

猪脐静脉血管内皮细胞的分离与培养^{*}

洪海霞, 张彦明, 孙 斐, 苏正元, 魏中锋, 张永国

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用 1 g/L 胶原酶灌注猪脐静脉, 消化分离内皮细胞并在适宜条件下培养。对培养细胞的生长特性进行检测, 并对细胞进行第Ⅷ因子相关抗原(F-VIII RA g)和扫描电镜形态学鉴定。结果表明, 70% 细胞在 24 h 内贴壁, 第 3~5 天生长迅速, 第 4~5 天长成单层。培养的细胞呈单层贴壁生长, 典型铺路石状, 第Ⅷ因子相关抗原(F-VIII RA g)检测阳性, 证明培养的细胞为血管内皮细胞。

[关键词] 细胞培养; 猪脐静脉血管内皮细胞; 胶原酶; 第Ⅷ因子相关抗原(F-VIII RA g)

[中图分类号] Q 954 6-33⁺ 2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)05-0001-04

血管内皮细胞衬贴于心血管内腔表面, 除具有屏障作用外, 还可合成、分泌多种因子, 在凝血、抗凝、抗纤溶、调节细胞生长、改变脂质代谢、维持血管壁完整性和管壁张力等方面具有重要作用, 同时在免疫调节、移植排斥、肿瘤转移、炎症消除等许多过程中发挥作用。Maruyama^[1]于 1963 年首次报道了人脐带内皮细胞的培养法, 直到 1973 年, Jaffe^[2]等才成功地从人脐静脉中分离到血管内皮细胞。近年来, 关于牛、兔、鼠、马等来源的血管内皮细胞在体外成功培养的研究均有报道^[3~5]。血管内皮细胞的体外成功培养, 不仅可为深入研究内皮细胞本身, 还可以为阐明许多疾病的病理生理机制提供良好的研究手段。猪瘟病毒对血管组织具有亲嗜性^[6], 它可引起猪的全身组织器官弥漫性出血, 小血管和毛细血管内皮细胞发生变性、坏死。为了研究猪瘟病毒对血管内皮细胞的致病作用, 阐明其发生的机理, 作者曾采用猪主动脉进行了血管内皮细胞的分离与培养, 但存在分离难、培养出的细胞生长缓慢、花费高等问题。本试验采用脐静脉进行了血管内皮细胞的成功分离培养, 为下一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 猪脐静脉血管内皮细胞的分离

无菌采取新鲜猪脐带 15 cm 左右, 投入无菌 PBS 液中。在超净工作台内, 取出脐带, 用止血钳夹住脐带两端, 投入体积分数为 75% 的酒精中浸泡约

60 s。取出, 将两端剪掉少许, 分出脐静脉。用 20 mL 注射器(插上灭菌的枪头)吸取 PBS 液反复冲洗脐静脉, 直至脐静脉苍白无血迹为止。用无菌棉线结扎脐静脉一端, 静脉腔内注射 1 g/L 胶原酶(Sigma I 型), 静脉腔充盈后, 小心结扎脐静脉的另一端, 检查无酶液外漏后, 将脐带放入无菌培养皿中, 置 37 °C 温箱中温育 5 min 左右, 取出脐带, 剪掉一端, 收集细胞悬液, 用培养液冲洗静脉几遍, 同收集的细胞悬液一并 1 000 r/min 离心 8~10 min。

1.2 脐静脉血管内皮细胞的原代培养

吸弃上清液, 收集细胞沉淀。在细胞沉淀中加入适量 M 199 培养液(内含体积分数 20% 胎牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 U/mL 肝素(Sigma), 10 μg/mL 胰岛素(Sigma), 10 μg/mL 氢化可的松, 100 U/mL 青链霉素), 用吸管吹打细胞成悬液, 接种到 25 mL 培养瓶中, 置 37 °C, 体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中, 至 24 h 时换液, 以后每隔 2~3 d 换液 1 次。5 d 左右内皮细胞可铺满单层。

1.3 内皮细胞的传代培养

待细胞铺满 80% 时, 吸弃培养液, 加入 A TV (胰蛋白酶(0.05 g/L)和 EDTA(0.01 g/L)按体积比 1:1 混合)1 mL。在显微镜下观察, 当细胞开始回缩变圆时, 立即加入传代用培养液终止消化, 用吸管轻轻吹打成细胞悬液, 按 1:2 传代。

1.4 内皮细胞的纯化^[7]

原代或传 1~2 代的细胞长至单层时, 用 0.25

^{*} [收稿日期] 2003-11-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30270988)

