

胰酶消化法培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞

毛昱嘉, 王文杰

(中国协和医科大学 中国医学科学院药物研究所, 北京市 100050)

[关键词] 细胞生物学; 胰酶消化法培养平滑肌细胞; 细胞培养; 胸主动脉; 平滑肌细胞; 大鼠

[摘要] 建立胰酶消化法培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞, 并和其他大鼠胸主动脉平滑肌细胞的培养方法相比较。在无菌条件下分离雄性 Wistar 大鼠胸主动脉血管中膜, 剪碎中膜, 在 37℃ 用 10 mL 0.25% 胰酶消化大约 3.5 h。中止消化后, 在 100 g 条件下离心 5 min, 收集细胞种入 25 cm² 细胞培养瓶。结果发现, 胸主动脉平滑肌细胞至少可以传 20 代以上, 并且细胞形态、生长特点、平滑肌 α 肌动蛋白表达不发生明显的改变。结果提示, 与目前的平滑肌细胞培养方法相比, 胰酶消化法培养平滑肌细胞的方法重复性好, 原代培养的平滑肌细胞具有数量多、生长迅速的特点。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Culture of Vascular Smooth Muscle Cells From the Rat Thoracic Aorta By Trypsin Digestion Method

MAO Yur Jia, and Wang Wen Jie

(Institute of Materia Medica Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

[KEY WORDS] Thoracic Aorta; Smooth Muscle Cell; Rats; Trypsin; Primary Culture

[ABSTRACT] **Aim** To develop a method of culturing vascular smooth muscle cells (VSMC) from isolated rat thoracic aorta and compare their growth with that of aortic VSMC by other culture method. **Methods** The vascular media of rat thoracic aorta was isolated from male Wistar rats in sterile condition. Mince the media, and suspend the media in 10 mL 0.25% trypsin for about 3.5 h at 37℃. After terminating the digestion, centrifuge the solution at 100 g for 5 min, and seed the cell into a 25 cm² vented cap flask. **Results** Thoracic aorta smooth muscle cell (SMC) were successfully passaged more than 20 times, without noticeable changes in morphology, growth characteristics, and smooth muscle α actin expression. **Conclusions** Compared with the currently employed methods, our technique has the advantages of good reproducibility, high yield of pure SMC and quick growth of primary culture.

动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄以及高血压等疾病常伴有血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的过度增殖, 因此 VSMC 是研究上述疾病发病机制和防治工作的重要对象。VSMC 培养常用的培养方法有贴块法^[1,2] 和酶解离法^[3]。目前国内实验室以贴块法培养平滑肌细胞为主, 但是贴块法培养周期较长, 从消化至细胞融合平均在 2 周左右, 并且贴块法培养所受影响因素较多, 成功率往往不太高。传统的酶解法大多使用各型胶原酶^[4] 或者协同弹性蛋白酶^[5] 共同消化血管中膜。

1 材料和方法

1.1 试剂和动物

胰酶购自 Sigma 公司; α -actin 抗体购自中山生

物技术有限公司; PBS 液各成分均为市售分析纯; 新生小牛血清购自 HyClone; DMEM 为 Gibco 产品。雄性 Wistar 大鼠 (2 只, 体重 175 $\pm$ 25 g) 购自中国医学科学院实验动物中心。

1.2 胰酶消化法原代培养

Wistar 大鼠处死, 迅速取出胸主动脉, 浸泡在含无菌 PBS 的表面皿中, 转移到无菌超净台。在表面皿中漂洗主动脉去除残留的血迹, 纵向剪开主动脉, 把主动脉铺平并使内膜朝上, 用镊子来回刮除内膜层, 剥离血管中膜。将剥离的血管中膜用眼科剪剪碎, 碎片大小在 1 mm $\times$ 1 mm 左右。装入含 0.25% 胰酶的玻璃培养瓶中于 37℃ 条件下消化。当在显微镜下观察组织块表面出现大量细胞时应立即加入血清终止消化, 一般消化的时间在 3.5 h。终止消化后将玻璃培养瓶置于 37℃ 空气摇床振摇 10 min, 继续用吹打的方法使组织块表面的细胞尽可能脱落。待细胞从组织块脱离后, 120 目细胞筛过滤, 转入离心管内离心, 弃上清, 用含 20% 小牛血清的 DMEM

[收稿日期] 2004-01-14

[修回日期] 2004-07-21

[作者简介] 毛昱嘉, 硕士, 研究方向为 PAF 受体拮抗剂在动脉粥样硬化早期病理生理过程中的作用, E-mail 为 maoyj_bj@hotmail.com。王文杰, 研究员, 研究方向为抗炎免疫药理学, 为本文通讯作者。

