DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.010


# 成人肠系膜动脉平滑肌细胞增殖模型的稳定性研究*

王旭开** 王 梅*** 刘光耀 杨成明 何多芬 (第三军医大学附属大坪医院心血管内科)重庆,400042

王 燕 万 瑛 (第三军医大学基础医学部分子生物学教研室)重庆,400038

提 要 目的:研究动脉血管平滑肌细胞(ASMC)的生长特性和体外血管活性物质对 ASMC增殖作用的影响。方法:应用复合酶法和贴块法成功地进行了成人 ASMC分离,经低浓度的人胰岛素样生长因子 I(HILGF-I)作用,成人 ASMC呈典型的"谷"与"峰"样生长,经历了10多个月传代培养至35代,并用 PMA作 MTT细胞毒性实验。结果:该细胞生长活性未见异常改变。结论:此方法能使分离下来的 ASMC的休眠期缩短,传代后生长特征稳定性强,培养与纯化能同步进行。

关键词 成人动脉平滑肌细胞;传代培养;动脉粥样硬化;细胞增殖模型

中图法分类号 R543.1

近年研究表明,动脉血管(AS)病变中主要细胞成份是来源于中膜的动脉平滑肌细胞(ASMC),ASMC参与 AS的形成和消退,同时高血压病中 ASMC的增殖、迁移、纤维化是血管重构的病理基础,影响体外培养 ASMC的因素很多,尤其是成人 ASMC培养难度很大,主要是分离后休眠期长,进入分裂期的细胞少。因此,目前国内外多数实验室仍选用幼年动物的 ASMC进行体外培养,也有选用胎儿脐动脉作 ASMC培养。我们为了研究成人 ASMC增殖及其影响因素,进行成人 ASMC的细胞株纯化,以及成人肠系膜 ASMC体外传代培养的稳定性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 成人肠系膜动脉的分离

选择无心血管疾病45~65岁的外科腹部手术病人(胃大部切除术,结肠部分切除术)的大网膜动脉。无菌操作下取大网膜动脉,用 Hanks液洗涤数次,去除血污,剥去结缔组织,纵轴剖开,用 Hanks液洗涤,剥除内膜,用 Hanks液洗两次,剪切成1 mm×1 mm方块,用插入法使中膜分离,将中膜移入另一平皿,加入100%小牛血清(FBS)(华西医科大学医学分子生物学研究室制备),另抽血管供体全血40 ml,离心后取血清备用。设对照组为胎儿脐动脉。

### 1.2 人肠系膜动脉平滑肌细胞的培养[1]

1.2.1 复合酶消化法 将小块动脉组织用 D-Hanks液冲洗,然后将动脉块置入消化液中(胶原酶 II弹性蛋白酶1胰蛋白酶抑制剂),并放入37℃恒温摇床上20 min,消化液经100目筛网过滤,1 500 g×5 min离心,再用培养液清洗,分次收集消化好的 ASMC,细胞计数:将收集的 ASMC置入含20%小牛血清 FBS的 DMEM培养液中,制成细胞悬液,用0.4%台盼蓝染色后计数活细胞数,并将 ASMC细胞数稀释至$10^6$/ml左右。将细胞悬液接种于培养器皿,5% $CO_2$培养箱中。

1.2.2 贴块法 将上述培养的组织,按肌丝走向切成1 mm×1 mm×1 mm小块,接种于小方瓶内(容积25 ml,培养面积110 $mm^2$)。加入20% FBS/DMEM培养液(DMEM为美国 GIBCO产品),置37℃培养箱中,每周更换培养基1次,7 d后在倒置显微镜下即可见移植块缘上可见生长晕,18 d后可见平滑肌细胞自移植块边缘细胞长满并形成致密单层时,即开始传代培养,先弃去培养瓶中生长液,用 Hanks液洗两次,用0.125%胰蛋白酶与0.02% EDTA(美国 Sigma产品),按1∶1∶2配制成的消化液加入培养瓶中覆盖细胞表面即可,于室温下消化2 min,除去大部分消化液,仅留0.2~0.3 ml在瓶中继续消化5 min,若光镜下见细胞收缩、聚集,并脱离瓶壁,即可加入含20% FBS的 DMEM培养液,将细胞在瓶壁轻轻吹下来,将悬浮细胞接种于新培养瓶中,补足培养液(每瓶5 ml,此时 DMEM培养液中小牛血清含量逐步降低至5%),吸取少量细胞悬液用0.4%台盼蓝染色后计数活细胞数后,置37℃ 5% $CO_2$培养箱中培养,当细胞长成致密单层时可再作传代。

