DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.040


# 大鼠肺动脉内皮细胞的简易培养鉴定

# Culture and characterization of rat pulmonary arterial endothelial cells

谢 崧* 钱桂生 杨晓静 王关嵩 (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: 探索一种简单的方法培养大鼠肺动脉内皮细胞(RPAECs)。方法: 分离大鼠肺动脉,将其切成小块,使其内皮面贴于培养瓶,用含有20%新生牛血清、肝素90μg/ml、L谷氨酰胺4 mmol/L、青霉素100 u/ml和链霉素100 ug/ml的RPMI-1640培养基培养。结果: 培养24 h后RPAECs从动脉块游出,72 h后将动脉块移去,RPAECs于6~10 d融合成单层细胞。这些细胞具有规律的鹅卵石样形成及Ⅷ因子相关抗原阳性。结论: 本方法成功地培养出大鼠肺动脉内皮细胞并通过鉴定。

血管内皮细胞是覆盖血管内表面的单层细胞,具有多种重要的生物学功能。而肺血管内皮细胞由于其所处的解剖部位特殊,在生理、病理的许多方面与体循环内皮细胞有明显的差异[1]。故培养肺血管内皮细胞对肺循环进行离体细胞水平的深入研究十分必要。以往曾进行牛、猪等大动物肺动脉内皮细胞培养,但其操作复杂,技术条件要求较高,价格昂贵,来源受到一定限制,制做动物模型也有诸多不便。而大鼠肺动脉细小,难以灌注,使用酶消化汉或机械分离法,细胞产量极低,培养十分困难。故国内一直未开展。我们采用组织贴块法成功地培养出大鼠肺动脉内皮细胞并通过鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

RPMI-1640培养基为美国 Gibco公司产品。

胰蛋白酶和肝素钠均为上海生化试剂商店提供。

新生牛血清为华西医科大学公共卫生学院产品。

兔抗人Ⅷ因子相关抗原抗血清为 DAKO产品,华美分装。

荧光标记羊抗兔 lgG为卫生部上海生物制品研究所生产。

荧光标记异植物血凝素为 Sigma公司产品。

抗菌素: 青霉素钠盐、硫酸链霉素使用浓度分别为100 u/ml、100μg/ml。

L谷氨酰胺为第二军医大学分装。

大鼠肺微血管内皮细胞为本研究所培养。

### 1.2 取材

选体重200~300 g健康雄性 Wistar大鼠,10%乌拉坦(10μl/mg体重)腹腔麻醉。颈动脉放血后,将整个大鼠泡于75%酒精中2~3 s,以后用组织剪逐层剪开胸腔,将心脏、肺脏一并切除,放入盛有含青霉素200 u/ml、链霉素200μg/ml的 Hanks液的三角烧瓶内备用。

### 1.3 大鼠肺动脉内皮细胞培养

1.3.1 大鼠肺动脉内皮细胞原代培养 将盛有心肺组织的灭菌三角烧瓶置于超净台。用 Hanks液冲洗,分离、剪下肺动脉主干。冲净血管内的血液,用眼科剪纵行剪开肺动脉。平展在塑料管上切成1.5 mm×1.5 mm的小动脉片,以其内膜面贴于灭菌的35 mm培养皿(1%明胶预置过液,4℃。用前2 h移入 $CO_2$培养箱,用前培养液冲洗)中。置 $CO_2$培养箱微干涸2 h后,加入培养基2 ml,放入37℃,5%二氧化碳培养箱中培养(湿度为100%)。72 h后细胞可达一定密度,将动脉片除去,换液一次,以后每2d换液一次,每次换液1/2继续培养6~10 d,形成细胞单层。内皮细胞纯度达95%。

1.3.2 大鼠肺动脉内皮细胞传代培养 将长成单层的原代细胞用0.08%胰蛋白酶进行消化,每瓶加入1 ml,置常温5 min,镜下观察,当细胞间连接疏松时立即倒出消化液,加入3 ml培养基。用吸管吹打使细胞脱落并充分混匀,吸出0.1 ml计数,得出细胞总数后,将含细胞的培养液稀释成(2.5~3.0)×$10^5$个细胞/ml的接种浓度。25 $cm^2$培养瓶每瓶接种3 ml细胞悬液,继续培养依次传代。

### 1.4 大鼠肺动脉内皮细胞的免疫细胞化学鉴定

1.4.1 制片 用0.08%胰蛋白酶如同细胞传代将细胞消化成细胞悬液。以800 r/min离心5 min,除去含血清的培养液,再向沉降的细胞中加少许温 Hanks液,用吸管轻轻吹打漂洗后,取少许细胞悬液薄涂于玻片上,用吸水纸吸干后甲醇固定5~10 min,取出备用。