培养基吹打细胞,最后接种于 25 mL 培养瓶,放入 CO₂ 孵箱培养,48 h 后换液。

1.3 传代培养

细胞融合后,倒去旧的培养液,加入适量的 0.25% 胰酶,显微镜下观察,见细胞收缩后去除消化液,加入适量培养液,吹打细胞,以 1:2 接种于新培养瓶中,补足培养液,放入 37℃、5% CO₂ 孵箱培养。传代细胞从第三代开始可换用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养。VSMC 至少可以传 16 代以上,并且从第二代开始平滑肌细胞即可冻存。

1.4 动脉平滑肌细胞的鉴定

相差显微镜下,细胞未汇合之前多数呈梭形,至汇合后,部分区域细胞束状排列,呈典型的“峰和谷”状态。将传代获得的平滑肌细胞接种于盖玻片上,3~4 天后至亚汇合状态,取出细胞爬片,PBS 清洗后用 4℃ 纯丙酮固定 15~30 min,自然晾干。采用小鼠抗大鼠 α -肌动蛋白抗体免疫组织化学染色鉴定 VSMC 肌动蛋白。根据 S-P 免疫组织化学染色的常规方法,以平滑肌细胞胞浆棕黄色为阳性结果。

1.5 冻存与复苏

取对数生长期 SMC,消化、离心,用 50% DMEM

培养基、40% 小牛血清、10% DMSO 的冻存液制成细胞悬液,细胞密度在 5×10^6 个/mL 左右。转移入冻存管后置 -80℃ 冰箱过夜,然后置于液氮罐中冻存。复苏细胞时从液氮罐中取出,放入 37℃ 水浴,冻存液解冻后加入 10 mL DMEM 离心,最后用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基制成细胞悬液,转移入培养瓶后放入 CO₂ 孵箱培养。

2 结果

2.1 原代平滑肌细胞生长情况

0.25% 胰酶消化组织约 3.5 h,在显微镜下可见组织块表面出现大量细胞,但是消化液中并无单个细胞出现,这时应及时终止消化。经摇床振摇、吸管吹打后可见大量单个的平滑肌细胞。移入培养瓶后,显微镜下观察细胞多数呈圆形。48 h 换液后继续培养 24 h,圆形细胞开始延展,贴壁细胞多数大小不等,形状多样,呈梭形、或者三角形等形状(图 1A, Figure 1A)。继续培养 72 h,培养瓶中出现多处细胞集落,细胞紧密相连,这时即可进行传代培养(图 1B, Figure 1B)。

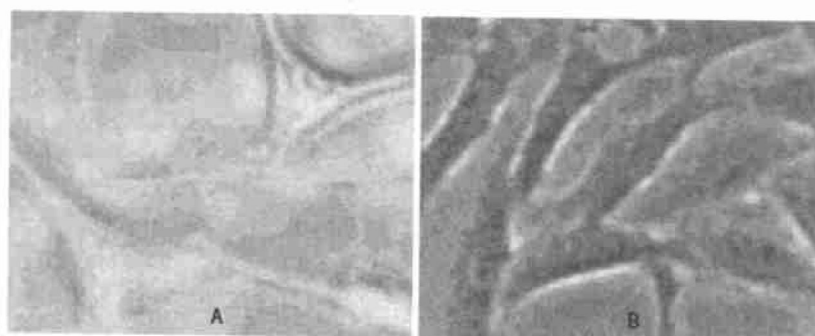


图 1. 平滑肌细胞原代培养后的相差显微镜观察 ($\times 100$) A 为 3 天, B 为 7 天。

Figure 1. Phase contrast microscopy of smooth muscle cell upon 3 and 7 days culture

2.2 传代平滑肌细胞生长情况

传代平滑肌细胞接种于培养瓶 12 h 后,细胞基本都已贴壁生长,形态多呈梭形或者长梭形,待细胞汇合后,传代细胞比原代细胞更易出现“峰和谷”的特征(图 2, Figure 2)。传代细胞至细胞生长再次汇合需要的时间因接种细胞密度的不同而有差异,平均在 5 天左右。

2.3 动脉平滑肌细胞的鉴定

运用 S-P 法对平滑肌细胞 α -肌动蛋白免疫组织化学染色,98% 以上细胞染色结果为阳性。倒置显微镜下观察可见胞浆呈棕黄色,并且含有与细胞纵轴平行排列的肌丝,细胞核用苏木素复染后呈淡蓝

色(图 3, Figure 3)。

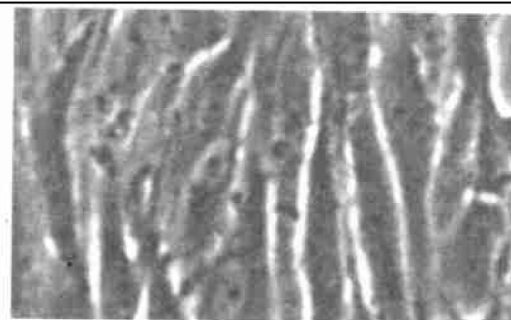


图 2. 细胞汇合后的第二代平滑肌细胞形态 ($\times 200$)

