

# 肺动脉内皮细胞的分离、培养和鉴定\*

王琪\*\* 吴中立

(第二军医大学病理生理学教研室)

郑尊 张淑英

(第二军医大学中心实验室)

肺血管内皮细胞是一种多功能细胞,尤其在肺的非呼吸功能方面更具特殊意义。当其受损,肺血管通透性升高导致肺水肿,在成人呼吸窘迫综合症发生机制中具有重要意义。但是处于体内多因素共同作用的复杂环境中,对肺血管内皮细胞的功能和代谢以及病变发生机制很难作深入研究。本文旨在建立新生小牛的肺动脉内皮细胞体外培养系统,以便在特定的体外条件下研究肺血管内皮细胞的功能。

## 材料与 方法

### 一、肺动脉内皮细胞的分离

取当日新生小牛(上海第九牧场),放血处死,3小时内取出完整心肺,所有操作均在无菌条件下进行。分离方法是综合 Ryan<sup>[1]</sup> 和 Jaffe<sup>[2]</sup> 方法改良,步骤如下:结扎各肺叶肺门处肺动脉分枝及未闭合的动脉导管,于肺动脉圆锥处插入自制的灌流管,以 Hanks 液反复灌流抽洗至灌洗液清亮,将 37℃ 预温的 0.1% 胶原酶液(Ⅱ, Sigma)6—8 ml 灌入,37℃ 分别孵育 20、30 及 40 min。吸取消化液,以无血清的 199 培养液(Nissui)反复抽洗,收集所有消化液和抽洗液并离心(1000 rpm × 10 min),沉淀以 199 培养液(199 培养基中另加 20% 小牛血清,青霉素 100 u/ml,链霉素 100 μg/ml, HEPES 10 mmol/L, L-谷氨酰胺 0.292mg/ml)悬浮并混匀,制成肺动脉内皮细胞悬液,并计算细胞收获量及细胞活力。

### 二、肺动脉内皮细胞的培养

1. 原代培养 将细胞悬液以  $2-4 \times 10^4/\text{cm}^2$  细胞数接种于经培养基质预处理的培养瓶中,加入 199 培养液,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,定期换液并观察。

2. 传代培养 培养的细胞经 D-Hanks 液冲洗并孵育后,以 37℃ 预温 0.08% 胰蛋白酶(Diffico)消

化。

### 三、肺动脉内皮细胞生长特性和培养条件的选择

1. 贴壁率 参考 Maciag<sup>[3]</sup> 方法,取原代细胞按  $4 \times 10^4/\text{cm}^2$  接种于 24 孔培养板,根据培养基质不同,将细胞分 4 组:(1) 无基质组;(2) 纤维连接蛋白(Fn)组:将 Fn(10 μg/cm<sup>2</sup>)滴于培养面,室温下 45 min 后吸出;(3) 鼠尾胶原组:接种前将自提的鼠尾胶原<sup>[4]</sup> 均匀涂于培养面,经饱和氨作用 30 min、Hanks 液冲洗;(4) 白明胶组:将 1% 白明胶均匀涂于培养面,4℃ 过夜,接种前冲洗。分别于接种后 8、16 和 24 小时,各组取 5 孔细胞,吸除培养液并多次清洗培养面以去除未贴壁细胞,以胰蛋白酶彻底消化细胞并计数,计算贴壁率——消化所得细胞数占接种活细胞数百分比。

2. 肺动脉内皮细胞的生长曲线和分裂指数曲线 生长曲线测定按常规法,分裂指数曲线测定按普里斯特法<sup>[5]</sup>。

3. 对数生长期群体倍增时间(PDT)由生长曲线计算<sup>[3]</sup>,  $PD = \log_2(C_2/C_1)$ ,  $PDT = T/PD$ , 其中 PD 表示群体倍增数, C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub> 分别表示对数生长期开始和结束时的细胞数(个/cm<sup>2</sup>), T 表示对数生长期持续时间(小时)。

4. 冻存与复苏 同常规法,冻存液含 65% 的 199 培养液、30% 小牛血清、5% 甘油。冻存 20 天后复苏,计算复苏率并观察接种后贴壁和生长情况。

5. 各类促内皮细胞生长物对肺动脉内皮细胞生长的影响 选用 4 种:(1) 200 μg/ml 的牛下丘脑来源的促生长物(Hypothalamus-derived Growth Substance, HGS),根据 Maciag 方法提取<sup>[6]</sup>;(2) 2% 视网膜膜来源的促生长物(Retina-derived Growth Substance, RGS),根据 Glaser 方法<sup>[7]</sup>提取;(3) 10% SMMC-7721 肝癌细胞培养液;(4) 90 μg/ml 肝

