

放,但不影响触发递质释放的突触前 Ca^{2+} 浓度。电镜观察表明,注射 TeTox 的神经末梢,停靠(docking)和末停靠的突触小泡数目均增加。进一步研究证实 SB 蛋白的裂解引起递质释放量减少,但不影响小泡停靠。提示 SB 蛋白可能在突触小泡停靠与融合之间某一环节介导神经递质的释放。

参 考 文 献

- [1] 杜红燕,吴馥梅,1995,生物化学与生物物理进展,22(5):422.
- [2] Ovtsharoff W, Bergmann M, Marquze-Pouey B et al., 1993, Dev. Brain Res., 72: 219.
- [3] Bergmann M, Schuster Th, Grabs D et al., 1993, Dev. Brain Res., 74: 235.
- [4] Rubenstein JL, Greengard P and Czernik AJ, 1993, Synapse, 13: 161.
- [5] Koontz MA and Hendrickson AE, 1993, Synapse, 14: 268.
- [6] DeBello WM, Betz H and Augustine GJ, 1993, Cell, 74: 947.
- [7] Sheng ZH, Rettig J, Takahashi M et al., 1994, Neuron, 13: 1303.
- [8] Li C, Takei K, Geppert M et al., 1994, Neuron, 13: 885.
- [9] Trimble WS, Cowan DM and Scheller RH, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4538.
- [10] Smith SJ, Buchanan J, Osses LR et al., 1993, J. Physiol., 472: 573.
- [11] Huttner WB, 1993, Nature, 365: 104.
- [12] Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al., 1992, Nature, 359: 832.
- [13] Sanders D and Habermann E, 1992, Nannyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 346: 358.
- [14] Hunt JM, Bommert K, Charlton MP, et al., 1994, Neuron, 12: 1269.
- [15] Llinas R, Gruner JA, Sugimori M, et al., 1991, J. Physiol., 436: 257.
- [16] McMahon HT, Foran P, Dolly JO, et al., 1992, J. Biol. Chem., 267: 21338.
- [17] Pevsner J, Hsu SC, Braun JEA, 1994, Neuron, 13: 353.
- [18] Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, et al., 1993, Cell, 75: 409.
- [19] Bennett MK and Scheller RH, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2559.
- [20] Kaiser CA and Schekman R, 1990, Cell, 61: 723.
- [21] Hess SD, Doroshenko PA and Augustine GJ, 1993, Science, 259: 1169.
- [22] Monck JR and Fernandez JM, 1994, Neuron, 12: 707.
- [23] De Hoop MJ, Huber LA, Stenmark H, et al., 1994, Neuron, 13: 11.
- [24] Schweizer FE, Betz H and Augustine GJ, 1995, Neuron, 14: 689.
- [25] 强梅等, 1996, 生理科学进展, 27(3): 268.
- [26] De Camilli P and Takei K, 1996, Neuron, 16: 481.

研究工作

恒河猴静脉内皮细胞培养的研究

潘玉先 潘明新 何红兵 杨继震

(第一军医大学附属珠江医院普外科血管病研究室 广州 510282)

自从人工血管内皮细胞移植技术引入血管外科领域后,使人工血管置换小口径动脉后的五年通畅率大大提高^[1]。如何获取足量的自体内皮细胞是该技术成功与否的关键。我国人工血管内皮细胞移植研究仅限于低等动物^[2-4],所得结果对临床应用的指导意义十分有限。我们成功建立了稳定的恒河猴血管内皮细胞原代

