DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.03.011

培养的肺动脉内皮细胞生长及生化特性的初步观察*

王培勇 孙秉庸 (第三军医大学基础部高原医学研究室、病理生理学教研室)重庆,630038

提 要 采用胰蛋白酶消化法和刮取法培养了肺动脉内皮细胞(PAEC)。通过原代培养、传代和冻存复苏等步骤,观察了PAEC的形态及生化特点,如Ⅷ因子相关抗原、细胞内钙、环磷酸腺苷等。结果表明:原代及传代培养的PAEC可很快贴壁生长,经2~5 d可汇合成单层,细胞呈铺路石状排列,Ⅷ因子相关抗原阳性,并能分泌血管紧张素转移酶;在含20%小牛血清的RPMI-1640培养基内,PAEC可传30代以上;传代后的细胞生长速度加快,但加保持其形态和生化特点。

关键词 细胞培养;肺动脉;内皮

中图法分类号 R329.2

血管内皮细胞不仅构成血管的内衬和屏障,而且还具有重要的内分泌功能,是分泌活跃的旁分泌细胞[1]。它对于血液细胞、血管壁张力及结构改建具有重要的调节作用。有关体血管内皮细胞特点已进行了较为广泛的研究,但有关肺血管内皮细胞的生长及生化特点的研究报道不多,本文通过肺动脉内皮细胞(PAEC)培养观察了PAEC的特点,以了解其生长、形态及某些生化特性,并且对培养的方法作了改进。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及器材

胰蛋白酶(trypsin,Difico 1∶250),RPMI-1640(JR Scientific Inc. USA),血管紧张素转换酶(ACE)测定药盒(海军总医院),兔抗人Ⅷ因子相关抗原抗体及羊抗兔抗体(上海生物制品研究所),其它试剂均为国产AR级。所用的培养瓶或培养皿为Costar产品。

1.2 方法

1.2.1 小牛肺动脉内皮细胞的培养 新生小牛活杀后,无菌下取出肺脏,分离出肺动脉主干及左右分支,用胰蛋白酶消化法[2]或刮取法[3]进行原代培养。因肺动脉分支繁多,难以结扎完全,我们做了如下改进:分离动脉时不必结扎分支,分出后将左右分支内膜翻出,直接投入0.5%胰蛋白酶中,为了减少污染可在室温下消化10~15 min,收集细胞进行培养。

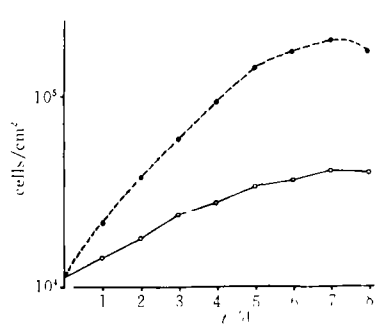
原代培养的PAEC因消化时间过长或刮取过重或操作不慎容易污染成纤维细胞或平滑肌细胞,因杂细胞生长较快,传代次数越多杂细胞污染越重,从而使培养失败。在培养中我们摸索出了下述方法可以清除杂细胞:吸弃培养液,用D-HANK'S液冲洗3次,加入0.1%的胰蛋白酶1~2 ml,置相差显微镜下观察,1~3 min即可见大部分PAEC收缩变圆而杂细胞仍然贴壁,此刻立即加入小牛血清以灭活胰蛋白酶,用吸管轻轻吹散细胞,吸出离心后即为较纯的PAEC,置培养瓶中培养,如此经过1~2次即可得到PAEC的纯培养。

细胞鉴定采作Ⅷ因子相关抗原免疫染色(ABC法)、ACE活性测定及相差显微镜下观察等方法进行。

1.2.2 其它观察 通过计数观察细胞的生长曲线,用Lowry法测定细胞蛋白质含量,用Fura-2荧光指示剂测定细胞内游离钙浓度($[Ca^{++}]$),用放免法测定了细胞内cAMP含量,以了解培养PAEC的特点。

2 结果

采用胰蛋白酶消化法或刮取法均可有效地分离PAEC,每头小牛的肺动脉可分离出10^5~10^7个细胞。刚分离下来的PAEC在相差显微镜下观察为亮球形,单个或数个成团。1~2 h后开始贴壁,细胞从球形逐渐变为梭形或扁平,胞质透明,中央有卵圆形的核。1~2 d后呈单层细胞集落。集落中心部位细胞较小排列紧密,边缘部位细胞大而扁平,此时可见大量正在分裂的细胞,胞体大而亮,数小时后可分裂为两个细胞。4~5 d集落可完全汇合,细胞呈多角形排列,细胞之间由突起相互联接。传代细胞与原代细胞类似,但贴壁和生长较快,经10~30 min即贴壁,3 d左右可汇合成层,传代次数越多细胞生长越快(见附图)。



