

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.50.025

[http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

杨诚, 梁瑞韵, 黄林洁, 江山平. 三种方法培养慢性阻塞性肺疾病大鼠气道平滑肌细胞的比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(50): 9448-9452.

三种方法培养慢性阻塞性肺疾病大鼠气道平滑肌细胞的比较*★

杨 诚, 梁瑞韵, 黄林洁, 江山平

中山大学孙逸仙
纪念医院呼吸内
科, 广东省广州市
510120

杨诚★, 男, 1981
年生, 广东省梅州
市人, 汉族, 在读
硕士, 医师, 主要
从事 COPD 平滑
肌增殖的研究。
yirilin@163.com

通讯作者: 江山
平, 教授, 主任医
师, 中山大学孙逸
仙纪念医院呼吸
内科, 广东省广州
市 510120
shanpingjiang@
126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)50-09448-05

收稿日期: 2012-03-14
修回日期: 2012-05-12
(20111114021/N · C)

文章亮点: 在建立慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的基础上, 首次应用 3 种方法原代培养慢性阻塞性肺疾病大鼠气道平滑肌细胞进行比较, 发现组织块法可以更简捷、经济和稳定可靠地培养出大量气道平滑肌细胞, 为今后同类实验提供实验依据。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 大鼠; 动物模型; 气道平滑肌细胞; 原代培养; 组织块法; 酶消化法; 改良组织块消化法; 细胞形态; α -平滑肌肌动蛋白; 组织构建

缩略语: 气道平滑肌细胞: airway smooth muscle cells, ASMC

摘要

背景: 原代培养方法被广泛应用于正常和哮喘大鼠气道平滑肌细胞的培养, 但少见用于慢性阻塞性肺疾病大鼠气道平滑肌细胞培养的报道。

目的: 建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型, 比较组织块法、酶消化法和改良组织块消化法原代培养模型大鼠气道平滑肌细胞生长情况的差异。

方法: 将 16 只清洁级雄性健康 SD 大鼠随机分成 2 组, 对照组正常饲养, 慢性阻塞性肺疾病组用熏烟法建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型, 显微镜下观察大鼠肺组织病理学特点。分别应用上述 3 种方法原代培养慢性阻塞性肺疾病大鼠气道平滑肌细胞, 相差显微镜下观察细胞形态, 用 α -平滑肌肌动蛋白免疫组织化学染色鉴定细胞类型。

结果与结论: 经病理学证实成功构建慢性阻塞性肺疾病大鼠模型。在倒置相差显微镜下见培养的细胞表现为典型的“谷-峰状”生长。经免疫细胞化学染色后, 可见胞质呈棕色阳性反应, 所培养的细胞有 94% 以上为气道平滑肌细胞。3 种方法在耗时和细胞质量方面均无明显差别, 但组织块法更经济、稳定可靠和简单。

Comparison of three methods for culturing the air smooth muscle cells of rats with chronic obstructive pulmonary disease

Yang Cheng, Liang Rui-yun, Huang Lin-jie, Jiang Shan-ping

Abstract

BACKGROUND: Methods of primary culture have been extensively used to culture airway smooth muscle cells in normal or asthma rats, but the same way to culture airway smooth muscle cells in chronic obstructive pulmonary disease rats has rarely been reported.

OBJECTIVE: To establish the rat chronic obstructive pulmonary disease model, and to compare the different growth conditions of airway smooth muscle cells in rat chronic obstructive pulmonary disease models by three methods: attachment-block culture and enzymatic dispersion as well as improved tissue-piece digestion inoculation.

METHODS: Sixteen healthy male clean-grade Sprague-Dawley rats were randomly divided into chronic obstructive pulmonary disease group and control group with eight rats in each group. Rats in the control group were fed normally. The rat chronic obstructive pulmonary disease models were established in the chronic obstructive pulmonary disease group by cigarette smoke exposure. The pathologic characteristics of lung tissues of the rat models were observed under microscope. The airway smooth muscle cells of rat chronic obstructive pulmonary disease model were cultured from primary generation using the three ways mentioned above, respectively. The morphology of the cultured cells was observed under phase contrast microscope and α -smooth muscle actin immunostaining was used to identify the cell types.