Figure 2. Second culture passage of smooth muscle cell after cell fusion

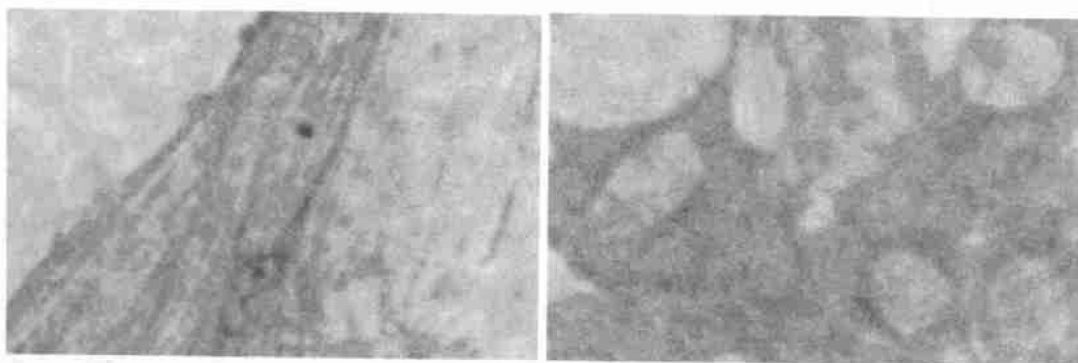


图 3. α -肌动蛋白染色鉴定动脉平滑肌细胞纯度 ($\times 200$)

Figure 3. The purity of third smooth muscle cell passage is tested by α -actin immunocytochemical stains

2.4 冻存和复苏

动脉平滑肌细胞从液氮中复苏后仍能旺盛生长。

3 讨论

胰酶消化法获得 VSMC 具有操作简单、成本低廉、成功率高、易获得大量细胞等特点。但是在操作过程中必须注意以下几点：分离血管中膜。血管中膜分离的好坏涉及到最后消化所得细胞的纯度，正确分离中膜应该是从血管外膜上剥离中膜层，而不是简单的用刀片刮去外膜层。由于位于血管内膜的内皮细胞是单层细胞，因此较易去除，一般只须用眼科镊子轻划几次即可。④消化程度。消化程度关系到细胞培养的成败，消化过长易导致细胞损伤过大不易成活，消化过短则不易产生细胞。胰酶消化中膜层有一特征，即由于胰酶消化能力较强，单个平滑肌细胞脱离中膜组织后迅速被胰酶解离成碎片。所以当在显微镜下观察发现中膜表面出现大量未脱离组织的细胞时应立即终止消化，通过在空气摇床的震荡以及吸管的不停吹打使粘附于中膜的单个细胞脱离组织游离到溶液中。待细胞大部分从中膜组织脱离后即可过滤、离心，最后加含 20% 血清的 DMEM 培养基种入培养瓶。为了避免细胞损失也可以省略过滤这一步，而通过细胞贴壁后倒除培养基的同时去除剩余的组织碎片。以上两点是胰酶消化中膜最关键的步骤。此外，由于消化过程中脱离组织块的平滑肌细胞基本都被胰酶解离为碎片，因此

建议在消化过程中不用振摇，待组织块表面出现大量细胞、终止消化后再通过振摇的方法使细胞脱离。整个操作过程中取材以及消化均须严格无菌操作。多次实验结果表明，取材大鼠的周龄对平滑肌细胞生长的快慢影响不大。平滑肌细胞同样也能在玻璃培养瓶中生长，但是生长情况差于塑料培养瓶。我室采用胰酶消化中膜获得 VSMC，具有以下优点：和贴块培养法相比明显缩短了培养周期和提高了实验的成功性，一般胰酶消化法从消化到细胞生长融合在 7 天左右。并且消化法可以通过显微镜确切把握细胞消化程度，只要消化程度恰当成功率可以达到 100%；④和传统的酶消化法相比，相对于胶原酶和弹性蛋白酶来说，胰酶价格低廉，实验成本明显降低。同时胰酶消化组织的时间显著低于胶原酶，一般胶原酶消化平均在 10 h 以上，而胰酶则在 3.5 h 后即可终止消化。综上所述，胰酶消化法简单易行、成本低廉，成功率非常高，具有很大推广价值。

[参考文献]

- [1] Ross Russell. The smooth muscle cell: iv. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*, 1971, **50**: 172-186
- [2] Chamley-Campbell J, Campell GR, Ross R. The Smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*, 1979, **59**: 1-61
- [3] Harder DR, Sperelakis N. Action potential generation in reaggregates of rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Blood Vessels*, 1979, **16**: 186-201
- [4] 汪浩川. 人动脉平滑肌细胞胶原酶解离培养方法. *中华病理学杂志*, 1995, **24** (2): 186
- [5] 涂永生, 黄红林, 朱炳阳, 廖端芳. ④型胶原酶/弹性蛋白酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 443-448

(此文编辑 文玉珊)