附图 PAEC生长曲线

。——。第1代 •-----• 第14代

Fig Growth curves of PAEC

。——。passage1 •-----• passage 14

* 国家自然科学基金资助项目,No.39270316

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

无论传代或原代 PAEC，Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色均为阳性。生长汇合成单层的细胞若不传代，则胞体变大，胞浆中逐渐出现空泡，继续培养则成片脱落，表现为接触抑制。

培养 PAEC 的其它特性见附表。

附表　培养 PAEC 的某些特征

Table　Characteristics of cultured bovine PAEC

Growth Pattern	cobble stone like single layer
Density	$15.25\times10^4/cm^2$(passage 14)
Protein content	30 $\mu g/cm^2$(passage 14)
Subculture period	3～5 days (passage 1～10)
	2～3 days (passage 11～30)
ACE activity	1.164 nM/min/mg cell protein
cAMP content	2.365 pmol/mg cell protein
$[Ca^{++}]$	180 nmol/L

3　讨论

血管内皮细胞来源于间充质，在体外培养可呈纤维细胞型，因此需要与来自血管壁的平滑肌及成纤维细胞相区别。一般认为，培养内皮细胞的主要鉴定指标是单层多角形排列，细胞内Ⅷ因子相关抗原阳性。此外近年来认为 ACE 和 α-巨球蛋白也可作为血管内皮细胞的标志物。接触抑制也是内皮细胞的生长特点。本实验中观察到培养的 PAEC 镜下呈多角型排列，有接触抑制现象，Ⅷ因子相关抗原阳性，可检测到 ACE 活性，证明培养成功。

许多研究表明，肺血管内皮细胞与体血管内皮细胞有一定的相似之处，但也有某些不同的特点[4]。因此本实验通过 PAEC 的培养，对其形态、生长及某些生化特点进行观察。实验表明，体外培养的 PAEC 传代次数越多，生长速度越快，这可能反映了 PAEC 经传代后适应了体外的环境。PAEC 在含 20%小牛血清的 RPMI－1640 培养基中可传 30 代以上，传代后仍保持其形态和生化特点，如单层生长、Ⅷ因子相关抗原阳性、可检测出 ACE 活性。这些特点的维持是进行体外内皮细胞研究的前题。培养时，若有杂细胞污染，用本文介绍的纯化方法同样可获得 PAEC 的纯培养。

体外培养 PAEC 的成功，为研究其与体血管内皮的异同提供了条件。

参考文献

1　汤　健，唐朝枢. 循环系统的内分泌功能. 北京：北京医科大学、协和医科大学出版社，1989：76

2　Ryan US. Isolation and culture of pulmonary endothelial cells. Environ Health Perspect，1984；56：103

3　Ryan US，Mortara M，Whitaker C. Isolation and culture and subculture of endothelial cells：Mechanical Methods. J Tissue Culture Meth，1986；10：36

4　王培勇，孙秉庸. 肺动脉内皮细胞与肺动脉平滑肌细胞相互关系的研究进展. 见：孙秉庸等主编. 病理生理学进展(第五册). 北京：科学技术文献出版社，1992：304～317

(收稿：1994-04-25；修回：1995-01-25)

A study on the growth and biochemical characteristics of cultured pulmonary artery endothelial cells

Wang Peiyong，Sun Bingyong (Research Lab of High Altitude Medicine，Department of Pathophysiology，Third Military Medical University，Chongqing，630038)

Abstract　New born bovine pulmonary arterial endothelial cells (PAEC) were cultured successfully in RPMI-1640 medium containing 20% bovine serum. Two culture methods，namely trypsin digesting and scraping，were compared. The two methods were both useful and effective. PAEC could be subcultured and had been survived for more than 30 passages. The cultured cells could secret Angiotensin converting enzyme (ACE) and Ⅷ factor related antigen were positive in PAEC culture. The cells grew more rapidly after subculture and retained their morphological and biocheminal chaiacteristics.

Key words　cell culture；pulmonary artery；endothelial cell

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