

建立血管壁模型的一种新方法及其应用

尹鸿操 陈铁镇 洪伟 董玉兰 杨向红

(中国医科大学实验病理学研究室, 沈阳 110001)

主题词 血管; 模型; 内皮; 细胞; 肌; 平滑; 羊膜; 脂质过氧化; 单核细胞; 动脉粥样硬化

摘要 为探讨建立血管壁模型的新方法, 采用胰蛋白酶和胶原酶处理人胎儿羊膜, 将人血管内皮细胞及平滑肌细胞分别培养在羊膜的两侧面, 用联胺诱发脂质过氧化, 观察单核细胞迁移的情况。结果显示, 内皮细胞及平滑肌细胞可分别培养在经过处理的羊膜的两面, 以构建成类似于机体的血管壁模型。该模型上的内皮细胞及平滑肌细胞发生脂质过氧化后, 大量单核细胞迁移入平滑肌细胞层。通过此模型可观察如单核细胞等其它血细胞在血管壁内的情况, 该构建血管壁模型的新方法对血管壁生理、动脉粥样硬化及炎症等方面的研究都很有意义。

Establishment of a Model of Vascular Wall and Its Application

YIN Hong- Cao, CHEN Tie- Zhen, HONG Wei, DONG Yu- Lan and YANG Xiang- Hong

(Department of Pathology School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, Experimental Pathology Research Laboratory China Medical University, Shenyang 110001, China)

MeSH Vascular; Models; Endothelium; Cell, Muscle, Smooth; Amnion; Lipid Peroxidation; Monocytes; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To establish a model of vascular wall and to introduce its application. **Methods** The human umbilical vein endothelial cells (ECs) and aortic smooth muscle cells (SMCs) were cultured separately on the two surfaces of a amnion membrane treated with trypsin and collagenase and the effect of lipid peroxidation (LPx) on the monocyte chemotactic protein (MCP- 1) expression in the above mentioned cells, was studied immunocytochemically. Monocyte migration through the ECs layer into the SMCs layer was observed under microscope. **Results** ECs and SMCs could be cultured on two surface of amnion to build a vascular wall model. After incubation with di- amide (DM), the ECs and SMCs on the amnion membrane expressed MCP- 1, and resulted in significantly increased monocyte migration through ECs and the amnion membrane into the SMCs layer. **Conclusion** This study established a model of vascular wall which is a very useful tool for the study on blood vessel biology, atherosclerosis and inflammation.

内皮细胞(endothelial cell, EC)及平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)是构成血管壁的主要细胞成份, 以往的研究将这两种细胞分离单独培养。本实验设计了用培养的人血管内皮细胞、羊膜及平滑肌细胞构建血管壁模型的新方法, 这对血管壁生理、动脉粥样硬化、炎症及肿瘤转移等方面的研究有重要意义。

1 材料及方法

1.1 材料

人血管内皮细胞取自健康新生儿脐带静脉。血管平滑肌细胞取自引产胎儿胸主动脉。人单核细胞由健康献血者的新鲜静脉血中分离。人单核细胞趋化蛋白- 1(monocyte chemotactic protein- 1, MCP- 1)单克隆抗体为日本・・・株式会社产品。RPMI- 1640培养基为GIBCO公司产品。

1.2 内皮细胞、单核细胞及平滑肌细胞的分离和培养

采用本研究室改进的Jaffe法^[1]分离人脐带静脉内皮细胞, 并用含20%胎牛血清的RPMI- 1640培养基培养。采用密度梯度离心法^[2]分离人新鲜静脉血中的单核细胞。在无菌条件下取引产胎儿主动脉, 剪成约1 mm²大小的组织块, 置于培养瓶内, 用含10%胎牛血清的RPMI- 1640培养基培养, 待平滑肌细胞融合后用0.125%的胰蛋白酶消化传代, 用第3~5代细胞进行下一步实验。

1.3 羊膜的准备及处理

取健康新生儿羊膜, 在无菌条件下用橡皮铲清理绒毛膜面, 用磷酸盐缓冲液冲洗。将羊膜置于0.5%的胰蛋白酶中, 37℃ 20 min, 再将羊膜置于室温0.25 mol/L的NH₄OH中2 h。用橡皮铲刮掉残存的上皮细胞并用磷酸盐缓冲液充分冲洗。

