

酶消化法分离老龄 SD 大鼠血管平滑肌细胞

王明勇, 陈 枫, 陈 庄

(泸州医学院附属医院医学实验中心, 四川泸州 646000)

摘要:目的 采用酶消化法培养老龄 SD 大鼠血管平滑肌细胞, 为血管疾病的研究提供大量的原代平滑肌细胞。方法 无菌取老龄 SD 大鼠主动脉, 采用 0.2% II 型胶原酶消化分离血管平滑肌细胞, 自然纯化及差速贴壁纯化血管平滑肌细胞, 免疫组化鉴定平滑肌细胞 α 肌动蛋白。结果 免疫组化染色显示细胞纯度在 95% 以上。结论 酶消化法用于血管平滑肌细胞的培养有利于获得大量的高纯度细胞供实验研究。

关键词: 细胞培养技术; 肌, 平滑, 血管; 免疫组织化学; 肌动蛋白类; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)34-3482-02

A method of enzyme digestion for dissociation of vascular smooth muscle cells in aged SD rats

Wang Mingyong, Chen Feng, Chen Zhuang

(Medical Experimental Research Center, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000)

Abstract: Objective To culture vascular smooth muscle cells of aged Sprague Dawley (SD) rats using enzymatic dissociation method and provide a large number of primary smooth muscle cells for research of vascular diseases. **Methods** Aortas of aged SD rats acquired sterilely were subjected to digestion. Vascular smooth muscle cells were digested and dissociated by 0.2% II collagenase, purified by natural purification and differential adhesion. α actin of smooth muscle cells were identified by immunohistochemistry. **Results** Immunohistochemical staining demonstrated the cell purity was more than 95%. **Conclusion** Enzymatic digestion method employed in vascular smooth muscle cell culture is conducive to obtaining a large number of cells with high purity for experimental research.

Key words: cell culture techniques; muscle, smooth, vascular; immunohistochemistry; actins; rats

随着对心血管疾病, 特别是动脉粥样硬化的研究的进一步深入, 提供稳定、大量的老龄大鼠血管平滑肌细胞是进行这些研究的基本保证。胚胎组织或幼龄动物的组织和器官分裂、增殖旺盛, 老龄动物则相反, 所以老年动物的组织细胞培养非常不易^[1], 本研究采用了组织植块培养法、悬浮组织块培养法、酶消化分散细胞培养法对老龄 SD 大鼠主动脉平滑肌细胞分别进行原代培养^[2-5], 相比其他方法, 酶消化法分离老龄大鼠平滑肌细胞稳定且易掌握, 本研究采用酶消化法成功稳定地分离、纯化培养老龄大鼠平滑肌细胞, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验动物: 健康的老龄 SD 大鼠, 24 月龄, 体质量 (546 \pm 37) g, 泸州医学院动物中心提供。主要试剂及仪器: DMEM/F12 培养基 (GIBCO 公司), 0.25% 胰酶 (GIBCO 公司), 胎牛血清 (杭州四季青生物公司), II 型胶原酶 (GIBCO 公司), 抗平滑肌肌动蛋白单克隆抗体 (武汉博士德生物公司), 免疫组化染色试剂盒 (武汉博士德生物公司), Thermo 二氧化碳培养箱 (美国)。LICA 倒置显微镜 (德国)。

1.2 方 法

1.2.1 动脉平滑肌细胞的分离和原代培养 动物经颈动脉放血处死, 在无菌条件下迅速取出主动脉, 立即放入 DMEM/F12 液的平皿中漂洗 2~3 次, 直到将凝血洗净, 用弯头小镊轻柔地剥除外膜纤维脂肪层, 纵行剪开血管, 在 DMEM/F12 液中漂洗 2 次, 将血管内膜面向上, 铺于小木板上, 用单面刀片自上而下刮 1~2 次, 以除去内皮细胞, 用眼科镊小心地撕下中膜内、中层, 置于 10 mL 试管壁上, 用眼科剪将其剪至糊状, 加入 2~5 mL 0.2% II 型胶原酶液 (用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基配制) 将组织块混匀, 置 5% CO₂ 饱和湿度的 37 °C 培养箱中消化 12~18 h, 待小块血管组织完全消化溶解后, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 细胞沉淀中加入新鲜配制的 DMEM/F12 培养基 (含 20% 胎牛血清, 青霉素 100 u/mL 和链

