文章编号:1000-5404(2005)24-2425-03

论著

不同方法培养大鼠肺动脉平滑肌细胞的差异

易 斌,钱桂生,白 莉,王关嵩 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 比较酶消化法、组织贴块法所培养大鼠肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cell, PASMC)的生长曲线、蛋白质含量、胞内[Ca^{2+}]含量上的差异性,探讨不同方法是否可以用于同一系列的信号通路研究。**方法** 酶消化法、组织贴块法分别培养PASMC,经过纯化以及免疫组化鉴定后,采用改良Lowry法测定蛋白质含量,采用荧光指示剂法测定胞内[Ca^{2+}]含量,光镜下观察生长曲线。**结果** 两种方法均顺利建立了纯PASMC系,但是在生长曲线和蛋白质含量上存在一定程度的差异,在胞内[Ca^{2+}]含量上差异有显著性意义($P<0.05$)。**结论** 在同一系列的信号通路研究中应该尽量采用其中一种细胞培养方法。

关键词: 肺动脉平滑肌细胞;细胞培养;蛋白质含量
中图法分类号: R322.121;R329.24 **文献标识码:** A

Comparing the characteristics of rat pulmonary arterial smooth muscle cell cultured by two methods

YI Bin, QIAN Gui-sheng, BAI Li, WANG Guan-song(Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To compare the growth curve, protein content, calcium ion content of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) cultured by enzyme digestion and tissue-sticking methods. To investigate whether PASMCs cultured by two ways could be offered to one series of signaling pathway studies. **Methods** The protein content was determined by upgraded-lowry, the calcium ion content by fluorescence indicator. The growth of PASMCs was observed by light microscope. **Results** There existed certain difference in protein content, growth curve between PASMCs cultured by the two methods, especially in calcium ion content ($P<0.05$). **Conclusion** Pure PASMCs cultured only by one way should be used in a series of signaling pathway studies.

Key words: pulmonary arterial smooth muscle cell; cell culture; protein content

近几年来,以肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cell,PASMC)为研究模型探讨各种疾病状态下肺血管重塑的细胞内信号传导通路已经成为研究热点[1]。PASMC性状(生长曲线、蛋白质含量、Ca^{2+}等离子的含量等)的稳定性对于信号传导通路的研究结果影响明显。PASMC的培养多采用贴块片和酶消化法。不同方法所建立的细胞系的性质是否存在差异及其程度还缺乏研究。为此本研究采用贴片法和复合胶原酶法分别培养PASMC,并对第4代细胞的生长曲线、蛋白质含量和胞内[Ca^{2+}]含量进行了测定和比较,旨在为深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及配制

低糖EMEM培养基(PAA,美国),按说明书配制,加双蒸水至800 ml,$NaHCO_3$调pH至7.4,加双蒸水定容至1 L,抽滤除菌后分装,-20 ℃保存。D-Hanks液:(hyclone,美国),加双蒸水定容至1 L,抽滤除菌后分装,-20 ℃保存。酶消化法采用0.2%胶原酶Ⅰ型(Sigma)、0.05%弹性蛋白酶Ⅲ型(Sigma)、0.05%胰蛋白酶抑制剂(Sigma)、0.1%牛血清蛋白、0.1%胰蛋白酶(进口分装),以上均用D-Hanks液配制而后过滤分装。小鼠抗大鼠α-SM-actin单克隆抗体(BM002,武汉博士德)。S-P免疫组化试剂盒(SA1021,武汉博士德)。

1.2 主要方法及操作步骤

1.2.1 取心肺组织 购自第三军医大学实验动物中心的SD大鼠8只,雌雄各半,体质量180~220 g,用氯胺酮100 mg/kg腹腔注射麻醉后经颈动脉放血处死,无菌环境下迅速取出心肺组织,放入无血清DMEM培养基中。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400200)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400200)
作者简介: 易 斌(1974-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事缺氧肺动脉重建的信号通路机制方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)86272103
通讯作者: 白 莉,电话:(023)68755320
收稿日期: 2005-10-05;**修回日期:** 2005-11-25

