

大鼠血管外膜成纤维细胞的原代培养 及生物学行为研究

鹿燕敏, 李兰芳, 霍海如, 谭余庆*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立大鼠血管外膜成纤维细胞的体外分离、培养及鉴定的方法, 并对其生物学特征进行观察。方法: 通过组织块贴壁法, 以含 20% 胎牛血清的 DMEM 诱导细胞生长, 0.25% 的胰酶消化细胞传代后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 在 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度下培养。倒置显微镜下观察成纤维细胞形态, 进行细胞中间丝蛋白的免疫化学鉴定, 并绘制细胞生长曲线。结果: 成纤维细胞能够迅速从组织块长出并增殖, 波形蛋白免疫细胞化学染色为阳性, 结蛋白及第 VIII 因子染色为阴性, 细胞在第 (2~4) 天进入指数生长期。结论: 该方法所获得的血管外膜成纤维细胞可在体外稳定培养, 为在细胞水平研究血管再狭窄机制提供了充足可靠的靶细胞模型。

[关键词] 成纤维细胞; 细胞培养; 细胞鉴定; 生物特征

[中图分类号] Q26 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)10-0061-03

Primary Culture Rat Vascular Adventitial Fibroblasts and Biological Behaviour Study

LU Yan-min, LI Lanfang, HUO Hai-ru, TAN Yu-qing*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the method of isolation, cultivation and identification of rat vascular adventitial fibroblasts in vitro, and observe its biological behaviour. **Methods:** Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was the basic culture medium, being supplemented with 20% fetal bovine serum using for culturing thoracic aortal adventitia tissue pieces, and with 10% fetal bovine serum using for culturing passage cells. The fibroblasts were incubate at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air in the incubator. Growth kinetics, cellular morphologies were observed, and the cultured cells were identified by cell cytoskeleton immunostaining. **Results:** The isolated fibroblasts

could grow and proliferate in vitro, and immunostaining of vimentin was positive, while which of desmin and vWF were negative. The exponential phase of growth was from the second to the fourth day after passage. **Conclusion:** Rat vascular adventitial fibroblasts can be cultured in stable condition in vitro, and sufficient and reliable target cells can be obtained for the study of mechanisms of vascular stenosis at molecular level.

[**Key words**] fibroblasts; cell culture; cell identification; biological behaviour

血管外膜成纤维细胞是血管外膜的主要细胞成分,当血管受损时,细胞被激活发生表型改变、增殖、迁移、分泌胶原蛋白、参与血管的修复过程^[1]。成纤维细胞分泌大量胶原蛋白,导致胶原的过度沉积是瘢痕形成的重要环节。血管外膜成纤维细胞的生物学特性被认为在血管损伤后狭窄等病变过程中发挥重要作用。因此,血管外膜成纤维细胞培养方法的建立将对探讨血管硬化性和狭窄性疾病发生机制及治疗具有重要意义。本实验探索了大鼠血管外膜成纤维细胞的体外培养方法及鉴定方法,观察并总结了其生长特征。

1 材料与方 法

1.1 材料 SD 大鼠(体重 250 g 左右)。Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(Dulbecco modified Eagle medium, DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶为 Gibco BRL 公司产品;MTT, DMSO 为 SIGMA 公司产品;Vimentin 小鼠单克隆抗体(NEOMARKERS)、Desmin 兔单克隆抗体(NEOMARKERS)、兔抗人 vWF(第 VIII 因子)单克隆抗体(CHEMICON)、抗小鼠免疫组化试剂盒、HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)均购自晶美公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原代细胞取材及培养 大鼠断头处死,75%乙醇浸泡 5 min,无菌条件下取胸主动脉,放入无菌预冷的 PBS 中,清洗后纵向剖开血管腔,刮去血管内膜和中膜,剩下薄层的血管外膜,转移入含有 20%胎牛血清的 DMEM 培养基中,剪成约 1 mm³ 小块,吸弃多余的培养基,将组织块均匀铺于培养皿上,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱干涸 24 h,待组织块贴壁后向培养皿中滴加少量含有 20%胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中,1 次/2 d 更换培养液,待细胞生长达到 70%~80% 融合状态时,用 0.25% 胰酶消化细胞,镜下观察细胞变圆、细胞间连接断开,加入适量 10% DMEM 培养基吹打成的细胞悬液接种于培养瓶中,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养,待细胞贴壁长满后按 1:3 传代。