### 1.3 冻存与复苏试验

将形成致密单层的细胞按上述传代培养法消化下来,离心(1000 r/min)5 min,弃上清,加入含20%小牛血清和10%二甲亚砜的培养液,制成每毫升内含有50~60万细胞悬液,注入冻存管中,置4℃冻箱过夜,次日以每分钟降2℃冷却到-60℃,全部浸入液氮中;细胞复苏,从液氮中取出冷冻管,立即置于40℃

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39370312

** 王旭开,男,37岁,副教授,副主任医师,博士研究生

*** 解放军324医院心血管内科 重庆,400020

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

水溶液中,不断摇动,化冻后,离心去上清,用含20% FBS的培养液吹打细胞,制成细胞悬液。放入培养瓶内,置于5% $CO_2$孵箱中培养。

### 1.4 成人肠系膜动脉平滑肌细胞鉴定

ASMC细胞鉴定见参考文献[1]。

### 1.5 人胰岛素样生长因子Ⅰ对ASMC增殖的影响

1.5.1 ASMC生长曲线 用含20% FBS的DMEM培养液将ASMC悬液调至2×$10^4$个/ml加入24孔培养板培养,每孔1 ml,37℃ 5% $CO_2$孵育24 h,换含1% FBS的DMEM培养液培养24 h,使细胞处同步状态(加秋水仙碱,无血清培养2 d),设对照组、人胰岛素样生长因子Ⅰ(Human insulin-like growth factor-Ⅰ HILGF-I)组、佛波酯(PMA)组,分别加入不同浓度的HILGF-I, PMA干预,每组2孔,24 h换液体1次,对照组加同样体积的培养液。48 h后用0.125%胰蛋白酶消化,制细胞悬液,用细胞计数板直接计数,重复3次。

1.5.2 HILGF-I对ASMC的DNA合成影响 用MTT微酶测量法,间接检测细胞增殖能力,并作毒性实验。将ASMC悬液用含20% FBS的DMEM培养液调至1.0×$10^5$/ml,加入96孔培养板,每孔100 μl,37℃ $CO_2$孵育24 h,用1% FBS的DMEM培养液再培养24 h,使细胞处同步状态(加秋水仙碱,无血清培养2 d),然后分组加入不同浓度HILGF-I PMA干预,每个浓度4个复孔,对照组加同样体积的培养液,每日换液体1次,培养48 h加入0.5% MTT每孔10 μl,置37℃培养4~6 h,各孔加酸化异丙醇200 μl静置15 min后用酶联仪选择检测波长570 nm,参考波长670 nm,测定$D$值,重复2次。

1.5.3 ASMC周期测定 用含20% FBS/DMEM液将ASMC悬液调至2×$10^4$个/ml加入24孔培养板培养,每孔1 ml,37℃ 5% $CO_2$孵育24 h换含1% FBS/DMEM培养24 h,使细胞处同步状态(加秋水仙碱,无血清培养2 d),分对照组,HILGF-I组,PMA组,在3% FBS/DMEM液中分别加入不同浓度HILGF-I PMA,每组3孔,24 h换液体1次,对照组加同样体积的培养液。72 h后用0.125%胰蛋白酶消化,制细胞悬液并离心,用90%乙醇固定,流式细胞光度仪测定。重复3次。

### 1.6 统计学分析

所有的数据均以$\bar{x}\pm s$表示,以$t$检验进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 培养动脉平滑肌生长情况

肠系膜动脉中膜的组织块种植于培养瓶后的第4天,在倒置显微镜下观察,可见ASMC以垂直方向从组织块的边缘长出,同一组织块的周边细胞生长密度不一,ASMC具有近距离飘移生长特性,常常很快脱离组织块,然后零散生长成簇或从组织块向外生长形成细胞晕,进而形成细胞簇,其簇间相连呈网状结构。ASMC有一可见圆形或圆形明亮的核,核中有1~4个大小不一深色的核仁,细胞浆丰富,含少量颗粒。传代细胞接种于培养瓶24 h,多数细胞已贴壁伸展。开始细胞呈圆形,不透明;边缘清楚,而后逐渐伸展,透明度增高,周界不清,呈典型的"谷"与"峰"生长。ASMC经传代培养至35次传代,生长方式未发生异常改变。

