DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.029

文章编号:1000-5404(1999)10-0765-03

2种酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞生长特性的比较*

Comparison of the characteristics of rat vascular smooth muscle cell cultured by two enzymatically dispersed methods

王关嵩** 钱桂生 杨晓静 陈维中 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所) 重庆,400037

提 要 **目的**:应用单纯胶原酶法、复合胶原酶法培养大鼠血管平滑肌细胞,比较其生长特性。**方法**:采用改良Lowry法测定了蛋白质含量,依照荧光指示剂法测定了细胞内[Ca^{2+}]。**结果**:2种方法其生长曲线类似,均于7～8 d至高峰,其蛋白质含量略有差异,也是在7～8 d达最大,钙含量分别为(202.60±15.18) nmol/L和(153.20±11.34)nmol/L。**结论**:单纯胶原酶法相对经济,复合胶原酶法能更好地保护细胞,可根据具体情况选用。

高血压、动脉粥样硬化、肺动脉高压等疾病均以血管平滑肌细胞的异常增生和迁移为特征。为此,近几年来,血管平滑肌细胞的培养已经成为基本技术。目前,仍然多采用贴块片[1],其方便经济、技术难度低,但贴块片确有不足,如细胞容易出现"去分化"或"调整"现象[2]。故我们采用单纯胶原酶法(A)和复合胶原酶法(B,包括胶原酶、弹性蛋白酶和胰蛋白酶抑制剂)培养了血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cell, VSMC),并初步比较了2种方法培养的VSMC生长特性。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂

胶原酶Ⅰ型(Sigma):0.2%,弹性蛋白酶Ⅲ型(Sigma):0.5%,胰蛋白酶抑制剂(Sigma):0.05%,牛血清蛋白:0.1%,胰蛋白酶(Hyclone分装):0.1%,以上均用D-Hanks液配制而后过滤分装。A法仅用胶原酶,B法要用胶原酶、胰蛋白酶抑制剂和弹性蛋白酶。M199培养基(美国Gibco):按说明书配制。

1.2 主要方法及操作步骤

1.2.1 取心肺组织并分离出主动脉 Wistar大鼠购自第三军医大学实验动物中心,雌雄各半,体重(200±18)g,依文献[1]方法进行操作。

1.2.2 消化 先用钟表镊撕成1 mm×1 mm左右的小条,放入预先盛有2～3 ml 0.2%的胶原酶液,盖紧瓶塞,置摇摆仪上37℃ 25次/min振摆10～12 h。若为复合酶消化法,则把小条放预先盛有内含0.2%的复合消化酶液2 ml于37℃ CO_2孵箱培养30～40 min。

1.2.3 培养 待小块组织完全消化溶解后,过200目网,1 000 r/min离心7 min。弃上清液,向细胞沉淀中加入新鲜配制的20%胎牛血清M199培养液,轻轻吹打,后按每瓶(25 ml)3×10^4活细胞接种在培养瓶里,放入37℃孵箱里静置培养。

1.2.4 传代 静置3 d后,贴壁的细胞呈伸展,部分区域已融合生长,培养基的颜色变黄,换新鲜培养基。6～7 d后,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0.1%胰蛋白酶及0.02% EDTA混合消化液1.5～2.5 ml消化30 s,镜下见细胞成片地收缩,呈颗粒状,立即倾去消化液。最后加入10% M199培养液,用滴管将细胞自瓶壁上吹打下来,分装接种。5 d后可再传代。

1.2.5 鉴定 用S-P法进行抗α-actin免疫组化染色。细胞经充分洗涤后,加入固定液,再用环氧树脂包埋,制成超薄切片,于透射电镜下观察。

1.3 生长特性的观察

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3孔瓶,培养9 d,逐日检测1组,计数操作见文献[3]。

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)被接种到底物上,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[3]。接种存活率=形成克隆数/接种细胞数×100%。