1.4.2 荧光染色

1.4.2.1 Ⅷ因子相关抗原间接荧光染色 用0.01 mol/L pH7.2 PBS液洗涤3次,每次3 min,样品片加1:50兔抗人Ⅷ因子相关抗原抗血清(用0.01 mol/L pH7.2 PBS液稀释)50μl 37℃下密封孵育30 min,然后用0.01 mol/L pH7.2 PBS液冲洗3×3 min,再加1:25荧光标记的羊抗兔 lgG 50μl 37℃密封孵育

* 谢 崧,男,33岁,主治医师,九五年级临床医学中青年人才培养基金班学员

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

30 min 0.01 mol/L pH7.2 PBS冲洗 3× 3 min,用吸水纸吸干,缓冲甘油封片,荧光显微镜观察。对照片第一抗体用 PBS代替,其它步骤同样品片。

1.4.2.2 异植物血凝素结合试验 用 0.01 mol/L pH7.2 PBS液冲洗后,吸水纸吸干后加入 25μg/ml荧光标记的异植物血凝素 50μl在室温密封孵育 30 min,而后用 PBS冲洗 3× 3 min,吸水纸吸干,缓冲甘油封片,荧光显微镜检查,样品片为肺动脉内皮细胞,对照片为肺微血管内皮细胞,两者染色过程一样。

## 2 结果

### 2.1 生长情况

组织块贴于培养皿壁后,组织块边缘因剪切而产生的小组织碎片立即向周围扩散,培养 24 h后内皮细胞从组织块边缘向四周游出,72 h左右游出物内皮细胞可达一定的细胞密度。取出组织块,继续培养 6~ 10 d细胞融合成片状。

### 2.2 细胞形态

细胞呈鹅卵石镶嵌状排列,细胞呈多角形或梭形,大小均匀。胞核清晰,呈卵圆形,胞浆丰富。

### 2.3 鉴定情况

Ⅷ R:Ag间接免疫荧光染色样品片阳性,呈明亮的黄绿色荧光,对照级阴性,异植物血凝素结合试验肺动脉内皮细胞阴性,而肺微血管内皮细胞呈明亮斩黄绿色荧光。

## 3 讨论

本实验主要根据颜培华等[2]报告的大鼠主动脉内皮细胞培养方法进行培养。在其基础上进行了改进,培养基中加了能抑制成纤维细胞生长的肝素[3],使内皮细胞纯度较高。选择与大鼠内皮细胞Ⅷ因子相关抗原有同源性的兔抗人Ⅷ R:Ag抗血清做为一抗,荧光标记的羊抗兔 IgG做为二抗,进行间接免疫荧光染色。同时选择仅能与肺泡微血管及直径小于 15~ 20μm的血管内皮细胞结合,不与大血管内皮细胞结合的异植物血凝素进行结合试验鉴定大鼠肺动脉内皮细胞[4]。

这种大鼠肺动脉内皮细胞培养方法简单,不需要在解剖显微镜下分离较长的肺动脉进行灌注和酶的消化等复杂过程,只是分离出肺动脉主干,切成小块,将内皮面贴在培养皿壁上培养即可。另外,由于使用含肝素的选择培养基培养,使内皮细胞纯度较高,满足原代研究的要求。与大动物相比大鼠价格低廉,来源丰富,有利于同行实验重复与交流及大样本的研究,制做动物模型也比较容易。宜于推广应用。

关键词 大鼠;肺动脉;内皮细胞;细胞培养
中图法分类号 R329-33

## 参考文献

1 Cutaia M, Rouds S. Hypoxic pulmonary vasoconstriction physiologic signficance, mechanism and clinical relevance. Chest, 1990, 97(3): 706
2 颜培华,李凤芝.大鼠主动脉内皮细胞培养及鉴定方法.军事医学院院刊, 1993, 17(2): 124
3 崔建奇,柳 川,周廷冲等.成纤维细胞生长因子与心血管疾病.生理科学进展. 1994, 25(1): 76
4 Magee J C, Stone A E, Oldham K T *et al*. Isolation, culture and characterization of rat lung microvascular endothelial cells. Am J physiol, 1994, 267(4): L433

(收稿: 1996-09-16;修回: 1997-03-06)
(编辑 汪勤俭)

# 紧急床旁经静脉临时心脏起搏 18例分析

# Analysis of 18 cases of emergent transient cardiac pacing by venous puncture at bedside

胡厚源* 何国祥 周 林 司良毅 迟路湘 (第三军医大学附属西南医院心血管内科)重庆,400038

提 要 目的:了解经静脉临时心脏起搏在抢救严重心律失常中的作用及经验。方法:因严重心律失常在我科接受经静脉临时心脏起搏者 18例,包括病窦综合征、高度或完全性房室传导阻滞、室速等,在床旁由右颈内静脉插入起搏电极(仅 1例经右股静脉)。结果:对于缓慢性心律失常用 VVI(或 AAI)方式起搏,有室速者用 VOO方式起搏,起搏时间平均 8.4±5.4(1~ 18)d,除 1例急性心肌梗塞患者因心源性休克死亡外,均救

* 胡厚源,男,31岁,主治医师,博士研究生

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