

# 人隐静脉血管内皮细胞的分离、培养及鉴定

李斌\* 刘宁<sup>1</sup>

(云南大学药学院, 生物制药创新人才培养基地, 昆明 650091;

<sup>1</sup> 云南省第一人民医院产科, 昆明 650032)

**摘要** 利用冠脉搭桥术后遗弃的隐静脉段获取内皮细胞, 采用消化酶消化收集内皮细胞, 扩增、冻存、复苏, 在体外建立内皮细胞系。此方法简便易行, 能在体外获得大量生物学特性保持良好的内皮细胞, 为临床血管内皮化研究提供新的细胞来源。

**关键词** 隐静脉; 血管内皮细胞; 细胞培养

大血管内皮细胞(EC)在调控人体生理和病理生理方面具有非常重要的作用。它们在凝血、伤口愈合、血管壁调节和血液组织交换方面发挥着不可缺少的作用, 并在动脉粥样硬化、血管炎和肿瘤感染等疾病的病理学方面有重要作用<sup>[1]</sup>。我们利用人体隐静脉获取内皮细胞, 通过扩增、冻存、复苏, 建立了内皮细胞系, 并对其生物特性进行了研究, 为血管研究提供新的细胞来源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

隐静脉段: 收集急性心肌梗塞后实施冠脉搭桥术病人的隐静脉, 病人年龄在 50~70 岁之间, 多并发高血压或动脉粥样硬化征。术后遗弃的隐静脉约 10 cm, 保存在 4 °C “转移液”中带回实验室, 6 h 内操作。

### 1.2 试剂

隐静脉段转移液: 新鲜配制的 RPMI 1640, 含 100 U/ml 青霉素, 100 mg/ml 链霉素, 2.5 μg/ml 两性霉素和 100 U/ml 肝素。pH 7.2, 0.22 μm 过滤除菌。

内皮细胞培养基: M199 培养基购于 Sigma 公司。人血清由昆明市中心血站提供。经 0.22 μm 过滤两次除菌, 分装保存在 -20 °C, 时间不超过 6 个月。

### 1.3 酶消化法分离培养人隐静脉内皮细胞

参照文献[2]的方法分离培养隐静脉内皮细胞(HSVEC)。将带有灌洗针头注射器插入静脉一端, 用 PBS(含有 100 U/ml 青霉素, 100 mg/ml 链霉素, 2.5 μg/ml 两性霉素)反复冲洗静脉腔, 然后注入 1 g/L

胶原酶 II, 夹闭静脉两端置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 37 °C 温育 15 min, 收集消化液, 在 4 °C 560 g 离心 5 min, 用 2 ml M199(含 20 % 人血清, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/ml 链霉素, 2.5 μg/ml 两性霉素, 2 mol/L 谷氨酰胺)悬浮细胞沉淀。HSVEC 培养在 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内, 12 h 后换液, 以后隔日换液。

### 1.4 内皮细胞传代培养

当内皮细胞长成单层, 倒置显微镜下观察呈“鹅卵石”样铺平时, 倾去培养液, 加入适量 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 镜下观察大部分出现细胞圆缩, 并有部分细胞上漂时, 即弃去胰蛋白酶液, 加入培养液, 并将细胞吹打均匀, 按 1:3 比例传代。

### 1.5 内皮细胞冻存和复苏

冻存前一天以新鲜配制 M199 培养液换液 1 次, 以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化内皮细胞, 镜下观察细胞出现圆缩, 弃消化液, 加 M199 吹打均匀。加入冻存剂(20 % 胎牛血清, 含 10 % 二甲亚砜), 将细胞吹打均匀, 调整细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml, 标明日期、来源、数量、生长形态、生物学特性等, 以标准程序放入液氮内冷存。复苏时, 迅速取出冷存管投入 42 °C 水浴中, 不断摇动令其快速融化, 然后加入培养液后尽快种于培养瓶中, 6 h 后换液, 以后隔日换液。

### 1.6 内皮细胞的鉴定

在 24 孔培养板内放置无菌的盖玻片, 每孔中

收稿日期: 2004-12-13 接受日期: 2005-02-23

云南大学理(工)科级科研项目资助(No.K1059069)