RESULTS AND CONCLUSION: The rat chronic obstructive pulmonary disease models were established successfully, which was proved by pathology. The cultured cells demonstrated the typical “hill and valley” appearance under phase contrast microscope. After α -smooth muscle actin immunostaining, brown positive reaction was observed in the cytoplasm. There were over 94% cultured cells identified to be airway smooth muscle cells. There was no significant difference of consuming time and quality of cells in these three ways. Compared with the other two methods, attachment-block culture was a more economical and stable and less complicated way to culture airway smooth muscle

cells in rat chronic obstructive pulmonary disease models.

Yang C, Liang RY, Huang LJ, Jiang SP. Comparison of three methods for culturing the air smooth muscle cells of rats with chronic obstructive pulmonary disease. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(50): 9448-9452.

0 引言

目前认为气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMC)增殖是慢性阻塞性肺疾病气道重塑的主要原因^[1-2], ASMC的体外培养为研究其细胞增殖提供了一个有效的平台, 是研究慢性阻塞性肺疾病气道重塑发病机制及其防治的科研基础。组织块法、消化法和改良组织块消化法是目前应用广泛的ASMC原代培养方法^[3-8], 但至今国内未见有对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型ASMC培养方法进行比较的报道。实验分别采用上述3种方法培养慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的ASMC, 总结其生长特性并对上述3种方法进行比较, 旨在建立高效、稳定的培养方法, 为慢性阻塞性肺疾病气道重塑的研究提供可靠的实验材料。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验, 细胞学体外观察。

时间及地点: 于2011年10至11月在中山大学基础医学实验教学中心分子医学实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁级健康雄性SD大鼠16只, 体质量150-200 g, 由中山大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(粤)2011-0029。16只大鼠随机数字表法分为慢性阻塞性肺疾病组和对照组, 每组8只。

慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道平滑肌细胞培养实验用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
I 型胶原酶	Invitrogen 公司
胎牛血清、高糖 DMEM 培养基	Gbico 公司
两步法免疫组织化学检测试剂盒、DAB 显色试剂盒、小鼠抗大鼠 α -actin 抗体	博士德公司
倒置相差显微镜	Olympus 公司

实验方法:

慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立: 采用熏香烟法建立慢性阻塞性肺疾病大鼠模型, 参考既往方法并略作改变^[9-10]。大鼠置入玻璃熏烟染毒箱(50 cm×40 cm×35 cm, 70 L)内熏椰树牌香烟(烤烟型, 焦油含量12 mg/支, 烟气烟碱量1.2 mg/支)烟雾, 30 min/次, 2次/d(每次6支烟), 每周休息1 d。对照组同一时间把大鼠置入另一相同玻璃熏烟染毒箱内, 30 min/次, 2次/d, 不做上述的熏香烟处理。两组动物均饲养于清洁环境中, 饲养至80 d时处死并采集标本。

取材: 腹腔注射2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠, 体积分数75%乙醇消毒胸腹部皮肤, 无菌条件下从腹部至颈部依次剪开皮肤、肌肉, 腹主动脉放血后剪开胸腔, 自颈部至下迅速分离气管及肺部组织, 取出双肺。右肺常规固定、石蜡包埋、切片和苏木精-伊红染色, 显微镜下观察肺泡结构改变^[11-12]。左肺转移入盛有Hank's液的培养皿中, 转入超净台, 依次去除肺组织、支气管动静脉、脂肪和残存结缔组织, 仅剩余支气管。每只大鼠支气管组织均采用下列3种方法进行原代培养。

组织块法原代培养ASMC^[13]: 用眼科虹膜剪将支气管组织剪成约1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块, 取一半组织块均匀贴放于25 mL培养瓶底面, 组织块间隙2.0-3.0 mm, 加入含体积分数20%胎牛血清和100 U/mL青链霉素的DMEM培养液3 mL, 翻转静置于37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中3 h, 再次翻转培养瓶使组织块浸没于培养液中, 半开放式静置培养, 2 d后培养液加至6 mL。观察记录细胞爬出和融合的状态及所需时间。

