

一套系统培养鼠主动脉血管壁细胞简单可靠的方法

宋方¹, 吴强¹, 陆德琴², 袁军³, 杨永耀¹, 谭洪文¹

(1. 贵州省心血管病研究所 贵州省人民医院心内科, 贵州省贵阳市 550002;

2. 贵阳医学院病理生理学教研室, 贵州省贵阳市 550004; 3. 贵州省人民医院中心实验室, 贵州省贵阳市 550002)

[关键词] 主动脉; 原代细胞培养; 血管平滑肌细胞; 外膜成纤维细胞; 肌成纤维细胞

[摘要] **目的** 探讨一套系统培养鼠主动脉血管壁成分细胞的简单、可重复的方法。**方法** 分别采用植块贴壁法进行主动脉血管平滑肌细胞和血管外膜成纤维细胞、结扎贴壁法进行血管内皮细胞的原代培养, 胰酶消化传代; 差速贴壁法及自然纯化法进行细胞纯化; 转化生长因子 $\beta 1$ 诱导血管外膜成纤维细胞转化为肌成纤维细胞; 相差显微镜及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、血小板/内皮细胞黏附分子 (CD31)、波形蛋白 (Vimentin) 抗体两两联合的方式分别进行形态学和免疫细胞化学鉴定。**结果** 组织及细胞活性良好, 血管平滑肌细胞及血管外膜成纤维细胞原代培养周期为 10~12 天, 血管内皮细胞为 12~14 天。传代培养周期为 7~10 天。经纯化传代后的细胞纯度达 95%~100%。血管平滑肌细胞呈典型的“峰-谷”状生长, α -SMA(+) / Vimentin(-); 血管内皮细胞呈“铺路石”样外观, CD31(+) / α -SMA(-); 血管外膜成纤维细胞形态和血管平滑肌细胞不易区分, Vimentin(+) / α -SMA(-), 诱导的肌成纤维细胞 Vimentin(+) / α -SMA(+)。原代细胞传至 10 代以上仍未见生长活力减退。**结论** 我们建立了一套系统培养纯度高、生长状态良好的大鼠主动脉血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、血管外膜成纤维细胞及肌成纤维细胞的简单可靠、重复性好的方法。该法对培养小鼠主动脉壁成分细胞仍然适用。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

The Simple and Reliable Methods of Systematically Culturing Rat Aortic Wall Cells

SONG Fang¹, WU Qiang¹, LU De-Qin², YUAN Jun³, YANG Yong-Yao¹, and TAN Hong-Wen¹

(1. Cardiovascular Institute of Guizhou & Department of Cardiology, Guizhou Province People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 2. Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China; 3. Department of Central Laboratory, Guizhou Province People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[KEY WORDS] Aorta; Primary Cell Culture; Vascular Smooth Muscle Cell; Adventitial Fibroblast; Myofibroblast

[ABSTRACT] **Aim** To discuss a set of system to culture vascular smooth muscle cell (VSMC), vascular adventitial fibroblast (VAF) and vascular endothelial cell (VEC) from murine aorta, which are simple, reliable and easy to replicate.

Methods The primary culture of VSMC, VAF and VEC used the tissue adherent method, trypsin digestion for passage transfer. The cells were purified by differential adherent and natural growth purification. Myofibroblast (MF) was transformed from VAF by growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) induced. Phase contrast microscope and immunocytochemistry staining were used to identify the morphological and the immunological characteristics, respectively.

Results The tissues and cells activity were excellent. The growth cycle of primary VSMC/VAF and VEC were 10~12 days and 12~14 days, respectively. And passage cycle was 7~10 days. After being purified and subculture, the cells purity achieved 95%~100%. The growth characteristics of VSMC assumed the model “peak and valley”, and with anti α -SMA (+) / Vimentin (-); the VEC assumed “pebble-like” appearance, and anti CD31 (+) / α -SMA (-); the staining of VAF were Vimentin (+) / α -SMA (-), while the induction MF were Vimentin (+) / α -SMA (+). The primary cells were successfully passaged more than 10 generations, without growth vigor decreasing.