及传代培养方法。为人工血管内皮细胞移植的临床基础研究奠定了坚实的基础。

材 料 和 方 法

1. 恒河猴静脉内皮细胞的原代培养

采取原位获取法^[6]获取恒河猴(N=10只,8-10 kg,全部为雄性。由华南濒危动物研究所提供)颈

外静脉或上肢浅静脉内皮细胞。简要方法如下：将颈外静脉或上肢浅静脉分枝仔细结扎。取血管长2.5—4 cm左右。在其两端各插入头皮针胶管，用无菌注射器抽取5—10 ml M 199培养液冲洗血管。注入0.1%胶原酶(I型或II型，美国Sigma公司)约1—1.5 ml，使静脉充盈，关闭静脉两端头皮针胶管。将静脉从原位取下，放入无菌器皿中，37℃恒温水浴箱中温育15—25分钟。收集静脉内的消化液。用含20%的小牛血清的培养液10 ml冲洗静脉腔，轻轻揉搓血管，收集冲洗液。将消化液及冲洗液合并，1000转/分钟离心10分钟，去上清，准确加入1 ml内皮细胞完全培养液[内含M 199培养基(Life Technologic^S美国)，30%胎牛血清(中国医学科学院血液研究所出品)、最适浓度的内皮细胞生长因子(本实验室制备)]，稀释沉淀细胞。用2 ml注射器加4号针头吸打细胞悬液至少5次。取样50 μl加入结晶紫溶液(柠檬酸钠1.92克，结晶紫0.10克，蒸馏水100 ml，pH 2.3)50 μl。混匀。室温放置10—30分钟，细胞计数器计数细胞。按公式：细胞总数(个细胞) = 五个大方格的细胞总数 × 2000。

将细胞悬液接种到直径为35 mm的无菌塑料培养皿(Corning公司)中，置37℃、5%CO₂细胞培养箱(德国 Heraeus B 5060 EK型)内静置培养。第二天用滤器将培养液中的红细胞滤除。以后，每2—3天换液一次，每次换1/2的培养液。逐日倒置显微镜(日本 Olympus T04型)下观察细胞生长情况，微格法每日计数细胞。

2. 恒河猴静脉内皮细胞的传代培养

倒置显微镜下计数，原代细胞密度达 $6.35 \pm 2.57 \times 10^4$ 个细胞/cm²时，即行传代。用D-Hank's液轻洗细胞单层2—3遍。培养皿内加入0.06%胰蛋白酶(德国 Serva公司)1—2 ml，镜下观察约2/3的细胞圆缩且未漂浮时，吸出消化液，加入1 ml完全培养液制成细胞悬液，结晶紫法计数后，抽取15—20 ml M 199完全培养液与细胞悬液混匀，吸入直径为88 mm的塑料培养皿。传代比例为1:6，2—3天换液一次，每次换液时将1/2的条件培养液去除悬浮细胞后再加入培养皿中。当细胞形成单层时，再以1:2比例传代，直至单层形成。

3. 内皮细胞生长曲线

采用微格法^[6]每日计数培养的细胞总数并绘制生长曲线。

4. 染色体检查

根据鄂征的方法^[7]作传代细胞的染色体检查。

5. 内皮细胞的鉴定

对原代及第二代细胞，用兔抗人第Ⅷ因子相关抗原抗体(第一抗体)及荧光标记羊抗兔IgG抗体(第二抗体，洛阳华美公司出品)着染细胞^[5]，结果阳性。而用PBS代替第一抗体的阴性对照，无此反应。

6. 内皮细胞的功能检测

当原代、第一代及第二代恒河猴静脉内皮细胞生长达单层，准备传代前24小时，更换全部培养液，再加入10 ml完全培养液，24小时后收集其上清液，并计量。置-20℃冰箱内保存、备用。用6-Keto-PGF 1α放射免疫分析试剂盒及人血 Von Willebrand因子(vWF)试剂盒(苏州医学院血栓与止血研究室)，对条件培养液中6-酮-前列环素和vWF含量进行测定。将所测定的二者含量再按以下公式换算成内皮细胞的基数细胞分泌量。基数细胞分泌量是指每10⁶个内皮细胞所分泌的6-keto-PGF 1α和vWF的量。

7. 细胞的冻存和复苏

将内皮细胞置液氮冻存。用冻存液(70% M 199 + 20%胎牛血清 + 10%二甲基亚砷)制备 1×10^6 个细胞/ml细胞悬液，装入塑料冻存管内，置-40℃冰箱内2小时，再将其移至液氮面上4—6小时后，投入液氮内保存。复苏时，从液氮内取出冻存管，立即于37℃水浴内解冻，吸出细胞悬液，1000转/分钟离心10分钟。用D-Hank's液洗净细胞两次，换完全培养液制成细胞悬液。取样50 μl，用1:1的0.4%台盼蓝溶液染色，计数活细胞。取样50 μl，用1:1结晶紫溶液计数所获细胞总数，以 1×10^5 个细胞/cm²接种密度接种到直径为35 mm培养皿内，置37℃、5%CO₂培养箱内静置培养。