霉素 100 μ g/mL, pH7.2), 轻轻吹打混匀, 然后按一个 SD 大鼠胸主动脉消化分散获得的细胞接种在一瓶细胞培养瓶内 (25 mL 容积), 放入 5% CO₂ 饱和湿度的 37 °C 培养箱中静置培养 1 h, 使细胞悬液中黏附能力较强的成纤维细胞先行黏附, 然后小心地吸出细胞悬液 (切勿振荡, 以免搅动先行贴壁的成纤维细胞) 接种到另一相同规格的培养瓶中, 放入 5% CO₂ 饱和湿度的 37 °C 培养箱中静置培养 72 h 后, 换新鲜培养液, 以后根据细胞生长情况 2~3 d 换 1 次液。

1.2.2 传代培养 细胞长成单层和多层交错的致密细胞层, 即可传代。传代时吸尽原有培养液, 加 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化 30~60 s, 镜下观察到细胞成片地收缩时, 加入 3 mL 含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基立即终止消化, 用弯头滴管将细胞自瓶壁上吹下来, 以 1:2 分装接种, 5 d 后可再传代。

1.2.3 细胞的纯化 (1) 自然纯化: 由于在组织取材时去除了绝大部分的血管内、外膜, 酶消化所得的细胞绝大多数为平滑肌细胞, 随着传代次数的增多, 平滑肌细胞可排除其他细胞的生长而优势增殖。(2) 差速黏附处理^[6-7]: 悬液接种到培养瓶内, 水平放置, 置 37 °C CO₂ 培养箱内培养 30~60 min, 使细胞悬液中黏附力较强的成纤维细胞先行黏附, 收集未贴壁的细胞悬液接种到另一培养瓶中继续培养。

1.3 鉴定 (1) 形态学观察: 观察细胞的大小、形态、生长特点、排列方式; (2) 免疫细胞化学染色: 将传代的细胞接种于放有盖玻片的 6 孔板中, 当细胞玻片生长至 80% 融合时, 用 α 肌动蛋白抗体进行免疫组化染色分析^[8]。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察 当细胞长满瓶底时, 可见平滑肌细胞的典型生长特点: 细胞呈梭形, 平行生长, 束状排列, 密集和稀疏处相互交错呈现“峰谷”状, 峰处多为多层细胞, 谷处没有细胞或 1~3 层细胞, 这易与成纤维细胞区别, 后者表现为“同心

圆”状的生长^[9]。

2.2 平滑肌免疫组化鉴定 α 肌动蛋白免疫组化染色可见细胞质内含有与细胞长轴相平行的黄色颗粒,证实为平滑肌细胞,细胞纯度在 95% 以上^[10-11]。

3 讨论

随着动物组织细胞培养技术和培养基质量的不断提高,目前对于血管平滑肌细胞的体外分离培养有很多报道,但对老龄 SD 大鼠的血管平滑肌细胞的报道少见,由于老龄动物组织细胞较年轻的动物组织细胞不易培养,寻找一种稳定的对老龄 SD 大鼠的血管平滑肌细胞培养的方法是非常重要的,本研究经过多次预实验,包括组织植块培养法、悬浮组织块培养法、酶消化分散细胞原代培养法,发现,植块培养法和悬浮组织块培养法成功率低,不易掌握,不能稳定地获得实验所需的细胞,即使成功,但耗时长,并且易产生纤维细胞等杂质,0.2% II 型胶原酶消化分离细胞原代培养法可稳定、大量的获得实验所需的细胞。这可能是因为老龄动物血管平滑肌细胞出现增龄变化,分离后休眠期长,进入分裂的细胞而不易在体外生长增殖,而且老龄动物动脉血管中膜,胞外基质增加,血管平滑肌细胞被增高的弹力膜和胶原纤维分隔,组织植块培养法中细胞爬出阻力增大,酶消化法可将胞外基质消化,细胞易游离出来。总之成功的老龄 SD 大鼠血管平滑肌细胞培养需要重视以下几点:(1)快速、仔细、彻底剥离血管中膜层,以获得高纯度的平滑肌组织;(2)组织块应尽量剪碎,便于很好地消化,消化程度是以肉眼不见消化液中的组织块,而是均匀黏稠状的混悬液为宜,在相差显微镜下可见大小成团细胞和单个细胞,如果 12~18 h 都不能很好地消化组织块,应及时更换胶原酶;(3)高质量的 II 型胶原酶和胎牛血清是成功的关键;(4)分离组织时动作一定要轻柔,避免对血管组织的过度损伤;(5)在开始培养的 72 h 内,必须绝对静置,以防刚贴壁的细胞重新漂浮而死亡;(6)传代时掌握好消化的时机是成功的关键,当细胞变成不透亮并细胞间有间隙出现,即可终止消化,消化后以成片成团的细胞成活率为高;(7)细胞培养全过程中要求严格的无菌操作^[12]。