Conclusion We have established a set of system methods to culture the primary VEC, VSMC, VAF and MF of rat aorta origin, the advantages of our approach

[收稿日期] 2010-11-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30871003); 贵州省优秀科技教育人才省长基金项目(黔省专合字[2009]30号)

[作者简介] 宋方, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为冠心病及心力衰竭的基础与临床, E-mail 为 songfangheart@yahoo.com.cn。通讯作者吴强, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病与心力衰竭的基础与临床, E-mail 为 waqqaa@yahoo.com.cn。陆德琴, 博士, 副教授, 研究方向为心肺病理生理。

are simple, reliable and easy to replicate, while the cells have high purity and excellent biological activity. This method is still suitable for culturing the ingredient cell of mouse aorta vessel wall.

血管壁及血管腔内多种细胞和细胞内外各种细胞因子之间的相互作用在动脉粥样硬化、高血压、血管介入治疗及冠状动脉搭桥术后再狭窄等血管增殖性疾病的发生、发展过程中起着重要的作用,其中血管内皮细胞(VEC)、血管平滑肌细胞(VSMC)及血管外膜成纤维细胞(VAF)的角色尤为重要。以VEC、VSMC、VAF及肌纤维细胞(MF)为有效干预靶点和调控终端,进一步阐明其生物学功能,对防治血管增殖性疾病具有重要的临床意义^[1-3]。目前鼠种属来源的基因及生物学试剂等配套最为完善,因此鼠种属来源的细胞及动物模型也最常应用于基础及临床前研究。目前国内外并无商业化的鼠种属来源的VEC、VSMC、VAF及MF原代细胞及细胞株出售。本研究在参考相关文献的基础上,实验并总结出一套系统培养鼠主动脉血管壁各种成分细胞的简单可靠、可重复的方法,成功培养出纯度高、结构和功能良好的细胞,为相关研究提供实验材料。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

SD大鼠,雌雄不限,体重120~150 g,约6周龄,购于第三军医大学实验动物中心。DMEM高糖培养液、标准南美胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素溶液(100×青-链霉素,含10 MU/L青霉素+10 g/L链霉素)、HEPES(1 mol/L, pH 7.2)、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液均为Hyclone公司细胞培养产品;L-谷氨酰胺(200 mmol/L)购自碧云天生物技术有限公司;TGF- β 1(T7039)、肝素(H0878)购自Sigma公司;经表面改性处理的25 cm²一次性细胞培养瓶、一次性6孔细胞培养板为Corning公司产品;兔IgG抗CD31多克隆抗体(BA2211)、小鼠IgG抗Vimentin单克隆抗体(BM0135)、小鼠IgG抗 α -SMA单克隆抗体(BM0002)、即用型SABC试剂盒、DAB显色试剂盒为武汉博士德公司产品。

1.2 无菌获取鼠主动脉全段

大鼠用8%水合氯醛按0.5 mL/100 g体重腹腔麻醉后,剃去胸腹部手术区过密的鼠毛,手持鼠耳将整只鼠浸入75%医用酒精中消毒约5 min(勿使大鼠的口鼻浸入酒精)。将大鼠仰卧放置于超净台内的无菌弯盘内,碘伏充分消毒胸腹部皮肤。沿腹中线剪开胸腔、腹腔,充分暴露、分离走行于脊柱前的主动脉全

段。向左心室内注射含1 MU/L肝素的无菌PBS 1 mL,剪断腹主动脉下端放血,取主动脉全段(约4~5 cm),置于含1 MU/L肝素及4×青-链霉素溶液的PBS(溶液C)的平皿中。为了避免前述操作及同时解剖多只大鼠可能产生的交叉污染,用酒精擦拭平皿及手套后送另一超净台内进行后续操作。

