维普资讯 http://www.cqvip.com

311-313

第21卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.4
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

人脐动脉平滑肌细胞贴块培养法

临床生化教研室 熊静波 彭永正 康格非 蒋纪恺 朱 旦

提 要 以人脐动脉为材料，用贴块法在含20%新生牛血清的DMEM中培养出细胞，经电镜和马氏染色鉴定，确认培养出的细胞为平滑肌细胞。平滑肌细胞传至第19代仍保持"谷与峰"生长特征。该法取材独辟蹊径，具有取材容易、操作简单、费用低廉的特点，为人动脉平滑肌细胞的培养提供了一种方便、实用的方法。

关键词 血管平滑肌;脐动脉;细胞学技术
中图分类号 R329-33

动脉平滑肌细胞(Smooth muscle cell, SMC)体外培养法始于70年代，由Ross[1]和Campbell[2]用贴块法培养成功。人动脉SMC培养取材困难、成功率低，因此，目前国内外大多选用动物SMC作为研究对象。

人动脉SMC培养多取材于外科手术切除的动脉或水囊引产胎儿[3,4]，二者取材均受限，且在原代和初几代培养时需加入人血清，而用于培养的人血清制备困难[4]。近年王旭开[5]采用复合胶原酶法分离人动脉SMC，虽克了贴块法的一些不足，但操作复杂，费用昂贵。

作者根据动脉供者年幼，则贴块法培养成功率高的原则[4]。考虑到脐动脉容易得到，且也是胎儿动脉，应较易培养出平滑肌细胞，因而用人脐动脉为材料，在原代和初几代培养时不加入人血清，而以20%新生牛血清(Newborn bovine Serum,NBS)代替，用贴块法培养人SMC获得成功，现介绍如下：

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM(Sigma,D5523)、新生牛血清(重庆百泰生物技术研究所)、HEPES(中科院生物化学研究所)、$NaHCO_3$(AR，北京化学试剂采购供应站)、青霉素钠(大连制药厂)、庆大霉素(四川长征制药厂)、胰蛋白酶(1:250, from bovine pancreas 8.1u/mg, Serva)、二甲亚砜(上海试剂一厂)。

CO_2培养箱(Sheldon Manufacturing INC)、25ml培养瓶、100ml培养瓶、冷冻管、millipore滤器、针头滤器、钟表镊。

1.2 方法

1.2.1 取材

新鲜脐带一段，置于消毒灭菌容器，常温带回实验室，在无菌环境分离出脐动脉。

1.2.2 贴块法原代培养

沿脐动脉纵轴剪开脐动脉，用单面刀片轻轻刮去内皮细胞，并用Hanks'液冲洗，用钟表镊撕去血管外膜，撕下动脉内1/2组织放入一加有少量DMEM(含20%NBS)的平皿，将组织剪碎至1mm³大小，将组织块涂布于25ml培养瓶，置于CO_2培养箱，待组织块粘附牢固后，加入含20%NBS的DMEM，放回CO_2培养箱内静置培养。

1.2.3 传代培养

当细胞融合成单层时，吸出培养液(第一次传代时，先用培养液轻轻冲洗瓶壁，使组织块脱离瓶壁)

维普资讯 http://www.cqvip.com

然后加入0.25％胰蛋白酶消化细胞，至细胞轮廓清晰，间隔明显时，终止胰酶消化，加入适量培养液，将细胞吹打下来。接种于新培养瓶时按1:4传代。

1.2.4 冻存与复苏

冻存：将形成单层的细胞用胰酶消化，制成单细胞悬液，以1，000rpm离心5min，去上清，加入含20％NBS，10％二甲亚砜(DMSO)的DMEM培养液，制成单细胞悬液，转入冷冻管中置4℃冰箱冰格45min，－20℃冰箱45min，悬于液氮罐口45min后浸于液氮冻存。

复苏：从液氮中取出冷冻管，迅速置于40℃水浴，摇动复温，化冻后以1，000rpm离心5min，去上清，再加入含20％NBS的DMEM培养液制成细胞悬液，转入细胞培养瓶，置CO_2培养箱培养。

1.2.5 鉴定

马氏染色：当第2代SMC在玻片上长成单层时，取出玻片用0.9％NaCl冲洗，放37℃培养箱干燥，用乙醇固定按常规方法马氏染色。

电镜：第3代细胞长成单层时，倾去细胞培养液，以4％戊二醛固定30min，用PBS洗涤三次，用橡皮刮刮下细胞，转入离心管离心，用1％锇酸后固定1.5h，按常规方法逐级脱水，环氧树脂618包埋、聚合、切片、醋酸铀、枸橼酸铅染色、于H－600透射电镜下观察。

