

血管的器官培养方法及其应用

欧和生 综述 唐朝枢 审校

(北京医科大学心血管研究所, 北京 100083)

近年来,血管医学研究取得了长足的进步,尤其对血管的发育、损伤、修复、再生和再狭窄等病理和生理过程的发生机制及其治疗干预措施等方面的研究进展

十分迅速。这些研究中常常需要应用血管器官培养的方法。器官培养不同于整体实验,它具有条件恒定、因素单一和便于干预等优点;也不同于细胞培养,它比后

者更客观地反映细胞与细胞之间的相互关系,没有细胞过程中细胞出现异质性、容易老化等缺陷,因此越来越广泛地被应用于血管医学的研究。本综述对血管器官培养方法及近年来的一些应用作一介绍。

1 简单孵育法

将无菌操作获取的血管用 PBS 溶液清洗后,置于培养瓶中,加入培养液,在 37℃、95%O₂ 和 5% CO₂ 的通气条件下孵育。培养液有多种,可用天然培养基如血浆和鼠尾胶原;亦可用合成培养液包括 NCTC109 培养液、199 培养液、Eagle 培养液(MEME)、RPMI 1640 培养液、McCoy 培养液、HAMF12 培养液和 DM-160 培养液等。这种方法简易,适于短期内(一般<24 h)对血管功能指标的检测观察。Thomas 等^[1]从 SD 大鼠取下胸主动脉,去内皮后剪成 3.5 mm 长血管环,然后置于 2 L 的 DEM 培养液中,并加入 1%胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素。观察在微量内毒素(10~30 g/L LPS)诱导下,血管内蛋白激酶 C 对一氧化氮合成酶(NOS)活性变化及血管抑制反应的调节作用,观察时间 18 h。

许多情况下可不需要培养液,而采用 Krebs-Henseleit(K-H)液对血管进行暂时性平衡营养,尤其在血管灌流模型中被广泛使用。如 Yokoyama 等^[2]取 SD 大鼠胸主动脉,剪成 4 mm 长动脉环,置 K-H 液中,观察缺氧—复氧过程中血管内皮依赖性松弛反应的变化,认为血管内皮依赖性松弛反应性的降低与氧化所介导的细胞死亡有关;Jin 等^[3]取 SD 大鼠胸主动脉和肺动脉,同样置于 K-H 液中,观察了平滑肌细胞球蛋白轻链激酶途径(myosin light chain kinase pathway)与酪氨酸激酶途径之间的联系,发现两者之间存在“交叉应答”(cross talk),并通过 MAPK 途径调节平滑肌细胞增殖,动脉环置于 K-H 液中,可短时期观察血管功能变化而无需培养液。由于缺乏必要的营养成分,不适于较长时间的实验观察。

2 琼脂孔孵育法

首先用无菌的 1.5%琼脂预制琼脂培养孔(agarose well),孔的直径和深度根据需要而定。然后将血管条置于琼脂孔内,加无血清培养液。此前可先在培养孔底部加 3~4 滴纤维蛋白原或胶原液,然后置 35~37℃培养箱中孵育。该方法适用于较长时间的血管条孵育,且培养液中无需加血清,但预先要制备琼脂培养孔、胶原或纤维蛋白原液。Nicosia 等^[4]用 1.5%琼脂(M-A 型)制成直径为 10 mm 和 17 mm 的培养孔,在孔底部加 4 滴

纤维蛋白原溶液;取 Fischer 344 大鼠胸主动脉,剪成 1 mm 长动脉环,然后置培养孔内,加无血清培养液。所用培养液有三种:MCDB 131、DMEMHamF12 混合液(1:1)和 MEM,培养液中可加青霉素(100 kU/L)、链霉素(100 mg/L)和两性霉素 B(0.25 mg/L),每周换液 2~4 次。对大鼠主动脉孵育于无血清培养液中微血管的生长情况进行观察,发现微血管的生成反应是有限的。最初 1 周持续有新的微血管生成,7~8 天达高峰,此后便开始快速消退。氢化可的松能抑制微血管生成,并认为无血清培养液是研究这种在血管生成抑制反应的可靠、敏感的方法。Villaschi 等^[5]运用同样方法观察雄性 Fischer 344 大鼠血管内源性碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)对新血管生成的影响,发现内源性 bFGF 对血管生成起重要促进作用。Nicosia 等^[6]用琼脂培养孔孵育大鼠主动脉达 20 余天,观察新的微血管中周皮细胞(pericyte)的形成及其来源。用免疫组织化学技术、植物凝集素标记、电镜和³H-胸腺嘧啶标记等方法,发现微血管形成早期,周皮细胞主要由内皮细胞形成,随后周皮细胞可包被微血管内腔,并从微血管底部迁移到顶部,周皮细胞可出现在培养的去内皮主动脉新内膜表面,在 DNA 合成期出现 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin)和 vimentin 的表达,说明这部分周皮细胞来源于血管平滑肌细胞。肝素能明显地减少这种周皮细胞的数量。实验证实不但内皮细胞能够分化成周皮细胞,而且邻近内皮下的平滑肌细胞也可分化成周皮细胞。