1.3 植贴壁法培养原代鼠主动脉血管平滑肌细胞和血管外膜成纤维细胞

在另一超净台内用溶液C洗净血管,袖套样剥离血管外膜及粘连的组织,齐根修剪腹主动脉的分支动脉。纵向剪开血管,将内膜面朝上固定,用眼科弯镊推刮内膜面2次。将动脉用PBS漂洗后置一新平皿中,用1~2滴FBS浸湿后剪成约1 mm³/块大小的肉糜后用弯头吸管及牙科探针分装铺入25 cm²培养瓶贴壁培养(1条血管可分装1~2瓶,组织块间隔3~5 mm均匀摆放),向瓶底加入6 mL培养液A(即原代VSMC、VAF培养基,含15%~20% FBS、1×青-链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺、10 mmol/L HEPES的高糖DMEM培养液),置37℃、5% CO₂培养箱中半开放培养,2~4 h后将瓶由直立缓慢放平,绝对静置培养7~9天后去除漂浮组织块并更换新鲜培养液(图1)。

1.4 结扎贴壁法培养原代鼠主动脉血管内皮细胞

在超净台内截取无分枝的胸主动脉约3 cm,缝衣针去尖,牵引缝线穿过血管腔,缝线的远端就近结扎动脉远端,血管钳牵引缝合线近端,同时用镊子夹住血管近端一角,轻轻反方向牵拉血管,使主动脉内膜面完全翻出,血管近端折入3 mm后缝扎该端,此时动脉两端被完全折入封闭。每个25 cm²培养瓶中置1条血管,加入约4 mL培养液B(即原代VEC培养基, FBS浓度为20%,添加0.1 MU/L肝素,余同培养液A),液面仅遮盖主动脉即可,置于孵箱中培养。可用镊子轻压血管使之与瓶壁接触较紧密、接触面积更大。7天后换液,以后每3~5天换液1次(图1)。

1.5 传代及纯化

首次传代:待细胞长至80%汇合度,轻轻晃动培养瓶及吸管轻轻吹下并吸去组织块,用不含钙镁的D-Hanks洗2遍,加入胰酶消化液约0.45~0.75 mL(视细胞密度)使其恰好覆盖细胞表面,室温下消化大约1~2 min,肉眼见瓶底细胞簇回缩,出现“针孔现象”或细胞脱落滑壁现象时加入培养液终止消化,轻轻拍打培养瓶壁及水平晃动培养瓶见

大部分细胞脱壁,再用吸管从上至下依次均匀吹打瓶壁使余下细胞脱壁;将细胞悬液按 1:3 接种到新的培养瓶中,补足培养液至每瓶 4 mL。差速贴壁法纯化 VSMC: 培养 45 min ~ 1 h 后取出培养瓶并直立,轻轻将尚未贴壁的细胞悬液吸至新培养瓶,12 mL 悬液分装 2 瓶,即为纯度较高的 VSMC。向原培养瓶底部各加入 6 mL 培养液,已贴壁者为以 VAF 为主的混合细胞。随着 VAF 的优势生长,VSMC 及 VEC 的比例会逐渐降低以致 3 ~ 5 代后消失。第 2 ~ 3 代及以后的传代仍可根据杂细胞的比例(据前次差速贴壁法后显微镜下观察贴壁/悬浮细胞的比例)采取同样的差速贴壁法再次纯化。若原代 VEC 显微镜下可见明显的纤维样细胞污染可采取同上的差速贴壁法纯化细胞(图 1)。传代细胞用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养,一般每 3 ~ 5 天换液(1 传 3 为 3 天,1 传 4 为 4 ~ 5 天),7 ~ 10 天传代。