1.2.2 取肺动脉 将心肺移入超净工作台，直视下解剖分离出肺动脉。用眼科镊小心仔细地剥除外膜的纤维脂肪层，并用眼科剪沿血管外侧纵向剪开，在 DMEM 培养基中漂洗 3 次。将血管内膜面向上，用刮匙自上而下刮 1～2 次去除内皮细胞。

1.2.3 酶消化法 先用眼科镊将肺动脉撕成 1 mm×1 mm 左右的小条，随后放预先盛有内含 0.2% 的复合消化酶液 2 ml 于 37 ℃ CO_2 孵箱静置 40 min。待小块组织完全消化溶解后，1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液，向细胞沉淀中加入新鲜配制的 20% 优等胎牛血清的低糖 DMEM 培养基，轻轻吹打，后按每瓶(50 ml) 1×10^5 活细胞接种在培养瓶里，共接种 5 瓶，放入 37℃孵箱里静置培养，3 d 后换液。

1.2.4 贴片法 剩余的中膜剪为 0.5 mm×1 mm×1 mm 的小块，移入培养瓶内，组织块之间距 0.5 cm 左右，共接种 5 瓶，每瓶 10 个组织块，加入含 20% 优等胎牛血清的 DMEM 培养液 1 ml，使组织块浸泡在培养液中，放入 37 ℃孵箱里静置培养，静置 2 d 后补充含 20% 优等胎牛血清的 DMEM 培养液 2 ml，继续培养 5 d 后开始观察。

1.2.5 传代 细胞长成单层和多层交错的致密细胞层，即可传代。倾去原有液体，加入 0.25% 胰蛋白酶消化 15 s，随后倾去大部分，剩余小部分继续作用 5 min，镜下见细胞成片地收缩，呈颗粒状时加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液，用滴管将细胞自瓶壁上吹打下来，以 1∶2 分装接种。

1.2.6 传代细胞纯化及测定 采用 3 瓶序列法[2]除去混入的内皮细胞和成纤维细胞，用免疫组织化学法测定其纯度。

1.2.7 鉴定 采用小鼠抗大鼠 α-SM-actin 免疫组织化学染色，根据 S-P 法的常规操作进行，以胞浆中与细胞长轴相平行的细丝状棕黄色免疫沉淀为阳性结果。

1.3 生长性状的观察

1.3.1 计数分析 传至第 3 代细胞，用胰蛋白酶消化分散后按 $1\times10^4/cm^2$ 密度接种于每组 6 孔板，培养 9 d，逐日检测 1 组，计数操作见文献[2]。

1.3.2 接种存活率 细胞被制成分散的悬液后，以低密度(2～5/mm^2)接种到底物上，贴壁并能存活生长形成细胞小群(克隆)的细胞百分数值。用以表示细胞群的活力。

接种存活率 = 形成克隆数/接种细胞数×100%

1.3.3 蛋白质含量测定 以 BSA 为标准，采用 Lowry 改良法测定 PASMC 的蛋白质含量。

1.3.4 胞内[Ca^{2+}]含量测定 取汇合成单层的 PASMC，弃培养液后用 D-Hanks 液冲洗 3 次，然后用 D-Hanks 液温育 5 min，细胞从瓶底分离后用 D-Hanks 液洗涤 3 次，然后用培养基制成细胞悬液(10^6/ml)，并用台盼蓝检查细胞存活率 >95% 者置 4 ℃保存备用。以本研究所建立的方法进行检测[1]，平行检查 5 孔。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 PASMC 的建系情况以及鉴定结果