[作者简介] 洪海霞(1979-), 女, 新疆阜康人, 在读硕士, 主要从事病毒与微生物学研究。

[通讯作者] 张彦明(1956-), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

g/mL 柠檬酸胰酶消化,倒置显微镜下观察,当视野内(10×10 倍)约 20%~40% 的细胞收缩呈圆形时,立即加入 3 mL 培养液,用吸管轻轻吹打 1~2 次,吸出,以 1 000 r/min 离心 10 min,细胞沉淀用不含血清的 M 199 液洗 1 次,置另一培养瓶内培养(含较多的成纤维细胞,但可继续纯化)。原培养瓶中剩下的约 60% 贴壁的内皮细胞(可能还含有成纤维细胞),加入传代培养用生长液中继续培养,待长至单层后可重复此过程。

1.5 内皮细胞生长曲线的测定

将长至单层的内皮细胞消化下来,吹打均匀后平均接种于 24 孔培养板内,接种密度约为 1×10^4 cm^{-2} ,每隔 24 h 取 3 孔细胞计数,取其平均值。3 d 后未计数的细胞换液。以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,作出内皮细胞生长曲线。

1.6 内皮细胞的鉴定

1.6.1 内皮细胞第Ⅷ因子相关抗原(F-VIIIRAg)鉴定 将细胞接种于 6 孔培养板,待细胞生长至融合状态(低密度单层)时用 PBS (0.01 mol/L, pH 8.0) 洗 3 次,投入体积分数为 95% 的酒精中固定 15 min,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加 1:500 稀释的兔抗人第Ⅷ因子相关抗原抗血清(博士德公司),置湿盒中 37 °C 温育 30 min。同时用 PBS 代替一抗做阴性对照。PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 羊抗兔 IgG 荧光抗体(Sigma),置湿盒中 37 °C 温育 30 min。用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。自然晾干,甘油缓冲液封片后于 Nikon 荧光显微镜下观察。

1.6.2 电镜样本的制作和观察 将细胞培养于放有盖玻片的 6 孔培养板内,取生长状态良好的细胞,用体积分数为 3% 的戊二醛 4 °C 固定 1 h, PBS 液洗 3 次,每次 10 min。体积分数 1% 锇酸固定 1 h, PBS

液洗 3 次,每次 10 min。用梯度乙醇脱水,依次在体积分数为 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 和 95% 的乙醇中各脱水 10 min。CO₂ 临界点干燥,真空下喷金后,扫描电镜下观察结果并照像。

2 结 果

2.1 细胞形态和特征

原代猪血管内皮细胞刚分离下来时为亮球形,多成团存在,细胞体积较红细胞大。大多在 12 h 以内贴壁,贴壁率为 70% 左右。细胞贴壁后,呈多角形或圆形,以岛屿状形式存在,单个细胞较少。培养 2~3 d 后,细胞岛屿迅速增大(密度大时融合成片),呈现典型的上皮细胞形状。细胞中央核明显,常有 2 个以上的核仁,无重叠生长现象。约 5 d 后,细胞铺满单层,呈典型的鹅卵石铺路状。传代细胞贴壁增快,大多 4 h 已贴壁,4~5 d 可长成单层,细胞由原代的多角形逐渐转变为长梭形,单层细胞呈典型的铺路石状排列。细胞形态见图 1。

2.2 细胞生长曲线

从图 2 可以看出,血管内皮细胞接种后,第 1~2 天生长缓慢,第 3 天生长开始加快,进入对数生长期,持续 3 d 左右后进入平台期,至第 7 天,细胞开始脱落死亡。

2.3 细胞的鉴定结果

2.3.1 F-VIIIARAg 检测 培养的细胞经兔抗人第Ⅷ因子相关抗原抗血清及 FITC 标记的羊抗兔 IgG 着染后,细胞核均呈明显的黄绿色荧光,用 PBS 代替兔抗人第Ⅷ因子相关抗原抗血清的对照组细胞则无荧光。仔细观察发现,在细胞核发荧光区域是由更亮的荧光颗粒或杆状物组成的。由此证实,培养的细胞为血管内皮细胞(图 3)。

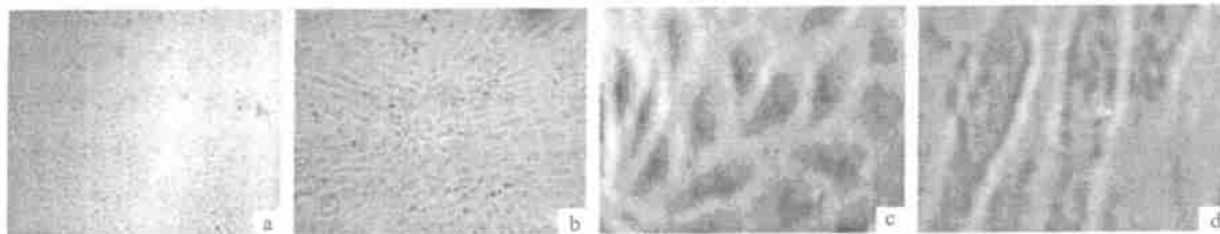


图 1 猪脐静脉血管内皮原代和传代细胞

a 培养 5 d 的原代细胞(1:100); b 培养 5 d 的原代细胞(1:400); c 传至第 4 代的内皮细胞(1:100); d 传至第 4 代的内皮细胞(1:400)

