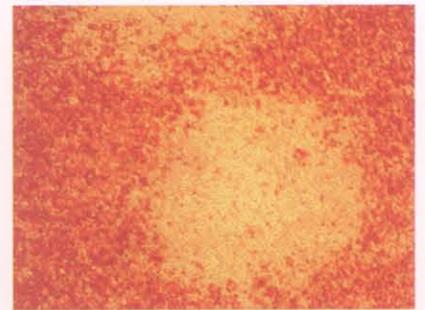


图5 空斑(100x)

Fig.5 plaque(100x)  
(见内文第23页)



图6 阴性(肉眼观察)

Fig.6 negative(naked eye)  
(见内文第23页)



图7 阴性(100x)

Fig.7 negative(100x)  
(见内文第23页)