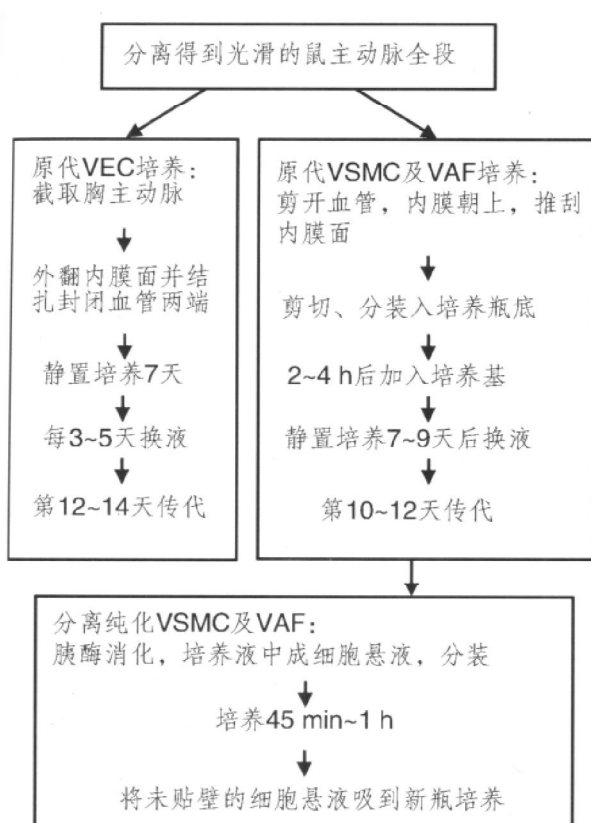


图 1. 大鼠主动脉血管壁细胞的原代培养及分离纯化流程图

Figure 1. The flow chart of the primary culture of rat aortic vascular wall cells and its isolation and purification

1.6 肌成纤维细胞的诱导

VAF 经传代纯化后(3 ~ 5 代),用含 0.5% FBS 的低血清 DMEM 静止约 48 h 后,滴入 TGF- β 1 使其

终浓度为 10 ~ 20 μ g/L,作用于静止后的 VAF 约 24 h 诱导其转化为 MF^[4]。

1.7 免疫细胞化学鉴定细胞类型及纯度

将 2 ~ 4 代细胞悬液接种到置有 18 mm \times 18 mm 盖玻片的直径 35 mm 培养皿或 6 孔板中,制备细胞爬片。待细胞生长达亚融合时,取出细胞爬片,PBS 洗后用 4 $^{\circ}$ C、4% 多聚甲醛固定 10 ~ 15 min 以上,按常规 SABC 法分别显示细胞特征性标志抗原 CD31(VEC 特异性)、Vimentin(VEC 及成纤维细胞特异性)、 α -SMA(VSMC 特异性),一抗稀释度为 1:250。苏木素衬染核,不加一抗为空白对照。对于四种血管壁细胞的鉴定可以利用特征性抗原在不同细胞类型之间的表达差异及原代培养时主要混杂细胞的类型,采用阳性和阴性表达抗原两两联合的方式鉴定。如采用抗 α -SMA(+) 联合抗 Vimentin(-) 来鉴定 VSMC 及计算杂细胞 VAF 的比例。同理,VEC 鉴定使用抗 CD31(+) 及抗 α -SMA(-),VAF 使用抗 Vimentin(+) 及抗 α -SMA(-),MF 使用抗 Vimentin(+) 及抗 α -SMA(+). 自传代第 2 ~ 3 代始,每种细胞类型取 2 ~ 3 次不同代次细胞,每张玻片 400 倍镜下随机记数 5 个视野,记数阳性细胞表达率或杂细胞率。

2 结果

2.1 细胞生长周期及形态学特点

原代培养一般 3 ~ 5 天后镜下即可见到散在或小区的细胞迁出,通过观察培养液颜色偏黄程度决定换液时间。植块贴壁法在接种 7 ~ 9 天后首次换液,10 ~ 12 天时细胞达 80% 以上汇合即可传代;结扎贴壁法 5 ~ 7 天后首次换液,原代培养周期约 12 ~ 14 天,迁出生长的细胞覆盖培养瓶面积的 2/3 以上,约 80% 的细胞汇合度时传代。传代细胞培养周期为 7 ~ 10 天。原代培养的细胞形态大小不一,为多种细胞成区域性混杂生长,以 SMC 为主的纤维样细胞密度低时可见长短不一的数个细胞突起,细胞呈长梭形,部分融合后交织成网带状(图 2A)。SMC 生长致密时细胞排列成束或为旋涡状(图 2B、2D 及 2F),呈典型的“峰-谷”状态(图 2C)。少量成片的内皮细胞为扁平的多角形,细胞间紧密相靠,呈“铺路石”样外观(图 2D 和 2E)。原代培养的 SMC 及成纤维细胞体积小,很饱满,故胞质折光性强,看不清细胞轮廓。传代及纯化后的原代 SMC 系生长特征更加明显,细胞突起增多,胞质伸展,至融合时细胞密度仍不均一,瓶内满布“菊花状”细胞