\* 本课题部分资金由国家自然科学基金资助。

\*\* 现在中心实验室。

素(Hep.)。实验分6组, (1)正常对照组, (2) HGS组, (3) RGS组, (4) HGS+Hep.组, (5) RGS+Hep.组, (6) 肝癌细胞培养液组。

#### 四、肺动脉内皮细胞的鉴定

1. 形态学 在倒置显微镜下直接观察细胞的形态及生长特征; 采用原位包埋法、制备超薄切片作电镜(H-800)观察。

2. 凝血Ⅷ因子相关抗原(Ⅷ R: Ag)的检测 光镜下采用间接免疫荧光法, Ⅷ R: Ag抗血清、异硫氰酸荧光素标记的IgG由上海生物制品所供应; 电镜采用免疫胶金法, 葡萄球菌蛋白A-胶体金溶液由南京军区总医院供应。

### 结 果

#### 一、肺动脉内皮细胞的分离

以胶原酶液孵育20、30和40 min, 消化的内皮细胞收获总量分别为 $(5.2 \pm 1.8) \times 10^6$ 、 $(8.9 \pm 2.5) \times 10^6$ 和 $(9.7 \pm 3.8) \times 10^6$ 。消化30 min, 内皮细胞收获总量较多而血管平滑肌细胞混入相对少, 是较适当的消化时间。

#### 二、肺动脉内皮细胞的培养

1. 原代培养 接种后2小时, 细胞沉于

培养面呈岛状分布, 4小时后有部分贴壁和伸展, 无论用否培养基质, 24小时细胞贴壁率都在89%以上。从接种至生长呈单层所需时间, 与接种细胞数有关, 一般为5—6天(图版图1)。

2. 传代培养 细胞贴壁、生长均良好, 有的细胞分化呈管状, 与文献<sup>[8]</sup>报道相似。细胞传至第6代, 生物学特性(包括核型分型)基本保持正常。根据血管平滑肌细胞消化浮起时间比内皮细胞晚2—3 min, 在消化传代时可基本被剔除, 使内皮细胞纯度维持在98%以上。

#### 三、肺动脉内皮细胞生长特性和培养条件的选择

1. 贴壁率 随使用不同培养基质而不同。Fn组和鼠尾胶原组的各时间贴壁率均显著高于无基质组; 白明胶未见显著促贴壁作用; 胶原在早期作用强于Fn, 但16小时和24小时无显著差异(表1)。所以Fn和胶原被广泛应用于培养面的预处理。但鼠尾胶原用法烦琐并增加污染机会, 所以本实验除为电镜制片的特殊培养外, 均以Fn作培养基质。

表1 肺动脉内皮细胞在不同培养基质中的贴壁率(%)

| 分 组  | 8小时           | 16小时         | 24小时        |
|------|---------------|--------------|-------------|
| 无基质  | 10.98±2.13    | 48.98±3.19   | 90.14±4.00  |
| Fn.  | 16.32±2.37**  | 63.02±4.36** | 94.90±2.02* |
| 鼠尾胶原 | 20.14±2.28*** | 65.12±4.60** | 95.14±2.06* |
| 白明胶  | 11.50±2.07    | 53.18±4.20   | 89.20±3.65  |

与无基质组比:  $p^* < 0.05$   $p^{**} < 0.01$   
与Fn组比:  $p^* < 0.05$

2. 肺动脉内皮细胞的生长曲线和分裂指数曲线 分裂指数曲线呈平台期、上升期和下降期; 生长曲线与之对应反映出生长潜伏期、对数生长期和生长停滞期(图1)。

3. 对数生长期群体倍增时间为 $29.07 \pm 1.77$ 小时。

4. 冻存后复苏率为 $84.2 \pm 8.3\%$  ( $n=8$ ), 接种后贴壁率为 $87.9 \pm 5.7\%$  ( $n=8$ ), 生长良好。

5. 各类促内皮细胞生长物对肺动脉内皮

细胞生长的影响 与正常组比, HGS组在第2—5天、RGS组在第3—5天细胞数有显著增加, 均在第5天达到生长高峰(图2); 两组群体倍增时间显著减少。两组间各点细胞数和群体倍增时间无显著差异。HGS组与HGS+Hep.组、RGS组与RGS+Hep.组比较, 各点细胞数及群体倍增时间均无显著差异(表2)。培养液中加入肝癌细胞培养液, 24小时存活率为 $42.8 \pm 9.2\%$ , 48小时几乎全部细胞浮起; 将已贴壁的细胞培养液中加入上述成分, 3天内