1.2.2 细胞形态学观察和免疫化学鉴定^[2] (ABC

法) 倒置显微镜下观察细胞形态和生长状态;取对数生长期细胞,消化吹打成细胞悬液,接种于铺有盖玻片的培养皿中,待细胞长至适当密度时,取出盖玻片,用 0.01 mmol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,4 °C 预冷的丙酮固定 10 min, PBS 清洗 5 min × 3 次。0.1% TritonX-100 内浸 20 min,以增加细胞膜通透性, PBS 清洗 5 min × 3 次。3% H₂O₂-甲醇溶液处理 30 min,以封闭内源性过氧化物酶, PBS 清洗 5 min × 3 次。滴加 10% 山羊血清,湿盒中封闭 30 min,防止非特异性吸附, PBS 清洗 5 min × 3 次,滴加小鼠单克隆抗波形蛋白(vimentin)抗体,4 °C 过夜清洗后滴加抗小鼠生物素化二抗,37 °C 30 min 后 PBS 清洗 5 min × 3 次,滴加 HRP 标记链亲和素,20 min, DAB 显色后封片。阴性对照一抗用 PBS 代替。同样方法进行结蛋白(desmin)、第 VIII 因子(vWF)的细胞免疫化学染色。

1.2.3 细胞生长曲线测定(MTT 法) 将成纤维细胞消化吹打均匀后调整细胞密度为 2 × 10⁴·mL⁻¹,接种于 96 孔板,分为 7 组,每组 5 个复孔,每孔 200 μL,每隔 24 h 检测 1 组,连续 7 d。具体操作如下:于 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养,待细胞贴壁后,每孔加入 20 μL MTT(5 mg·mL⁻¹),37 °C,5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h,终止培养后吸弃孔内上清液,每孔加入 200 μL 二甲基亚砷,振荡后,酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测定吸光度(A 值)^[3]以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

2 结果

2.1 细胞原代培养与传代 血管外膜组织块干涸 24 h 后贴附于培养皿底部,第 3~4 天可见长梭形的细胞从组织块边缘萌出,细胞呈梭形和多边形(见图 1),之后迅速增殖,1 周左右即可长至融合状态,胰酶消化进行传代培养,传代后细胞表现为优势生长,呈放射状或网状交织走行。细胞经两次传代后即可达到纯化,可稳定传代至 7~8 代。

2.2 细胞形态学观察及鉴定 显微镜下观察细胞呈梭形或多角形。波形蛋白免疫化学染色显示成纤

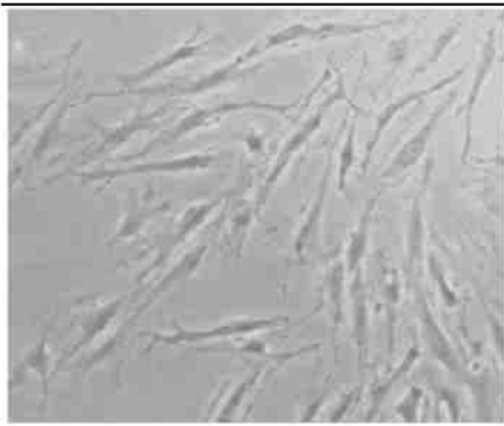


图 1 原代成纤维细胞(传代前)($\times 200$)