酶消化法原代培养ASMC^[14-15]: 将另外一半的支气管组织块置于25 mL培养瓶中, 加入2 mL的0.2% I 型胶原酶, 吹打均匀, 37 °C消化50 min后, 加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化, 过滤后滤液1 000 r/min离心5 min, 弃去上清液, 以Hank's液清洗后, 用含体积分数20%胎牛血清和100 U/mL青链霉素的DMEM培

Department of Respiratory Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Yang Cheng★, Studying for master's degree, Physician, Department of Respiratory Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China yirilin@163.com

Corresponding author: Jiang Shan-ping, Professor, Chief physician, Department of Respiratory Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China shanpingjiang@126.com

Supported by: National Natural Science Foundation (Youth Fund) of China, No.2010*

Received: 2012-03-14 Accepted: 2012-05-12

养液重悬, 在37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中半开放式静置培养, 3 d后换液。观察记录细胞贴壁和融合的状态及所需时间。

改良组织块消化法原代培养ASMC^[16]: 把上述酶消化过的组织块用培养液洗涤后, 再用组织块法原代培养ASMC, 方法如前述。观察记录细胞爬出和融合的状态及所需时间。

传代培养ASMC^[17]: 倒置相差显微镜下观察, 细胞融合达80%左右, 即可进行首次传代。倒掉培养液, 用Hank's平衡盐溶液清洗, 加入0.25%胰酶溶液1 mL, 在镜下观察见大部分贴壁细胞已边缘透亮, 胞质回缩, 加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化, 吹打使细胞脱落, 1 000 r/min离心5 min。用含体积分数10%胎牛血清和100 U/mL青链霉素的DMEM培养液重悬细胞并接种, 每3 d换液1次。观察记录细胞融合的状态及所需时间。

ASMC的纯化^[18]: 在组织取材过程中注意去除支气管周围组织。机械刮除法去除杂细胞岛。利用差异贴壁法去除少量的成纤维细胞。

ASMC的鉴定^[19-20]: ①形态学观察: 应用倒置相差显微镜观察细胞大小、形态、生长特点及排列方式等。

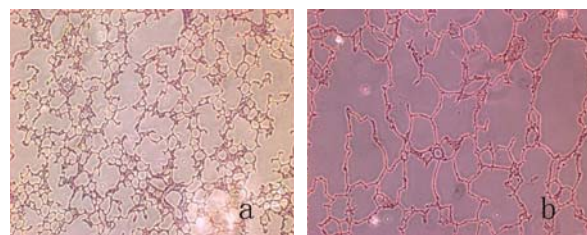
②免疫细胞化学染色: 细胞爬片用40 g/L多聚甲醛溶液固定, 滴加体积分数为3%H₂O₂, 室温10 min, 蒸馏水洗后, 5%BSA封闭, 倾去, 不洗。小鼠抗大鼠 α -actin抗体(1:300), 4℃孵育过夜。PBS浸洗后用HRP标记抗小鼠IgG(1:300)室温孵育30 min。PBS浸洗后, 按1 mL蒸馏水+A、B、C(DAB试剂盒, 要按顺序滴加)各1滴, 混匀, 镜下显色观察, 注意避光。镜下观察到胞质呈棕色阳性反应时立即停止显色, 用自来水充分冲洗后苏木精染色, 常规脱水、封固。在普通光镜下观察并拍照。

主要观察指标: 大鼠肺切片中肺泡破坏的程度; 原代培养中细胞爬出、贴壁、融合的状态及时间; 传代培养中细胞融合的状态及时间; 细胞形态变化; 免疫细胞化学染色后鉴定观察。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入SD大鼠16只, 均进入结果分析, 无脱落。

2.2 大鼠肺组织病理学改变 与对照组大鼠相比, 慢性阻塞性肺疾病组大鼠肺组织可见肺泡腔明显扩大、肺泡壁变薄、肺泡间隔破裂及肺泡腔融合, 见图1。



a: Control group

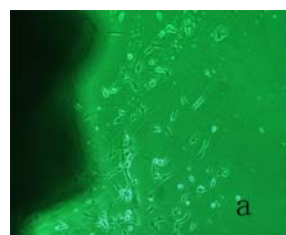
b: COPD group

注: 与对照组大鼠相比, 慢性阻塞性肺疾病组大鼠肺组织可见肺泡腔明显扩大、肺泡壁变薄、肺泡间隔破裂及肺泡腔融合

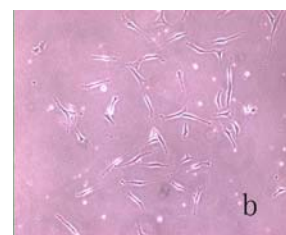
Figure 1 Pathological changes of rat lung in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) group and control group ($\times 100$)

