文章编号:1000-5404(2007)01-0039-04

论著

组织块法培养大鼠肺微血管内皮细胞的综合鉴定

徐顺贵[1],吴国明[1],徐 智[1],冯起甲[1],王关嵩[1],张健鹏[2] ([1]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;[2]武警总医院呼吸内科,北京 100039)

提 要:目的 为组织块法培养的大鼠肺微血管内皮细胞(rat pulmonary microvascular endothelial cells, RPMVECs)建立合理可靠的多指标综合鉴定方案。**方法** 采用外周肺组织贴块法培养RPMVECs,抽取组织块进行切片观察,以大鼠肺动脉平滑肌细胞和人脐静脉内皮细胞为对照,对培养细胞进行CD34、植物凝集素BSI、Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学鉴定,通过光镜和透射电镜观察细胞形态和超微结构。**结果** 组织切片显示组织块源于外周肺组织,CD34免疫细胞化学染色阳性,植物凝集素BSI结合试验阳性,而Ⅷ因子相关抗原染色阴性,透射电镜未见Weibel-Palade小体。**结论** Ⅷ因子相关抗原和Weibel-Palade小体并非RPMVECs鉴定的理想指标,联合应用外周肺组织切片、CD34和植物凝集素BSI三指标为组织块法培养的RPMVECs提供了一个简单易行、合理、可靠的综合鉴定方案。

关键词:肺微血管内皮细胞;细胞鉴定;大鼠
中图法分类号:R322.12;R322.35;R329 **文献标识码**:A

Comprehensive characterization of rat pulmonary microvascular endothelial cells cultured by tissue-sticking method

XU Shun-gui[1], WU Guo-ming[1], XU Zhi[1], FENG Qi-jia[1], WANG Guan-song[1], ZHANG Jian-peng[2] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Respiratory Diseases, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To establish a comprehensive characterization protocol of rat pulmonary microvascular endothelial cells (RPMVECs) cultured by tissue-sticking method. **Methods** RPMVECss were cultured with peripheral lung tissue-sticking method. Histological sections from peripheral lung tissue pieces used for cell culture were examined. With rat pulmonary artery smooth muscle cells and human umbilical vein endothelial cells as controls, the cultured cells were identified by immunocytochemical staining using CD34 antibody, lectin from Bandeiraea simplicifolia and factor Ⅷ related antigen. The cell morphology and ultrastructure were observed with inverted light microscope and transmission electron microscope respectively. **Results** Histological sections showed that tissue pieces were scissored from peripheral lung lobes accurately. The cultured cells had characterization of binding lectin from Bandeiraea simplicifolia and positive immunocytochemical staining with CD34 antibody, but negative for factor Ⅷ related antigen. Weibel-Palade bodies were not found in cells. **Conclusion** Factor Ⅷ related antigen and Weibel-Palade body are not ideal indexes for RPMVECs identification. The combination of peripheral lung tissue section, CD34 immunocytochemical staining and lectin from Bandeiraea simplicifolia binding assay provides a simple and reasonable comprehensive characterization protocol for RPMVECs.

Key words: pulmonary microvascular endothelial cells; cell characterization; rat

肺组织贴块法是大鼠肺微血管内皮细胞(rat pulmonary microvascular endothelial cells, RPMVECs)原代培养的常用方法之一,培养过程中常有杂细胞混入,RPMVECs也会因培养条件的不同而改变其形态,并易与其他细胞混淆。既往对其鉴定大多采用大血管内皮细胞的鉴定方法,所用指标较单一。事实上,微血管内皮细胞的形态和功能与大血管内皮细胞具有异质性[1],应用单一指标进行鉴定特异性差。因此,有必

基金项目:国家"十五"重大攻关课题(2003BA712A07-01)
Supported by the Key Sci & Tech Research Foundation of the National "Tenth Five-Year Plan" of China (2003BA712A07-01)
作者简介:徐顺贵(1974-),男,福建省仙游县人,博士研究生,主治医师,主要从事急性肺损伤发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68755320
通讯作者:吴国明,电话:(023)68774693,E-mail:guomingwu@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-09-13;修回日期:2006-11-03