2 结果

2.1 原代细胞生长情况

脐动脉组织块种植于培养瓶后第7天，在倒置显微镜下观察到，在离组织块稍远的区域有数个细胞清晰可见，但不是所有的组织块周围都有细胞长出，至第10天，培养瓶内可见大量细胞生长，在无组织块的区域亦可见细胞生长，此即血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)的飘移生长特性。

细胞刚从组织块飘移长出时，多呈纺锤形，大小较均匀。随着细胞数量的增多，其大小和形状亦呈多样化，可呈带状、三角带状、星形。细胞在有的区域重叠生长，形所谓“峰”，在有的区域较少甚至没有，形成“谷”，此即平滑肌细胞的“谷与峰”生长特征。VSMC有一圆形或卵圆形核，核中有1－4个大小不一核仁，胞浆丰富，高倍镜下可见半透明颗粒。

2.2 传代细胞生长情况

细胞用胰蛋白酶消化后呈圆形，传代接种于细胞培养瓶后4h就有细胞贴壁。传代细胞形态亦呈多样性，但纺锤形细胞较原代培养细胞少。传代细胞保持“谷与峰”生长特征，至第19代VSMC，其生长特征未见改变。

2.3 冻存细胞复苏情况

细胞冻存于液氮中两个月后复苏，4h后已有少量细胞贴壁，至第24h，大多数细胞均已贴壁。复苏细胞生长良好，4天后细胞融合成单层。

2.4 鉴定结果

2.4.1 马氏染色：血管平滑肌细胞因含肌丝而染成红色，无染成绿色的成纤维细胞存在。

2.4.2 透射电镜结果：在同一细胞可观察到细胞有基板(basal lamina)，在靠近质膜区域可见成束排列肌丝(图1)。细胞含有丰富的粗面内质网(rough endoplasmic reticulum,RER)和游离核蛋白体(图2)。

3 讨论

脐动脉是中动脉，去除内膜、外膜后其中层只含SMC，由于去除不彻底，贴块法可能会有内皮细胞和成纤维细胞混杂生长，但经几代培养后，内皮细胞一般已经去除。电镜下，VSMC有基板，但成纤维细胞没有，这是VSMC与成纤维细胞在超微结构上的鉴别特征之一。此外，成束排列的肌丝在成纤维细胞亦不可见。

马氏染色可区分VSMC与成纤维细胞，前者因含肌丝而染成红色，而后者则被染成绿色。本次培养出的细胞其胞浆全染成红色，说明培养细胞纯度很高。

维普资讯 http://www.cqvip.com

由脐动脉分离的SMC含RER及游离核蛋白体丰富，说明细胞合成代谢旺盛，这可能和无需人血清就可用贴块法培养成功脐动脉SMC有关。以往实验表明[4,6]，来自年幼供者的动脉培养SMC成活率较高。脐动脉是胎儿动脉，用贴块法也应较易培养出SMC，此次实验正好证实了作者的推测。



图1 VSMC有基板和成束排列肌丝×30-000

血管平滑肌细胞贴块培养法较难成功，易出现去分化现象，本次实验成功，除了在取材上的独到之处外，主要注意了如下几点：Ⅰ、高纯度蒸馏水，原代培养采用新鲜三蒸水；Ⅱ、培养液中加入了HEPES，使PH值稳定在7.10左右。Ⅲ、静置培养：组织块贴附于载体后，不移动装有培养液的培养瓶，以免组织块因培养液振荡而悬浮。



图2 VSMC有丰富的粗面内质网和游离核蛋白体 ×25.000

参 考 文 献

1.Ross R,et al.J Cell Biol 1971;50:172

2.Chamley－Compled J,et al.Physial Rev 1979;59:1

3.汪浩川，等.华西医科大学学报 1995;26(1):105

4.陈和芬，等.中华心血管病杂志 1986;14(6):361

5.王旭开，等.第三军医大学学报 1993;15(4):357

6.夏人仪，等.中华心血管病杂志 1982;10(2):134

(收稿日期1996－05－02)

THE CULTURE OF HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS FROM HUMAN UMBILICAL ARTERY USING PRIMARY－EXPLANT METHOD

Xiong Jingbo,et al

Dept.of clinical Biochemistry

Cells were migrated from explants of human umbilical artery and grown to confluence in DMEM containing 20% of newborn bovin serum.The cells were identified as smooth muscle cell by their characteristics under electron microscope and masson stain.They formed the characteristics of"hill and valleys" which remained unchanged untill the 19th passage.The use of easy－obtained umbilical artery makes the culture of human vascular smooth cells convenient.In addition,the method is reliable and simple.

KEY WORDS Smooth muscle,vascular;Umbilical arteries,Cell culture