3 体外循环模拟法

尽管上述方法使血管在体外环境生存,但不很理想,最明显的缺陷是缺乏体内血管血液动力学环境和血管壁承受的压力。体外循环模拟可弥补这一缺陷,基本方法是:用一个蠕动泵建立体外培养液循环系统,并通过压力检测器检测和控制流经血管的“血压”和流速,并维持在正常生理范围内。使用的装置主要包括三部分:蠕动泵、三通玻璃储水池和压力检测器。该方法缺点是仪器多,增加了污染机会。但该方法既可防止血管塌陷导致血管内皮细胞损伤,又尽可能模拟血液动力学因素如血压和血流速度对血管壁细胞功能的影响,故越来越广泛地使用。Bardy 等^[7]用该方法观察新西兰家兔主动脉在不同压力和血流速度影响下血管壁所发生的结构适应性反应。组织形态学研究发现,动脉灌注压达 80 mmHg 以上时,内膜出现损伤并导致血管中层平滑肌³H-TdR 掺入率增加 2 倍,3~5 天达高峰,6~8 天恢复到原来的水平;而无“血流”和“血压”条件下

孵育 3 天,内膜完整,中膜亦无 DNA 合成增加;血清也影响平滑肌细胞 DNA 合成。内膜完整时给予血清,无论血流和压力如何,DNA 的合成均无改变;给予 80 或 150 mmHg 压力而无血清可导致 DNA 合成增加 8 倍以上,同时细胞纤维连接蛋白(Fn)合成也增加。表明在这种循环液培养体系中,血压、血流速度和血清对细胞 DNA 和蛋白质合成均有明显影响。他们还用同一方法观察家兔主动脉血压和血管紧张素 I (Ang I) 之间的关系及其 Fn mRNA 表达的影响^[8],证实局部肾素-血管紧张素系统的刺激介导管腔内压的产生;管腔内压和 Ang I 的增加促进血管 Fn 表达,并在 mRNA 翻译前水平受到调节。Chen 等^[9]也用该方法培养人冠状动脉,研究 bFGF 对动脉粥样硬化斑块的影响,发现外源性 bFGF 能刺激冠状动脉内皮细胞增殖,促进微血管生成,对斑块有一定的作用。

4 外翻管培养法

为了更直接地观察内膜改变,可将血管外翻,使内膜变成“外膜”后进行培养。Nicosia 等^[10]用该方法研究了血管生成过程中的内膜结构性变化。取大鼠胸主动脉(保存肋间动脉残枝 3~4 mm)剪除外膜,轻洗后用穿线直针小心穿过动脉腔,轻推血管使内膜外翻,去针后结扎另一端,并在血管的两端烧灼少许,以防残存的外膜组织出现在动脉外端。动脉外翻后置于含 MCD131 培养液的琼脂孔内,此前孔底部已加少许胶原,然后加入 50 mg/L 的庆大霉素,于 35.5℃ 培养箱中孵育。用免疫组织化学技术和超微电镜观察新血管生成过程中内膜的改变,发现新血管内皮来源于内膜层活化的内皮细胞;这些细胞相互爬行形成双层或多层细胞丘,成为微血管形成的萌芽。V β 因子相关抗原和 α -平滑肌肌动蛋白表达证实新的微血管腔内周皮细胞大部分来源于原血管的内皮细胞,少部分来源于血管平滑肌细胞。周皮细胞在新血管形成过程中的作用有待研究。血管外翻最适于内膜结构和功能研究,但外翻动作要轻,避免机械性损伤内皮细胞。

血管的器官培养方法多种多样,应根据实验需要以及实验室本身的条件决定用哪种方法。此外,培养液的选择和某些附加成分的取舍需要在实验中摸索。还应注意血管存在种系差异和器官位置差异。随着对血

管生理和病理研究的不断深入,血管的培养方法也逐渐改善和提高,并越来越广泛地运用于高血压、心肌梗塞、静脉血栓形成、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等病变的临床和基础研究。

参考文献

- 1 Mckenna TM, Clegg JM, Williams TJ. Protein kinase C is a mediator of lipopolysaccharide-induced vascular suppression in the rat aorta. *Shock*, 1994, 2: 84~89.
- 2 Yokoyama S, Korthis RJ, Benoit JN. Hypoxia-reoxygenation impairs endothelium-dependent relaxation in isolated rat aorta. *Am J Physiol*, 1996, 270: R126~131.
- 3 Jin N, Siddiqui RA, English D, et al. Communications between tyrosine kinase pathway and myosin light chain kinase pathway in smooth muscle. *Am J Physiol*, 1996, 271: H1 348~355.
- 4 Nicosia RF, Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. *Lab Invest*, 1990, 63: 115~122.
- 5 Villaschi S, Nicosia RF. Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol*, 1993, 143: 181~190.
- 6 Nicosia F, Villaschi S. Rat aortic smooth muscle cells became pericytes during angiogenesis in vitro. *Lab Invest*, 1995, 73: 658~666.
- 7 Barely N, Karillon GJ, Meroal R, et al. Differential effects of pressure and flow on DNA and protein synthesis and on fibronectin expression by arteries in novel organ culture system. *Circ Res*, 1995, 77: 684~694.
- 8 Baroly N, Joelle RM, Benessiano, et al. Pressure and angiotensin I synergistically induce aortic fibronectin expression in organ culture model of rabbit aorta. *Circ Res*, 1996, 79: 70~78.
- 9 Chu-Huang Chen, Hai Hoang Nguyen, Weilbaeher D, et al. Basic fibroblast growth factor reverses atherosclerotic impairment of human coronary angiogenesis-like responses in vitro. *Atherosclerosis*, 1995, 116: 261~268.
- 10 Roberto F, Nicosia, Bonanno E, et al. Large-vessel endothelium switches to a microvascular phenotype during angiogenesis in collagen gel culture of rat aorta. *Atherosclerosis*, 1992, 95: 191~199.

(1997-04-15 收到)