DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.032
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
324 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0324-03

豚鼠耳蜗微血管内皮细胞的分离培养与鉴定

魏运军,张学渊 (第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

提 要:目的 建立稳定可靠的耳蜗微血管内皮细胞分离培养方法。方法 采用显微解剖法分离出耳蜗血管纹,组织块培养法进行体外培养。结果 接种后2 d,部分组织块边缘有散在的细胞生长,之后细胞数逐渐增多,10 d左右以组织块为中心可见成片细胞组成的细胞集落。倒置显微镜下,单个培养细胞多呈长梭形,而融合成片状单层的培养细胞排列紧密,有内皮细胞培养时典型的"铺路石样"外观。经纯化后,95%以上的培养细胞第Ⅷ因子相关抗原显示阳性反应。结论 本研究方法能够获取体外培养的耳蜗微血管内皮细胞。

关键词:内皮细胞;细胞培养;毛细血管;耳蜗
中图法分类号:R322.12;R322.923 文献标识码:A

Isolation, culture and characterization of cochlea microvascular endothelial cells from guinea pigs

WEI Yun-jun, ZHANG Xue-yuan (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To set up a reliable method for isolating and culturing cochlea microvascular endothelial cells. Methods Cochlea stria was separated by micrergy from guinea pigs and the stria tissue nubbles were cultured *in vitro*. Results Two days later, a few cells were seen disseminately around partial tissue nubbles and their number was increased with time prolongation. There were some cellular colonies consisted of large quantity of cells around the partial tissue nubbles on 10 th day. Under the inversion microscope, the single cultured cells presented a long fusiform and the confluent monolayer cells linked tightly and exhibited the typical structure of "scree" of cultured endothelial cells *in vitro*. After purification, over 95% of the cultured cells showed factorⅧ relative antigen positive reaction. Conclusion The method used in this study can obtain cochlea microvascalar endothelial cells of guinea pig *in vitro*.

Key words: endothelium cell; cell, cultured; capillaries; cochlea

血迷路屏障是存在于血液与内耳迷路液之间、具有选择性通透功能的生理屏障系统,其作用在于保持迷路液成分的相对稳定,维持内耳微环境的平衡,从而保证内耳感音装置行使正常生理功能,同时,血迷路屏障通透性变化很可能是某些内耳疾病发病机制的重要环节,研究血迷路屏障的通透性已成为近年来国内外耳科学研究的热点之一[1,2]。迄今为止,由于国内外一直沿用传统的在体(*in vivo*)研究的实验方法,受到活体动物研究技术条件的限制,使该项研究目前进展缓慢。内耳特定部位(如耳蜗血管纹等)的微血管内皮细胞是构成血迷路屏障的基础,本研究旨在建立内耳微血管内皮细胞的培养方法,获取单层融合的血管内皮,并通过离体(*in vitro*)研究该血管内皮,从而实现对血迷路屏障体外模型的进一步研究。

1 材料与方法

1.1 豚鼠耳蜗血管纹组织块的分离与培养

选取重约300 g的封闭群豚鼠10只,雌雄兼有,均耳廓反射灵敏,耳镜检查正常。以1%戊巴比妥纳(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,断头,迅速取出双侧听泡,用75%酒精浸泡2 min,无菌等渗盐水冲洗后浸入D-Hanks液中。解剖显微镜下剪去听泡骨壁,钩破蜗尖,自顶回至基底回完整剥离出耳蜗外侧壁软组织带,并仔细分离出含深色色素的血管纹,将血管纹组织块切碎,均匀平铺于两个35 mm的培养皿底(事先加有鼠尾胶原),静置30 min,向培养皿中加入含有25%胎牛血清(Hyclone)的DMEM培养液(Hyclone,另加L-谷氨酰胺0.9 g/L,Hepes 20 mmol/L,青霉素100 U/ml,链霉素100 μg/ml),置5% CO_2,37 ℃培养箱中培养[3]。有细胞生长后,每3 d更换约1/2的培养液,10 d后进行首次传代:吸掉全部培养液,用D-Hanks液冲洗培养皿3次,用0.25%胰蛋白酶(含0.01% EDTA,Sigma)消化液消化,常温下约5 min大部分细胞开始脱壁,中止消化,取出组织块,将细胞悬液离心,弃去上清液后加培养液,台盼蓝染色并计数,细胞成活率约90%。将未染色的细胞悬液接种于培养瓶中继续培养,细胞密度为$(2\sim3)\times10^5$/ml。