维细胞胞浆染成棕黄色(见图 2), 阴性对照无着色, 说明细胞是间质性来源。结蛋白、第 VIII 因子均无着色, 排除是平滑肌细胞和内皮细胞的可能。

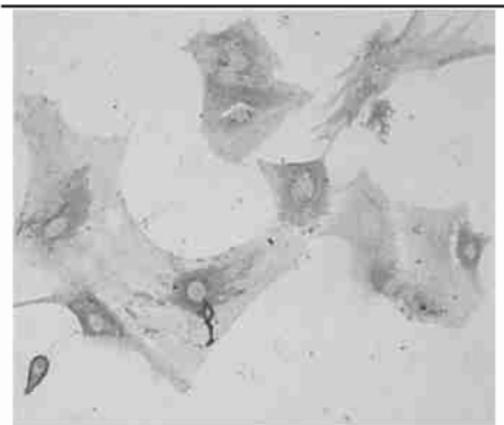


图 2 细胞波形蛋白 DAB 染色($\times 400$)

2.3 成纤维细胞的生物学特性 MTT 法可以较准确地反映活细胞数, 能较客观地反映细胞的增殖情况。本实验以 $2 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于 96 孔板, 细胞于第 7 天长满。从生长曲线(见图 3) 可以看到, 细胞第 1 天处于潜伏期, 第 2~4 天处于指数分裂期, 第 5 天进入平台期。

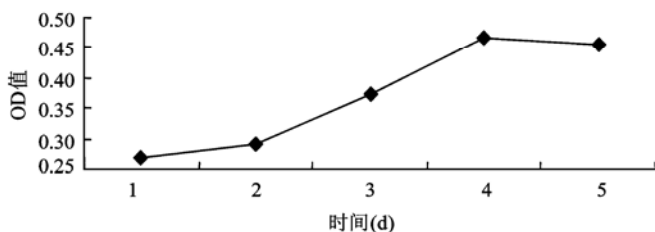


图 3 细胞生长曲线

3 讨论

Sartore 等^[4]指出, 血管外膜成纤维细胞不仅增殖迁移参与新生内膜的形成, 而且表达胶原蛋白, 导致血管收缩和纤维化, 是病理性血管重构的重要原因。血管外膜成纤维细胞所起的作用类似于非血管组织的修复过程, 即在体外能够缩短胶原的长度, 在体内能够使伤口缩合。它在血管损伤后狭窄及动脉粥样硬化等疾病中起着重要作用。

成纤维细胞具有较强的分裂、增殖能力, 适应性强, 易培养, 性状稳定, 很难发生转化。我们进行了大鼠胸主动脉外膜成纤维细胞培养方法的探索, 包括胰酶消化法, 发现组织块法简便, 可操作性强, 重复性好, 为血管损伤后发生纤维化的研究提供了良好的平台。根据 MTT 法原理, 各孔光密度值与细胞活力成正比关系, 我们采用该法间接说明细胞的数量, 反映细胞的生长状态。对于该细胞的鉴定, 我们采用细胞中间纤维免疫化学法, 波形蛋白在组织病理学中作为最常用的间叶组织的标记, 是许多种细胞普遍表达的一种非特异抗原, 而结蛋白是平滑肌细胞的特异性标记物, 第 VIII 因子是内皮细胞的标记物^[5], 其中来源于小鼠和兔的一抗经证实均与大鼠源性的抗原发生特异性结合, 因此我们采用三者来共同佐证了细胞来源是间质性的, 排除了其肌性和内皮性细胞来源的可能。

[参考文献]

- [1] Saverio Sartore, Angela Chiavegato, Elisabetta Faggini, *et al.* Contribution of Adventitial Fibroblasts to Neointima Formation and Vascular Remodeling: From Innocent Bystander to Active Participant[J]. *Circ. Res.*, 2001, 89: 1111-1121.
- [2] D.L. 斯佩克特, R.D. 戈德曼, L.A. 莱因万德. 细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 1004-1010.
- [3] 李素文. 细胞生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 115.
- [4] Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, *et al.* Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant[J]. *Circ Res*, 2001, 89(12): 1111-1121.
- [5] 李甘地. 组织病理技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 82-86.