1.4 模型的建立

将修整好的羊膜固定在套在一起的两个塑料圈之间,并置于培养皿内,如图 1(Figure 1)所示。使羊膜原长有上皮细胞的一面向上,有绒毛的一面向下,形成上室及下室。在下室内加 0.01% 的胶原酶(Sigma) 37℃ 30 s,使羊膜更薄而疏松,用磷酸盐缓冲液充分漂洗。在 6 孔培养板内将培养装置倒置,下室向上,加入平滑肌细胞悬液(RPMI- 1640 培养基, 10% 胎牛血清,平滑肌细胞密度为 $2 \times 10^8/\text{L}$) 培养。2 天后,将羊膜已长有平滑肌细胞的一面向下,用无菌棉签轻轻擦掉羊膜上由平滑肌细胞分泌的细胞外基质,或用 0.01% 胶原酶消化 30 s。用 37℃ 磷酸盐缓冲液轻轻冲洗后在上室加入内皮细胞悬液(RPMI- 1640 培养基, 20% 胎牛血清,内皮细胞密度为 5×10^8 个/L),培养 2 天后进行实验。

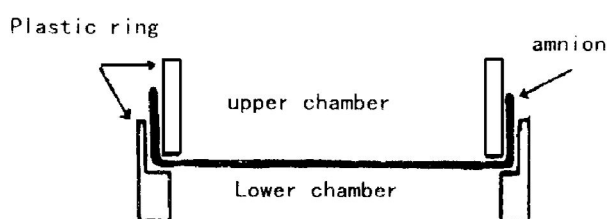


图 1. 血管壁模型培养装置示意图

Figure 1. The chamber for cell culture of the blood vessel wall model

1.5 脂质过氧化对单核细胞趋化蛋白-1 表达及单核细胞迁移的影响

将已培养好的血管壁模型分为实验组及对照组。对照组的上下室均加不含血清的 RPMI- 1640 培养基。实验组的上室加含 0.1×10^{-4} mol/L 联胺的无血清培养基,下室加不含血清的培养基。培养 60 min 后进行如下实验。

采用 γ TBA 法^[3]检测内皮细胞及平滑肌细胞过氧化脂质含量。将培养装置移入另一培养板内,对照组的下室及实验组下室加不含血清培养基,两组的上室加入单核细胞悬液(用 Hanks 液配制,单核细胞密度为 10^9 个/L)培养 2 h。37℃ 磷酸盐缓冲液洗涤后用 95% 甲醇固定,石蜡包埋,切片后进行 HE 染色,然后在高倍镜下观察单核细胞迁移情况。将对照组及实验组血管壁模型固定,包埋切片后用 ABC 法进行单核细胞趋化蛋白-1 免疫组化染色,第一抗体为鼠抗人单核细胞趋化蛋白-1 单克隆抗体,1:100 稀释。

2 结果

2.1 血管壁模型的建立

在相差显微镜下观察,SMC 在羊膜上生长一天后已呈多层排列,细胞轮廓不清。在上室加入 EC 后半小时即可见 EC 粘附在羊膜上,2 h 后 EC 伸展并开始融合,呈多边形排列。经切片及 HE 染色后可见扁平的 EC 呈单层排列在羊膜上,羊膜经过处理后呈很薄的膜状结构,羊膜下的 SMC 呈多层排列,胞核呈梭形(图 2, Figure 2)。

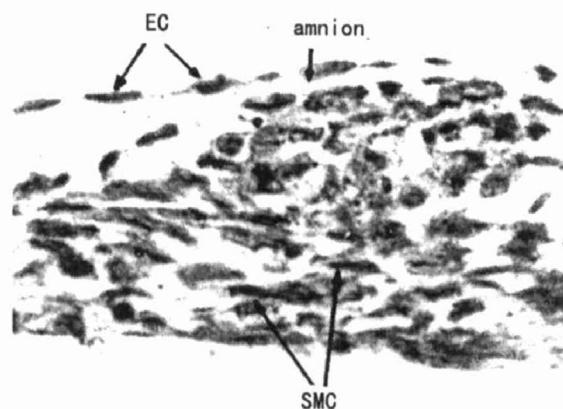


图 2. 血管壁模型的垂直切片(经 HE 染色, $\times 150$)

Figure 2. Perpendicular section of the blood vessel wall model (HE, $\times 150$)