要根据微血管内皮细胞的特性，综合多个指标对RPMVECs进行鉴定。为此，我们采用组织贴块法培养RPMVECs，通过组织块石蜡切片、细胞形态和免疫细胞化学证实成功培养该细胞，并对Ⅷ因子相关抗原等鉴定指标进行评价，确立了较为合理的RPMVECs综合鉴定方案。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基(低糖，美国Hyclone公司)，优等胎牛血清(美国Gibco公司)，内皮细胞生长添加物(ECGS，美国Sigma公司)，胰蛋白酶(美国Amresco公司)，异硫氰酸荧光素标记植物凝集素BSI(FITC-BSI，美国Sigma公司)，兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体、S-P免疫组化染色试剂盒、浓缩型DAB试剂盒(北京中杉金桥公司)，兔抗大鼠CD34多克隆抗体(武汉博士德公司)。

1.2 大鼠肺微血管内皮细胞培养

健康3月龄雄性SD大鼠6只，由本校实验动物中心提供，体质量(134.1±13.6) g。速眠新0.8 ml/kg肌肉注射麻醉，同时腹腔注射肝素钠3 000 U。75%乙醇消毒，切断颈动脉放血处死，开胸暴露心肺，夹闭上下腔静脉，用无血清培养液自右心室灌洗肺循环至双肺发白，剪取肺叶。超净台下剪除肺叶脏层胸膜，剪取胸膜下肺组织(厚度小于1.5 mm)，切成1 mm×1 mm×1 mm大小组织块，无血清培养液漂洗3次，均匀贴入25 cm^2 塑料培养瓶，每瓶25块，置孵箱固化2 h后，加入含20%优等胎牛血清、肝素钠90 U/ml、ECGS 50 μg/ml的DMEM培养液2 ml静置培养。60 h后小心吸除组织块，追加培养液2 ml继续培养，隔天半量换液。10 d左右细胞融合成单层细胞，0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA 1∶1混合消化液消化后按1∶2传代。2代细胞用于鉴定。

1.3 细胞鉴定

1.3.1 组织块石蜡切片观察 抽取部分用于细胞培养的组织块，10%甲醛固定，常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片，苏木精-伊红染色，光学显微镜下观察切片的组织成分和形态结构。

1.3.2 倒置相差显微镜下观察细胞形态 组织块贴壁后在孵箱中静置培养60 h，此间避免进行细胞观察以防组织块脱壁漂浮。按时去除组织块后，隔日在倒置相差显微镜下观察原代和传代细胞的形态变化，并予照相记录。

1.3.3 Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学染色 按照过氧化物酶标记的链霉卵白素(Streptavidin/Peroxidase，S-P)免疫组化检测试剂盒说明书进行操作。染色前细胞爬片经0.3% Triton X-100/PBS室温孵育5 min，兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体稀释比例为1∶50，DAB显色。以PBS替代一抗为空白对照，大鼠肺动脉平滑肌细胞染色作阴性对照，人脐静脉内皮细胞染色为阳性对照。

1.3.4 CD34免疫细胞化学染色 细胞爬片，染色前细胞不经0.3% Triton X-100/PBS孵育，兔抗大鼠CD34多克隆抗体1∶100稀释，染色方法及对照设置同上，以细胞膜出现棕褐色沉淀判定为阳性结果。

1.3.5 植物凝集素BSI结合试验 细胞爬片，0.01 mol/L PBS漂洗，滴加25 μg/ml异硫氰酸荧光素标记植物凝集素BSI(FITC-BSI)，室温避光孵育30 min，PBS漂洗，缓冲甘油封片。以大鼠肺动脉平滑肌细胞和人脐静脉内皮细胞为对照，荧光显微镜观察FITC-BSI结合情况。