\* 通讯作者。Tel: 0871-5031119, Fax: 0871-5035538, E-mail:

libin36@ynu.edu.cn

种植 1 ml 含有  $10^5$  个细胞的悬液。待内皮细胞生长至汇合时，取出盖玻片，用 PBS 洗涤 1 min，共 3 次，然后投入冷丙酮中，细胞面向上，作用 5 min，用 PBS 再洗 3 次，而后进行免疫组化染色，封闭液 37 °C 封闭 4 h，加兔抗人 vWF 和鼠抗人 CD31 抗体，放入湿盒内 4 °C 过夜。次日用 PBS 洗涤 3 次后，加入辣根酶标记的二抗，放入 37 °C 温育 2 h，再用 PBS 洗涤 3 次，用 SABC 显色试剂盒显色，显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 HSVEC 细胞形态和特征

刚消化下来的内皮细胞呈圆形，单个或成团，原代培养 12 h 后，贴壁呈多角形，培养 5~7 天，汇合成单层，细胞大小均匀，呈“鹅卵石”样平铺(图 1)。

### 2.2 HSVEC 的 vWF 和 CD31 抗体相关抗原免疫组化鉴定

光镜下观察 vWF 抗体染色中 95 % 的细胞呈阳

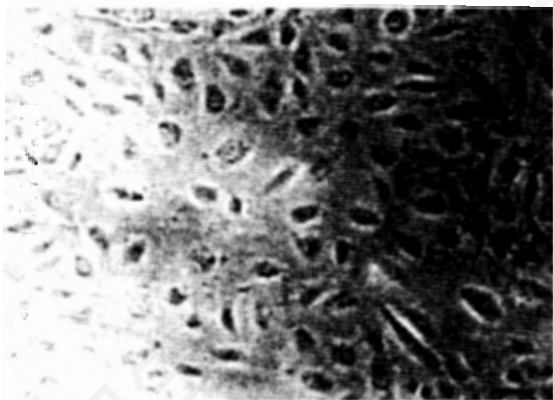


图 1 HSVEC 体外生长形态(光镜,  $\times 100$ )

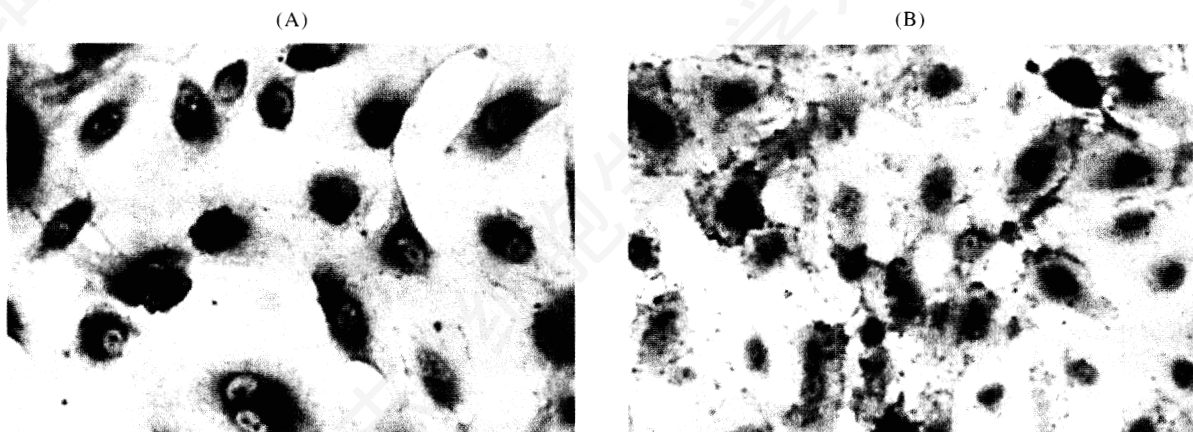


图 2 免疫细胞化学检测 vWF(A)和 CD31(B)的表达(光镜,  $\times 100$ )

性反应，胞浆内出现棕褐色颗粒(图 2A)，CD31 抗体染色也显示大部分细胞呈阳性反应(图 2B)，证明所分离的细胞是内皮细胞。

## 3 讨论

近年来人们对新血管生成过程的研究不断深入，特别是与其相关的多种病理被逐渐阐明，使得抗血管生成疗法被广泛关注。血管内皮细胞的激活增生是新血管生成过程的重要一环，也是很好的药物治疗靶点。我们采用胰蛋白酶消化分离 HSVEC，并以 20% 人血清培养液维持细胞，未发现有成纤维细胞或平滑肌细胞污染。培养的 3~7 代的 HSVEC 均具有形态学特征和细胞特有的单抗标记 vWF。通过扩增、冻存、复苏，建立了内皮细胞系，为临床血管内皮化研究提供了新的细胞来源。

