文章编号:1000-5404(2005)12-1297-02

技术方法

大鼠输精管平滑肌细胞的体外培养

Culture of smooth muscle cells isolated from the ductus deferens of rats

刘　铭,杨　康,廖克龙,曾会昌　(第三军医大学西南医院胸心外科,重庆 400038)

提　要: 目的　建立从 SD 大鼠的输精管中提取、培养获得平滑肌细胞的方法。**方法**　取 SD 大鼠的输精管,用酶消化法分离、提取平滑肌细胞,进行体外培养、扩增。倒置相差显微镜下观察体外培养的平滑肌细胞的生长情况,用平滑肌特异性的抗 α-SMA 做免疫组化染色,鉴定培养的细胞。**结果**　平滑肌细胞体外培养呈长梭形,并出现"峰-谷"样生长特征。用抗 α-SMA 免疫组化染色的方法鉴定所培养为平滑肌细胞,其纯度为(91.3 ± 5.2)%。**结论**　成功地建立了从 SD 大鼠输精管中提取、培养获得自体平滑肌细胞的稳定模型。

向受损的心肌组织中移植补充外源性细胞是近年来治疗心肌缺血的新方法。研究表明,移植胚胎心肌细胞、骨髓干细胞、骨骼肌成肌细胞、平滑肌细胞等能不同程度地改善动物心肌缺血模型的受损心功能[1],和其他类型细胞比较,平滑肌细胞具有来源充足、获得容易、操作简单的优点,并且能进行自体移植,从而可以避免异体细胞移植所致的免疫排斥反应和伦理、道德问题,因此,有一定临床实用价值,并已经受到了研究者的关注[2]。为获得用于自体移所需的平滑肌细胞,我们研究建立了从 SD 大鼠输精管组织中提取、培养获得自体平滑肌细胞的方法。

1　材料与方法

1.1　实验动物

成年雄性 SD 大鼠 6 只,体质量 300 g 左右,购自第三军医大学实验动物中心。

1.2　主要试剂

0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2),胰蛋白酶(Sigma 公司),Ⅰ型胶原酶(Sigma 公司),DMEM 培养液(Gibco 公司),胎牛血清(Gibco 公司),青霉素(100 U/ml),链霉素(100 μg/ml),抗平滑肌 α-肌动蛋白单克隆抗体(α-SMA,Sigma 公司)。

1.3　取材、细胞原代及传代培养

SD 大鼠肌注氯胺酮(22 mg/kg)麻醉后,作下腹部横切口,切取双侧输精管。剥去外膜组织,小圆刀片刮除内膜,4 ℃ PBS 缓冲液(含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml)反复漂洗 4 ~ 6 遍,然后剪碎成 1 mm^3 大小的组织块。先用 0.1% 的Ⅰ型胶原酶消化作用 10 min,倒去上清液,再加 0.2% 的胰蛋白酶和 0.1% 的Ⅰ型胶原酶消化 20 min,使游离成单个细胞,600 × g 离心 5 min,收集消化的细胞,接种至 25 cm^2 培养瓶,加含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置 37 ℃含 5% CO_2 孵箱中培养。当原代培养的细胞融合生长达 80% 时,进行传代培养,改用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。共培养 4 周,传代 1 次。

1.4　细胞形态观察

用倒置显微镜观察。

1.5　细胞生长曲线的绘制

取处于对数生长期的原代培养细胞,加含 0.05% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的消化液作用 2 ~ 3 min,使细胞脱壁,10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化、吹打混匀,按 4 × 10^4/ml 的密度接种至 24 孔细胞培养板中。于接种后 1、3、5、7、9、11 d 分别每次取出 3 孔细胞进行计数,余下的隔 3 d 更换培养液 1 次。取各时间段细胞计数的平均值,绘制成细胞生长曲线。

1.6　细胞鉴定

取体外培养 4 周的细胞,用 100% 甲醇 - 20 ℃固定 15 min,平滑肌特异性的 α-SMA 单抗二步法免疫组化染色,鉴定平滑肌细胞。普通光镜 400 倍视野下,任意取 6 个视野,计数抗 α-SMA 染色阳性细胞数和总细胞数,两者平均值的比值即为培养的平滑肌细胞的纯度。