两种方法均顺利培养出纯 PASMC 系，组织贴块法在 20 d 进行第 1 次传代，而酶消化法为 9 d 第 1 次传代。利用 S-P 法对 PSAMC α-SM-actin 免疫组化染色，两种方法所培养的细胞系 98% 以上的细胞染色阳性，倒置显微镜下可见胞浆中与细胞长轴相平行的细丝状棕黄色免疫沉淀，证实均为平滑肌细胞(图 1)。



图 1 α-SM-actin 免疫细胞化学鉴定 (S-P×100)

Fig 1 Immunohistochemical staining of α-SM-actin in pulmonary arterial smooth muscle cells under invert microscope (S-P×100)

2.2 所培养的 PASMC 的生长曲线和蛋白质含量

两种培养方法培养的 PASMC 的生长曲线和蛋白质含量上有一定程度上的差异，但差异并不显著($P>0.05$)，二者均于 7～8 d 达高峰，而后由于接触抑制而下降。具体见表 1、2。

表 1 PASMC 的生长曲线[$\times10^4\cdot(cm^2\cdot d)^{-1}$]

Tab 1 The growth quantities of pulmonary arterial smooth muscle cells [$\times10^4\cdot(cm^2\cdot d)^{-1}$]

	Clones	Growth day (d)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Enzyme digestion	1	2.0	2.3	2.7	3.4	3.7	4.0	4.1	4.2	4.1
Tissue sticking method	1	1.8	2.0	2.5	2.8	3.4	3.8	4.0	4.0	3.8

表 2 PASMC 的蛋白质含量[$\mu g\cdot(cm^2\cdot d)^{-1}$]

Tab 2 Protein content of pulmonary arterial smooth muscle cells [$\mu g\cdot(cm^2\cdot d)^{-1}$]

	Clones	Growth day (d)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Enzyme digestion	11.2	16.3	22.5	24.0	28.1	31.7	35.3	36.2	37.5	35.2
Tissue sticking method	11.2	15.2	21.3	23.6	25.9	28.9	32.3	33.7	34.4	32.3

2.3 PASMC 的胞内[Ca^{2+}]含量

组织块法培养 PASMC 的胞内[Ca^{2+}]含量为(195.32±14.62) nmol/L，而酶消化法为(150.18±11.87) nmol/L，差异有显著性意义($P<0.05$)。

3 讨论

PASMC 作为一种研究模型，已经广泛的用于慢性阻塞性肺病、低氧性肺动脉高压等方面的研究。近年来，随着研究逐渐深入到信号传导通路水平，对 PASMC 细胞系的稳定性(蛋白质、各种离子、细胞周期、生长曲线等方面)要求更高。在进行某研究中，往往需要进行多次细胞原代培养工作。目前国内外采用

原代培养细胞建系中，酶消化法和组织贴片法是最常用的 2 种方法，在同一系列研究中能否同时使用、混用后是否对研究结果有显著性影响，这些方面需要研究证实。

本研究采用组织贴片法和酶消化法分别培养 PASMC，并对第 4 代 PASMC 的生长曲线、蛋白质含量和胞内[Ca^{2+}]含量进行了测定和比较。研究表明两种方法所建立的 PASMC 细胞系在生长曲线和蛋白质含量变化上均存在一定的差异，但是差异不显著。研究表明组织块法培养 PASMC 的胞内[Ca^{2+}]含量为(195.32 ± 14.62) nmol/L，而酶消化法为(150.18 ± 11.87) nmol/L，差异有显著性意义($P < 0.05$)。在信号传导通路研究中，通过 Western blot 等方法检测各类激酶、通道蛋白、受体等蛋白质的含量是研究的重要方面[3-5]，这 2 种方法所培养的 PASMC 在总蛋白质含量上的差异可能对研究结果造成影响。同样由于胞内[Ca^{2+}]属于信号传导通路的第二信使，在 PASMC 相关信号传导研究中起着重要的作用[6]，因此本研究的两种方法在胞内[Ca^{2+}]浓度上的显性差异对信号传导研究结果有着明显的影响。然而影响的具体环节及其程度仍然需要进一步研究。