1.4 蛋白质含量测定

以BSA为标准,采用lowry改良法测定VSMC的蛋白质含量[4],生化试剂购自第三军医大学生物化学教研室。

1.5 胞内[Ca^{2+}]含量测定

取汇合成单层的VSMC,弃培养后用Hank's液冲洗3次,然后用无钙镁含1 mmol/L EDTA的Hank's液温育5 min,细胞从瓶底分离后用Hank's液洗涤3次,然后用培养基制成细胞悬液(1×10^6/ml),并用台盼蓝检查细胞存活率>95%者置4℃保存备用。以Fura-2(中国科学院药物研究所)为荧光指示剂测定细胞内钙释放。负载Fura-2时,向细胞悬液内加入5 μmol/ml的Fura-2/AM 37℃温育45 min,以使细胞内F-2/AM完全水解为Fura-2。离心弃上清后将细胞悬浮于无钙镁的

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39700057

** 王关嵩,男,31岁,讲师,博士研究生

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

Hank's液(内含1 mmol/L EGTA)中于2 h内测定。另备未负载Fura-2的细胞以测自身荧光，于37℃恒温稳定后测试。$[Ca^{2+}]$的荧光检测：激发波长340 nm，发射波长500 nm，光栅5 nm；发射波长510 nm，光栅10 nm，分别加入1%Trition或20 mmol/L EGTA测量最大或最小荧光强度。$[Ca^{2+}]$的计算参照Grynkiewicz[5]的方法进行。平行检查5孔，结果采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞的形态及其鉴定

生长在培养瓶内的VSMC倾去培养液并用Hank's液清洗置于倒置显微镜下观察细胞形态，单细胞呈长形或椭圆形，胞质密度高，不透明，胞核多为卵圆形，有多个核仁。加入培养液后6～8 h就开始沉下贴壁生长。在倒置显微下可见VSMC呈长形或椭圆形，合时呈片状，树枝状，胞质中有较多的丝样物质，显示出棕黄色。电镜下VSMC呈不规则形态，胞内有大量饮泡，基膜下有密斑，胞内有密体，富含游离核糖体，粗面内质网扩张，没有高尔基体，见图1。

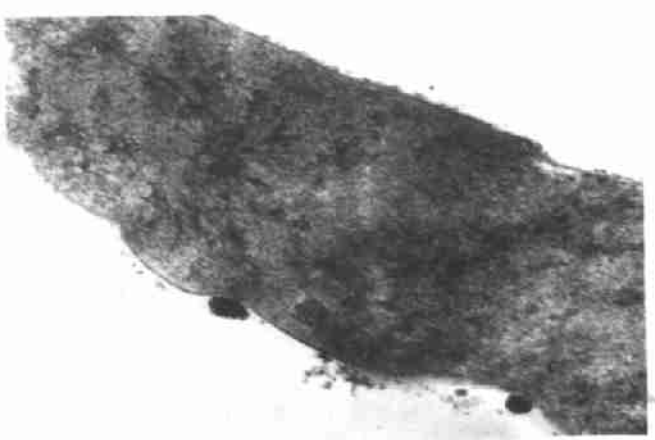


图1 VSMC的电镜照片显示密斑、肌丝和密体，粗面内质网扩张，富含游离核糖体 (TME×30 000)

2.2 2种消化酶法的特点及价值见表1

表1 2种培养法基本情况的比较

	A	B
消化时间(h)	11～18	0.6～1
1次收集细胞数	(1.10～1.34)×10⁶	(6.80～9.50)×10⁶
细胞碎片(/HP)	多*	少
台盼蓝排斥率(%)	68～83	95～98
细胞成片成团率(%)	25～30	50～63

*：A约是B的4～6倍

2.3 VSMC的生长状态

2种培养方法培养的VSMC其生长曲线和蛋白质含量无明显差别，二者均于7～8 d达高峰，而后由于融合抑制而下降。故应选择此时为消化传代的时机，见表2、3。

表2 VSMC的生长情况(×10⁴/cm²·d⁻¹)

