DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.032

经验交流

体外培养人脐静脉内皮细胞的多形态性观察*

Observation on the polymorphism of *in vitro* cultured human umbilical vein endothelial cells

姚忠祥 蔡文琴 (第三军医大学基础部组织学与胚胎学教研室) 重庆, 630038
张继萍 (重庆医科大学医疗系) 重庆, 630042

血管内皮细胞具有复杂的合成与代谢功能[1]。作者应用苏木精-伊红(HE)染色、免疫细胞化学(ICC)染色及倒置相差显微镜和扫描电镜(SEM)对体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)进行了观察,并与原位HUVEC进行SEM比较,对其意义进行了初步探讨。

1 材料与方法

参照文献[1]的方法分离培养HUVEC,第5天对生长在盖玻片上的HUVEC进行:① 倒置相差显微镜直接观察;② 4%多聚甲醛 4℃固定 30 min,然后依次浸入 Mayer苏木精溶液 1 min和 1%伊红水溶液 30 s进行 HE染色和与神经降压素(Neurotensin, NT)的兔抗血清(Sigma, 1∶2 000)进行 ICC染色(NT抗血清孵育 6 h,羊抗兔血清和 PAP复合物各孵育 30 min, 37℃, DAB显色;③ 2.5%戊二醛固定 30 min(同时取人脐静脉"+"字切开), 1%锇酸后固定 30 min(4℃),酒精脱水,醋酸异戊酯置换,液态 CO_2 临界点干燥,离子溅射镀金,JAM-T300扫描电镜观察。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察

体外培养第5天的HUVEC可分为密集区和稀疏区。密集区细胞融合成连续的单层,细胞主要为椭圆形或多边形。密集区边缘和稀疏区细胞主要呈梭形,有的细胞呈放射状排列或围成圆形,少数细胞伸出巨大的薄翼形胞质。

2.2 HE及ICC染色观察

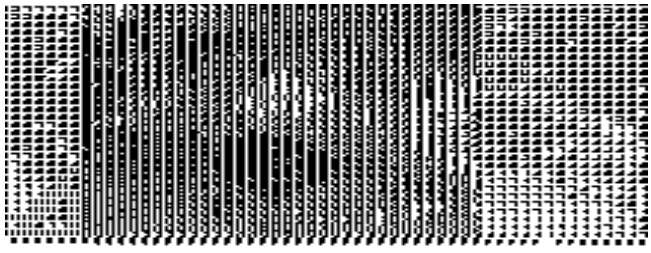
HE染色时,密集区细胞胞核呈椭圆形,染淡蓝色,胞质染淡红色;密集区边缘和稀疏区的梭形细胞胞核呈梭形,着色深,呈紫蓝色,胞质染粉红色。

NT抗血清ICC染色可见密集区细胞胞质显浅棕色,密集区边缘和稀疏区的梭形细胞胞质呈深褐色见附图。

2.3 SEM观察

SEM观察体外培养第5天的HUVEC,可见密集区细胞主要呈椭圆形或多边形,胞质薄,细胞中央略呈椭圆形隆起;细胞表面可见隆起走行的细条纹和小凹窝;胞质边缘伸出突起相互连接。稀疏区细胞主要呈梭形或椭圆形,细胞表面的突起长短不一,有的突起相互连接。

SEM直接观察原位的HUVEC,可见细胞表面光滑,呈梭形或椭圆形,细胞排列非常紧密,互相嵌合,细胞长轴与血管长轴方向基本一致。



附图 体外培养第5天的HUVEC ICC染色显示NT样阳性免疫反应 (PAP×100)

3 讨论

Pupnick[2]培养微血管内皮细胞出现4种不同类型,推测这些细胞来源于不同的节段。本研究观察到体外培养的HUVEC其形态亦呈多样性,推测可能与它们来源于脐静脉的不同节段有关。

应用SEM观察原位的HUVEC,其表面光滑,与体外培养HUVEC的形态存在巨大差异,可能由于体外生长环境与原位的不同,导致了形态上的差异。

HE染色和NT抗血清ICC染色时位于密集区边缘和稀疏区的细胞较密集区显示更高染色密度,推测这些细胞处于不同的细胞生长周期和功能状态。NT对心血管系统具有很复杂的作用[3]。本研究观察到体外培养的HUVEC中含有NT,其生理意义尚有待进