### 2.2 HILGF-I对细胞增殖的作用

2.2.1 HILGF-I对ASMC细胞数的影响 与对照组比较HILGF-I刺激组与浓度梯度有明显关系,增加明显说明HILGF-I有明显促ASMC增殖作用。在$10^{-7}$ mol/L时增殖最明显,见表1。

表1 不同浓度的HILGF-I对ASMC增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n$=6)

Tab 1 The effects of different concentration of HILGF-I on proliferation of ASMC($\bar{x}\pm s$, $n$=6)

| Group | Concentration ($C_B$/mol·$L^{-1}$) | Cells number(×$10^4$/ml) |
|---|---|---|
| Control | | 5.32±0.85 |
| HILGF-I | K×$10^{-6}$ | 7.26±0.35** |
| | K×$10^{-7}$ | 7.56±0.53** |
| | K×$10^{-8}$ | 6.59±0.78* |
| | K×$10^{-9}$ | 6.77±0.39* |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control group

2.2.2 HILGF-I对ASMC的DNA合成作用 用MTT微酶法测得$D$值在三组中差别明显,HILGF-I PMA均较对照组高($P<0.05$),说明ASMC能量代谢活跃,产生大量的能量以供合成多种大分子物质和细胞分裂所需。与细胞计数结果相符。阳性对照组PMA呈逐渐下降的趋势,而HILGF-I组则在$10^{-7}$mol/L的浓度时DNA合成的能量代谢最活跃,见图1。

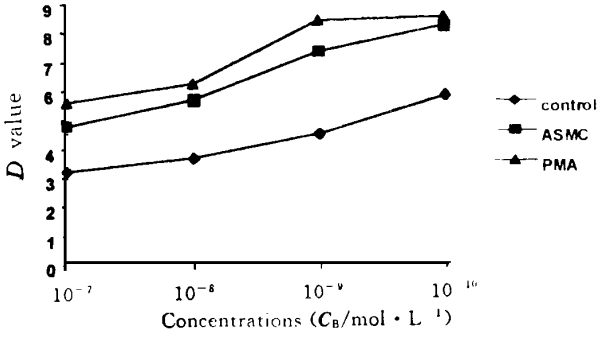



图1 不同浓度的HILGF-I对成人肠系膜动脉平滑肌细胞DNA合成量的影响

Fig 1 Different concentrations of HILGF-I on the DNA synthesis of adult human mescentric ASMC

2.2.3 HILGF-I对ASMC细胞周期分类的影响 流式细胞光度仪对细胞周期分类显示:HILGF-I PMA干预组ASMC处DNA合成期和分裂期细胞数及百分比均较对照组高($P<0.05$),而PMA组较HILGF-I组高。HILGF-I浓度为$10^{-9}$mol/

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

L时上两期细胞数最多,与浓度成反比;佛波酯浓度浓度在 $10^{-5}$ mol/L时则这两期细胞数最低,在 $10^{-6}$ mol/L时则这两期细胞数最多,并随浓度的下降而减少。HILGF-I浓度为 $10^{-6}$ mol/L和 $10^{-7}$ mol/L时 G1期细胞数最多,见表 2

表 2　HILGF-I对 ASMC细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Tab 2　The effects of HILGF-I on ASMC cycle ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

| Group　Concentration ($C_B$/mol $L^{-1}$) | Cell number | | |
|---|---|---|---|
| | G1 | S phrase | G2+ M phrase |
| Control | 6590± 250.57 | 2471.6± 109.8 | 83.3± 31.53 |
| HILGF-I $1\times10^{-6}$ | 6955.3± 456.62 | 2771.6± 553.37 | 115.3± 17.09 |
| $1\times10^{-7}$ | 7039.3± 699.78 | 2821.3± 419.96 | 153.0± 60.22** |
| $1\times10^{-8}$ | 6640± 530.94 | 3228.7± 508.22* | 189.5± 28.38** |
| $1\times10^{-9}$ | 6310.7± 130.32 | 3377.3± 49.24* | 225.0± 21.01** |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control group

