DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.030

大鼠血管平滑肌细胞分离培养的探讨*

王关嵩** 杨晓静 钱桂生 胡义德 兰阳君*** （第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所）重庆，400037

提 要 **目的**：培养大鼠血管平滑肌细胞。**方法**：手术显微镜下分离主动脉和肺动脉，再用翻转干涸法进行操作。**结果**：显微镜下分离组织，可基本除净动脉纤维脂肪层和外膜，再用刀片轻刮内膜，可保证所贴组织块为动脉中膜。传至第三代时，用台盼蓝检查细胞传代成活率95%，光镜、电镜和免疫组化鉴定培养细胞，培养细胞纯度96%。**结论**：贴块片简便易行、经济，又可以防止膜损伤，可为血管病理变化研究提供适宜的细胞。

关键词 肌，平滑，血管；细胞培养

中图法分类号 R322.74

肺血管的收缩反应增强和结构改建是缺氧性肺动脉高压形成的主要血管变化特征[1]。肺动脉平滑肌细胞培养和研究在探讨肺血管收缩反应病理变化中有重要意义。虽然大动物如牛、猪大血管的平滑肌细胞培养已有报道，但小动物小动脉平滑肌细胞培养又有特殊价值[2]。为此，我们建立了大鼠平滑肌细胞分离培养的方法，并对其生物学特征进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 动脉平滑肌的分离

1.1.1 取心肺组织 Wistar大鼠5只购于第三军医大学实验动物中心，有合格证号。雌雄不拘，体重180 g～200 g。0.5%戊巴比妥钠麻醉，于无菌操作台上，经颈动脉放血处死后，迅速取出心肺组织，浸泡在含青链霉素的无菌Hanks液中。

1.1.2 取主动脉和肺动脉 在超净工作台上，手术显微镜下，迅速分离出主动脉和肺动脉，并剥除纤维层和外膜。

1.2 动脉平滑肌细胞原代培养

1.2.1 剪切摆布 用眼科剪沿纵行剖开，内膜面向上，用刀片自上而下轻刮2～3遍，以去除内皮细胞。然后反复剪切成1 mm×1 mm小块。用吸管吸出小块，摆放在培养瓶底，小块相互间距离以0.5 cm为宜。

1.2.2 翻转干涸培养法 轻翻转培养瓶，令瓶底向上，置于37 ℃ CO_2孵箱3 h～5 h，使小块微干涸；然后加入少许培养液，让培养液慢慢覆盖于瓶底上的组织小块，置温箱中静止培养。待细胞从组织块游出数量增加后，再补加培养液。

1.3 平滑肌细胞的传代培养

细胞长满瓶壁后，吸尽培养液，向培养瓶中加入0.125%胰蛋白酶和0.02%的EDTA液（两者比例1∶1）2 ml。在室温下将培养瓶置于倒置显微镜下观察。待细胞回缩、细胞间隙增大后，立即用20%小牛血清培养液终止消化，吸除消化液，加Hank液，轻轻转动培养瓶，除去残余消化液。加入培养液，用细吸管轻轻反复吹打瓶壁细胞，使之脱落瓶壁形成细胞悬液，再分装接种入培养瓶。细胞密度保持在(1～5)×10^6个/ml。3 d～4 d换液1次，5 d～6 d再传代，如此进行3次。

1.4 传代细胞成活率的检查

取消化传代的细胞悬液9 ml，加入1 ml 0.4%台盼蓝液，混匀后吸取1滴于血球计数器上，置显微镜下观察，凡着色细胞均为不正常细胞或死亡细胞。共计数1 000个细胞。

1.5 传代平滑肌细胞的纯化及测定

采用刮除法或酶消化法除去混入的成纤维细胞和内皮细胞。然后用免疫组织化学法测定纯度。

1.6 培养细胞的鉴定

1.6.1 免疫组织化学鉴定 采用鼠抗人α-actin免疫组织化学染色，根据S-P法的常规操作进行，以棕黄色为阳性结果。

1.6.2 光镜和电子显微镜观察 常规倒置显微影下观察。依电镜常规标本制作方法制成超薄切片，于透射电镜下观察照像。

2 结果

2.1 台盼蓝染色结果

共计数1 028个细胞，其中48个为阳性，约有95%以上的细胞染色呈阴性，表明培养的细胞消化传代后成活率较高。

2.2 细胞的光镜及电镜观察结果

倒置显微镜下观察细胞，未贴壁前细胞在光镜下呈长形或椭圆形，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24 h左右细胞开始贴壁生长，贴壁生长的细胞胞

* 国家自然科学基金资助项目，No. 39700057

** 王关嵩，男，30岁，讲师，硕士 *** 基础医学部手术学及应用解剖学教研室 重庆，400038

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

质透明，彼此融合在一起。细胞呈长梭形、放射性生长，成束的细胞平行排列，部分区域细胞多层重叠，部分区域呈单层，高低起伏，呈现平滑肌细胞特征性的"峰"、"谷"状生长，见图 1。