2.2 平滑肌细胞及内皮细胞过氧化脂质含量

从表 1 (Table 1) 可见,实验组血管壁模型上 SMC 及 EC 过氧化脂质含量均显著高于对照组($P < 0.01$)。

表 1. 内皮细胞和平滑肌细胞丙二醛含量 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	DM dose	EC	SMC
Control	0	1.41 ± 0.14	2.22 ± 0.29
Experimental	0.1×10^{-4}	3.51 ± 0.26^a	6.975 ± 0.13^a

a: $P < 0.01$, compared with control group

2.3 脂质过氧化对单核细胞趋化蛋白-1 表达的影响

对照组内皮细胞及平滑肌细胞均呈阴性反应(图 3, Figure 3),实验组镜下可见内皮细胞及平滑肌细胞层有大量褐色阳性反应物(图 4, Figure 4)。

3 讨论

平滑肌细胞和 EC 是构成血管壁的主要细胞成分。EC 损伤或活化是动脉粥样硬化发病的始动因素,SMC 迁移到 EC 下并增殖是动脉粥样硬化病变的主要特征之一。以前的研究是将这两种细胞单独培

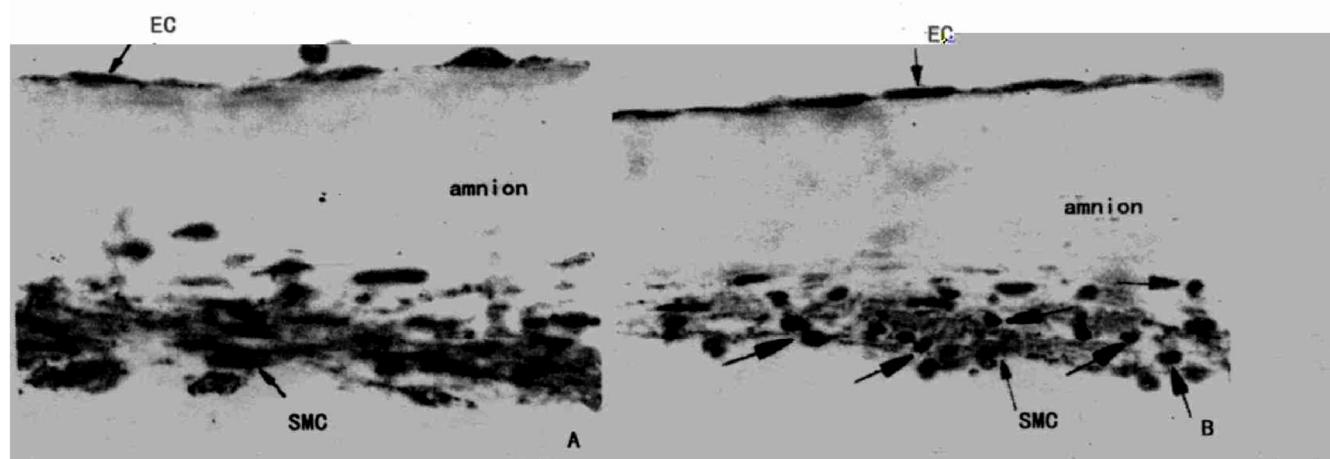


图3. A: 对照组血管壁模型垂直切片. B: 实验组血管壁模型垂直切片. HE 染色, 在平滑肌细胞层内可见很多单核细胞(箭头所示) (×200)

Figure 3. A: Perpendicular section of the blood vessel wall model of control groups. B: The blood vessel wall model incubated with diamide in the medium perpendicular section. HE, there are many monocyte (arrowhead) in the smooth muscle layer (×200)