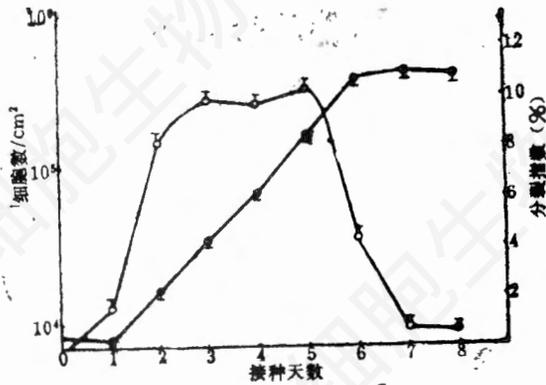


图1 第3代肺动脉内皮细胞的生长曲线(●)和分裂指数曲线(○)  
接种细胞数为  $0.8 \times 10^4/\text{cm}^2$ , 各点  $n=5$ 。

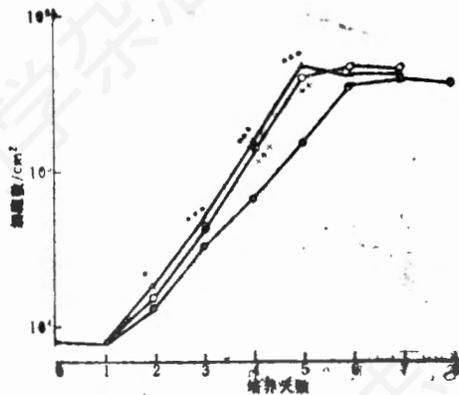


图2 加入HGS、RGS的第3代肺动脉内皮细胞生长曲线。

正常组(●), HGS组(△), RGS组(○)。HGS组与正常组比, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; RGS组与正常组比, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。各点  $n=5$ 。

表2 促生长物对对数生长期群体倍增时间的作用

| 分组( $n=5$ ) | 群体倍增时间(小时)           |
|-------------|----------------------|
| 正常对照组       | $29.07 \pm 1.77$     |
| HGS         | $22.68 \pm 1.19$ *** |
| HGS + Hep.  | $23.34 \pm 1.81$ *** |
| RGS         | $23.04 \pm 1.51$ *** |
| RGS + Hep.  | $23.02 \pm 2.01$ *** |

与正常对照组比: \*\*\* $p < 0.001$ 。

细胞全部浮起。台盼蓝染色强阳性。

#### 四、肺动脉内皮细胞的鉴定

1. 形态学观察 光镜下内皮细胞呈鹅卵

石样, 单层生长连接成片(图版图1), 而血管平滑肌细胞呈长梭形, 重叠生长, 形成“峰-谷”状, 两种细胞有截然区别。电镜(TEM)下可见胞浆内有成簇长杆状小体, 有膜包绕, 内有沿纵轴方向平行排列的微管样结构(图版图2), 即Weible—Palade小体, 与文献<sup>[9]</sup>报道相同,

2.  $\text{VII R}_1 \text{ Ag}$  的检测 间接免疫荧光法显示细胞核周的胞浆呈强荧光反应(图版图3), 阴性对照未见特异性荧光; 电镜(TEM)免疫胶金法显示胞浆、胞膜以及分泌泡内有胶金颗粒沉着, 阴性对照未见有胶金颗粒存在。

#### 讨论

内皮细胞的分离方法有多种<sup>[2,10,21]</sup>。酶浓度和消化时间至关重要。本实验用0.1%胶原酶消化30 min(37℃), 内皮细胞收获量高, 血管平滑肌细胞混入少, 活细胞占  $94.2 \pm 4.1\%$ 。

为提高贴壁率, 常使用的培养基质有Fn、胶原、白明胶、Laminin及Entactin( $\text{GP}_3$ )等。Bissel<sup>[12]</sup>认为Fn不仅能促进内皮细胞贴壁, 还可使其表面生长因子受体聚合以增强生长因子的作用, 并促进DNA合成。本实验提示Fn与胶原均可提高贴壁率, 其中胶原在早期作用更明显。

