

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 primry culture. The primary culture was passaged from diameter 3.5 cm plates to diameter 8.8 cm plaetes 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 avaiable 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 fluoescent linked anti-VIII antigen antibodies. The content of both 6-keto-PGF 1α 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。

材料与方 法

1. 主要材料与试剂

胰蛋白酶(DIFCO, 1:250), RPMI-1640(JR SCIENTIFIC INC., USA), ET-1 测定试剂盒(东亚免疫试剂研究所), 心钠素、地高辛和血管紧张素Ⅱ测定试剂盒(北方免疫试剂研究所), 内皮素-1、心钠素单克隆抗体(Peninsula Lab., USA), Ⅷ因子相关抗原抗体和 S-P 免疫组化染色试剂盒(福建迈新生物技术开发公司), 抑肽酶(Boehringer Mannheim, Germany), 其它试剂均为国产或进口 AR 级, 所用的培养器皿为 COSTAR 产品。

2. EEC 培养方法

新生小牛由牛奶厂提供, 出生后禁食, 于 10 小时内活杀。无菌下开胸, 取出心脏和肺, 分离出肺内动脉至二级分支, 按以往的方法培养 PAEC^[3]。EEC 按以下方法培养: 将右心室用 D-HANKS 液冲洗 3—5 次, 以洗净残存血液, 然后将心室纵行剖开, 翻出心内膜面, 用 10 号手术刀轻轻刮取 EEC, 注意每个部位只能刮一次, 收集细胞置入 3025 培养瓶中, 用吸管吹打分散, 加入含 20% 新生小牛血清(NBS)的培养基, 置 37℃CO₂ 孵箱培养。长成单层后以 0.1% 的胰蛋白酶消化传代, 用 0.4% 的 Trypan Blue 染色测定细胞活性, 方法同 PAEC^[3]。用相差显微镜观察细胞的生长和形态特点。

3. 血管活性肽的放免测定

将同代(5—6 代)的 EEC 和 PAEC 按 4×10^6 /cells 密度接种于 3025 培养瓶, 加入 10 ml 含 20% NBS 的 RPMI-1640 培养基。37℃ 培养 24 小时, 细胞贴壁伸展后吸弃培养液, 更换含 1% 灭活并透析过的贫血小板 NBS 的培养基(10 ml), 培养 24 小时后收集培养液, 加入抑肽酶(100 μl/ml), 置 70℃ 备测。样本收齐后按药盒说明书测定 ANP、AT II、EDLF(用地高辛放免药盒测定)和 ET-1。同时计数每瓶的活细胞数, 血管活性肽的分泌量以 Pg/10⁵ 个细胞表示。

4. 免疫组化染色

将 EEC 和 PAEC 接种于 24 孔培养板内的玻片上, 生长汇合成单层细胞后, 换含 1% 透析和灭活的贫血小板血清 RPMI-1640 培养基后, 分常氧(21% O₂) 和无氧(低于 1% O₂) 24 h 组, 应用 S-P 法^[4]进行免疫组化染色, 以棕黄色为阳性。用真彩色医学图像分析系统(空军总医院 CMIAS 007)测其积分光密度(IOD)值, 作为活性肽的相对含量。

5. 统计学分析

所得数据采用单因素方差分析, 结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 做 Welsh *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为统计学上相差有显微意义, $P < 0.01$ 为相差有非常显著意义。

结 果

1. EEC 培养及形态特点

采用刮取法可以有效地分离 EEC, 刚刚分离下 EEC 成团块状, 需吹打分散后培养。接种 1 天细胞即可贴壁伸展, 7—14 天可长成汇合的单层贴壁细胞。传代 3—6 代后细胞生长速度较快, 约 3—4 天即可长成单层细胞。与 PAEC 相比, 原代 EEC 生长速度较慢, 传代后二者生长速度相似, 两者均有接触抑制现象。从形态上看, PAEC 呈卵石排列, 细胞排列和大小较为整齐一致, 细胞较小(直径为 20—30 μm)。如图版图 1 所示。而 EEC 呈单层生长多角形排列, 有的细胞间以突起相互交错, 细胞大小不一致, 至少可以分成两类: 一种为巨大扁平的细胞, 有的细胞内可见双核, 细胞直径约为 60—120 μm; 另一类细胞较小, 呈小多角形或梭形, 细胞直径约为 30—40 μm。如图版图 2, 3 所示。