1.3.6 透射电镜观察 用0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA 1∶1混合消化液消化细胞，含血清培养液中止消化，制成单细胞悬液，移入1.5 ml EP管，1 000 r/min离心10 min，吸除上清液，加入2.5%戊二醛固定细胞，脱水、包埋、超薄切片，透射电镜观察细胞的超微结构。

2 结果

2.1 病理组织学光镜观察

肺泡结构清晰，未见大支气管，肺间质结构完整，未发现大血管，符合正常大鼠外周肺组织的形态结构特征。见图1。

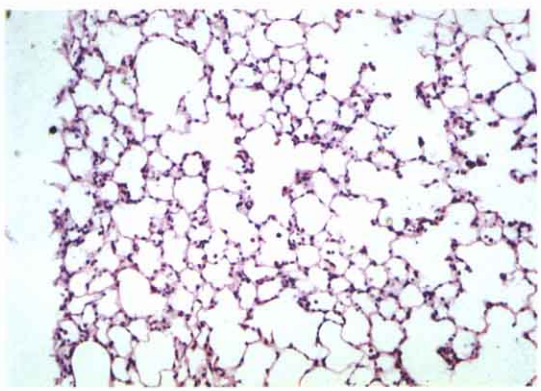


图1 组织块石蜡切片 (HE×200)

2.2 培养细胞形态观察

倒置相差显微镜下观察原代培养细胞，细胞呈短梭形或多角形，细胞核清晰，细胞质丰富，大小均匀，铺路石样排列，单层贴壁生长。见图2。随着传代或血清浓度等培养条件的改变，细胞形态可出现变化，如由短梭形或多角形伸展为长梭形，铺路石样排列转变为漩涡状排列等。



图2 正常大鼠肺微血管内皮细胞 (倒置相差显微镜×100)

2.3　Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学染色

培养的大鼠肺微血管内皮细胞染色阴性。对照片中，空白对照和大鼠肺动脉平滑肌细胞染色亦呈阴性，而人脐静脉内皮细胞质则有棕褐色沉淀，呈阳性反应。

2.4　CD34 免疫细胞化学染色

染色结果显示，培养的大鼠肺微血管内皮细胞膜出现棕褐色着色，见图 3。与人脐静脉内皮细胞阳性结果一致。空白对照和大鼠肺动脉平滑肌细胞染色则为阴性。



图 3　正常大鼠肺微血管内皮细胞 CD34 免疫细胞化学染色（S-P ×400）

2.5　植物凝集素 BSI 结合试验

荧光显微镜观察，培养的大鼠肺微血管内皮细胞与 FITC-BSI 结合，呈明亮的绿色荧光。见图 4。FITC-BSI 与大鼠肺动脉平滑肌细胞亦有微弱结合，荧光强度明显弱于大鼠肺微血管内皮细胞。人脐静脉内皮细胞则未见 FITC-BSI 荧光显示。

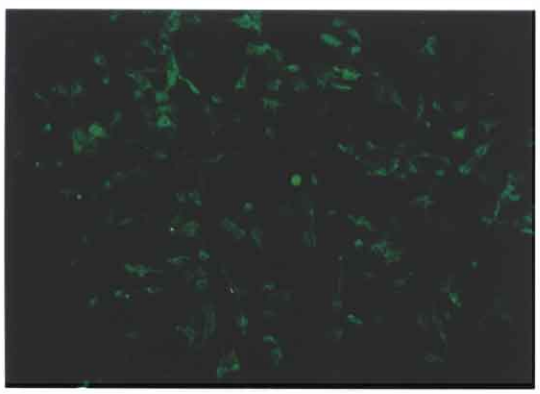


图 4　正常大鼠肺微血管内皮细胞与 FITC-BSI 的结合情况（荧光显微镜 ×100）

2.6　透射电镜观察

培养的大鼠肺微血管内皮细胞超微结构显示，细胞表面有突起；细胞核较大，核仁清晰，部分核形欠规则，可见核沟；细胞质中高尔基复合体、粗面内质网和滑面内质网发达，部分内质网扩张成池，线粒体不丰富，吞饮小泡较少，未见 Weibel-Palade 小体。见图 5。