促内皮细胞生长物有多种, 本实验所用的几种, 从细胞生长曲线和群体倍增时间提示: 1. HGS和RGS有促内皮细胞生长作用; 2. 肝素与促内皮细胞生长物无协同作用; 3. 肝癌细胞培养液有强烈杀内皮细胞作用, 但有文献<sup>[13]</sup>报道: 某些肿瘤分泌物可促进内皮细胞生长和新生血管形成, 认为是肿瘤灶扩大和转移机制之一。结果不同可能取决于肿瘤分泌物与内皮细胞之间的相互作用。

内皮细胞鉴定, 有两条必备指标: 形态学特征和 $\text{VII R}_1 \text{ Ag}$ 存在。体内只有内皮细胞和巨核细胞内含 $\text{VII R}_1 \text{ Ag}$ , 但两者形态极易区别。本实验两项指标均以两种方法检测, 证明是内

皮细胞。

本文方法所分离的肺动脉内皮细胞,细胞活力、纯度和贴壁率都较高,培养中生长良好,已传6代,生物学特征仍保持正常,冻存后复苏率较高,经鉴定是内皮细胞,可以作为肺动脉内皮细胞的体外模型进行研究。

由于肺动脉的内皮细胞与肺小血管的内皮细胞形态和代谢方面有所差异<sup>[14]</sup>,因此用肺动脉内皮细胞的实验结果在多少程度上反映肺小血管内皮细胞的改变,尚难判定。

### 摘 要

以新生小牛肺动脉为材料,采用灌流抽洗-0.1% 胶原酶消化法分离出小牛肺动脉内皮细胞。以199培养液培养并已传6代,生长率、分裂指数、对数生长期群体倍增时间均与国外报道近似,冻存后复苏率为 $84.2 \pm 8.3\%$ 。通过形态学特征和凝血Ⅷ因子相关抗原检测证实是内皮细胞。纤维连接蛋白或鼠尾胶原作培养基可显著提高该细胞的贴壁率。牛下丘脑和牛视网膜来源的促生长物有显著促内皮细胞生长作用。该细胞体外培养方法的建立,为体外研究肺血管内皮细胞的功能、代谢及病理变化

提供了可靠模型。

### 参 考 文 献

- [1] Ryan, U. S., 1984, *Environmental Health Perspectives*, 56:103—114.
- [2] Jaffe, E. A. et al., 1973, *J. Clin. Invest.*, 52:2745—2756.
- [3] Maciag, T. et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 91: 420—426.
- [4] 鄂征主编, 1988年, 组织培养术, 第63—64页, 人民卫生出版社, 第二版。
- [5] 普里斯特, J. H., 1985年, 医学细胞遗传学和组织培养, 刘权章等译校, 第405—406页, 科学出版社。
- [6] Maciag, T. et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76:5674—5678.
- [7] Glaser, B. M. et al., 1980, *J. Cell Biol.*, 80:298—304.
- [8] Madri, J. A. & Williams, S. K., 1983, *J. Cell Biol.*, 97:153—165.
- [9] Weible, E. R. & Palade, G. E., 1964, *J. Cell Biol.*, 23:101—112.
- [10] Ryan, U. S. & White, L. A., 1985, *Tiss. & Cell*, 17(2):171—176.
- [11] Cole, O. F. et al., 1987, *Cell Biol. Intl. Rep.*, 10:399—405.
- [12] Bissel, M. J., 1982, *J. Therol. Biol.*, 99: 31—68.
- [13] Walker, C. et al., 1987, *J. Cell Sci.*, 87: 739—747.
- [14] Smith, U. & Ryan, J. W., 1973, *Fed. Pro.*, 32:1957—1966.

## G 显带人体中期染色体亚显微结构的扫描电镜观察

郑高飞 应建华 宋颖 曾锋

(衡阳医学院超微结构研究室)

高岳生 阳冬玉 杨新

(衡阳医学院附二医院遗传室)

应用扫描电镜(SEM)和光镜(LM)对比观察技术研究人体中期染色体的带纹亚显微结构国外有一些报道<sup>[1-3]</sup>,他们从各个不同的角度阐述染色体的带纹的某些结构。但至今对其精细结构及其变化规律尚未彻底了解,许多问题有待进一步研究。本实验室用一种简便有效的

染色体G显带SEM技术(改良Harrison<sup>[1]</sup>方法)制出G带型纤维结构明显的染色体样品,曾初步报道,认为染色体的纤维结构较国外报道的更为明显<sup>[4]</sup>。现根据观察到200—300Å染色质纤维结构水平描述人体中期染色体G显带各部分的亚显微结构,并对某些问题进行探