1.2 培养细胞纯化

在细胞传代时,当加入消化液后,显微镜下只要观察到约3/4的细胞回缩近圆形时即中止消化(经需5 min),轻轻吹打后将细胞悬液种入空白培养瓶,而脱壁慢的1/4的细胞则弃掉,即每次传代只保留脱壁较快的约3/4的培养细胞,当细胞悬液接种后,当观察到约3/4的细胞贴壁后(约18 min),即吸掉培养瓶中的培养液,连同尚未贴壁的1/4的细胞一起弃掉,重新加入培养液置CO_2孵箱中培养。传代后12 h,培养细胞已完全伸展,在倒置显微镜下刮去已贴壁的可疑杂细胞。上述操作在前三代细胞传代时连续进行[3,4]。

1.3 培养细胞的免疫组化(S-P法)鉴定

将生长于盖玻片上的第四代培养细胞用4%多聚甲醛固

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870834)
作者简介:魏运军(1965—),男,湖北省黄陂县人,讲师,主治医师,主要从事内耳微循环方面的研究。电话:(023)68752579
收稿日期:2000-06-08;修回日期:2000-12-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

定, PBS 冲洗后加 3% H_2O_2-甲醇 37 ℃孵育 30 min, 10% 羊血清封闭, 加入 1∶100 的兔抗人Ⅷ因子抗体 4 ℃湿盒过夜, PBS 冲洗 3 次后加入 1∶100 的羊抗兔 IgG, 充分冲洗后加入 1∶100 三抗, DAB 显色, 复染液复染后摄片。空白对照用 PBS 代替Ⅷ因子抗体, 其余步骤不变, 阴性对照则使用豚鼠肝细胞[5]。

2　结果

2.1　豚鼠耳蜗微血管内皮细胞的生长与形态

耳蜗血管纹微小组织块接种后 2 d 可见部分组织块边缘有细胞长出, 之后细胞数量逐渐增多, 见图 1, 接种后 10 d 左右, 这些组织块周围已可见由成片细胞组成的细胞集落。倒置显微镜下, 单个的培养细胞大多呈长梭形, 少数为三角形或多边形, 胞体大且折光性强。细胞传代后约 8 d, 经过大量增殖的培养细胞紧密排列, 融合成片状单层, 显微镜下形成内皮细胞培养时典型的"铺路石样"外观, 见图 2。传代细胞初种时为明亮的球形, 悬浮于培养液中, 18 min 左右大部分细胞已经贴壁, 分布均匀, 2 h 后细胞变大变长, 12 h 细胞已完全展开, 8 d 左右细胞已增殖融合成单层。

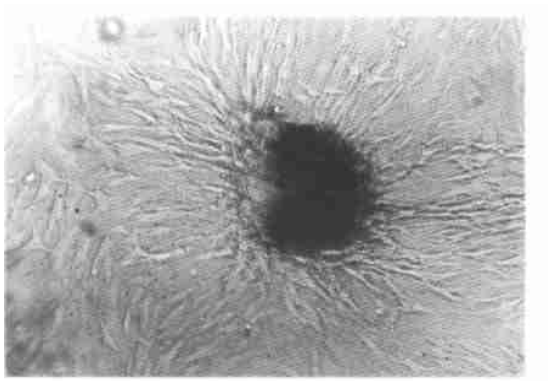


图 1　血管纹组织块培养后 **5 d**, 周围细胞向外生长　(× 200)
Fig 1　A few cells grew around the stria tissue nubble after cultured for 5 days　(× 200)

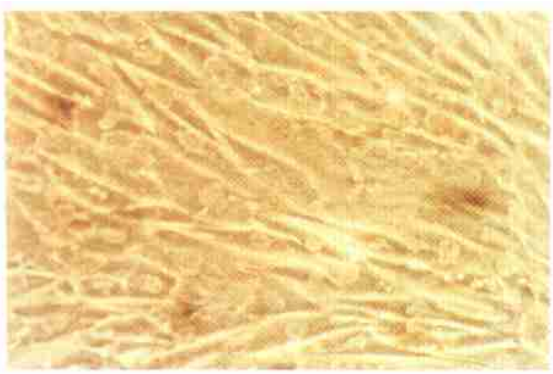


图 2　细胞接种后 **8 d**, 单层内皮细胞呈"铺路石样"外观　(× 500)
Fig 2　Eighth day after cells inoculation, the monolayer cells appeared structure of "scree"　(× 500)