簇。亚融合的 VEC 瓶内背景略显“脏乱”，可能与其分泌多种细胞因子等相关。而 VSMC 及 VAF 培养瓶内环境清洁。

2.2 免疫细胞化学鉴定

阳性细胞轮廓清楚，核清晰可见，胞浆着棕黄色，背景清晰无着色。极少量的杂细胞轮廓不清，只见蓝色衬染的细胞核和非特异性着色(图 3C、3F 和 3I)。经传代及纯化后各代次阳性细胞率均在 90% 以上，其中第 2~3 代 VEC 细胞阳性率为 100%，VSMC 及 VAF 阳性率在第 3~4 代亦达 95% 以上(表 1)。VEC 细胞核不着色，胞浆周边着色，符合 CD31 表达特征(图 3A、3B 和 3C)；VSMC 核小，圆形居中，胞浆内大量棕色细长的与细胞长轴平行排列的 α 肌动蛋白丝(图 3D、3E 和 3F)。

表 1. 血管壁三种细胞的免疫细胞化学阳性表达率
Table 1. Positive rate of three type cells of vascular wall by immunocytochemistry

细胞类型	第 2 代	第 3 代	第 4 代
VEC(CD31 阳性率)	100%	100%	—
VSMC(α -SMA 阳性率)	95%	98%	—
VAF(Vimentin 阳性率)	—	90%	95%

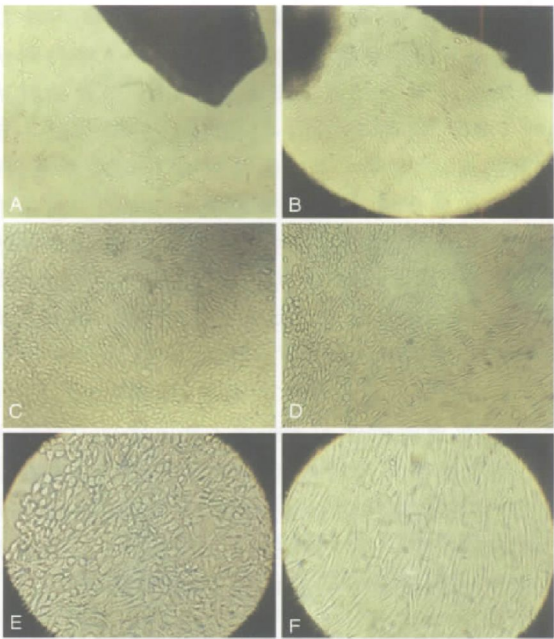


图 2. 组织块贴壁法培养的原代主动脉血管壁细胞光镜特征
A、B 和 C 为 40 × , D 为 ×100, E 和 F 为 ×200; A 摄于第 7 天, B 摄于第 9 天, C 摄于第 11 天。

Figure 1. Tissue adherent method cultured primary aortic vascular wall cells by light microscopy features