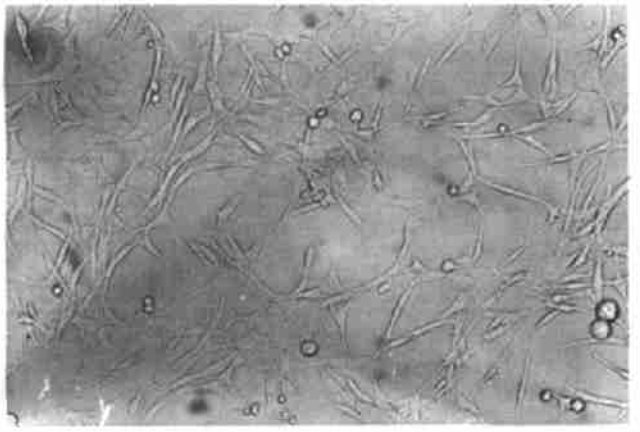


图 1　正常生长的血管平滑肌细胞　(×100)
细胞排列成梭形或束状

Fig 1　Normal growth of 3rd generation VSMC　(×100)
Cells spindle shaped or in fascicular arrangement

电镜观察，细胞呈不规则形态，胞浆内有很多与细胞纵轴平行的肌丝，大量吞饮泡，基膜下有密斑、胞内有密体，沿胞核呈束状分布的微丝管，缺乏高尔基体，见图 2。



图 2　血管平滑肌细胞的电镜照片　(TEM×12 000)
示肌丝、密斑、密体

Fig 2　TEM of VSMC　(TEM×12 000)
Showing myofilaments, dense patches and dense bodies

2.3　肌动蛋白免疫组化染色

运用 S-P 法对动脉平滑肌细胞行肌动蛋白免疫组化染色，96%的细胞染色阳性。倒置显微镜下可见胞核外周呈棕黄色，胞质中有较多的条丝状物，即为肌动蛋白。表明培养细胞经 3 次消化传代后细胞纯度较高，见图 3。

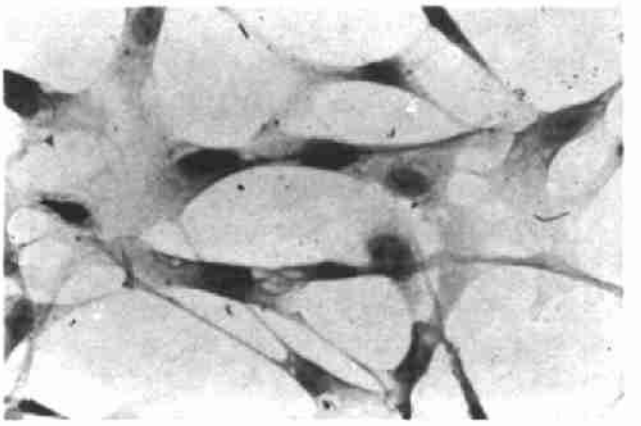


图 3　抗 α-actin 免疫组化染色　(S-P×400)
VSMC 中肌丝呈棕黄色

Fig 3　Antiactin immunohisto chemical stain　(S-P×400)
Myofilaments appeared as brownish-yellow filaments

3　讨论

低氧性肺动脉高压时，常可见肺动脉中膜平滑肌细胞大量的增生和迁移。因此，研究平滑肌细胞增殖和迁移的机制以及相应的治疗成为目前研究的热点。

本项工作虽然简便经济，经过一定量的初步锻练，即可掌握相关的基本操作和技术；但也有一些特殊要求：①取材严格。应在手术显微镜或解剖显微镜下进行。②操作熟练准确。小动物的取材比较困难，需要分步进行，首先要从胸腔取出心肺组织。③严格无菌操作。杀动物和取动脉宜分别在无菌手术室和细胞培养室进行。④购买动物的年龄应适中。大于 250 g，细胞往往有一段长潜伏期；小于 150 g，则动脉组织太小，不便于操作。

贴块法培养的细胞，需要采取方法使细胞纯化。首先将平滑肌细胞与成纤维细胞分开，因为血管壁外膜和中膜总有成纤维细胞。其具体方法如下，可供选择。①刮除法。用橡皮制成刮擦，把先贴壁的成纤维细胞标记后刮去。②三瓶置换法。先把 A 瓶混合细胞 37 C 孵箱静置 20 min～30 min 后，把培养液倒入 B 瓶，再培养 20 min～30 min 后，再把培养液倒入 C 瓶，这样 A 瓶为成纤维细胞，B 瓶为混合细胞，C 瓶则为较纯的平滑肌细胞。如果 C 瓶细胞纯度仍不理想，可以再重复操作 1～2 次。③酶消化法。先标记下成纤维细胞，然后在传代时，酶消化之。