2　结果

2.1　平滑肌细胞体外培养生长情况

原代细胞接种后 2 ~ 3 d,细胞逐渐贴壁、生长,细胞大小不等、形状多样,有梭形、长条形、带状三角形或星形等,细胞核呈卵圆形或圆形,核中有 1 ~ 3 个大小不一、深色的核仁,胞浆丰富,含少量颗粒。随着细胞的扩增,细胞生长范围不断扩大,至 16 ~ 20 d 细胞长满覆盖培养瓶底,细胞生长密集,呈梭型或长梭型,细胞突起相互交错,彼此融合,部分区域细胞多层重叠,部分区域细胞单层,高低起伏,呈平滑肌细胞培养典型的"峰-谷"状生长结构特征。传代培养的细胞,其贴壁和生长速度均较原代培养的细胞加快,约 10 ~ 14 d,细胞长满培养瓶底,见图 1。

2.2　平滑肌细胞生长曲线

平滑肌细胞生长曲线近似"S"形,接种后第 2 天细胞数量有所减少,经过 2 ~ 3 d 的潜伏适应期后,细胞生长开始进入对数生长期,持续 3 ~ 4 d 进入平台生长期,见图 2。

2.3　抗 α-SMA 免疫组化染色

抗 α-SMA 染色鉴定培养的细胞为平滑肌细胞,胞浆呈棕黄色,肌丝结构清晰可辨,沿细胞纵轴分布,这是平滑肌细胞所特有的;细胞核为淡蓝色苏木精衬染,无棕色反应。计算培养的平滑肌细胞的纯度为(91.3 ± 5.2)%,见图 3。

作者简介:刘　铭(1971 -),男,湖北省咸宁市人,博士,主治医师,主要从事缺血性心脏病的基础和临床方面的研究。电话:(023)68765332

收稿日期:2004-04-12;修回日期:2004-11-11

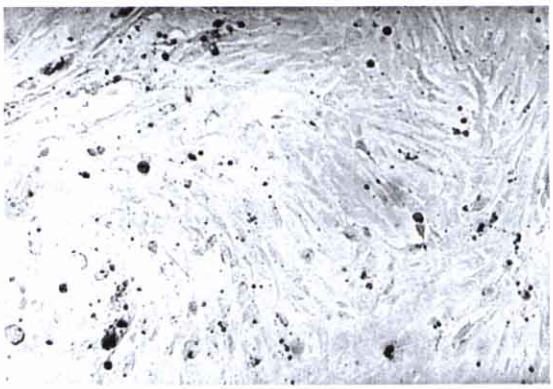


图1 倒置显微镜下体外培养的平滑肌细胞 (×100)

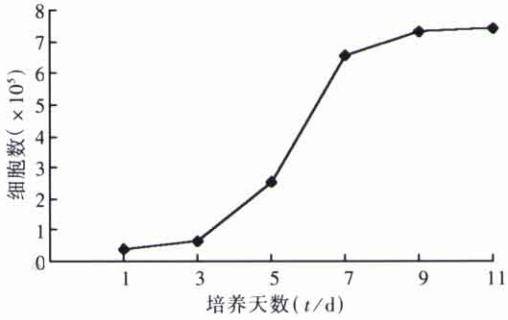


图2 平滑肌细胞生长曲线

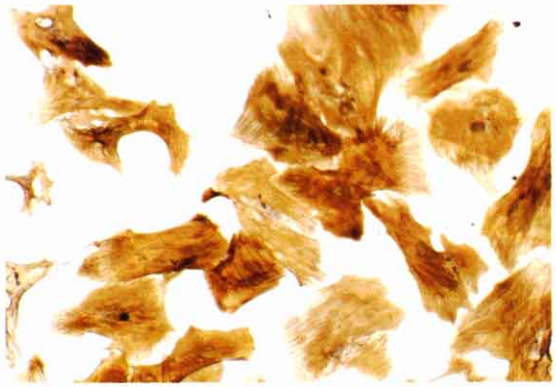


图3 平滑肌细胞抗 α-SMA 免疫组化染色 (×400)