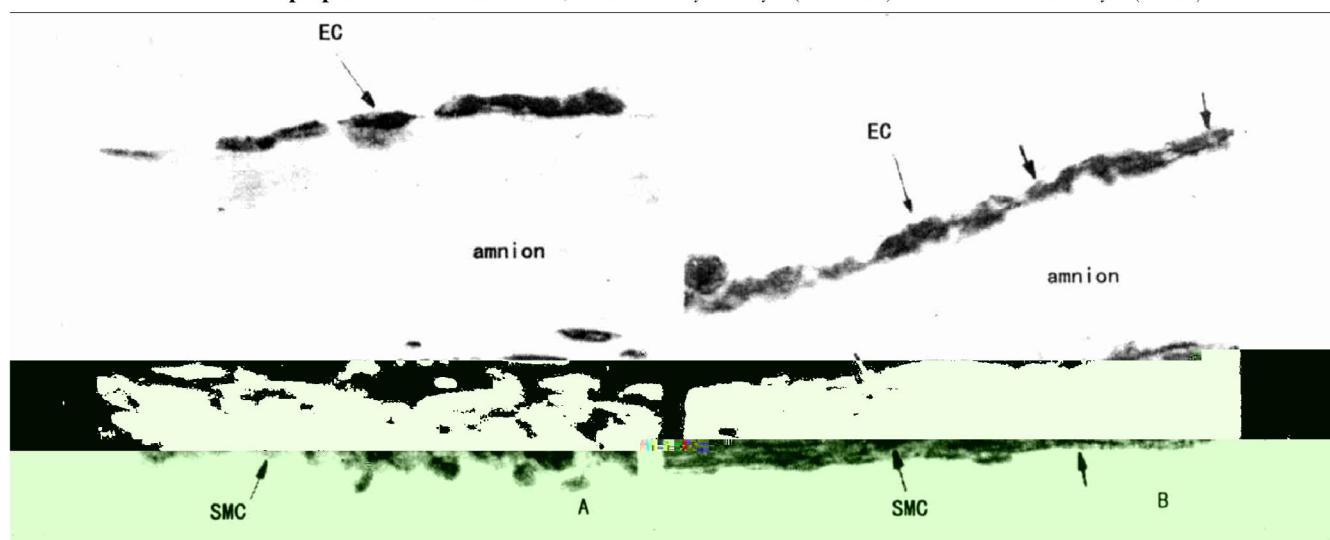


图4. A: 对照组血管壁模型垂直切片(用 MCP-1 单抗免疫组化染色后 ECs 和 SMCs 呈阴性反应). B: 用含联胺培养基孵育后, ECs 和 SMCs 显阳性反应(箭头所示) (×200)

Figure 4. The blood vessel wall model of control group (Perpendicular section, the ECs and SMCs showed negative immunostaining with anti-MCP-1 antibody). **B: When incubated with diamide the ECs and SMCs showed positive immunostaining** (arrowhead) (×200)

养,但在机体内这两种细胞之间存在复杂的相互作用,所以建立血管壁模型对研究动脉粥样硬化发病机理、血管壁生理及炎症反应等有重要意义。本室已首次在国内将人脐带静脉 EC 培养在羊膜上制成血管内膜模型^[4]。在此基础上,本实验设计了用 EC、SMC 及羊膜建立血管壁模型的方法。用本实验方法构建的血管壁模型,由上到下依次是内皮细胞、羊膜及平滑肌细胞。羊膜的主要成分是胶原纤维和基质,去掉上皮细胞后在上皮细胞面留有基底膜成份,而且羊膜经过胶原酶消化后更薄而疏松,有利于 EC 与 SMC 相互作用,所以用这种方法构建的血管壁模型在结构上十分近于机体状态。目前国外构建血管壁模型是先将平滑肌细胞培养在不透明的微孔

滤膜上,在平滑肌细胞上面加 iv 型胶原蛋白及人纤维粘连蛋白,然后在上面培养内皮细胞^[5]。同该方法比较,本实验方法有以下优点:将 EC 及 SMC 培养在透明的羊膜上,可在相关显微镜下观察到这两种细胞的生长状态,有利于模型培养成功,不需要很昂贵的 iv 型胶原蛋白及人纤维粘连蛋白,也可省略很多中间步骤。本实验观察到,血管壁模型上的 EC 及 SMC 不表达 MCP-1,而单独培养时则表达,在机体正常的血管壁上也检测不到 MCP-1 表达^[6]。这些结果提示血管壁模型上的 EC 与 SMC 之间存在相互作用,这两种细胞的功能发生了变化,较单独培养时更近于机体状态。本实验也观察到诱发模型上的 EC 及 SMC 脂质过氧化并表达 MCP-1,使大量单核

细胞穿过 EC 层迁入到 SMC 层,说明应用该模型可以观察单核细胞在血管壁内的迁移情况,也可以用此模型研究淋巴细胞等其它炎性细胞在炎症反应过程中及各种肿瘤细胞在转移过程中的生物学行为。所以本实验建立的这种构建血管壁模型的新方法对动脉粥样硬化、炎症反应及肿瘤转移等方面的研究都有重要意义。

参考文献

- 1 陈铁镇,张宝庚,王速,等. 培养人内皮细胞的研究. 中华病理学杂志, 1987, **16** (2): 136- 139
 - 2 Recalde HR. A simple method of obtaining monocytes in suspension. *J Immunol Methods*, 1984, **69**: 71- 77
 - 3 Hiroshi O, Nobuko O, Kunio Y. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, **95**: 351 - 358
 - 4 范江霖,陈铁镇. 血管内膜模型的建立及在动脉粥样硬化研究中的应用. 中华病理学杂志, 1992, **21** (6): 352- 355
 - 5 Mahanad N, Hough GP, Stevenson LW, et al. Monocyte migration into the subendothelial space of a coculture of adult human aortic endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1988, **82**: 1 853- 863
 - 6 Seppo YH, Lipton BA, Rosenfeld ME. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage- rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 5 252- 256
- (1999- 01- 03 收到, 1999- 07- 10 修回)
(此文编辑 朱雯霞)