结 果

1. 原代细胞及传代细胞生长情况

本实验10条浅表静脉面积： 1.98 ± 1.18 cm²，经胶原酶消化后获取细胞总数为： $106.09 \pm 20.06 \times 10^3$ 个细胞，原代细胞接种于塑料培养皿后，细胞贴壁时间在12小时以内，镜下见贴壁细胞呈圆型或扁圆形。振动培养皿，细胞不摇动。接种后3—4天内处于静止生长期，增殖缓慢。此后细胞逐渐舒展、呈梭形，倒置显微镜下可见细胞质透明，核圆形

位于中央。4天后细胞生长迅速,进入对数生长期,镜下可见较多2个核仁的细胞,核仁位于中央,有分裂相。当细胞增殖到原贴壁数的 7.39 ± 5.04 倍时,接触抑制形成,此时增殖速度缓慢,生长曲线处于平台期,即应传代。原代培养天数平均为 7.7 ± 1.82 天。收获细胞总数为: $95.4 \pm 32.1 \times 10^4$,较接种细胞数增加 7.39 ± 5.04 倍。

原代细胞密度达 $6.35 \pm 2.57 \times 10^4$ 个细胞/ cm^2 时,以1:6的比例传第一代,接种密度为 $1.02 \pm 0.41 \times 10^4$ 个细胞/ cm^2 ,经 4.5 ± 1.65 天培养,细胞形成单层,收获细胞总数为 $4.82 \pm 1.12 \times 10^6$;再以1:2的比例传第二代,接种密度为: $4.03 \pm 0.93 \times 10^4$ 个细胞/ cm^2 ,经 2.50 ± 0.75 天培养收获细胞总数为: $11.46 \pm 2.69 \times 10^6$ 。从原代细胞的培养到第二代细胞的收获共历时 13.89 ± 1.36 天,细胞数增长了 147.93 ± 88.68 倍,细胞传代10分钟后镜下可见多数细胞沉积,30分钟后大部分细胞贴壁、少部分细胞变形但未完全伸展,未变形细胞为圆形,不透明,具立体感,边缘清楚,2小时后细胞全部变形伸展,透明度增高,呈梭形,鹅卵石样,无重叠生长现象,形态饱满(见图版)。

2. 第Ⅷ因子相关抗原免疫荧光检查

经第Ⅷ因子相关抗原免疫荧光检查,荧光

显微镜下观察99%以上的原代及传代细胞的细胞核周围均可见大量黄绿色荧光,证实所培养的细胞为内皮细胞。

3. 生长曲线

对实验组恒河猴的原代及传代静脉内皮细胞采用微格法每日计数,绘制生长曲线,如下图所示:

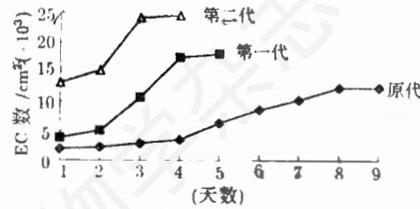


图1 原代及传代内皮细胞的生长曲线

4. 染色体的检查

传代细胞未见异常染色体。

5. 功能检测

对原代、第一代及第二代内皮细胞培养之上清液中vWF因子和6-酮-前列腺素含量进行检测,结果见表1、表2,各代基数细胞分泌量无显著差异。

6. 细胞冻存与复苏

细胞冻存1个月后,95%以上的细胞复苏成活。约70%—80%的细胞贴壁生长。

表1 内皮细胞培养上清液中vWF分泌量测定

	例数	细胞量 ($\times 10^6$)	上清液 (ml)	vWF含量 (%)	基数细胞分泌量 ($\%/10^6$ EC)
原代	11	0.61 ± 0.25	2	3.12 ± 0.96	11.25 ± 3.24
第一代	7	4.48 ± 1.12	20	2.96 ± 1.12	12.22 ± 4.15
第二代	8	11.46 ± 2.69	40	3.31 ± 1.04	11.56 ± 2.97