2. 免疫组化

免疫组化定性染色观察发现, EEC 与 PAEC 相比也有不同的特点。二者 ET-1、ANP 和 Ⅷ 因子相关抗原染色均为阳性, 但 EEC 的 ANP 和 Ⅷ 因子染色较 PAEC 弱, 而 ET-1 染色较 PAEC 强。免疫组化积分光密度分析表明 EEC 的 ET-1 含量较 PAEC 明显增多 ($P < 0.01$), 而 ANP 和 VIIIa_g 含量较 PAEC 明显减少 ($P < 0.01$) (表 1)。

3. 血管活性肽的放免测定

在同样条件下培养 24 小时, EEC 的 ET-1 分泌量是 PAEC 的 2.6 倍 ($P < 0.01$), 而 ANP 分泌仅为 PAEC 的 56% ($P < 0.01$), EDLF 的分泌量为 PAEC 的 63% ($P < 0.01$), 二者 AT II 分泌量相近。如表 2 所示。

表1 EEC与PAEC的ET-1、ANP和VIII_A免疫组化积分光密度(IOD)比较

	ET-1	ANP	VIII _A
EEC	55.12±3.43*	2.77±0.17*	47.82±4.27*
Cell number	292	478	175
PAEC	23.18±5.29	15.68±2.45	81.35±9.21
Cell number	351	111	230

* P<0.01 vs PAEC

表2 EEC与PAEC释放ET-1、ANP、AT II和EDLF的比较(pg/10⁵ cells/24 h)

	ET-1	ANP	EDLF	AT II
EEC	449.6±1572*	22.77±11.76*	91.59±37.86*	129.78±13.20
n	6	6	12	12
PAEC	170.8±47.98	40.14±7.32	145.64±43.05	118.50±13.54
n	6	6	9	6

* P<0.01, vs PAEC

讨 论

EEC在循环系统中具有特殊的重要地位,它出现在心脏发育早期,参与心脏间隔形成、原始营养血管的发育^[5]。虽然EEC与血管内皮细胞(VEC)相延续,但二者在形态、结构和细胞骨架组装上有明显不同^[6]。我们的实验观察到EEC与PAEC相比,在许多方面具有不同的特点。原代培养时,PAEC可很容易地由0.5%胰蛋白酶从血管壁上消化分离,我们也曾试用胰蛋白酶消化法从心内膜上分离EEC,但易导致培养失败,由于EEC需长时间消化,分离的细胞可能因受损不易存活,这提示心内膜内皮,细胞可能与心内膜下层粘附力强。EEC的形态与PAEC也有不同的特点,PAEC呈卵石排列,细胞排列和大小较为整齐一致,细胞较小(直径为20—30 μm),而EEC呈单层生长多角形排列,细胞间以突起相互交错,细胞大小不一致,一种为巨大扁平的细胞,有的细胞内可见双核,细胞直径约为60—120 μm;另一类细胞较小,呈小多角形或梭形,细胞直径约为30—40 μm。上述观察提示EEC可能是一种特化的VEC。

EEC具有旺盛的分泌功能,目前已经确

认EEC可以分泌一氧化氮、前列环素、前列腺素E₂和内皮素等活性因子,但其活性因子的分泌与血管内皮相比具有不同的特点。如在静止状态下EEC和血管VEC的PGI₂释放速度无明显差别,但在血流冲击和急性缺氧情况下,EEC的PGI₂释放率较大血管VEC高19倍和34倍^[7]。也有人观察到,EEC的ET基础释放水平调节心肌功能,而心肌毛细血管VEC则无ET释放迹象^[8],说明EEC可能比VEC具有更活跃的分泌功能。ANP、ET-1、AT II、EDLF是心脏和血管功能及结构的重要调节因子。我们实验中所采用的细胞成活率均大于95%,研究发现EEC的VIII_A相关抗原免疫组化定性染色阳性,ET-1强阳性,而ANP弱阳性,积分光密度分析表明EEC的ET-1含量较PAEC明显增多,而ANP和VIII_A含量较PAEC低;同时放免测定发现EEC还能向培养液中分泌ET-1、ANP、AT II和EDLF等血管活性成份,其ET-1的分泌是PAEC的2.6倍,而ANP、EDLF分泌较PAEC低,EEC和PAEC二者AT II分泌量相近。体外培养的EEC除具有强大的ET-1分泌功能外,对其它多种血管活性因子的分泌较PAEC弱,提示EEC与PAEC具有不同的功