	接种数	生长时间(天)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1.0	2.0	2.3	2.7	3.4	3.7	4.0	4.1	4.2	4.1
B	1.0	1.8	2.0	2.5	2.8	3.4	3.8	4.0	4.0	3.8

表3 VSMC的蛋白质含量情况(μg/cm²·d⁻¹)

	接种数	生长时间(天)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	11.2	16.3	22.5	24.0	28.1	31.7	35.2	36.2	37.5	35.6
B	11.2	15.2	21.3	23.5	25.9	28.9	32.3	33.7	34.4	32.3

2.4 VSMC的钙含量

2种酶消化法培养的VSMC，其钙含量有明显差异。单纯酶消化法的$[Ca^{2+}]$高于复合酶法($P<0.01$)。分1、2、3、4、5次测量结果见表4。

表4 2种培养分法VSMC的钙含量测定情况(nmol/L)

	1	2	3	4	5	$\bar{x}\pm s$
A	192	213	195	224	189	202.60±15.18*
B	143	164	151	166	142	153.20±11.34

*：$P<0.01$ 与B比较

3 讨论

近年来，国内外在研究高血压、动脉粥样硬化和肺动脉高压等血管性疾病的机制时，一种认为是血管重塑[6]，另一种是认为由于血管中膜的平滑肌细胞的增生和迁移[7]。目前，研究血管平滑肌细胞在各种因素作用下生长增殖的变化成为热点，进行上述研究的基础就是必须建立稳定生长的较纯细胞系或细胞株。目前，国外已有血管平滑肌细胞建株[8]，国内尚未见报道。国内外绝大部分文献仍采用原代培养建系细胞进行实验[9]，实际上在实验中应用建株和建系的细胞各有优缺点。国外文献近年来培养VSMC多采用复合胶原酶法[10]，而国内大多采用单纯胶原酶法和贴块法[1,11]，尽管二者培养方法不一致，但实验的结果又应当进行比较。为克服此不足，我们尝试进行了2种酶法的培养，取得了成功。并且对其培养细胞的数量、蛋白质含量和$[Ca^{2+}]$进行了测定和比较，为2种酶消化法进行培养的VSMC的深入研究奠定了较好的基础，尚未见文献报道相似的研究。而且，该实验以大鼠动物为材料，培养了VSMC，与国内通用的牛、猪、兔等动物的主动脉比较，选材较新。

本实验由相同的操作者同时应用两种酶消化法培养同一种属动物VSMC，并进行有关各项指标的测定，比较的结果可靠。此外，我们对2种酶法进行了一些改进，对单纯胶原酶法，我们仅刮外膜不刮内膜，因

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

肺动脉甚小不便操作且易损伤中膜平滑肌细胞；进行复合胶原酶法进行培养时，我们先将平滑肌组织在消化之前在 20%的胎牛血清培养基中培养过夜以促进平滑肌细胞产生。从本研究的结果看，复合酶法确有一些优点：①明显缩短消化时间，更具良好的选择性；②收获的细胞数量多，对细胞膜的损害程度较轻；③成活的细胞数量和质量都有提高；④由于酶作用时间短，分离细胞的纯度也有所提高；⑤较好地保护了离体 VSMC 的性状和代谢。但是应该看到，单纯酶法分离的 VSMC 与复合酶法相比 虽有差距，但不显著，其简便可行，无需配制很多酶液；经济，仅一种酶；技术难度相对地较低，容易掌握和推广。可根据具体情况选用。

本研究还显示 2 种方法培养的 VSMC 生长状态、蛋白质含量和[Ca^{2+}]浓度均有差异，故在同种系列研究中应该采用一种方法，不可混用，否则无法进行统计学的分析和比较。