表2 内皮细胞培养上清液中6-PGF1 α 分泌量测定

	例数	细胞量 ($\times 10^6$)	上清液 (ml)	6-keto-PGF1 α 含量 (pg/ml)	基数细胞分泌量 (pg/ 10^6 EC)
原代	11	0.61 ± 0.25	2	27.85 ± 9.14	101.83 ± 31.5
第一代	7	4.48 ± 1.12	20	26.31 ± 10.02	101.50 ± 33.57
第二代	8	11.46 ± 2.69	40	31.58 ± 11.16	102.01 ± 29.48

讨 论

有关恒河猴静脉内皮细胞的培养,国内外均未见报道。我们根据以往内皮细胞体外培养经验并加以改进,成功地建立了恒河猴静脉内皮细胞培养方法。该方法的关键之处在于如下几点:

1. 最佳的培养系统。①培养基 pH 值在 6.9—7.2 范围内;②优质胎牛血清,应用浓度为 30%;③最适浓度的细胞 ECGS 及其条件培养液的使用;④细胞基质: 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的人纤维连接蛋白或 8% 明胶预处理培养皿。

2. 原代内皮细胞获取率及接种率的多少是细胞能否成活的关键,低于 $9.92 \pm 3.34 \times 10^3$ 个细胞/ cm^2 的接种率,细胞则难以扩展,细胞胞浆易变大,边缘变锐,细胞核增多(3—5个),胞浆内出现颗粒样的黑色小点,直至发生自溶。因此,为了获取较多的静脉内皮细胞,所取静脉必须有足够的长度和直径。

3. 原位获取法的应用,有效提高了成功率,较其它方法如离体物理消化法、离体化学消化法有无可比拟的优点:①操作简便;②可减少污染机会;③消化效率提高,失败率降低。因猴的来源不易,所获静脉较短,一般长度为 3 ± 0.913 cm,直径为 0.24 ± 0.06 cm,因此原位获取法是比较理想的方法。

4. 结晶紫计数法及微格计数法的应用。结晶紫溶液是一种高渗酸性细胞染液,该染液将细胞浆溶解的同时,固定并着色细胞核,这样可避免因在计数过程中红细胞污染及细胞自溶所造成的计数误差。微格计数法是根据统计原理,随机计数 10 个小培养面的细胞数,而后推论总体细胞数的方法。直接每日对培养细胞进行计数,方便简捷,根据结果绘制的生长曲线与每日消化细胞计数绘制的曲线相符,均反映了内皮细胞的生长情况。

5. 当收集静脉管腔内的消化液或用完全培养液冲洗管腔时,戴无菌手套轻轻揉搓静脉;可提高细胞获取率。

基于以上几点经验,在 13.89 ± 1.36 天内使细胞增至 147.93 ± 88.68 倍;而以往的内皮细胞传代培养方法将细胞以 1:2—3 的比例传代,在 20 天内细胞仅能增加 8—32 倍^[1],所获细胞量远远达不到临床的需求,若延长培养时间,即使获得足量的内皮细胞,但因细胞功能逐渐减退,难以使内皮化人工血管获得令人满意的抗血栓形成功能。

本实验通过检测内皮细胞的基数细胞分泌量发现,恒河猴血管内皮细胞能同时合成并分泌 vWF 和 PGF 1 α 。原代、第一代和第二代内皮细胞分泌 vWF 和 PGF 1 α 的量之间无明显差异($P > 0.05$)。说明内皮细胞经快速培养法培养后,仍保持良好的功能状态。