能特点。本实验所培养的 EEC, 取材于心内膜, 其生长具有明显的接触抑制, VIII_{A_g} 染色和内皮素染色发现, 虽然细胞大小不一致, 但均为阳性, 因而是心内膜内皮细胞。有关 EEC 在超微结构和其他活性物质的分泌与 PAEC 有何不同, 尚需在今后的实验中进一步研究。

由于右心 EEC 在心血管系统中处于特殊位置, 它所分泌的血管活性物质, 不但经旁分泌方式作用于心肌组织, 调节心功能, 而且经血流由右心房、右心室射血进入肺循环, 经循环内分泌方式作用于肺动脉, 从而调节肺血管功能和结构; 另外我们推测, 病理情况下, 经代谢后的静脉血液中的某些成份也可作用于 EEC, 使后者的活性因子分泌发生变化, 从而影响心肌和肺血管功能。

摘 要

心内膜内皮(EEC)是心脏功能重要的调节者。本实验观察培养的新生小牛右心室 EEC 形态特点及其血管活性物质的分泌功能。培养的 EEC 较同样条件下培养的肺动脉内皮细胞(PAEC)大而伸展。免疫组化发现 EEC 的 VIII 因子相关抗原(VIII_{A_g})、心钠素(ANP)染色较弱, 而 EEC 的内皮素(ET-1)阳性反应染色

较 PAEC 强。采用放免测定发现 EEC 可向培养液中释放分泌 ET-1, 其释放量是 PAEC 的 2.6 倍, 其血管紧张素 II(ATII)分泌量与 PAEC 类似, 但 ANP 和内源性洋地黄因子(EDLF)的释放量显著低于 PAEC(P<0.01)。

上述观察揭示, 右心室 EEC 能通过旁分泌血管活性成份特别是能分泌大量的 ET-1, 从而调节心肌功能, 同时对肺循环也可能起重要的调节作用。

关键词: 心内膜内皮细胞 心钠素 内皮素
血管紧张素 内源性洋地黄因子

参 考 文 献

- [1] Smith JA, et al., 1992, *Trend Physiol Sci.*, 13: 113—116.
- [2] De-Hert SG, et al., 1993, *Anesthesiology*, 79(6): 1354—60
- [3] 王培勇等, 1995, 第三军医大学学报, 17(3): 212—3
- [4] 施作榕, 1986, 中华免疫学杂志, 2(3), 169—171
- [5] Brutsaert DL, et al., 1992, *Am J Physiol.*, 243(4 P 52):H 985—1002
- [6] Andries LJ, et al., 1993, *Cell Tissue Res.*, 273(1): 107—17
- [7] Ramaiotti C, et al., 1993, *Circ Res.*, 72(5): 1044—64
- [8] Evans HG, et al., 1994, *Cardio Vasc Res.*, 28(11): 1694—9

STUDY ON PARACINE AND MORPHOLOGY OF CULTURED ENDOCARDIAL ENDOTHELIAL CELLS

Wang Pei Yong Liu Jian Luo De Cheng Sun Bing Yiong

(Research Lab of High Altitude Medicine, Department of Pathophysiology, Third Military Medical College, Chongqing 630038, PR China.)

Zeng Qiang

(The Institute of Geriatrics, The General Hospital of PLA, Beijing 100853)

ABSTRACT

The endocardial endothelium modulates the performance of the subjacent myocardium. In the present study, morphological and paracrine characteristics of cultured bovine endocardial endothelial cells (EEC) in vitro were investigated and compared with pulmonary artery endothelial cells (PAEC) harvested from the same animals and cultured under the same conditions.