本实验用 0.2% II 型胶原酶(用含的 20% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基配制)消化老龄 SD 大鼠主动脉平滑肌细

胞,并综合运用自然纯化法、差速贴壁法纯化获得高纯度血管平滑肌细胞,经鉴定,细胞纯度可达 95% 以上,本方法稳定易掌握,具有一定的推广价值,为心血管系统病研究提供稳定的细胞来源。

参考文献:

- [1] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 2 版. 北京:世界图书出版社, 2007.
 - [2] 方正旭,王伶,刘东. 关于动脉平滑肌细胞培养的几个问题[J]. 江西医学院学报, 2002, 42(5): 157-158.
 - [3] Di Luozzo G, Bhargava J, Powell RJ. Vascular smooth muscle cell effect on endothelial cell endothelin-1 production[J]. J Vasc Surg, 2000, 31(4): 781-789.
 - [4] Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture[J]. Physiol Rev, 1979, 59(1): 1-61.
 - [5] 周晓莉,雷寒,柳青. 血管平滑肌细胞的培养及鉴定[J]. 重庆医学, 2005, 34(6): 877-879.
 - [6] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 2001.
 - [7] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京:北京出版社, 1995.
 - [8] 李萍,杨志刚,文国容,等. 茶多酚对 ACC-M 细胞株 Fas、FasL 表达的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(3): 268-269.
 - [9] 章静波. 细胞生物学实用方法与技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995.
 - [10] 王生兰,苏娟,徐一洲,等. 大鼠血管平滑肌细胞体外培养的类型转换及其鉴定[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(4): 268-269.
 - [11] 来利红,王如兴,蒋文平. 酶消化法急性分离大鼠主动脉平滑肌细胞及其鉴定[J]. 苏州大学学报:医学版, 2008, 28(1): 23-24.
 - [12] 费雷谢尼. 动物细胞培养-基本技术指南[M]. 张静波,徐存拴,译. 4 版. 北京:北京科学出版社, 2004: 116-120.
- (收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-07-12)
-
- (上接第 3481 页)
- [5] Castillejo MA, Maldonado AM, Dumas-Gaudot E, et al. Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula*[J]. BMC Genomics, 2009(10): 294.
 - [6] 张慧珍,巴月,杨继要,等. 肺癌相关蛋白的筛选与鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(1): 6-8.
 - [7] Heukeshoven J, Dernick R. Effective blotting of ultrathin polyacrylamide gels anchored to a solid matrix[J]. Electrophoresis, 1995, 16(5): 748-756.
 - [8] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2004, 25(9): 1327-1333.
 - [9] Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4(12): 3665-3685.
 - [10] 蒋兰兰,姜惠,张克勤. 大鼠成骨细胞分泌组双向电泳样品制备方法的建立[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007, 27(7): 770-772.
 - [11] Gagné JP, Ethier C, Gagné P, et al. Comparative proteome analysis of human epithelial ovarian cancer[J]. Proteome Sci, 2007(5): 16.
 - [12] 刘健平,陈国华,陈本美,等. 蛋白质组双向电泳实验中一些常见失误的分析[J]. 生命科学研究, 2003, 7(2): 177-179.
 - [13] Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity[J]. Electrophoresis, 1999, 20(3): 601-605.
 - [14] 燕贞,刘桂芝,王建设,等. 蛋白质组学方法筛选早期肺鳞癌相关蛋白[J]. 肿瘤, 2010, 30(2): 130-133.
 - [15] 赵欣,蒲小平. 蛋白质组学在药物研究中的应用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(8): 988-991.
 - [16] 陈倩,谭彬,王应雄,等. 自然流产患者蜕膜组织疾病特异蛋白的初步筛选与鉴定[J]. 重庆医学, 2010, 38(21): 2861-2863.
- (收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-28)