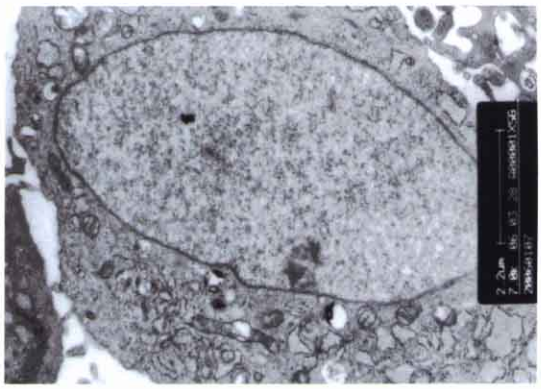


图 5　正常大鼠肺微血管内皮细胞的超微结构（TEM ×7 000）

3　讨论

肺微血管内皮细胞具有血管通透、物质转运等多种生理功能，并在急性肺损伤等病理过程中发挥重要作用，该细胞的体外培养广泛运用于这些生理功能及病理作用的研究，大鼠外周肺组织贴块法是常用的细胞培养方法之一。大鼠外周肺组织的正确取材是成功培养 RPMVECs 的前提，严格剪取外周肺组织可以减少大血管内皮细胞和平滑肌细胞的污染。既往研究对外周肺组织的取材厚度并未做出明确的界定，缺乏客观依据[2]。我们参考本所培养方法，将取材厚度控制在 1.5 mm 左右，同时抽取组织块进行石蜡切片观察，证实组织块来源于外周肺组织，为准确取材提供了客观证据[3]。

组织块法利用细胞迁移能力的差异分离出 RPMVECs，分离过程中仍有可能混入成纤维细胞等杂细胞。“铺路石样”是内皮细胞与杂细胞鉴别的特征性细胞形态，但我们在培养中发现，随着传代或血清浓度的改变，RPMVECs 细胞形态可由“铺路石样”转变为长梭形，甚至呈漩涡状排列，类似成纤维细胞或平滑肌细胞。由此可见，RPMVECs 的细胞形态未必都呈“铺路石样”，“铺路石样”细胞形态只宜作为 RPMVECs 鉴定的参考指标，RPMVECs 主要还是通过免疫细胞化学进行鉴定。

CD34 是血管内皮细胞标记物，我们对培养的细胞进行了 CD34 免疫细胞化学鉴定，结果为阳性，确认所养细胞是内皮细胞。然而 CD34 无法鉴别微血管和大血管内皮细胞，因此有必要联合其他指标进一步鉴定。研究表明，植物凝集素 BSI 能与肺微血管内皮细胞特异性结合，但不结合于大血管内皮细胞[4]。据此，植物凝集素 BSI 结合试验阳性进一步证实了该内皮细胞是肺微血管内皮细胞。

Ⅷ因子相关抗原(FⅧRAg)向来被认为是内皮细胞免疫组化鉴定的经典指标,Weibel-Palade 小体作为FⅧRAg 的贮存体也被视为鉴定内皮细胞的特征性形态学指标。微血管内皮细胞鉴定资料显示,许多动物或人不同组织来源的微血管内皮细胞 FⅧRAg 表达阳性[5]。然而,我们的鉴定结果显示 RPMVECs FⅧRAg 染色阴性,透射电镜亦未见 Weibel-Palade 小体,两个结果相互印证,与文献[6]报道一致。基于此,我们认为 FⅧRAg 和 Weibel-Palade 小体并非鉴定 RPMVECs 的理想指标。

综上所述,由于组织块法原代培养 RPMVECs 难以完全避免杂细胞的污染,有必要对培养细胞进行鉴定。目前还缺乏能充分证明 RPMVECs 的特异性单指标,因此确认 RPMVECs 的最好办法仍是联合多个指标测定细胞的一系列特征后做出综合评定。为此,我们对鉴定指标进行筛选,确立了一个 RPMVECs 综合鉴定方案:首先通过外周肺组织切片证实取材的准确性;其次通过 CD34 免疫细胞化学证明培养细胞为血管内皮细胞;随后在此基础上通过植物凝集素 BSI 结合试验进一步确认微血管内皮细胞。该方案简单易行,合理可靠,为外周肺组织贴块法培养的大鼠肺微血管内皮细胞提供了较为理想的鉴定方法。

参考文献:

[1] Chi J T, Chang H Y, Haraldsen G, *et al*. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(19): 10623-10628.