用自体内皮细胞采集、扩增，但其技术要求高，所获细胞数量有限，且时效性差，不易作为常规方法为临床采纳<sup>[3,4]</sup>。我们选用冠脉搭桥术病人的隐静脉作为材料来源，方便、易取，同时由于是同种细胞，排异性小，通过扩增可获得大量的内皮细胞，经过冻存、复苏，可有效地保存和利用获得的内皮细胞，克服了因自体取材带来的获取细胞量少、时效性差、技术难度大等缺点，为临床研究提供大量内皮细胞提供了保证。

为获取足够数量的内皮细胞，应注意以下诸因素：培养液中应加入 20% 人血清为细胞增殖的最适合浓度。在高血清浓度下，HSVEC 的贴壁和增殖均不依赖于胞外基质。原代细胞种植密度宜在  $1 \times 10^5$  个/ml 以上，冻存细胞应在对数增长期，密度宜在  $1 \times 10^6$  个/ml 以上，密度过低，影响细胞生长，传代时应尽量将细胞吹打均匀，减少细胞团

块。换液周期应为隔天一次, 换液周期长会导致低增殖。复苏时, 水浴温度要准确, 冻融后种植的培养液应以新鲜配制的 M199 为宜。

### 参考文献 (References)

- [1] 穆 杨等. *动物医学进展*, 2002, 23: 82
- [2] Watkins MT *et al. J Surg Res.* 1984, 36: 588
- [3] Deutsch M *et al. J Vasc Surg.* 1997, 25: 757
- [4] 孙继虎等. *解剖科学进展*, 1997, 3: 1

## In Vitro Culture of Human Saphenous Vein Endothelial Cells

Bin Li\*, Nin Liu<sup>1</sup>

(School of Pharmacy, Center for Advanced Studies of Medicinal and Organic Chemistry of Yunnan University, Kunming 650091, China; <sup>1</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, the First Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

**Abstract** The human saphenous vein endothelial cells were successfully dissociated and cultured by using the human saphenous vein segments leftover from cardiac bypass surgery. Endothelial cells were received, proliferated, frozen, and resuscitated by using digestive enzyme. The content of living cells produced using this method is very high and the passage cells were similar to the primary culture in shape and on the growth rate. It was also shown that endothelial cells line *in vitro* can be established simply and timely using this method.

**Key words** saphenous vein; endothelial cell; *in vitro* culture

Received: December 13, 2004 Accepted: February 23, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Yunnan University (No.K1059069)

\*Corresponding author. Tel: 86-71-50311119, Fax: 86-71-5035538, E-mail: libin36@ynu.edu.cn

### 分子生物学基础实验技术培训班

(北京天为时代科技有限公司举办)

**培训宗旨:** 适应科学发展需要, 培养分子生物学领域初级技术人员。

**培训时间:** 周六、周日全天。

**培训内容:** 分子生物学基本实验技术的原理方法及常见问题分析和解决方案(包括: 理论讲解及实际动手操作)。

**第一部分: 分子生物学基础实验技术**

(1) PCR 技术原理及应用, 包括: 模板制备、引物设计、体系建立和 PCR 反应等; (2) 琼脂糖凝胶电泳技术; (3) DNA 片段的纯化回收; (4) 质粒的提取(菌体的收集、裂解及质粒的纯化、鉴定); (5) DNA 片段的克隆(DNA 片段与载体的连接、转化); (6) 重组菌的鉴定。

**第二部分: RNA 的相关实验及 DNA 的提取**

(1) 总 RNA 提取(细菌、酵母、组织、血液); (2) RT-PCR 反应; (3) 基因组 DNA 的提取。

**第三部分: 荧光定量 PCR 技术**

(1) 荧光定量 PCR 技术: 原理, 引物设计, 体系建立, 反应结果分析。

**第四部分: 蛋白质免疫反应相关实验(Western blotting)**

(1) 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术; (2) Western blotting 实验: 原理, 方法(蛋白质样品的分离、转膜、封闭、抗体反应、显色)。

**培训地点:** 北京天为时代科技有限公司分子生物学实验室

**公司地址:** 北京海淀区成府路 35 号北陆楼 4 层 邮编: 100083

**报名方式:** 电话: 010-62521767, 62526072 传真: 010-62551779 E-mail: people@tw-biotech.com

**招收人数:** 15~20 人/期。收费标准: 询价。

有关信息会定期在公司网站(www.tw-biotech.com)上发布, 欢迎大家咨询。