

内皮细胞培养中清除成纤维细胞的新方法

王 毅 朱佩芳 王正国
(第三军医大学野战外科研究所)

在原代细胞培养中很容易混杂成纤维细胞,并且随着传代次数的增加,由于成纤维细胞生长迅速,在培养细胞中所占的比例也日渐增加。本文介绍一种清除成纤维细胞的方法,对各种非成纤维细胞的原代培养有一定参考价值。

以往是用0.1%的胶原酶消化法^[1]来清除成纤维细胞。但由于胶原酶价格昂贵,故并不实用。我们从熊绍银等^[2]用柠檬酸胰酶消化分散细胞的方法中所得到的经验,试用于清除成纤维细胞,取得了较为满意的效果。

一、材 料 和 方 法

(一) 细胞

无菌条件下取小牛肺,沿肺动脉主干分离肺动脉树,结扎各分枝,并在结扎处远端剪断之。用含抗菌素的D-Hank's液(含青霉素100 U/ml,链霉素100 μg/ml)浸泡半小时,然后将肺动脉内皮面翻向外,用D-Hank's液冲洗内皮面5次,结扎残端后,置37℃、0.1%胶原酶中消化半小时,离心收集内皮细胞,以 3×10^5 /ml细胞密度接种于199培养基,37℃、5% CO₂条件下培养,细胞传至第4—5代备用。培养瓶规格为25 ml。

(二) 消化剂的配制

1. 0.25%柠檬酸胰酶 胰酶(国产)2.5 g,柠檬酸钠2.96 g,氯化钠6.15 g,1%酚红1.5 ml,加去离子水1 L溶解。用1 mol氢氧化钠调pH至7.2。用0.2 μm孔径的针头式滤器除菌,小瓶分装, -20℃保存。

2. 0.25%胰酶 取2.5 g胰酶用D-Hank's液1000 ml溶解,用上法除菌,分装和保存。用前调pH至7.2。

3. EDTA-胰酶 先配成含0.02%EDTA的D-

Hank's液1000 ml,再加入2.5 g胰酶,溶解后除菌,分装, -20℃保存,用前调pH至7.2。

(三) 消化清除成纤维细胞

倾倒掉培养瓶中的培养液,立即加入消化液2 ml,置倒置显微镜下观察。内视野内(10×10倍)约20—40%的细胞(包括成纤维细胞和内皮细胞)收缩呈圆形时,立即加入M-199培养基(含10%小牛血清,青霉素100 U/ml,链霉素100 μg/ml, pH 7.2)3 ml,用毛细吸管吹打3—4次后,吸出离心,清洗1次后,置另一培养瓶内培养(含较多成纤维细胞,但仍可继续纯化)。原培养瓶中剩下约60%附壁的内皮细胞(仍含少量成纤维细胞),用培养基清洗一次后,换上新培养液继续培养。1—3天细胞长满后重复此过程2次,即可得到纯度很高的内皮细胞(见图1—4)。

二、结 果

(一) 三种消化剂消化时间的比较

三种消化剂使视野下(10×10倍)20—40%的细胞收缩为圆形所需的时间是:0.25%柠檬酸胰酶:3分钟;0.25%胰酶:2分钟;EDTA-胰酶:1分钟。

(二) 三种消化剂作用后内皮细胞附壁情况比较

三种消化剂消化下来的细胞,经一次培养基清洗后,约80%细胞附壁的时间分别为:0.25%柠檬酸胰酶:12 h;0.25%胰酶:36 h;EDTA-胰酶:48 h。

(三) 三种消化剂作用后细胞恢复和繁殖情况比较

原培养瓶中经三种消化剂分别消化后的剩余细胞,用培养基清洗一次后,再长满的时间为:0.25%柠檬酸胰酶:24 h;0.25%胰酶:

(下转第6页)