摘 要

利用胶原酶对恒河猴血管内皮细胞进行消化,以 $9.92 \pm 3.34 \times 10^3$ 个细胞/ cm^2 的接种率接种于 35 mm 培养皿中原代培养,体外培养 7.7 ± 1.82 天,细胞增长了 7.39 ± 5.04 倍,以 1:6 及 1:2 比例分别传第一代、第二代共历时 13.89 ± 1.36 天细胞增长了 147.93 ± 88.68 倍。对原代及传代细胞进行染色体及第 VIII 因子相关抗原免疫荧光检查,证实所培养的细胞为内皮细胞。通过检测培养上清中 vWF 和 PGF 1 α 的含量,原代、第一代与第二代之间均无明显差异($P > 0.05$)。

关键词: 恒河猴 内皮细胞 体外培养

参 考 文 献

- [1] Zilla P., Deutsch M., Meinhait J., et al., 1994, *J. Vasc Surg.* 3: 540—547
- [2] 汪忠镐,蒲力群等,1988,北京生物医学工程,12: 34—40.
- [3] 杜伟,汪忠镐等,1991,中华胸心血管外科杂志,7(2): 81—83.
- [4] 罗国华,管衍等,1995,中华外科杂志,1995,10(33): 623—624.
- [5] 何红兵,仲剑平等,1990,第一军医大学学报,10(4): 321—314.
- [6] 何红兵,潘玉先等,1995,第一军医大学

学报, 15(3): 198-200
 [7] 鄂征等, 1993, 人民卫生出版社.

[8] 何红兵, 潘玉先等, 1992, 中国病理生理
 杂志, 8(5): 447.

STUDIES ON CULTURE OF MACAQUE'S VENOUS EN- DOTHELIAL CELLS IN VITRO

PAN Yu Xian PAN Ming Xin HE Hong Bing YANG Ji Zhen

(Laboratory of Vascular Surgery, Zhujiang Hospital affiliated to First Military Medical
 University, Guangzhou 510282)

The macaque's venous endothelial cells were harvested with 0.1% collagenase and then inoculated into the plastic culture plate (diameter 3.5 cm) at a density of $9.92 \pm 3.34 \times 10^3$ cells/cm² for primary culture. The primary culture was passaged from diameter 3.5 cm plates to diameter 8.8 cm plates and then to another two 8.8 cm plates which was reached on day 13.89 ± 1.36 . The splitting rate was 1:6 at first passage and 1:2 at second passage. When culture were terminated, $11.46 \pm 2.69 \times 10^6$ of avialbe endothelial cells could be regularly obtained, which was 147.93 ± 88.68 folds as compared with those harvested from host vein. The cultures were confirmed as endothelial cells with the fluorescent linked anti-VIII antigen antibodies. The content of both 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ and vWF in the supernatant were detected with ELISA and radioimmunoassay. There were no difference among the primary and subcultures endothelial cells.

Key words: Macaque Endothelial cell Culture in vitro

培养的心内膜内皮细胞形态和旁分泌特点的初步研究

王培勇 刘健 罗德成 孙秉庸

(第三军医大学高原医学研究室、病理生理教研室 重庆 630038)

曾强

(解放军总医院 北京 100853)

心内膜内皮细胞(endocardial endothelial cell, EEC)一直被认为仅仅是心脏内腔的衬里和屏障。但近年的研究发现,它与血管内皮细胞同样是一种多功能的细胞,除屏障功能和跨膜转运功能外,EEC能通过分泌血管活性物质对心脏的舒缩起调节作用^[1],许多体液中的物质如神经递质、代谢产物、血管活性肽可通过EEC而影响心脏舒缩,EEC的分泌功能及血流中的物质对其功能的调制可能是心泵功能重要的心脏内自动调节机制^[2]。但有关EEC分泌功能对心血管系统调控的许多方面尚不明

确。本研究建立了新生小牛右心室EEC的培养方法,并观察其形态、生长特点,测定其内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、心钠素(atrial natriuretic peptide, ANP)、血管紧张素II(angiotensin II, AT II)及内源性洋地黄因子(endogenous digitalis-like factors, EDLF)等血管活性物质的分泌功能,并与同一动物来源的肺动脉内皮细胞(pulmonary artery endothelial cells PAEC)做了比较。

* 现地址: 北京医科大学心血管基础研究所 100083。