## 3　讨论

动脉平滑肌细胞培养流程中有关技术问题[2~4]:① 培养用的血清:血清中的生长因子和大分子物质有利于细胞的生长贴壁伸展,因此血清是培养液中 20%的 FBS或胎儿血清或血管供体血清,并以混合 FBS的质量为好(即 2~ 3头小牛血清相混)。② 培养基的选用:DMEM培养基是培养动脉平滑肌细胞的最佳选择,其它培养基亦能作用,但效果较差。DMEM培养基的特点是 $Ca^{2+}$、$Mg^{2+}$ 含量高,氨基酸、维生素和葡萄糖丰富,利于 ASMC的生长。在原代和前三代细胞培养时,若能补加细胞培养用的 HILGF-I或其它细胞因子,效果更好。③ 20%血清培养液的 pH值:pH应在 7.2左右,绝对不能大于 7.4,宁酸勿碱。因大多数细胞对碱的抵抗力较差,采用 $NaHCO_3$/$CO_2$缓冲体系时,最好选用 HEPES。④ 传代细胞消化程度:将培养瓶对着自然定观察,可见从平均、光滑透亮的薄层慢慢成为不透亮而有"小孔"出现,镜下观察细胞收缩,边缘由不清到清晰,可见时即为合适。⑤ 静止培养:培养开始时必须绝对静置 3 d,培养瓶不能震动和移动,以防刚贴壁的细胞重新漂浮而死亡,影响成活率。

近年的研究表明,大动脉和中动脉的内膜和中膜内没有成纤维细胞,而平滑肌细胞是动脉中膜唯一的一类细胞[5,6],我们在取材上严格分离动脉壁中膜的内、中层作为培养材料,使平滑肌细胞达到纯培养。为血管疾病的研究和防治提供了一个可靠的细胞模型。

HILGF-I是多肽激素,由胰 β细胞分泌经血循环作用靶细胞,属循环内分泌。HILGF-I对 ASMC有促生长或增殖作用,将 HILGF-I加入 ASMC培养液中可以促进 ASMC的生长,增加细胞内 DNA和蛋白质合成。体外培养人的 ASMC研究表明,HILGF-I可促进 ASMC增殖及 DNA合成[7,8,9],并与蛋白激酶激活剂佛波酯的作用平行。

培养人的 ASMC,体外研究 HILGF-I对 ASMC的增殖作用影响,是了解 ASMC在外界各种刺激作用下,HILGF-I具有促细胞生长作用,高浓度的 HILGF-I与受体结合而调节细胞的生长和 DNA合成。本实验体外培养人的平滑肌细胞并观察 HILGF-I对 ASMC生长增殖影响,与 PMA组对照发现 ASMC增生在 $10^{-5}$ mol/L时最高,即在最初就有强烈的反应,随着时间的推移其增生的反应也逐渐减弱,提示人 ASMC对 PMA有时间耐受性反应;与空白对照组比较 HILGF-I组细胞生成明显增加,但较 PMA组明显降低,说明 HILGF-I有明显促 ASMC增殖作用,并与浓度梯度有显著关系,在 $10^{-7}$ mol/L时增殖最明显,也有随着时间推移其增生的反应也逐渐减弱的现象。

ASMC增殖是多种因素作用的结果,HILGF-I的作用不容忽视,深入研究其机理,对于治疗和预防与高胰岛素血症胰岛素抵抗相关的一类疾病有一定临床意义。

## 参考文献


1 王旭开,刘光耀,杨成明等.复合胶原酶法分离人血管平滑肌的新方法.第三军医大学学报,1993,15(4):357

2 赵三妹.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

3 汪浩川.人动脉平滑肌细胞贴块培养法.华西医科大学学报,1995,26(1):105

4 Overbeck HW, Dubey R K. Plasma-derived sarum from hypertensive rats differentially increases growth of cultured arteriolar smooth muscle. Am J Physiol, 1994, 267(36): R489