从本研究结果看来，两种方法均能顺利培养出较纯的 PASMC 细胞系，但是各有优缺点。酶消化法建系周期短，获取的细胞较多，效果肯定，无细胞"去分化"、"调整"现象。而组织贴片法操作简单可行，无需配置众多消化酶液，比较经济，容易掌握和推广。可以根据具体情况选用。

综上所述，不同的细胞培养方法可能对信号传导通路的研究结果造成影响，尽量在同系列研究中采用同一种细胞培养方法。

参考文献：

[1] Sheares K K, Jeffery T K, Long L, *et al*. Differential effects of TGF-beta1 and BMP-4 on the hypoxic induction of cyclooxygenase-2 in human pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(5): L919 - L927.

[2] 王关嵩，杨晓静，钱桂生，等. 大鼠血管平滑肌细胞分离培养的探讨[J]. 第三军医大学学报，1998, 20(4): 348 - 350.

[3] Li P, Oparil S, Sun J Z, *et al*. Fibroblast growth factor mediates hypoxia-induced endothelin-a receptor expression in lung artery smooth muscle cells[J]. J Appl Physiol, 2003, 95(2): 643 - 651.

[4] Barman S A, Zhu S, Han G, *et al*. cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle *via* cGMP-dependent protein kinase [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(6): L1004 - L1011.

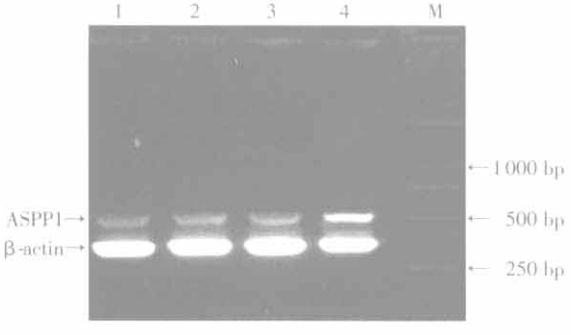
[5] Suzuki Y J, Day R M, Tan C C, *et al*. Activation of GATA-4 by serotonin in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 17525 - 17531.

[6] Zhang W M, Yip K P, Lin M J, *et al*. ET-1 activates Ca^{2+} sparks in PASMC: local Ca^{2+} signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285 (3): L680 - L690.

（编辑　王　红）

更　正

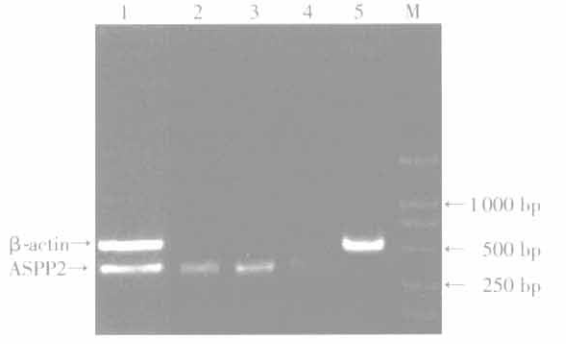
因发排、校对错误，本刊 2005 年第 21 期 2104，2105 页的图 1、2 为下图，特此更正。编辑部对由此给读者和作者带来的阅读和使用不便深表歉意。



1: HEPG2; 2: MCF-7; 3: A549; 4: Fibroblast; M: Ladder marker

图 1　肿瘤细胞中 ASPP1 的 mRNA 表达

Fig 1　The mRNA expression of ASPP1 in 3 tumor cell lines and normal control



1: Fibroblast; 2: HEPG2; 3: MCF-7; 4: A549; 5: β-actin; M: DNA marker

图 2　肿瘤细胞中 ASPP2 的 mRNA 表达

Fig 2　The mRNA expression of ASPP2 in 3 tumor cell lines and normal control

（本刊编辑部）