2.2　免疫组化结果

用免疫组化 S-P 法检查第Ⅷ因子相关抗原, 95% 以上细胞的胞浆中有棕黄色着色, 即呈阳性反应, 见图 3, 而空白对照组与阴性对照组无此着色, 更进一步证实为血管内皮细胞。



图 3　纯化后的第 **4** 代培养细胞, 经免疫组化检测Ⅷ因子抗原, 胞质呈棕黄色阳性反应　(S-P× 500)
Fig 3　After purification, the fourth generation cultured cell showed brownish yellow positive reaction of factor Ⅷ relative antigen in cytoplasm by immohistochemistry　(S-P× 500)

3　讨论

自 60 年代, 国外学者提出血迷路屏障的概念并被普遍接受以来, 国内外一直采用形态学的方法和各种示踪技术, 在活体动物上对血迷路屏障的通透特性进行了大量研究[2], 由于受到在体(*in vivo*)研究技术手段的限制, 这些研究未能对血迷路屏障通透性的调控机制进行探索, 更无法利用改变其通透性的方法开展对内耳疾病的防治研究, 阻碍了学科进步[6]。近年来, 国外学者用特殊的活体组织毛细血管分离技术, 获取培养的单层融合内皮细胞, 由此成功建立了研究不同器官血管内皮细胞通透性的体外模型, 并被广泛应用。

Auerbach 等[7] 通过研究证实, 不同血管内皮细胞存在着明显的差异, 这种差异既存在于动脉血管与静脉血管, 大血管与小血管之间, 也存在于中枢器官与外周器官微血管之间, 例如与外周器官相比, 中枢器官微血管内皮多为无窗型, 细胞间形成紧密连接, 胞饮较少, 对辣根过氧化物酶等大分子物质不通透, 因此, 有学者将这类血管内皮称为屏障型内皮细胞。构成血脑屏障和血迷路屏障的脑及内耳微血管内皮细胞是典型的屏障型内皮, 近年来由于脑微血管内皮的分离培离成功及体外模型的建立, 使血脑屏障的通透性研究及药理学研究, 取得了许多重要进展。受此启发, Lamm[6] 于 1994 年尝试将内耳软组织酶解后, 用梯度离心的方法首次分离出了血管内皮细胞, 但由于其中存在小动脉小静脉内皮的细胞沾染问题, 消弱了其作为屏障型内皮的研究价值, 因而未能得到认可及应用。

内耳结构复杂, 微血管分布弥散且组织量很少, 分离培离符合条件的微血管内皮有一定困难。本研究为了得到体外培养的耳蜗微血管内皮细胞, 选择将毛细血管相对丰富的耳蜗血管纹进行微小组织块培养, 并经过多次纯化处理, 得到了相对纯净的微血管内皮细

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

胞。做法是:①熟练内耳显微解剖,自制的解剖工具细小尖锐且韧性好,便于显微解剖操作;②为避免过多杂细胞的污染,将血管纹与螺旋韧带分开,将血管纹粘牢于培养皿底并切碎,利于毛细血管内皮向外生长;③原代培养的培养液中胎牛血清浓度应不低于 20%,当细胞集落足够大,细胞数足够多时才能首次传代;④利用内皮细胞普遍具备消化时脱壁早、接种后贴壁快的特点进行多次纯化处理,可大大提高内皮细胞的纯净度,但因为这样传代时会损失约 1/2 的培养细胞,因而前三代细胞接种时数量应多一些,约(2 ~3)× 10^5/ml,以后每次接种时数量可保持在 0.5× 10^5/ml[4]。

Ⅷ因子是内皮细胞的标志性抗原,本研究分离培养的细胞经免疫组化(S-P 法)鉴定,超过 95%的细胞含有该抗原,而对照组则均为阴性,说明作者培养的细胞是基本纯净的内皮细胞[4]。同时,该细胞连续传代 10 代,仍生长良好,形态未见明显变化,证明本研究在国内外首次分离培养成功的豚鼠内耳微血管内皮细胞,具有良好的稳定性,能为离体研究血迷路屏障的通透性,提供一理想的模型。

参考文献:

