

人脐带动、静脉内皮细胞的异质性研究*

杨映波 王正国

(第三军医大学大坪医院创伤急救科 重庆 630042)

内皮细胞(EC)的异质性是指EC之间的结构、功能、抗原成分、代谢特性和对生长因子的反应的不相同。不同器官、相同器官的不同部位,甚至在同一个微血管祥的不同节段的EC之间都可表现出异质性^[1]。对EC异质性研究是近年来的重要进展之一^[2]。对EC异质性的研究将为定点血管病理学提供实验依据,并大大丰富对EC生物学特性的认识。

本文以一次性获得同源性很好的人脐带动脉内皮细胞(HUAEC)和静脉内皮细胞(HUVEC)为材料,从体外培养细胞的形态、免疫细胞化学特点及脱落细胞形态等方面研究了EC的异质性。

材料与方 法

1. 同源 HUAEC 和 HUVEC 的获取和培养^[3]

2. 脱落 HUAEC 和 HUVEC 观察

消化、分离EC之后,室温下离心(1000 rpm, 10 min)。分别吸取 HUAEC 和 HUVEC 上清液(其中含有失去生长活力的脱落细胞)少许,0.4%台盼蓝染 2—3 分钟,普通光镜下观察。

3. APAAP 桥联酶标技术标记细胞 VIII R: Ag

(1) 制片:细胞培养皿内置入约 0.3 cm × 0.3 cm 盖玻片。培养至细胞汇合(一般 72 小时)后,取出培养 EC 片,投入冷丙酮内固定 2 小时以上(4℃),取出,以塑料袋包裹后,置 -22℃ 保存备用。

(2) 染色:按说明书(军科院基础分子免疫室)操作。主要步骤如下:每片滴加 VIII R: Ag 单克隆抗体 20 μl(DAKOPATTS, 美国,工作稀释度 1:150)后,室温下作用 60 分钟;再加入二抗(GAM IgG) 20 μl,作用 30 分钟;最后,滴加碱性磷酸酶底物显色液(新鲜配制) 20 μl, 37℃, 显色 25 分钟。实验均在湿盒内进行,

并且每步完成后以 PBS 洗片, 擦片。阴性对照将一抗改为 PBS, 其余步骤相同。

结 果

1. 培养 HUAEC 和 HUVEC 的形态:通过干涉相差显微镜(TMT-2, OLYMPUS)观察,可见培养 72 小时后的 HUAEC 和 HUVEC 均生长良好,完全汇合,呈铺路石状镶嵌排列;细胞大小均匀,胞核清晰。但是,两种细胞的形态明显不同。HUAEC 大多为多角形(图版图 1), 而 HUVEC 多为长梭形(图版图 2)。

2. 细胞表面 VIII R: Ag 含量:经 APAAP 桥联酶标法标记后, HUVEC 呈强阳性反应。细胞表面呈现深着色的玫瑰色颗粒(图版图 3)。相形之下, HUAEC 着色较浅,颗粒稀疏(图版图 4)。

3. 脱落 HUAEC 和 HUVEC 的形态:经台盼蓝染色后,脱落细胞明显着色。脱落 HUAEC 长而曲折,呈带形(图版图 5)。相形之下,脱落 HUVEC 短而平直,呈梭形(图版图 6)。

讨 论

VIII R: Ag 是 EC 的标志性抗原,但不同部位 EC 的 VIII R: Ag 含量并不相同。王振义^[4]曾用葡萄球菌蛋白 A(SPA)酶联标记法进行 EC 的定位研究。发现不同脏器血管中, VIII R: Ag 的分布不一致。脐静脉中的 VIII R: Ag 含量似比脐动脉的多。本文结果与王氏的结果类似。但由于本文采用了 APAAP 桥联酶标技