其次，因为内膜无法刮除干净，必然在原代培养液里混有内皮细胞，主要采用 2～3 次传代，利用内皮细胞比平滑肌细胞贴壁晚的特点，通过换液把它除去。

在普通光镜下，平滑肌细胞呈椭圆形或长形，加

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

1 ml去甲肾上腺素和等量台盼蓝至5 ml后呈圆形或椭圆形蓝染[3]，而成纤维细胞则扁平而稍大，胞质透明，无收缩反应，长时间培养后在培养基上呈同心圆旋涡状生长。本实验中A、B瓶细胞出现此情况，C瓶未出现该情况。免疫组化鉴定，因平滑肌细胞中含有大量肌动蛋白，肌动蛋白单克隆抗体进入细胞内与肌动蛋白结合，继而与二抗、S-P复合物结合染成棕黄色，而成纤维细胞内无肌动蛋白，故不显色。本实验中，经免疫组化染色后数200个细胞，仅见4个细胞未着色，判断细胞纯度约为96%。在电镜下，成纤维细胞的胞质中无饮泡，无密斑密体，亦没有束状的微丝管，而有许多高尔基体。

（本实验承烧伤研究所罗向东副教授、病理生理学教研室王培勇博士、大坪医院心血管内科王旭开副教授、组织与胚胎学教研室吴康副教授指导，特此致谢！）

参考文献

1 段生福. 肺原性心脏病. 见：陈灏珠 主编. 内科学. 第2版. 北京：人民卫生出版社，1994：21～29

2 Abraham R, Thomas J K, Mark B T *et al*. Development and charaterization of cloned rat pulmonary arterial SMC line that maintains differentiated properties through multiple subculture. Circulation, 1992; 86(6): 1977

3 Ross R. The smooth muscle cell Ⅱ. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. J Cell Biol, 1971; 50(92): 172

（收稿：1997-09-11；修回：1998-03-29）

（编辑 冷怀明）

Culture of rat pulmonary artery smooth muscle cells*

Wang Guansong, Yang Xiaojing, Qian Guisheng, Hu Yide, Lan Yangjun (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hopsital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract **Objective**: To culture rat vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods**: Pulmonary artery were separated carefully and cut into fine tissue pieces. These pieces used for culture of VSMC by method of adhesion to wall. **Results**: Cell cultured were typical form of VSMC under light microscope, electron microscope and immunohistochemical test. The cell viability is 95% in subculture by trypan blue. The cell purity is 96% by immuohistochemical method. **Conclusion**: This method is simple and convenient. It provides ideal materials for vascular physiopathologic studies.

Key words rat; pulmonary circulation; pulmonary artery; cell culture

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39700057

肺原发性恶性纤维组织细胞瘤一例

A case report of primary malignant fibrous histiocytoma of lung

宫 亮** （第三军医大学附属西南医院呼吸内科）重庆，400038

患者男性，63岁，因右胸痛2月，加重伴咳嗽2周入院。查体患者较消瘦、颈前后、锁骨上、双腋下及双腹肌沟未扪及肿大淋巴结，气管居中，右第四前肋、第七后肋以下叩浊，右中、下肺野呼吸音低，胸部X片示右后胸壁包块、呈椭圆形。CT提示①右中肺叶紧邻心缘旁见约4 cm×6 cm片块状影，其内有稍低密度区，与心右缘间可见脂肪间隔。前界与前胸壁紧邻；②右下肺见约7.5 cm×9 cm片块样影，块影内可见小片状稍低密度区，其前仍有透光区，后侧紧邻后胸壁，内侧紧邻脊椎；③左下肺外段见片状稍高密度影，并以宽基底与胸壁相邻，其内见点状低密度影，边缘有角状突出和毛刺样改变。查痰未见癌细胞，行纤维支气管镜检查未见腔内异物。行经皮右肺穿刺活检及胸膜活检，病理检查见瘤组织由成片瘤细胞构成，瘤细胞排列呈编织状、漩涡状。瘤细胞圆、卵圆、梭形，浆中量、核深染，可见核分裂像，间质较多炎细胞浸润。免疫组织化学染色示组织细胞抗原染色（+），α-抗胰糜蛋白酶（+），细胞角蛋白（−）。病理诊断肺恶性纤维组织细胞瘤累及胸膜。因患者不愿接受化疗出院，现随访1月尚存活，但一般情况差，肺内已有广泛转移。最后诊断为右肺恶性纤维组织细胞瘤伴右胸膜累及；慢性支气管炎；慢性阻塞性肺气肿；双上肺大泡。

（下转353页）

** 宫 亮，男，26岁，主治医师，学士

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