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39670382

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

一步研究。

综上所述,体外培养的 HUVEC具有多种形态,可能与体外培养的 HUVEC来源于人脐静脉的不同节段、生长环境的变化及处于不同的细胞生长周期和功能状态等有关。

关键词 细胞培养;内皮细胞;脐静脉
中图法分类号 R329.2

参考文献

1 Cai W Q(蔡文琴), Terenghi G, Bodin P *et al*. *In situ* hybridization of neuropeptide Y gene expression in the endothelial cells of human umbilical blood vessels. Chinese Science Bulletin, 1995; 40(12): 1022

2 Pupnick M A. Phenotypic diversity in cultured cerebral microvascular endothelial cells. In Vitro Cell Dev Biol, 1988; 24(3): 435

3 汤 健,唐朝枢.神经降压素.见:汤 健,唐朝枢编著.循环系统的内分泌功能.北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1989. 142~143

(收稿: 1996-02-19;修回: 1996-09-05)
(编辑 冷怀明)

正常孕妇外周血中循环内皮细胞的变化*

Changes of CEC in normal pregnant women

李 力 陈竹钦 张稚玲 冯素珍** (第三军医大学附属大坪医院妇产科)重庆, 630042

循环内皮细胞(CEC)作为活体内血管损伤的指示物而受到国内外学者的广泛关注[1~3],但在产科领域对 CEC的研究偶见国外文献报道[4],而国内尚未见文献论述。为此,我们对正常妊娠过程中,早、中、晚孕期及产前、产后妇女外周血 CEC的数量及形态进行了初步的研究,以期引起国内同行的兴趣,并对病理产科开展 CEC研究能有所裨益。

1 对象与方法

1.1 对象

为我院门诊及住院病人,共130例,其中早、中、晚孕期及临产时、产后各20例,剖宫产术前、术后各15例。研究对象均身体健康,无肝、肺、肾脏疾患病史,无心血管系统及外周血管性疾病史。查体及心、肾功能、ECG、血生化检查均无异常发现。

1.2 方法

1.2.1 采血 门诊病人于上午9:00~10:00,住院临产病人于清晨,剖宫产病人在送往手术室前及产后、术后24 h,取左肘静脉血3.0 ml与0.4 ml 3.8%枸橼酸钠液充分混匀后立即送检。

1.2.2 分离 CEC按 Samaden等[5]的 Percoll密度梯度分离法略加修改。

1.2.2.1 将采集的3.0 ml抗凝血以等量生理盐水稀释。

1.2.2.2 从试管底部缓慢加入2.0 ml Percoll分离液(密度=1.050)。

1.2.2.3 1500*r*/min离心20 min后,取 Percoll界面以上的液体作为上层(密度为 <1.050), Percoll层作为中层(密度=1.050)。

1.2.2.4 取上层液经3000*r*/min离心20 min后,倾去上清,加入生理盐水0.5 ml充分混匀使其成为重悬液。

1.2.2.5 分别取中层液及上层重悬液1滴,分别加入细胞计数池内,在光镜下计数全部9个大方格内的 CEC数4次,取平均数为其平均值作为 CEC数,单位为细胞个数/(0.9 μl)。

1.2.3 CEC鉴定 按 Iwata等[6]的方法略作修改。取上清液少许在玻片上,干燥后用甲醇固定5 min,用 PBS漂洗3次,干后滴加兔抗人Ⅷ-R Ag血清,置于37℃中孵育30 min,再用 PBS漂洗3次,干后滴加异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG荧光抗体,方法同上。干后滴加缓冲甘油,置 BH型荧光显微镜上观察。阴性对照分别为单纯加兔抗人Ⅷ-R Ag血清, FITC标记的羊抗兔 IgG荧光抗体和 PBS等三份内皮细胞标本。本实验中因去除了血小板等血细胞的影响,镜下所见的免疫荧光细胞即是 CEC。

2 结果

2.1 CEC数量的变化

以妊娠早期最低,妊娠中期达到最达高,分别为4.82±2.22个/(0.9 μl)和17.65±9.57个/(0.9 μl),前者明显低于其他各时间点(P <0.01~0.001),后者则显著高于产前及产后各时间点(P <0.001~0.002);剖宫产术后较术前所增加,虽与术前比较相差不显著(P >0.05),但却明显高于正常产前(P <0.05),见表1、2。

* 全军"八五"攻关项目
** 创伤急救中心 重庆, 630038

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