Morphologically, EECs were much larger and flatter than PAECs. Immunocytochemistry demonstrated more positive endothelin-1 (ET-1) staining, less positive atrial natriuretic factor (ANP) and factor VIII related antigen staining in EEC than in PAEC. The rate of ET-1 release was 2.6-fold ($P < 0.01$) greater, whereas that of ANP and endogenous digitalis-like factor (EDLF) were lower from EEC than from PAEC ($P < 0.01$), that of angiotensin II (AT II) release was similar. The above results suggest EEC is different from PAEC and a greater source of ET-1. The paracrine of vasoactive factors by EEC may play important roles in regulating cardiac function and pulmonary circulation.

Key words: Endocardial endothelial cells Morphology Endothelin-1 Atrial natriuretic peptide Angiotensin II Endogenous digitalis-like factor

铝对原代培养大鼠海马神经细胞毒性作用的初步观察

田德全 严振国

(上海中医药大学 200032)

铝是一种常见金属,在组成地壳的元素中占第三位。正常人脑铝含量为 $1.25 \pm 2.4 \mu\text{g/g}$ 干重。流行病学研究表明饮用水中铝含量升高使早老性痴呆病(Alzheimer's disease, AD)患病危险增加^[1],AD病人大脑新皮层灰质内铝含量超过 $5 \mu\text{g/g}$ 干重,主要沉积在神经原纤维缠结和淀粉样斑块中,说明铝是导致AD发病的重要环境因素之一。本研究用神经培养技术,观察铝引起神经细胞死亡的规律及其与细胞外钙离子的关系,旨在从细胞水平初步探讨铝对神经细胞的毒性作用及毒性作用机理。

材料与方 法

1. 动物

新生1d和4d的SD大鼠。

2. 主要试剂与液体

DMEM干粉培养基为Gibco公司产品,胰蛋白酶,NaHEPES为Sigma公司产品,阿糖胞苷为Fluka产品,其余试剂均为国产分析纯。

完全DMEM培养液 1升DMEM培养液中含 NaHCO_3 3.7g,青霉素G 10万单位,链霉素 100mg,胎牛血清 10%,小牛血清 10%,pH 7.2。

Hanks液(mmol/L) NaCl 137, KCl 5.0, CaCl_2 1.3, MgSO_4 0.8, Na_2HPO_4 0.6, KH_2PO_4 0.4, NaHCO_3 3.0, 葡萄糖 25, pH 7.2。

D-Hanks(mmol/L) Hanks液中不加 CaCl_2 和 MgSO_4 , pH 7.2。

条件液1(mmol/L) NaCl 140, KCl 3, NaH_2EPES 10, 葡萄糖 25, CaCl_2 4, MgCl_2 2, 用 NaHCO_3 调 pH 7.2。

条件液2 条件液1中去掉4mmol/L CaCl_2 , 补加4mmol/L MgCl_2 , 其余同条件液1。

0.1mol/L氯化铝储备液 称2.415g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于100ml去离子三蒸水中。

以上液体均用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, 4°C 冰箱储存备用。

0.25%胰蛋白酶液 称0.25g胰蛋白酶撒于100ml D-Hanks液中, 4°C 溶胀过夜后, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, -20°C 冰箱冰冻备用。

3. 主要设备

CO_2 培养箱(Heraeus, 德国), 倒置相差显微镜(CK 2, Olympus, 日本), 冰冻离心机(Hega, 1.0 R, Heraeus, 德国), 水浴恒温振荡器(HZX-H, 哈尔滨东联电子技术开发公司), 超净工作台(SHJ-CTJ型, 上海净化设备厂)。

4. 大鼠海马神经细胞培养方法

细胞准备 取出生4d的SD大鼠, 拉颈处死, 75%酒精浸泡消毒后, 无菌下迅速开颅, 取脑, 解剖镜下分离出皮层组织, 放入盛有培养液的平皿中, 仔细剔除脑膜和血管等结缔组织, 用完全培养液洗两次后, 用虹膜剪剪成糜状, 并用吸管轻轻吹打成细胞悬液, 经200目不锈钢网筛过滤。记数后以 $1 \times$