（感谢基础医学部中心实验室肖桃元教授在电镜方面给予的指导和帮助。）

关键词　平滑肌；细胞培养；钙；蛋白质

中图法分类号　R813.1^{+}1　　**文献标识码**：B

参考文献

1　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. 第三军医大学学报，1998，20(4)：348

2　熊静波，彭永正，康格非，等. 人脐动脉平滑肌细胞贴块培养法. 重庆医科大学学报，1996，21(4)：246

3　鄂　征　主编. 组织培养和分子细胞学技术. 北京：北京出版社，1995. 153～156

4　管原洁，副岛亚美　著，张　旭　译. 蛋白质的定量法. 第 2 版. 北京：农业出版社，1981. 45～49

5　Grynkiewicz G, Poeine M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properyies. J Biol Chem, 1985, 260(6): 3440

6　戴生明，缪朝玉，苏定均. 心血病学新概念：血管重塑. 生理科学进展，1996，27(1)：57

7　蔡英年. 肺动脉高压形成时肺血管细胞的增殖和调节. 生理科学进展，1992，23(4)：298

8　Pusch M, Neher E. Rats of diffusional exchange between small cell and a measuring patch pipette. Pflugers Arch, 1988, 411(2): 204

9　Rothman A, Kulik T J, Taubman M B, *et al*. Development and characterization of a clones rat pulmonary arterial smooth muscle cell line. Circulation, 1992, 86(6): 1977

10　Powell R J, Hydowski J, Frank O, *et al*. Endothelial cell effect on smooth muscle cell collagen synthesis. J Surg Res, 1997, 69(1): 113

11　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. 中华病理学杂志，1987，16(4)：260

（收稿：1999-05-05；修回：1999-07-22）

（编辑　王　红）

（上接 762 页）

2　结果

前后进行的 6 次测试基本无变化，见图 1。固定后 2 d 与固定后 5 个月比较，*CV* 值和细胞周期分布均无明显变化，见表 1。

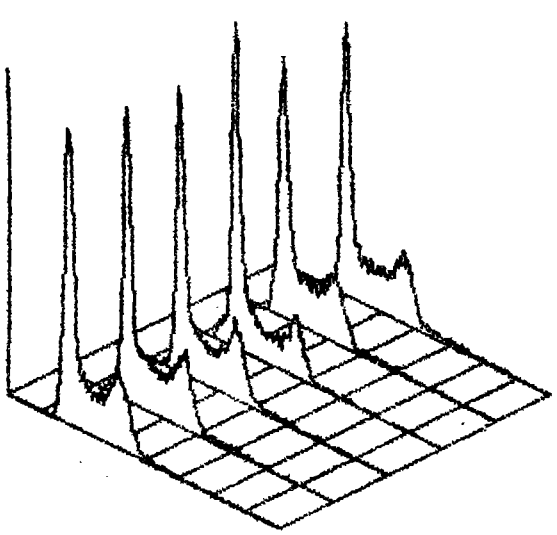


图 1　6 次测试结果的直方图

从左至右分别为固定后 2 d，1、2、3、4、5 个月

表 1　70%冷乙醇固定样品不同时间 *CV* 值及细胞周期分布

	CV 值(%)	G_0+G_1	S	G_2+M
第 2 天	6.53	43.93	24.45	21.99
5 个月	6.91	44.97	22.41	21.50

3　讨论

用 70%冷乙醇固定的单细胞悬液进行流式细胞仪分析，至少可以保存 5 个月以上。而且此固定液既经济又方便。这样就为较长时间内保存大量样品提供了条件。由于样品量的限制，此实验没能继续做下去。能否可以保存更长的时间，这将有待日后进行更深入的探索。

关键词　细胞保存；乙醇；流式细胞仪

中图法分类号　R329.2^{+}8　　**文献标识码**：B

参考文献

1　左连富. 流式细胞术样品制备技术. 北京：华夏出版社，1991. 44～45

（收稿：1999-03-15；修回：1999-07-28）

（编辑　冷怀明）

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