图1 对照组和慢性阻塞性肺疾病组大鼠肺组织病理学改变($\times 100$)

2.3 ASMC原代培养的生长情况 ①组织块法: 在组织贴块第三四天见梭形细胞爬出, 第9天或第10天细胞间相互融合, 见图2a。②酶消化法: 在2 d内可见梭形细胞贴壁伸展, 八九天细胞间相互融合, 见图2b。③改良组织块消化法: 在组织贴块第二三天见梭形细胞爬出, 第八九天细胞间相互融合。



a: Attachment-block culture at 3 d



b: Enzymatic dispersion at 2 d

注: 组织块法原代培养大鼠气道平滑肌细胞, 在组织贴块第3天见梭形细胞爬出, 酶消化法原代培养大鼠气道平滑肌细胞在2 d内可见梭形细胞贴壁伸展

Figure 2 Primary culture of airway smooth muscle cells in rat chronic obstructive pulmonary disease models

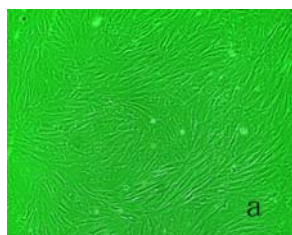
图2 慢性阻塞性肺疾病模型大鼠气道平滑肌细胞原代培养情况(倒置相差显微镜, $\times 100$)

2.4 ASMC传代培养的生长情况 细胞达80%融合后进行传代, 传代培养3-5 d后细胞长满瓶底, 可进行下次传代。传代后的平滑肌细胞与原代细胞生长方式和形态特点一致。

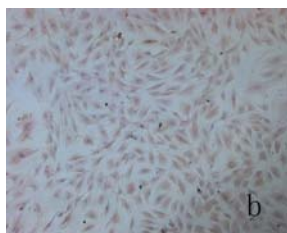
2.5 细胞鉴定

形态学观察:倒置相差显微镜下单个ASMC呈梭形或不规则多角形,有多个细胞突起,胞质丰富,核圆形居中,可有多个核仁。细胞生长部分融合时细胞长梭形,平行排列成束,相互穿插,呈现起伏状生长,表现为典型的“谷-峰”状生长,见图3a。

免疫细胞化学检测:经特异的平滑肌 α -actin免疫细胞化学染色后,胞质呈棕色阳性反应。经鉴定,94%以上细胞为ASMC,见图3b。



a: ASMC displayed the characteristic “hill and valley” appearance (phase contrast microscope)



b: Positive expression of ASMC α -actin (immunocytochemical staining)

注:部分融合时大鼠气道平滑肌细胞长梭形,平行排列成束,相互穿插,呈现起伏状生长,表现为典型的“谷-峰”状生长。经特异的平滑肌 α -actin免疫细胞化学染色后,胞质呈棕色阳性反应。经鉴定,94%以上细胞为气道平滑肌细胞。

Figure 3 Culture and identification of airway smooth muscle cells (ASMC) in rat chronic obstructive pulmonary disease models ($\times 100$)

图3 慢性阻塞性肺疾病模型大鼠气道平滑肌细胞传代培养和鉴定情况($\times 100$)

3 讨论

成功分离、培养慢性阻塞性肺疾病大鼠ASMC为了解慢性阻塞性肺疾病生物学方面问题提供了非常有效的模型。大鼠常被建立动物模型用于研究慢性阻塞性肺疾病^[21],所以本实验也选取大鼠作为建模对象。由肺组织病理切片可以看出,慢性阻塞性肺疾病组大鼠肺泡破坏显著,模型复制成功。本模型的成功建立为进行ASMC的相关研究,提供了可靠的细胞来源。