3 讨论

体外细胞培养选择符合实验要求的取材部位是实验的关键步骤。平滑肌细胞培养的通常取材部位是主动脉等大血管[3],但大鼠的主动脉细小,平滑肌组织含量少,常需取数只大鼠的主动脉用于培养,由于本研究获取平滑肌细胞的最终目的是用于自体移植,要求接受移植的大鼠存活,因此取主动脉不符合实验要求。胃肠道虽然富含平滑肌组织,但其管腔较薄,取材时容易穿破管腔造成污染[4],导致细胞培养失败,也不是理想的取材部位。因此,我们根据本实验的特殊要求,参照 Yoo 等[5]的方法,选取大鼠的输精管组织来提取平滑肌细胞进行培养,国内尚少见报道。

平滑肌细胞培养的方法主要有组织块贴壁法和酶消化法两种[6]。贴壁法的优点是操作较为简便,获得的细胞纯度高,但这种方法细胞培养周期长,获得的细胞数量较少,且易使平滑肌细胞胞质内肌丝丧失、亚细胞器增加,细胞性状发生改变。而消化法细胞解离充分,细胞数量充足,接种后细胞生长快速,可在较短的时间内获得大量细胞,成功率高。我们应用酶消化法,并略作改进,将消化分二步进行,先以 0.1% 的Ⅰ型胶原酶作用 10 min,使容易被消化酶解离出来的内皮细胞、成纤维细胞等混杂细胞先游离出来,去除之[7],再用 0.2% 胰蛋白酶和 0.1% Ⅰ型胶原酶消化 20 ~ 30 min,这样可获得纯度更高平滑肌细胞用于培养。实验显示,该方法培养周期短、收获的平滑肌细胞数量多、细胞纯度高,能更好得保护离体细胞的性状和代谢。

培养液是细胞培养至关重要的因素,我们体会血清在平滑肌细胞培养过程中必不可少,它含有细胞生长所需的基质和刺激细胞分裂的因子,而且胎牛血清比血清好;如果用不含血清的培养液,则会导致细胞不生长。原代培养时加 20% 的胎牛血清,传代培养时可改为 10%,能加速平滑肌细胞的分裂、增殖。此外,体外培养的细胞普遍耐酸不耐碱,偏酸的环境有利于平滑肌细胞的生长,因此我们在培养液中加入 15 ~ 25 mmol/L 的 Hepes,使 pH 值稳定于 7.0 ~ 7.3。

通过以上实验,我们应用二步酶消化法,成功地从 SD 大鼠的输精管组织分离、提取、培养获得了用于自体细胞移植所需的高纯度平滑肌细胞。

关键词:平滑肌细胞;细胞培养;大鼠
中图法分类号:R329-33 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Penn M S, Francis G S, Ellis S G, *et al*. Autologous cell transplantation for the treatment of damaged myocardium[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2002, 45(1): 21 - 32.

[2] Li R K, Jia Z Q, Weisel R D, *et al*. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(3): 513 - 522.

[3] Campbell J H, Campbell G R. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle[J]. Clin Sci (Lond), 1993, 85(5): 501 - 513.

[4] 贾 敏, 刘丽宏, 梅其炳, 等. 大鼠胃底平滑肌细胞的培养[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(4): 380 - 381.

[5] Yoo K J, Li R K, Weisel R D, *et al*. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 70(3): 859 - 865.

[6] 涂永生, 黄红林, 朱炳阳, 等. Ⅱ型胶原酶/弹性蛋白酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(5): 438 - 440.

[7] 赵三妹, 夏人仪, 王宗立, 等. 动脉平滑肌细胞的培养方法及其应用[J]. 中华病理学杂志, 1987, 16(4): 260 - 262.

(编辑 刘洪娥)