

# 一次性获得脐带动、静脉内皮细胞的实验技术\*

杨映波 王正国

(重庆, 第三军医大学附属三院 630042)

近年来发现不同器官、甚至同一器官的不同部份的血管内皮细胞在结构、功能、抗原成份和分谢特点等方面均不相同<sup>[1]</sup>。脐带动、静脉内皮细胞在低密度脂蛋白代谢等方面亦存在明显差异<sup>[2]</sup>。因而, 对血管内皮细胞异质性(Heterogeneity)的研究, 是阐明其生理特点及病理变化规律的重要方面。同源性较好的细胞是进行异质性研究的必要条件。因而, 探索获得同源动、静脉内皮细胞的实验技术具有重要的应用价值。目前, 国内外文献中尚未见到介绍一次性获得脐带动、静脉内皮细胞的实验技术的报道。

我们在从事脐带动、静脉内皮细胞的异质性研究(如形态特点、抗原分布和纤溶酶原激活剂抑制物活性等)中摸索了一种方法, 可以一次性获得脐带动、静脉内皮细胞, 除了省时简便之外, 更重要的是可获得同源的动、静脉内皮细胞。

## 材料与方 法

(一)脐带 收集健康、正常分娩胎儿的脐带约30 cm左右, 排尽残血, 剪去钳夹部分, 投入灭菌保存液<sup>[3]</sup>(0.14 mol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 15 mmol/L H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mmol/L 葡萄糖, pH 7.3)中, 4℃保存, 24小时内使用。

(二)消化剂 为0.25%胰蛋白酶液。称取胰蛋白酶(Trypsin, 200 FIP u/g, MERCK)0.25克, 溶于10 ml 超纯水(NANO Pure II, Barnstead)中。0.22 μm 针头式滤器过滤, 小瓶分装, -22℃保存。临用时稀释10倍。

(三)培养液 RPMI-1640 培养液(每升含20%小

牛血清、L-谷氨酰胺 0.3 mg、青霉素 100 u、链霉素 100 u、pH—7.4)

(四)灌洗针头 将12号注射针头 针 2.0 cm处剪断、磨平。另自制与针座孔相吻合的胶塞, 使之插入针座孔后可以密合(图1)。

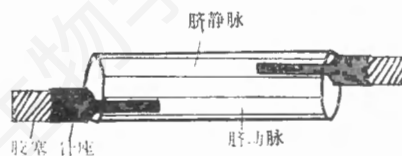


图1 灌洗针头与胶塞位置示意图

## (五)消化、收集细胞

1. 取两颗灌洗针头。一颗插入脐带一端的两根动脉的任一根内; 另一颗插入脐带另一端的静脉内, 均用止血钳钳紧。此时针头均应靠近止血钳的关节部, 以使未插入针头的血管不受压(图2)以D-Hanks液分别反复灌洗脐带动、静脉直至将余血冲洗干净。

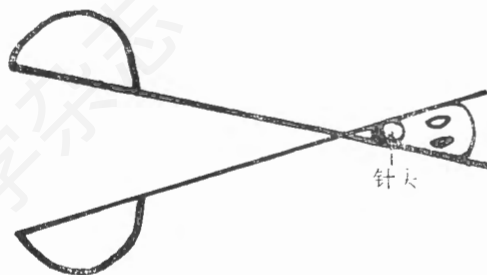
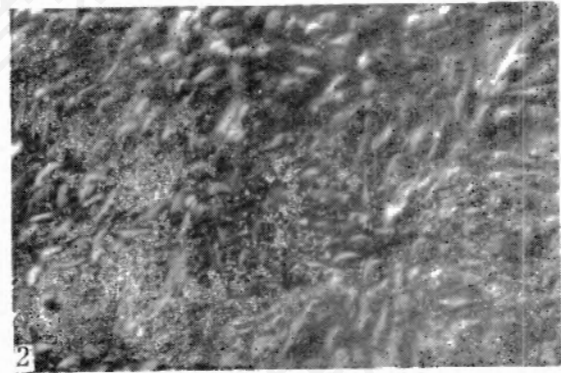
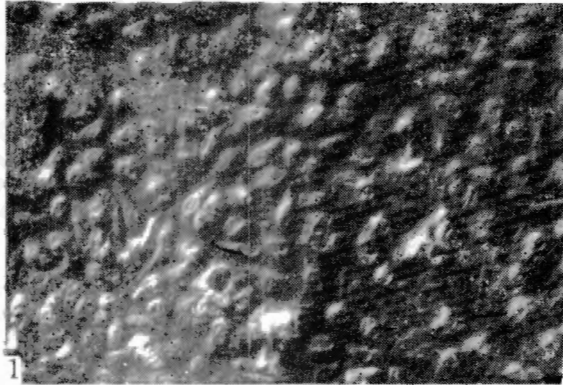


