

Ⅶ型胶原酶/弹性蛋白酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞

涂永生, 黄红林, 朱炳阳, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 消化, 酶; 肌, 平滑, 血管; 培养; 大鼠

[摘要] 为快速、成功培养大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞, 在无菌条件下分离大鼠胸主动脉, 并剥离外膜及内皮, 然后用Ⅶ型胶原酶/弹性蛋白酶消化血管中层。2 h 左右完全消化成单个细胞时, 离心收集细胞, 然后重悬、接种细胞。24 h 后便可见细胞贴壁, 4~5 天便可传代。传至第 3 代时, 用台盼蓝检查细胞存活率为 96%, 光镜和免疫组织化学鉴定培养细胞, 培养细胞纯度为 97%。与国内报道的贴块法及消化法相比, 用酶解法培养血管平滑肌细胞的培养周期缩短 4~5 天, 能更好的保护细胞, 维持细胞形状。

[中图分类号] R329-33

[文献标识码] A

Enzymatic Dispersion Method of Primary Culture of Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells

TU Yong-Sheng, HUANG Hong-Lin, ZHU Bing-Yang, and LIAO Duann-Fang

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

MeSH Digestion, Enzymatic; Muscle, Smooth, Vascular; Culture; Rats

ABSTRACT **Aim** To culture rat vascular smooth muscle cells by novel enzymatic dispersion method. **Methods** Rat aorta was removed from left subclavian origin to diaphragmatic insertion in sterile conditions. The vascular media was digested, then the cells were centrifuged and plated down in prepared flask. **Results** The primary vascular smooth muscle cells of rat aorta was performed successfully by using enzymatic dispersion method. The cell viability of third generation is 96% by trypan blue, and the cell purity is 97% tested by light microscope and immunocytochemical stains. **Conclusions** The growth period of enzyme-dispersed vascular smooth muscle cells is shorter by 4~5 days than that of explant method and enzymatic dispersion method reported in domesticity.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)是研究动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)、血管成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄(restenosis, RS)及高血压等疾病发病机制及其防治工作的重要研究对象。70 年代, 由 Ross^[1] 和 Campbell 等^[2] 采用贴块法培养 VSMC 获得成功。目前, 国内仍多采用贴块法^[3], 但贴块法培养周期长, 我室选用Ⅶ型胶原酶和弹性蛋白酶两种酶消化 VSMC, 并对此方法培养的 VSMC 生物学特性进行了鉴定, 建立了一种培养大鼠 VSMC 的新方法。

[基金项目] 国家自然科学基金(编号 39970847)及省自然科学基金(编号 99JY20032)。

[作者简介] 涂永生, 男, 1976 年出生, 湖北省石首市人, 药理在读硕士研究生。廖端芳, 男, 1959 年出生, 湖南省沅江市人, 教授, 博士研究生导师, 湖南省学位委员会委员, 南华大学药物药理研究所所长, 从事动脉粥样硬化发病机制及其防治的研究工作, 为本文通信作者。

1 材料与方法

1.1 试剂

胶原酶(Ⅶ型)、弹性蛋白酶均购自 Sigma 公司; α -Actin 抗体购自福州迈新公司; Hanks 液各成分均为市售分析纯; 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)购自德国 MERCK 公司; 新生牛血清(NCS)购自杭州四季青公司; DMEM 为 GIBCO BRL 产品。

1.2 取材

150~200 g 雄性 SD 大鼠(10~12 周龄)购自中南大学湘雅医学院实验动物中心。脱颈使其死亡, 颈动脉放血, 迅速取出胸主动脉(起于左锁骨下, 止于动脉进入膈的部位), 浸泡入装有无菌 Hanks 的培养皿中, 并转移到无菌超净台。

1.3 消化

分两次消化, 首先将动脉用 Hanks 液漂洗 2~3 次, 并剪去血管外脂肪及结缔组织, 放入 2 g/L 胶原酶Ⅶ(1 mL/aorta)消化液中消化 20~30 min。然后,

用 5 号镊子夹住外膜,向相反方向柔和拉扯除掉外膜。将动脉置于含 10%NCS 的 DMEM 中孵育 24 h。然后取出动脉,再放入含 2 g/L 胶原酶^①以及 0.25 g/L 弹性蛋白酶的复合消化液中(1.5 mL/aorta),在 5% CO₂、37℃培养箱中孵育 2 h 左右。