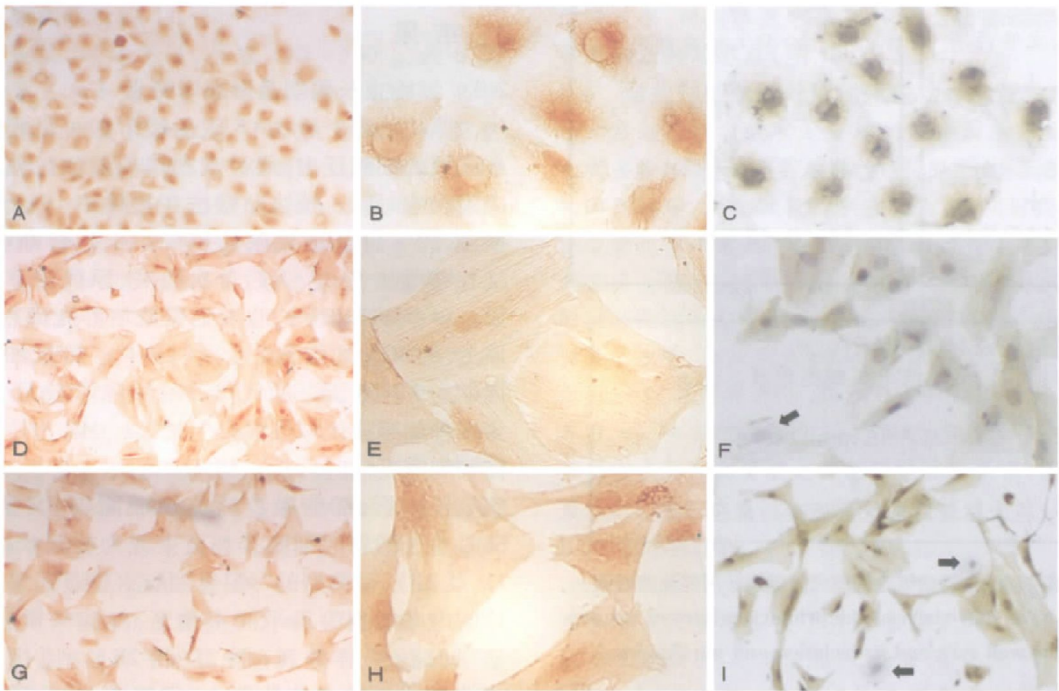


图 3. 主动脉血管壁细胞的免疫细胞化学鉴定 A、B、C 显示 VEC 胞浆 CD31(+) , D、E、F 显示 VSMC 胞浆平行排列的 α -SMA (+) , G、H、I 显示 VAF 胞浆 Vimentin(+) ; C、F、I 为苏木素衬染核, 黑色箭头所指为未见特异性一抗着色的阴性细胞。A、D、G 为 ×40 , B、C、E、H 为 ×200, F、I 为 ×100。

Figure 3. Aorta vascular wall cells identified by immunocytochemistry

3 讨论

3.1 鼠主动脉血管壁细胞原代培养常用方法

酶消化法比较适合于人、猪、牛等动物的大血管壁细胞的分离及原代培养,其血管粗,无分枝,操作容易,成功率高;植块法更适合于小动物的大血管如大、小鼠主动脉;剪碎后酶消化法适用于微小/毛细血管^[5]。目前常见的大、小鼠主动脉 VEC 或 VSMC 分离及原代培养的方法有酶消化法和植块/植环培养法等^[5-13],虽然对上述分离方法作了改进,但未见明显优势。

酶消化法培养周期稍短,但因酶活性的变化致使其作用时间及条件不宜掌握,方法难度较大、重复性差,且增加了污染机会。

3.2 本法操作要点及优势

关于动物的选择。同月龄的 SD 大鼠比 Wistar 大鼠体重大,雄性大鼠生长快于雌性。月龄长体重大的大鼠更易于取材及处理血管,但月龄大的大鼠细胞爬出率及增殖能力降低,120~150 g 大鼠对于组织块贴壁法已经足够,但采用结扎贴壁法培养 VEC 需要更粗大的血管,宜采用体重更大的雄性 SD 大鼠。事实上细胞的生长状态和速度受胎牛血清的品质及添加的生长因子等培养基成分影响更大。

注意取材的无菌操作及贴块技巧。①最好在一个超净台内取材后送至另一超净台内进行后续动作,避免交叉污染。在缓冲间取材则要注意避免血管暴露于敞开容器的时间过长及加用高浓度的双抗。②金属手术器械如剪刀刀口及镊子头部不小心接触到无菌区外后,需用无菌棉签沾 75% 以上医用酒精再次擦拭并置酒精灯外焰烧灼 5~10 s 后冷却使用。③取材时动作要快,剪下血管后大约 15~30 min 完成操作,以免影响组织及细胞活性。④通过心室内注射肝素及在含肝素的 PBS 中洗净血液,防止凝血效应对细胞的活化。⑤去内皮不推荐用刀片推刮,避免中膜损伤过大,VSMC 反而不易长出。若细胞迁出不佳,可无须推刮内膜或减轻弯镊推刮力度。如果单是培养 VAF,可加大刀片推刮内膜及中膜程度,以便尽可能去除 VEC 及 VSMC,使 VAF 呈优势生长。⑥组织块不应剪切过大,1~2 mm³ 较合适,组织边缘光滑,这样利于细胞从组织块中迁出和生长。组织块间距 3~5 mm,以保证细胞从组织块游出后有足够的生长空间并保持局部细胞密度的均匀,从而获得尽量多的原代细胞。⑦干涸时间短有利于组织块存活,而时间长则使组织块贴壁较牢不易被冲起。在不引起组织块大量漂浮的前提下翻瓶