图2 灌洗脐血管时钳夹位置示意图

2. 将脐带两端的止血钳分别改变方向180°, 此时针头均远离止血钳关节部。重新钳紧止血钳使未插针头的血管受压而闭塞(图3)。充入D-HanKs液检查无漏液且流出通畅后, 由针座孔注入0.25%胰蛋白酶液(动脉3—5 ml, 静脉8—10 ml)。用胶塞封闭后,

\* 国家自然科学基金资助课题

## 杨映波等图版



图版说明

1. 脐带动脉内皮细胞(微分干涉相衬摄影。OLYMPUS, IMT-2,  $\times 200$ )。
2. 脐带静脉内皮细胞(微分干涉相衬摄影。OLYMPUS, IMT-2,  $\times 200$ )。

(上接插页 4)

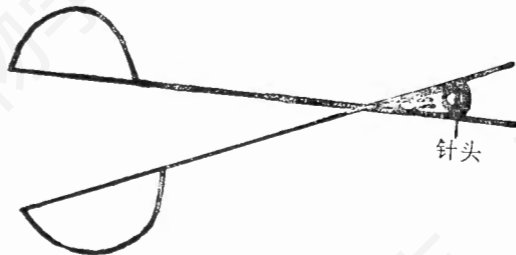


图 3 注入消化液时钳夹位置示意图

将脐带放入一盛有 D-Hanks 液的无菌容器内,然后将容器放入  $37^{\circ}\text{C}$  水浴中作用 10 分钟。

3. 将脐动脉一端的胶塞取出,用刻度离心管收集消化液。此后迅速注入适量(动脉 3 ml, 静脉 5 ml)含 20% 小牛血清的培养液以终止酶消化作用并收集入刻度离心管中。以同样方法收集另一端静脉的细胞。收集细胞的全过程应在两分钟内完成。预实验表明,在两分钟内收集部位的先后对细胞存活率无明显影响。

4. 室温下 1,000 rpm, 离心 10 分钟,倒尽上清液,吸取 1 ml 培养液于离心管中,吹打成悬液,调整细胞浓度至  $4-5 \times 10^5/\text{ml}$ , 将其均匀接种于 35 mm 培养皿(培养面积约  $10 \text{ cm}^2$ , 0.25% 明胶预置过夜,  $4^{\circ}\text{C}$ 。用前 2 小时移入  $\text{CO}_2$  培养箱)中进行培养。细胞培养密度约为  $4-5 \times 10^4/\text{cm}^2$  培养面积。

### 结果和讨论

用本方法一次性获得的脐带动、静脉内皮细胞数分别约为  $1.5-2.0 \times 10^6$  和  $0.8-1.5$

$\times 10^6$ (脐带长约 30 cm)。0.4% 台盼蓝拒染试验表明动、静脉内皮细胞存活率均在 95% 左右。接种后动、静脉内皮细胞生长良好,并表现出不同的形态特征。动脉内皮细胞以多角形为主,静脉内皮细胞以长梭形为主,二者均呈典型的铺路石样镶嵌排列(图版图 1、2)。我们认为这一方法完全可供同时进行脐带动、静脉内皮细胞的异质性研究之用。

值得提出的是: 1. 在整个消化分离过程中,全部器具如注射器、离心管和灌注针头等均须作好标志,注意把动、静脉内皮细胞分开。2. 一次性获得动、静脉内皮细胞后,如果再消化余下的脐动脉,所获内皮细胞存活率大为降低,培养效果不佳。3. 尽管有人强调于消化分离的脐带应在分娩后 3 小时以内进行,但用 Jaffe 推荐的内皮细胞保存液<sup>[3]</sup>收集脐带,在分娩后超过 3 小时乃至 24 小时以内分离消化的内皮细胞存活率仍在 95% 左右。这为集中消化脐带以获取内皮细胞带来便利。

### 参考文献

- [1] Kumar S et al, 1983, *Differentiation*, 36: 57-70.
- [2] Hinsbergh V et al, 1983, *Arteriosclerosis*, 3: 547-559,
- [3] Jaffe EA. 1980, *Transplant Proc*, 12: 49-53.