5 Pepe M G. Receptor binding and mitogenic effects of insulin and insulin-like growth factor Ⅰ and Ⅱ for heman myeloid leakemic cell. J cell physiol, 1987, 133 219

6 Overbeck H, Wu guiyun, Durham J. Humoral factorcs, in hypertensive rats trophic for cultured aortic smooth muscle cells. Am J Physiol, 1995, 268(36): H767

7 Salvetti A. The inter-relationship between insulin resistance and hypertension. Drugs, 1993, 46(suppl 2): 149

8 Ribstein J. Arterial hypertension, hyperinsulinism and insulin resistance. Presse-Med, 1992, 21(28): 1318

9 Pepe M G. Receptor binding and mitogenic effects of insulin and insulin-like growth factor Ⅰ and Ⅱ for human myeloid leakemic cell. J cell physiol, 1987, 133 219


(收稿: 1996-11-05;修回: 1997-07-20)

(编辑　冷怀明)

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

# Stability of the proliferation model of adult human mesenteric arterial smooth muscle cells*

Wang Xukai, Wang Mei, Liu Guangyao, Yang Chengming, He Duofen, Wang Yan, Wan Ying (Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

**Abstract** Objective: To investigate the growth characteristics of arterial smooth muscle cells (ASMCs) at the molecular level and the effects of extracorporal vaso-active substances on the proliferation of ASMCs. Methods: After the cultivation of the mature human ASMCs was successfully carried out and the cell class established in our laboratory, the primary culture of the human ASMCs was performed with the methods of patch adhesion and compound enzyme. Then the cells were treated with human insulin-like growth factor 1 (HILGF-1). 10 months later, the 35th passage of the cells was got and then MTT cytotoxic test was conducted with PMA. Results: After the treatment with HILGF-1, the cells grew in peak- and valley-like manners and no changes of the growth characteristics of the cells were found. Conclusion: The methods can shorten the shock period of isolated cells and enhance the stability of the passages of the cells. Therefore, the culture and purification of the cells can be performed simultaneously.

**Key words** human arterial smooth muscle cell; human insulin-like growth factor 1; atherosclerosis; proliferation

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39370312

# 抗-Ce抗-e引起难配血一例报道

# Report of a case of difficulty in blood matching due to the presence of anti-Ce and anti-e

肖瑞卿* 林武存 (第三军医大学附属西南医院输血科) 重庆, 400038

输血可导致患者产生同种 Rh 抗体,以抗-D 抗-E较常见,但抗-Ce抗-e同时出现则少见。我们1991年在为兄弟单位解决疑难配血时发现1例,现报道如下。

## 1 病例简介

患者,男性,68岁。1990年9月7日因慢性粒细胞白血病收治入院,先后输新鲜全血900 ml,白细胞血小板混悬液14单位,无不良反应,症状缓解出院。1991年2月20日复发再次入院,输全血3次共计900 ml,每次均有寒战、发热反应,体温在38.6℃~39.2℃,血红蛋白逐次下降,由82 g/L降为68 g/L、60 g/L、53 g/L,巩膜黄染,配血困难,送我院做血型血清学检查。

## 2 血型血清学检查

血型 O ccDEE M,直接抗球蛋白试验:抗 IgG、抗 $C_3$均为阴性。抗体鉴定见表1。

表1 患者血清与已知 Rh 血型谱细胞反应结果

| 谱细胞 | 盐水法(37℃) | 木瓜酶法 | 抗球蛋白法 |
|---|---|---|---|
| CcDEe | 0 | 4+ | 4+ |
| ccDEE | 0 | 0 | 0 |
| CCDee | 0 | 4+ | 4+ |
| ccddee | 0 | 4+ | 4+ |
| CcDEE* | 0 | 1+ | 1+ |
| Ccddee | 0 | 4+ | 4+ |
| 自身 | 0 | 0 | 0 |

*:谱细胞由上海血站提供

吸收释放试验:患者血清加 ccddee 细胞吸收后,56℃热放散,放散液加 ccddee 细胞,抗球蛋白法 4+,CcDEE 细胞 1+。患者血清加 CcDEE 细胞吸收后放散,放散液同 CcDEE 细胞 1+,同 ccddee 细胞 1+。

(下转41页)

* 肖瑞卿,女,46岁,副主任技师

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