越早越好,一般 2~4 h 内翻瓶,如果预先用 FBS 润湿过组织块,6~10 h 以内(如过夜)翻瓶均可。翻瓶时从培养瓶的一角试着平放,如果组织块大量飘起,则应延时翻瓶。⑧原代培养周期长,使用培养皿较易污染,故不便于采用直接通过外膜朝下或内膜朝下,刀片划成小块的方法培养^[12],实际上不管是哪面朝下,仍会有组织块周边的杂细胞爬出。且刀片划块的方法对组织块牵拉损伤较大,细胞迁出的时间延长、迁出的数量减少,即便成功细胞生长融合周期也会明显延长。

培养基及添加剂的合理选择。①高糖 DMEM、DMEM/F12 对于以上几种细胞的原代及传代培养均可,但 DMEM/F12 含葡萄糖等营养成分比高糖 DMEM 低,换液要及时提前。原代培养时一般 5 天后要观察培养基颜色偏黄决定是否换液,笔者经验发现 6 mL 培养液 A 足够 25 cm² 培养瓶内细胞融合。传代培养时使用四季青 FBS 亦可,但传代及换液周期适当延长。传代培养的 VEC 可不加肝素。②加入终浓度为 10 mmol/L HEPES 是为了使培养液的 pH 稳定在 7.0~7.4 之间,不含 HEPES 的 DMEM 缓冲能力不强,反复开瓶吸收空气中的 CO₂ 后 pH 易偏碱。大多数细胞耐酸不耐碱,VEC 及 VSMC 亦是如此^[14]。③含内皮细胞生长添加剂 (ECGS) 的培养基能促进内皮细胞的生长及纯化,一般认为使用胶原酶或明胶包被的培养瓶皿更有利于原代培养细胞的粘附^[12]。在原代细胞量少的情况下,例如用酶消化法获得少量的内皮细胞,经长时间酶消化及离心后细胞状态受损,则要求上述处理,以期给细胞生长提供更好的环境。另外,在人类 VEC 原代培养中多推荐添加 ECGS。贴壁法操作得当可获得大量未受损的原代细胞,能很快适用培养环境并生长良好,我们并未添加 ECGS 及预包被培养瓶,采用此简单的方法获得了大量优良的原代细胞。FBS 含多种细胞生长因子及激素,肝素除能防止取材时血液凝固引起的内皮细胞活化外,还能促进肝素结合型的生长因子(如 ECGF、FGF 等)的活性^[15,16],高浓度的优质 FBS 及添加的肝素可能替代 ECGS 的功效。④TGF- β 1 是 MF 分化的关键因素^[3], 1×10^{-7} mol/L 血管紧张素 II 常用来诱导 VAF 转化为 MF,血管紧张素 II 对 MF 的影响和 TGF- β 1 部分一致^[4]。

细胞的纯化。差异贴壁法分离 VEC/VAF 与 VSMC 一般时间设为 30 min~2 h。由于本法培养的细胞状态良好,改进的胰酶消化法无须离心,减少了对细胞的刺激,我们发现培养 45 min~1 h 时已贴

壁细胞和悬浮细胞层次感清晰。若要在第1~2代即获得高纯的VAF,可在静置培养30 min后即吸出未贴壁细胞。有报道采用空气推注法除去VEC^[17],显微镜下机械刮除法去除小范围的杂细胞簇,笔者认为操作实用性不强,应尽量避免。早先的研究多借助仪器(如抗体包被的免疫磁珠^[18]、流式细胞仪^[8])来分离纯化VEC,增加了培养成本等。利用差异贴壁法分离VEC/VAF与VSMC,优势细胞呈优势生长的自然纯化作用是简单、可重复的纯化细胞的可靠方法。