目前常用的ASMC原代培养方法有组织块法、酶消化法和改良组织块消化法3种。以往的研究主要围绕正常大鼠和哮喘模型大鼠而展开^[22-23],本实验创新地在建

立慢性阻塞性肺疾病大鼠模型基础上进行3种ASMC原代培养方法的比较。细胞鉴定结果发现3种方法均可用于原代培养慢性阻塞性肺疾病大鼠模型ASMC,并能培养出纯度较高的细胞。

王超智等^[16]发现,组织块法培养出的细胞6-9 d可见细胞从组织边缘爬出,改良组织消化法培养三四天可观察到细胞爬出,明显快于单纯组织块法。而实验结果表明,组织块法原代培养于三四天即可见细胞从组织边缘爬出,明显快于其报道的6-9 d。同时发现,在细胞爬出用时上,组织块法与改良组织块消化法(两三天)无明显差异。可能的原因是王超智等在实验中使用的培养液只含有体积分数为10%胎牛血清,而本实验使用了含体积分数为20%胎牛血清的培养液。

从实验操作过程来看,3种方法各有特点:①组织块法操作简单,可减少污染的机会。②单纯消化法可使细胞均匀贴壁,用时较短。但操作较为复杂,容易带来污染。且消化时间比较难掌握,消化时间过短,ASMC尚未消化下来,细胞过于稀少明显影响细胞生长;消化时间过长,影响细胞活力。③改良组织块消化法几乎不受消化时间长短的影响,但操作最为复杂,最易导致污染。

综合来看,3种方法在耗时和细胞质量两个方面均相差不大。其中组织块法实验成本较低,且操作简便,显著减少了在原代细胞培养中多种影响因素的干扰。与其他两种方法比较,应用组织块法可以更简捷、经济和稳定可靠地为后续实验提供大量细胞。

致谢:感谢中山大学基础医学实验教学中心分子医学实验室的老师们提供的实验平台和技术指导。

4 参考文献

- [1] Kaminska M, Foley S, Maghni K, et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):45-51.
- [2] Pera T, Sami R, Zaagsma J, et al. TAK1 plays a major role in growth factor-induced phenotypic modulation of airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;301(5):L822-8.
- [3] Yan MH, Zhu SY, Duan CL, et al. Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi. 2010;26(10):966-972.
闫明华,朱述阳,段存玲,等. PolyI:C介导气道平滑肌细胞TLR3和IL-8、Eotaxin的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2010,26(10):966-972.
- [4] Zhang WH, Ji GJ, Zhu SY, et al. Shiyong Yixue Zazhi. 2011;27(23):4200-4202.
张文辉,嵇桂娟,朱述阳,等. 阿奇霉素对大鼠气道平滑肌细胞瘦素和白介素-8、肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 实用医学杂志,2011,27(23):4200-4202.