Fig 1 Swine umbilicus veins endothelial in primary culture and passage culture

a Phase contrast micrographs of umbilicus veins endothelial cells 5 days after seeding $\times 100$;

b Phase contract micrographs of umbilicus veins endothelial cells 5 days after seeding $\times 400$;

c Phase contrast micrographs of umbilicus veins endothelial cells passaged to 4th generation $\times 100$;

d Phase contrast micrographs of umbilicus veins endothelial cells passaged to 4th generation $\times 400$

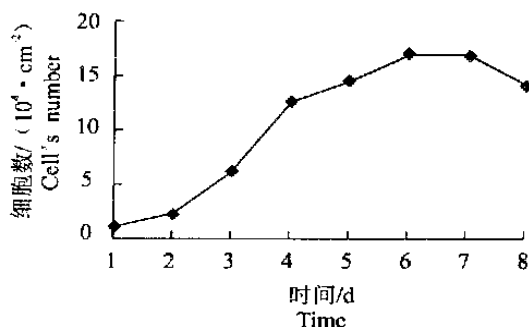


图2 内皮细胞的生长曲线

Fig 2 Growth line of endothelial cells in 7 days



图3 F-VIIIRAg 阳性细胞(1:400)

Fig 3 Fluorescence localization of factor VIII related antigen in endothelial cells ×400

2.3.2 扫描电镜观察 由图4可以看出,血管内皮细胞呈多角形,近似圆形或形状不规则,从胞浆中伸出许多细胞突起,附着于邻近细胞表面,细胞表面还

有许多小凹窝,大小不一,分布不均匀。细胞核所在部位略微隆起。

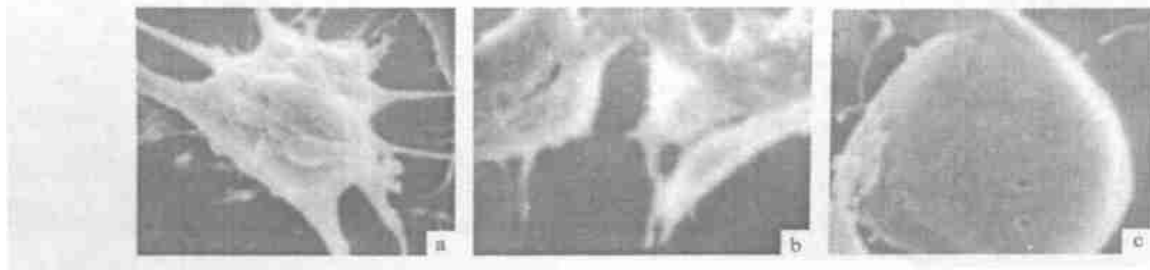


图4 血管内皮细胞的电镜观察

a 内皮细胞伸出许多突起,表面有许多小凹窝(1:20 000); b 内皮细胞呈多角形,细胞核处隆起(1:2 000); c 内皮细胞近似圆形,表面有圆形凹窝(1:20 000)

Fig 4 Phase contrast electron microscope of endothelial cells

a Endothelial cells stretched out many fingers, and many little nests on its surface ×20 000;
b Endothelial cells appeared polygon, nucleus swelling ×2 000;
c Endothelial cells appeared approximate circular shape, circular nest on its surface ×20 000

3 讨论

内皮细胞由于供体的年龄、性别、种属来源不同,其特性亦有一定差别。培养的内皮细胞从形态学上可分为2类。一类占培养内皮细胞的大部分,直径在50~70 μm,为类圆形或多角形的小型细胞,被称为典型内皮细胞,呈单层铺路石样排列,占幼龄动物血管内皮细胞的大部分;另一类是直径100~200 μm的大型内皮细胞。这类细胞通常带有2个以上细胞核,被称为非典型内皮细胞。非典型内皮细胞是成年动物的大动脉内皮细胞,与动脉硬化和老化有关。一般来说,血管内皮细胞随着年龄的增加,由典型的内皮细胞慢慢转变为非典型内皮细胞;年龄越大,非典型内皮细胞比例越高。在细胞生长方面,随着传代次数的增多,非典型内皮细胞也逐渐增多。