[1] McDouall R M, Yacoub M, Rose M L. Isoation, culture, and characterisation of MHC Class Ⅱ-positive microvascular endothelial cell from human heart[J]. Microvasc Res, 1996, 51(2): 137—152.
[2] Juhn S K, Rybak L P, Prado S. Nature of blood-labyrinth barrier in experimental conditions[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1981, 90(2 Pt 1): 135—141.
[3] Biegel D, Spencer D D, Pachter J S. Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties *in vitro*[J]. Brain Res, 1995, 692(1-2): 183—189.
[4] Abbott N J, Hughes C C, Revest P A, *et al*. Development and characterisation of a rat capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier[J]. J Cell Scienee, 1992, 103(1): 23—27.
[5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 1996. 63—83.
[6] Lamm K, Zaju G, Schacht J. Living isolated cells from inner ear vessels: a new approach for studying the regulation of cochlea microcirculation and vascular permeability[J]. Hear Res, 1994, 81(1-2): 83—90.
[7] Auerbach R, Alby L, Morrissey L W, *et al*. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells[J]. Microvasc Res, 1985, 29(3): 401—411.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)03-0326-01

体外循环中肝素耐药 1 例报告

A case report of heparin-resistance during extracorporeal circulation

连丽红, 唐令凤, 杨军民 (第三军医大学附属西南医院心胸外科, 重庆 400038)

我院开展体外循环 710 例,发生肝素耐药 1 例,现报告如下。

1 临床资料

患者女,18 岁,体重 40 kg,反复咳嗽 3 月,心慌、心累 2 月,心脏彩超显示"左房粘液瘤"。术前检查 Hb 100 g/L, HCT 0.333, PLT 406× 10^9/L, PT 13.8 s(正常对照 12~15 s),余结果正常。入院 3 d 后手术,全麻、气管插管,仰卧位,胸部正中切口。ACT 生理值 115 s,右心耳注入肝素 3 mg/kg 共 120 mg, 5 min 后查 ACT 305 s;追加肝素 50 mg, ACT 320 s;追加肝素 100 mg, ACT 398 s;追加肝素 50 mg, ACT 400 s;经下腔静脉插管放血 300 ml 入氧合器,输入 400 ml 新鲜冰冻血浆,再次追加肝素 120 mg, ACT 值达 535 s,建立体外循环。体内肝素用量达 11 mg/kg,是常规肝素用量的 3.6 倍,预充液给予肝素 50 mg。转流中每 30 min 查 ACT 1 次,均在正常范围。经右房切口,见粘液瘤为分离的 2 个肿瘤, 2.5 cm× 1.5 cm, 6 cm× 6 cm,蒂约 1 cm,分别位于卵圆窝上、下的房间隔处,完整切除粘液瘤及蒂部周围的房间隔组织,以心包片修补缺损的房间隔组织。开放主动脉后心脏自动复跳,体外循环 108 min,阻断主动脉 78 min。鱼精蛋白 400 mg 拮抗满意,术后胸液共 350 ml, 9 d 后痊愈出院。

2 讨论

肝素耐药现象极为少见。由于心脏粘液瘤瘤体内出血、变性和坏死,可引起自身免疫反应,在复杂病例中还常见有血液异常,如血小板计数高、抗凝血酶 III(Antithrombin III)低、贫血等。本病例肝素耐药可能与血小板计数高有关[1],因肝素使血小板聚集,从而产生血小板因子 4(PF4), PF4 是肝素拮抗剂。此外,还可能与抗凝血酶 III含量低有关[2],肝素抗凝的机制在于它必须与足够量的抗凝血酶 III结合,才能充分发挥后者对凝血酶和 Xa 因子的抑制作用。

因此,对粘液瘤患者肝素耐药倾向应特别提高警惕,首次肝素化后 ACT> 350 s 插管, ACT< 480 s 不应开始体外循环运转,应及时追补肝素,若 ACT 仍低,可先输入新鲜冰冻血浆以提高抗凝血酶 III含量,使肝素的作用得以正常发挥,同时,在体外循环期间应严密监测 ACT。

关键词: 体外循环; 肝素
中图法分类号: R973.2 文献标识码: B

参考文献:

[1] 胡小琴 主编. 心血管麻醉及体外循环[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 223—225.
[2] 邓硕曾, 胡如兰, 陈 雷, 等. 左房粘液瘤患者血浆抗凝血酶 III的初步观察[J]. 中国循环杂志, 1993, 8(5): 306—307.

(编辑 冯崇英)

作者简介: 连丽红(1969—),女,山西省沁县人,主管技师,主要从事心内直视手术体外循环灌注方面的研究。电话: (023)68754000-73084

收稿日期: 2000-06-05; 修回日期: 2000-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net