- [5] Liu XS, Xu YJ, Zhang ZX, et al. Shengli Xuebao. 2003; 55(2): 135-141.
刘先胜,徐永健,张珍祥,等. 蛋白激酶C对大鼠支气管平滑肌KV通道的影响[J]. 生理学报,2003,55(2):135-141.
- [6] Peng J, Yang J, Guo W, et al. Wuhan Daxue Xuebao. 2006; 27(6):716-719.
彭娟,杨炯,郭卫. 小剂量茶碱对大鼠气道平滑肌细胞表达NF- κ B与ICAM-1的影响[J]. 武汉大学学报:医学版,2006,27(6): 716-719.
- [7] Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. Eur Respir J. 1996 Apr;9(4):808-20.
- [8] Qu YJ, Bai HB, Wang ZC, et al. Zhongguo Yaolixue Tongbao. 2010,26(6):814-818.
曲悦君,白洪波,王超智,等. 川芎嗪抑制大鼠气道平滑肌细胞增殖的作用[J]. 中国药理学通报,2010,26(6):814-818.
- [9] Lixuan Z, Jingcheng D, Wenqin Y, et al. Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF-kappaB activation in cigarette smoke induced inflammatory models. Pulm Pharmacol Ther. 2010,23(5):411-419.
- [10] Zheng H, Liu Y, Huang T, et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. Toxicol Lett, 2009, 189(3):225-234.
- [11] Song XL, Wang CH, Bai C. Dier Junyi Daxue Xuebao. 2010 (03):246-249.
宋小莲,王昌惠,白冲. 脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型的比较[J]. 第二军医大学学报,2010(03): 246-249.
- [12] Chen Y, Hanaoka M, Chen P, et al. Protective effect of beraprost sodium, a stable prostacyclin analog, in the development of cigarette smoke extract-induced emphysema. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;296(4):L648-L656.
- [13] Liu Y, Huang M, Li T, et al. Xiandai Shengwuxue Jinzhan. 2011(11):2065-2067.
刘媛,黄茂,李涛,等. 组织贴块法建立人气道平滑肌细胞体外培养模型的研究[J]. 现代生物医学进展,2011(11):2065-2067.
- [14] Zhao JP, Ye YJ, Gao M, et al. Huazhong Keji Daxue Xuebao. 2009,38(2):190-194.
赵建平,叶永军,高敏,等. 线粒体ATP敏感钾通道对哮喘大鼠气道平滑肌细胞表型转化的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版,2009,38(2):190-194.
- [15] Qiu C, Li N. Guangdong Yixue. 2008(11):1791-1793.
邱晨,李娜. 气道平滑肌细胞培养方法探讨[J]. 广东医学,2008 (11): 1791-1793.
- [16] Wang ZC, Xu JD, Bai HB, et al. Xiandai Shengwuxue Jinzhan. 2009(14):2631-2648.
王超智,许继德,白洪波. 改良组织块消化法建立大鼠气道平滑肌细胞模型[J]. 现代生物医学进展,2009(14):2631-2648.
- [17] Wang Y, Zhang SY, Wang XL, et al. Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi. 2004;20(2):181-184.
王英,张睢扬,王希良,等. 气道平滑肌细胞Ryanodine受体亚型mRNA的表达及其在哮喘中的变化[J]. 中国应用生理学杂志, 2004,20(2):181-184.
- [18] Lu HP, Zhang WX, Li CC. Wenzhou Yixueyuan Xuebao. 2009; (3):264-266.
卢虹蓓,张维溪,李昌崇. 哮喘大鼠气道平滑肌细胞培养方法探讨[J]. 温州医学院学报,2009,(3): 264-266.
- [19] Fryer A, Huang YC, Rao G, et al. Selective O-desulfation produces nonanticoagulant heparin that retains pharmacological activity in the lung. J Pharmacol Exp Ther. 1997;282(1):208-219.
- [20] Zhang CK, Qu SM, Su MQ, et al. Disi Junyi Daxue Xuebao. 2004;(7):656-659.
张彩莲,屈栓民,苏明权,等. 氨茶碱对大鼠气道平滑肌细胞增殖抑制及其对c-fos表达的影响[J]. 第四军医大学学报,2004,(7): 656-659.
- [21] Martin JG, Tamaoka M. Rat models of asthma and chronic obstructive lung disease. Pulm Pharmacol Ther. 2006;19(6): 377-385.
- [22] Yin J, Dai YR. Zhonghua Xiaochuan Zazhi: Dianziban. 2011; (6):388-393.
尹娟,戴元荣. 线粒体膜电位和细胞色素C在哮喘大鼠气道平滑肌细胞中的表达[J]. 中华哮喘杂志: 电子版,2011,(6): 388-393.
- [23] Shi GC, Deng WW, Wan HY, et al. Shanghai Yixue. 2003; 26(12): 895-898.
时国朝,邓伟吾,万欢英,等. 组胺刺激的气道平滑肌细胞钙离子浓度和长度变化及机制[J]. 上海医学,2003,26(12): 895-898.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金(青年)项目(2010), 课题名称: 瞬时感受器电位 M7 通道对慢性阻塞性肺疾病气道平滑肌细胞增殖的调控作用及其信号通路。

作者贡献: 梁瑞韵和杨诚进行实验设计, 实验实施为杨诚、黄林洁, 实验评估为江山平、梁瑞韵, 资料收集为杨诚、黄林洁, 杨诚成文, 江山平审校, 江山平对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

文章要点: ①熏烟法复制 COPD 大鼠模型。②分别应用三种方法原代培养 COPD 大鼠气道平滑肌细胞, 总结比较这三种方法的优劣。。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。