* 国家自然科学基金资助课题。

术, HUVEC 和 HUAEC 表面 VIII R:Ag 含量的差异更加明显^[5]。应当指出, 脐带动、静脉 EC 所处的内环境与机体大部分动、静脉 EC 所处的内环境不尽相同。脐静脉内血液的含氧量为 80%, 而脐动脉内血液的含氧量仅为 58%。并且, EC 的 VIII R:Ag 含量与血液中的营养成分相关。因而提示, 本实验中脐带动、静脉内皮细胞在 VIII R:Ag 含量上的差异可能与血中含氧量不同有关。

Cornhill 等^[6]观察到虽然 EC 在血管原位都是顺血管方向纵行排列的, 但不同部位血管的 EC 形态不尽相同。如衬在微血管内的 EC 扁平而细长, 衬在大血管内的 EC 为多角形。Cornhill 等认为, 产生这种差异的原因可能与不同部位 EC 所承受的血流动力学应力(即物体受到外力作用时, 其内部产生的对抗的力)不同有关。本实验观察到, HUAEC 大多为多角形, 与 Cornhill 文中衬在大血管内的 EC 的形态类似; 而 HUVEC 多为长梭形, 与 Cornhill 文中衬在微血管内的 EC 的形态类似。其原因可能亦与两者在活体内所承受的血流动力学应力不同有关。但目前对 EC 在不同的血流动力学应力影响下如何形成不同的细胞形态的机理尚不清楚。

本文首次观察到脱落动、静脉 EC 的形态存在明显差异。脱落 HUAEC 长而曲折, 呈带形; 而 HUVEC 短而平直, 呈梭形。Hladovec 等^[7]曾经发现在脱落的 EC(即循环内皮细胞, CEC)中有一种带尾状结构的细胞成分, 并推测这种 EC 可能来自动脉。Hladovec 认为, 尾状结构的作用可能是将细胞更牢固地锚在动脉基底膜上, 并构成血管的骨架结构。因而, 尾状结构可能是来自动脉的 EC 所具有的一种形态特征。脱落动、静脉 EC 的不同形态与 CEC 中的尾状结构有无关系, 尚待进一步研究。

摘 要

异质性 (heterogeneity) 是内皮细胞重要的生物学特征之一。本文从体外培养细胞的形态、免疫细胞化学反应和脱落细胞形态等方面研究了人脐带动脉内皮细胞 (HUAEC) 和静脉内皮细胞 (HUVEC) 的异质性。实验结果表明: 1. 体外培养的 HUAEC 以多角形为主, HUVEC 以长梭形为主; 2. HUAEC 表面的 VIII R:Ag 较少, HUVEC 表面的 VIII R:Ag 较多; 3. 脱落的 HUAEC 长而曲折, 呈带形, 但 HUVEC 则短而平直, 呈梭形。上述结果提示, HUAEC 和 HUVEC 之间存在着明显差异。

图 版 说 明

1. 人脐带动脉内皮细胞(干涉相差摄影, IMT-2, OLYMPUS, $\times 200$)
2. 人脐带静脉内皮细胞(干涉相差摄影, IMT-2, OLYMPUS, $\times 200$)
3. 人脐带静脉内皮细胞的 VIII R:Ag 标记 (APA-AP 桥联酶标法, $\times 250$)
4. 人脐带动脉内皮细胞的 VIII R:Ag 标记 (APA-AP 桥联酶标法, $\times 250$)
5. 脱落的 HUAEC, $\times 250$
6. 脱落的 HUVEC, $\times 250$

参 考 文 献

- [1] Kumar, S. et al., 1987, *Differentiation*, 36: 57—70.
- [2] 杨映波、王正国, 1993, 国外医学生理、病理科学与临床分册, 13: 30—33.
- [3] 杨映波、王正国, 1992, 细胞生物学杂志 14: 插页 3—4.
- [4] 王振义, 1983, 中华血液学杂志, 4: 179—183.
- [5] Cordell, J.L. et al., 1984, *J Histochem Cytochem.*, 32: 219—229.
- [6] Cornhill, JF et al., 1980, *Atherosclerosis*, 25: 321—325.
- [7] Hladovec, J. and Rossmann, P., 1973, *Thromb Res*, 3: 665—674.