血管中的MF主要来自VAF的活化,是一种具有SMC胞样特点的成纤维细胞,获得了表达SMC特征蛋白 α -SMA的能力,能迁移至内膜并增生形成新生内膜,参与血管重塑过程^[3,4]。TGF- β 1是MF分化的中心调节因素,缺乏TGF- β 1成纤维细胞在体外并不能分化为MF^[3]。我们发现终浓度为10~20 μ g/L的TGF- β 1作用于饥饿静止后的VAF均足够诱导其分化为MF。

本法对小鼠主动脉原代VSMC、VAF及MF的培养仍然适用。小鼠主动脉细小,对于VEC的培养可参照Kobayashi等^[12]方法,或在推刮损伤外膜及中膜后按文中的植块贴壁法培养。鼠主动脉VEC及VSMC原代细胞可传至10~20代以上^[6],本法培养的细胞传至10代以上仍未见生长活力退化。总之,我们建立了一套系统培养大鼠主动脉原代VEC、VSMC、VAF及MF的简单可靠、重复性好的方法,并且可根据所需原代细胞数量及种类按此法作出适当的调整。该法对血管组织操作步骤简单,快速,无需在冰上或4℃液体环境内操作,污染机会少,组织细胞损伤少,状态良好的组织细胞及尽早进入了培养环境为细胞的迁出和增殖奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767-801.
- [2] 陈灏珠. 实用心脏病学[M]. 第4版. 上海: 上海科学技术出版社, 2007; 57-62.
- [3] 邱菊辉, 王贵学, 罗向东. 肌成纤维细胞与血管内再狭窄[J]. *中华心血管病杂志*, 2009, 37(7): 663-665.

- [4] 郭淑杰, 吴凌云, 魏坚, 等. 血管外膜肌成纤维细胞分化相关蛋白研究[J]. *化学学报*, 2007, 65(15): 1504-510.
- [5] 林哲绚, 罗文鸿, 李慧. 鼠主动脉内皮细胞培养[J]. *汕头大学医学院学报*, 2004, 17(3): 182-184.
- [6] 毛昱嘉, 王文杰. 胰酶消化法培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(6): 729-731.
- [7] 潘礼龙, 戴敏, 王伟. 大鼠主动脉内皮细胞原代培养的研究[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(3): 410-413.
- [8] Magid R, Martinson D, Hwang J, et al. Optimization of isolation and functional characterization of primary murine aortic endothelial cells [J]. *Endothelium*, 2003, 10(2): 103-109.
- [9] 林哲绚, 罗文鸿, 李慧. 瞬间热处理大鼠主动脉内皮细胞分离培养法[J]. *解剖学杂志*, 2004, 27(5): 571-573.
- [10] 林京, 张子力. 改良植块贴壁法建立大鼠主动脉平滑肌细胞体外培养模型[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4): 827-829.
- [11] 宋明宝, 黄岚, 于学军, 等. 缝隙连接阻断剂对体外培养的大鼠血管平滑肌细胞表型转化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(2): 85-88.
- [12] Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, et al. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2005, 12(3): 138-142.
- [13] 张迎红, 胡豫, 梅恒, 等. 三种分离大鼠主动脉内皮细胞方法的比较研究[J]. *微循环学杂志*, 2007, 17(4): 15-16.
- [14] McGuire PG, Orkin RW. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrata [J]. *Lab Invest*, 1987, 57(1): 94-105.
- [15] Thornton SC, Mueller SN, Levine EM. Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation [J]. *Science*, 1983, 222(4624): 623-625.
- [16] D'Amore PA. Heparin-endothelial cell interactions [J]. *Haemostasis*, 1990, 20 (Suppl 1): 159-165.
- [17] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002; 1517-519.
- [18] Marelli-Berg FM, Peek E, Lidington EA, et al. Isolation of endothelial cells from murine tissue [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 244(1-2): 205-215.

(此文编辑 文玉珊)