内皮细胞比较娇嫩,培养困难,不能大量获得细胞。在原代培养时,长约15 cm的脐带消化下来的细胞(经离心吹打后成细胞悬液,约5 mL)不需再作稀释,可直接接种至25 mL培养瓶中,4~5 d可长至单层。接种密度太稀时,细胞生长缓慢,难以长成单层,细胞生长状态较差。内皮细胞传代次数有限,传代遵循1传2的原则。多传时,细胞生长缓慢,细胞易变形、老化,甚至难以长成单层。

消化酶以胶原酶为好,与用胰蛋白酶比较,消化的细胞数量大,对细胞的毒性小,且细胞纯度高,胶原酶的浓度多选择1 g/L (200 U/mL)^[8]。消化时间不能过长,脐静脉管壁薄,容易造成酶液外漏,使大量的细胞混入,消化时间以5 min为好。在用胶原酶消化时,消化时间也应视具体情况而定,有的5 min足以消化大量细胞,但有的则需10~15 min,甚至

更长。因此, 试验前应作预试验, 找出最佳的消化时间。

F-VIII RA g 是内皮细胞的标志性特征^[9]。在对内皮细胞进行鉴定时, 本试验结果是核呈现明显的黄绿色荧光, 这与以前报道的核周围着色^[10]不太一致, 这可能是本试验对一抗或标记性二抗稀释不够造成的。但仔细观察发现, 细胞核发荧光区域是由更亮的荧光颗粒或杆状物组成的, 这一结果与阳性细胞出现细长荧光颗粒的报道是一致的^[2]。Weibel-Palade 小体, 是血管内皮细胞又一特异性的标志,

在电子显微镜下, 为宽 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{m}$, 长 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 的椭圆形棒状结构。F-VIII RA g 就是该小体产生的。

肝素对内皮细胞的影响也较大, $50 \mu\text{g/mL}$ 肝素可显著提高血管内皮细胞的增殖, 且有助于内皮细胞的纯化, 能提高内皮细胞的纯度。

目前, 在内皮细胞培养及其特性的掌握上还存在一些问题, 如细胞生长的最佳营养条件尚需不断摸索等。随着研究方法的日益成熟, 将为相关研究提供理想的细胞模型。

[参考文献]

- [1] Maruyama Y. The human endothelial cell tissue culture[J]. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1963, 60: 69- 79
- [2] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. J Clin Invest, 1973, 52: 2745- 2756
- [3] 孙 新, 曹国钱, 沈有安, 等. 牛脑微血管内皮细胞的体外培养及形态学观察[J]. 第二军医大学学报, 1992, 13(2): 178- 180
- [4] 吴文斌, 胡常林, 汤为学. 大鼠皮质微血管内皮细胞的培养[J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27(2): 151- 155
- [5] 王云开, 苏 海, 程晓曙. 高压培养对猪离体主动脉内皮细胞功能的影响[J]. 高血压杂志, 2000, 8(1): 81- 86
- [6] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学技术出版社, 1997. 14- 20
- [7] 王 毅, 朱佩芳, 王正国. 内皮细胞培养中清除成纤维细胞的新方法[J]. 细胞生物学杂志, 1991, 13(1): 47.
- [8] 鄂 征. 组织培养技术[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1986. 171.
- [9] 沈士亮, 徐玉会, 武忠弼. 葡萄球菌 A 蛋白胶体金银法对血管内皮细胞第 VIII 因子相关抗原的研究[J]. 中华病理学杂志, 1989, 18(1): 69- 70
- [10] 冯 治, 马清钧. 人脐静脉血管内皮细胞的分离、培养、鉴定及试验研究[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(2): 138- 142

Segregation and culture of endothelial cells from swine umbilicus veins

HONG Hai-xia, ZHANG Yan-ming, SUN Pei, SU Zheng-yuan, WEI Zhong-feng, ZHANG Yong-guo

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of
Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Swine umbilical cord was sterilized by 75% ethyl alcohol about 1 min and umbilicus veins were washed by PBS. 1 g/L collagenase I was poured into umbilicus vein and digested 5 min at 37°C . Endothelial cells obtained was collected by centrifugation, cultured in M199+ 20% fetal calf serum. The plating efficiency to plastic was 70%- 75% for 24 hours in collagenase dispersed cells. A confluent monolayer was formed by 4- 5 days. The endothelial cells looked like cobblestones and were stained positively for factor VIII relative antigen, which is feature of endothelial cells. It shows cells cultured are umbilicus veins cells.

Key words: cell culture; swine umbilicus veins endothelial cells; collagenase; factor VIII relative antigen