1.4 培养

血管被完全溶解后,加入含 20%NCS 的 DMEM 终止消化,150×g 离心 5 min,弃上清液,用记数板计数细胞,以 $(1\sim 3)\times 10^7$ /L 活细胞接种在含 20%NCS 的 DMEM 25 mL 培养瓶中。放入 5% CO₂、37℃培养箱中培养。24 h 后便可看到少量贴壁平滑肌细胞,2~3 天后更换新鲜培养液。5 天左右,细胞达到 70%~80% 融合时即可按常规方法传代。取第 3 代细胞进行生物学特性鉴定。

1.5 鉴定

将传代培养获得的血管平滑肌细胞滴种于培养皿里的盖玻片上,3~4 天贴壁生长后,依次做如下处理:培养皿里加入 1/3 培养液体积的 10% 福尔马林(双蒸水、40% 甲醛以 9:1 配制, pH7.2),预固定 15 min(在 37℃培养箱中温育),倾去培养液并用 PBS 漂洗 2~3 遍,再用 10% 福尔马林固定 20 min,然后用双蒸水冲洗。采用小鼠抗大鼠 α -Actin 免疫组织化学染色,鉴定血管平滑肌细胞肌动蛋白。根据 S-P 法的常规操作,以胞浆棕黄色为阳性结果。

1.6 传代细胞成活率

取消代传的血管平滑肌细胞悬液 9 滴,加入 1 滴 0.4% 台盼蓝液,混匀后吸取 1 滴于细胞计数板上,置显微镜下观察,凡着色细胞均为不正常细胞或死亡细胞。共计数 1 000 个细胞,计算细胞成活率。

1.7 冻存与复苏^[4]

冻存时取对数生长期细胞(前一天已换液),消化、离心,用 70% DMEM、20% NCS 和 10% 二甲基亚砜(DMSO)的冻存液制成细胞悬液,令细胞密度达到 $(10\sim 100)\times 10^8$ /L,然后转移到冷冻储存管中,置 4℃冰箱中 4~5 h 或过夜 $\rightarrow -20^\circ\text{C}$ 冰箱 1~2 h $\rightarrow -80^\circ\text{C}$ 冰箱中或放入液氮管。复苏时从液氮中取出细胞,立即放入 36℃~37℃水浴中,化冻、离心,用 20%NCS 的 DMEM 制成细胞悬液,细胞密度一般为 $(1\sim 10)\times 10^8$ /L。接种到 25 mL 培养瓶内,置于 CO₂ 培养箱中培养。

2 结果

2.1 细胞生长情况

接种第 2 天,原代培养细胞便可在倒置显微镜

下观察到。未贴壁的原代细胞有单个成椭圆形也有成团细胞。贴壁的原代细胞大小不等,形状多样,有长条形、带状三角形或星形等,细胞之间有突起相连。VSMC 有一卵圆形或圆形明亮的核,核中有 1~4 个大小不一、深色的核仁,细胞胞浆丰富,含少量颗粒(见图 1, Figure 1)。传代细胞接种于培养瓶 24 h 左右大多数细胞已贴壁伸展。未贴壁前细胞椭圆形、不透明、界限清楚,随后逐渐伸展,透明度增高,相互接触,呈典型的“谷与峰”生长(见图 2, Figure 2)。



图 1. 原代培养的血管平滑肌细胞($\times 200$)

Figure 1. Primary vascular smooth muscle cells($\times 200$)

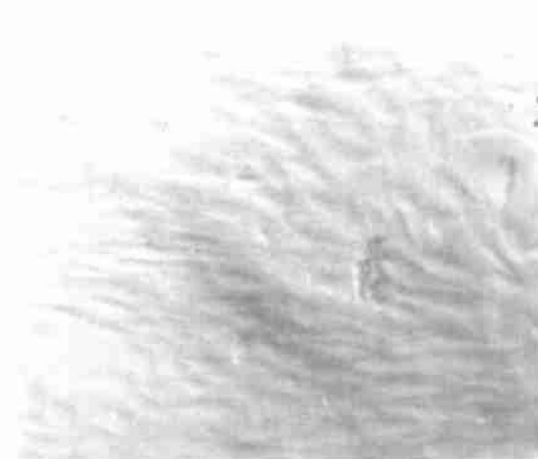


图 2. 正常生长的血管平滑肌细胞($\times 100$)

Figure 2. Normal growth of 3rd generation vascular smooth muscle cells($\times 100$)