[2] Zhang H, Sun G Y. LPS induces permeability injury in lung microvascular endothelium *via* AT_1 receptor[J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 441(1): 75-83.

[3] 王关嵩, 蔡文琴, 钱桂生, 等. 肺微血管内皮细胞系的建立及脂多糖作用后酪氨酸激酶受体活性的变化[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2): 94-97.

[4] King J, Hamil T, Creighton J, *et al*. Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes [J]. Microvasc Res, 2004, 67(2): 139-151.

[5] Medhora M, Daniels J, Mundey K, *et al*. Epoxygenase-driven angiogenesis in human lung microvascular endothelial cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(1): H215-H224.

[6] 王新红, 殷莲华, 金惠铭. VEGF 高表达的胶质瘤细胞 C6 对共培养微血管内皮细胞表达 Flk-1 及 Flt-1 的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(11): 1365-1369.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2007)01-0042-01

"药源性"急腹症型铅中毒的诊断体会

杨彤翰[1],王志刚[2],孔佩艳[3],严治林[4] (第三军医大学新桥医院:[1]肝胆外科,[3]血液内科,[4]泌尿外科,重庆 400037;[2]中国人民解放军61792部队卫生队,重庆 400041)

铅中毒比较少见,接诊时易被临床医师忽略或误诊[1,2]。为提高对本病的认识及警惕性,特将我们近期收治的1例铅中毒患者,并根据患者叙述,将与本患者有同样发病特点并在外地治疗的其妻子一同报告,并重点就诊断中的有关问题进行讨论。

1 临床资料

患者,男性,49岁,2005年10月22日出现乏力伴轻度腹痛,20 d后腹痛加重,因有胆囊结石、左肾结石史而收住院治疗。腹痛呈持续性阵发性绞痛,难忍,伴腹胀、便秘,以脐周及左中下腹为主,多在晚上8~9时发作,常需杜冷丁止痛。查体见巩膜轻度黄染,腹平软,左中下腹部隐约压痛,肠鸣音弱。肝功能:ALT 119 IU/L,T-BIL 32.5 μmol/L,D-BIL 10.8 μmol/L。1周后Hb由入院时的110 g/L降至77 g/L,大小便常规及隐血试验(-),肝炎标志物(-)。血铅415.6 μg/L,尿铅417.2 μg/L。经用依地酸二钠钙1 g+10%葡萄糖液250 ml,连用3 d,休息4 d,共5疗程驱铅治疗,自觉症状消失,血铅降至53 μg/L,血色素升至120 g/L。痊愈出院。

2 讨论

职业性铅中毒常有铅接触史,如铅矿开采、冶炼、蓄电池制造及焊接等工种,主要因铅及其化合物以烟尘、粉尘、蒸气等形式经呼吸道吸入所致,诊断一般不难。而非职业性铅中毒,多因过量误服含铅化合物的食物或药物引起,病史隐匿容易误诊。近年来,用偏方治疗某些慢性疾病而导致的病例时有报道[1-5]。潜伏期一般2~3 d,长者可达1~2周。

铅以离子状态进入血液,约95%沉积于骨骼和毛发中。血

(下转50页)

作者简介:杨彤翰(1947-),男,山东省莱州市人,主任医师,教授,主要从事于肝胆疾病的外科治疗及相关方面的研究。电话:(023)68774306

收稿日期:2006-02-22;修回日期:2006-04-03