2.2 肌动蛋白的免疫组织化学染色

运用 S-P 法对 VSMC 肌动蛋白免疫组织化学染色,97% 的细胞染色阳性。倒置显微镜下可见胞浆呈棕黄色,胞质中有较多的条丝状物,即为肌动蛋白。胞核为淡蓝色(见图 3, Figure 3)。



图 3. 抗 α -actin 免疫组织化学染色, 肌动蛋白为棕黄色 ($\times 400$)

Figure 3. Antiactin immunohistochemical stain (S-P), myofibrils appeared as brownish yellow filaments ($\times 400$)

2.3 台盼蓝染色结果

共计数 1 000 个细胞, 其中 40 个为阳性, 约有 96% 以上的细胞染色呈阴性, 表明培养的细胞消化传代成活率较高。

2.4 冻存与复苏

血管平滑肌细胞冻存于 -80°C 超低温冰箱中或液氮中, 复苏后仍能旺盛生长。

3 讨论

血管中膜的平滑肌细胞迁移、增殖和分泌功能的变化, 以及其信号转导在 PTCA 术后 RS、As 等心血管疾病的发病机制中发挥重要作用。如氧化应激条件下^[5], 活性氧可以激活细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulating kinase 1 and 2, ERK1/2), 从而刺激平滑肌细胞增殖; 同时, VSMC 还可以通过旁分泌/自分泌机制分泌 PDGF、EGF 和 CyPA 等生长因子, 从而激活 ERK1/2, 促进 VSMC 增殖。进行上述研究必须建立稳定生长的较纯细胞系或细胞株。国外文献培养 VSMC 多采用复合胶原酶法^[6], 而国内多采用贴块法^[3], 这两种方法方便、经济、技术难度低, 但贴块法培养周期长, 国内亦有酶消化法培养 VSMC^[7], 但所用酶种类及数量过多。如高平进等用胶原酶、弹性蛋白酶、大豆胰蛋白酶抑制剂和牛血清白蛋白消化培养 VSMC。本文仅选用胶原酶 ① 型和胰蛋白酶两种酶, 分两步消化亦成功培养了

VSMC, 国内尚未见类似报道。但据文献^[7]报道, 酶消化法可获收缩表型 VSMC, 而贴块法可获合成型 VSMC。关于 SMC 的生长特性, Campbell^[8]等作了详细介绍。因此, 在同一研究中应选用同一种平滑肌细胞培养方法, 否则会影响实验结果。

本方法操作简单, 但必须注意以下几点。取材严格无菌操作: 杀动物和取动脉宜分别在无菌手术室和细胞培养室进行。④消化程度: 要不断在显微镜下观察消化程度, 当血管成胶冻状, 镜下可见单个细胞或成团细胞时, 即可终止消化。50~60 min 时可用吹打管吹打几次以助消化。第 2 次消化之前, 让血管在含 20% NCS 的 DMEM 中孵育一晚, 可以促进 VSMC 活力, 同时可以检验以前操作是否污染。④消化分两步: 第一次消化目的是尽可能柔和而轻易除掉外膜及内皮, 避免大的损伤。

与国内报道的贴块法及酶消化法相比, 本方法有以下一些优点: 明显缩短消化及培养时间; ④收获的细胞数量多, 对细胞膜的损害程度轻。一次成功的制备可以产生 $(1\sim 3) \times 10^6$ 个细胞/aorta; ④细胞纯度高; 更好地保护离体细胞的性状和代谢。

参考文献

- [1] Ross R. The smooth muscle cell: iv. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers [J]. *J Cell Biol*, 1971, **50**: 172-186
- [2] Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. Smooth muscle cell in culture [J]. *Physiol Rev*, 1979, **59**: 1-61
- [3] 王关嵩, 杨晓静, 钱桂生, 等. 大鼠血管平滑肌细胞分离培养的探讨 [J]. 第三军医大学学报, 1998, **20**(4): 348-350
- [4] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995: 153-156
- [5] Liao DF, Jin ZG, Bass AS, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cell [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 189-196
- [6] Harder DR, Sperelakis N. Action potentials generation in reaggregates of rat aortic smooth muscle cells in primary culture [J]. *Blood Vessels*, 1979, **16**(4): 186-201
- [7] 高平进, 朱鼎良, 陈玉英, 等. 蛋白激酶 Ca 与血管平滑肌细胞表型转化 [J]. 中华心血管杂志, 1999, **27**(6): 453-455
- [8] Campbell JH, Campbell GR. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle [J]. *Clin Sci*, 1993, **85**: 501-513

(此文 2001-06-04 收到, 2001-10-16 修回)

(此文编辑 朱雯霞)