

• 方法学研究 •

大鼠腹膜间皮细胞的原代培养与鉴定

曾莉*, 徐庆, 金桂兰, 夏卫军, 陈卫平, 钱丽
(南京中医药大学, 江苏南京 210046)

[摘要] 目的: 建立简便有效的大鼠腹膜间皮细胞(PMC)的体外培养方法。方法: 用0.25%胰蛋白酶-0.16% EDTA_{a2}消化大鼠腹膜组织, 细胞悬液经100目筛网滤过后进行培养。用形态学、免疫组化(SP法)鉴定细胞。结果: 分离培养的细胞光镜下呈铺路鹅卵石状。电镜下可见丰富的微绒毛和内质网。免疫组化鉴定显示波形蛋白抗原阳性, 第8因子、CD45抗原阴性, 证实培养的细胞的确是PMC。结论: 大鼠腹膜间皮细胞培养成功, 该模型可为进一步研究腹腔粘连的防治提供实验基础。

[关键词] 腹膜; 间皮细胞; 胰蛋白酶; 免疫组化

[中图分类号] Q26 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)10-0059-03

腹腔粘连是腹盆腔手术后常见的并发症, 近年来对其形成机制有了较深入的研究, 认为腹腔粘连的形成与多种因素有关, 其中腹膜间皮细胞(PMC)的完整性及功能正常与否是腹腔粘连形成的关键因素^[1]。建立PMC培养体系, 为体外研究其生理功能及其在抗腹腔粘连中的细胞分子机制研究提供了有效手段。我们根据经验及文献方法并加以改进, 研究建立了大鼠腹膜间皮细胞(RPMC)培养方法, 为进一步研究腹腔粘连的防治提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠, 体重(250~270)g, 由南京中医药大学实验动物中心购自上海斯莱克实验动物责任有限公司, 实验动物生产许可证: SCXK(沪)2003-0003; 实验动物使用许可证: SYXK(苏)2002-0123。

1.1.2 主要仪器设备 眼科剪、镊, 培养皿, 50 mL培养瓶, 10 mL尖底离心管, CO₂培养箱, 超净台, 离心机, 倒置相差显微镜, 100目不锈钢筛, 0.22 μm滤膜过滤器, 6孔板。

1.1.3 主要试剂 1640培养液(Invitrogen Corporation

公司)使其含有青链霉素各100 U·mL⁻¹, 小牛血清20%; PBS液; 细胞消化液, 将胰蛋白酶(国药集团化学试剂有限公司)2.5 g, EDTA二钠盐0.16 g溶于1 000 mL PBS液中, 过滤除菌, 分装于小瓶内, -20℃保存; 免疫组化抗体(波形蛋白抗体, 第8因子抗体 CD45抗体, Elivision™ plus 广谱试剂盒)均为福建迈新公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PMC的原代培养 将大鼠处死, 浸泡于75%酒精中置于紫外线下30 min。将大鼠移至方盘内, 开腹, 无菌摘取腹膜, 将剪取的腹膜组织置于无菌培养皿内, 用PBS漂洗3次后放入50 mL培养瓶内, 加入0.25%胰蛋白酶-0.016% EDTA细胞消化液20 mL, 放置于37℃, 5% CO₂培养箱内消化25 min, 每5 min振摇1次, 最后5 min保持静止。消化结束后将消化液用100目不锈钢筛过滤于培养皿内, 加入等量含20%的小牛血清的1640完全培养液终止消化。用移液器分装于10 mL尖底离心管, 1 000 r·min⁻¹离心10 min, 弃上清, 加入适量完全培养液溶解细胞沉淀, 分装于50 mL培养瓶, 放置于37℃, 5% CO₂, 湿度95%培养箱内培养。

1.2.2 PMC的传代培养 原代细胞培养24 h后, 以等体积的新鲜完全培养液替换瓶内全部陈旧培养液, 此后每3 d换液1次。约培养(4~7) d细胞生长融合, 可以首次传代。当细胞生长融合成单层, PBS漂洗2次, 每瓶加入完全消化液2 mL, 在37℃, 5% CO₂培养箱内消化15 min。镜下观察细胞消化情况,

[收稿日期] 2007-12-11

[基金项目] 江苏省中医药局资助项目(H05062), 江苏省自然
高校科学基金(05KJB360094)

[通讯作者] * 曾莉, Tel: (025) 85811788; E-mail: zengbingli@
163.com

细胞脱落变形后,加入 4 mL 完全培养液终止消化。将细胞悬液分装于离心管内 $1\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ 离心 10 min,弃上清,加入适量完全培养液溶解细胞沉淀,分别传代于 50 mL 培养瓶和 6 孔板(盖玻片泡酸,洗净,烘干,在盛有多聚赖氨酸的塑料培养皿内浸泡 5 min~ 10 min,取出,在干燥箱内 $60\ ^\circ\text{C}$ 烘干 1 h,高压灭菌。将灭菌后的盖玻片放置于 6 孔板内),加入适量完全培养液,继续在 $37\ ^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$, 湿度 95% 的培养箱中静置培养,至细胞完全贴壁伸展。

1.2.3 PMC 的鉴定 免疫组化鉴定:细胞爬片取出入 10% 中性福尔马林固定 30 min;入 0.1% TritonX100;滴加即用型一抗,室温下孵育 60 min PBS 洗 3 次。每张盖玻片滴加 50 μL ElivisionTM plus 广谱试剂盒中的试剂 A,室温下 20 min, PBS 洗 3 次。每张盖玻片滴加 50 μL ElivisionTM plus 广谱试剂盒中的试剂 B,室温下 30 min, PBS 洗 4 次;DAB 显色,苏木素复染;脱水;封片。透射电镜鉴定:消化间皮细胞, $1\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ 离心 5 min, 3% 戊二醛固定, PBS 洗涤 2 次;1% 锇酸固定 30 min, PBS 浸洗 2 次,每次 10 min;脱水;丙酮固定 10 min;Epon812 浸泡、包埋;LKB-V 型超薄切片片机切片(70 μm);H-600 透射电镜(日本)下观察、拍片。

2 结果

光镜下刚从腹膜消化下来的间皮细胞呈分散的小圆型细胞,约 24 h 左右贴壁,个别细胞伸展。72 h 所有贴壁细胞均伸展,呈梭形等,边缘不整,细胞呈现拉网状生长,与相邻的细胞相互连接。以后细胞拉网生长现象减少,生长融合呈多角形,大小较为一致,似铺路石样外观。免疫组化鉴定,光镜下观察所培养细胞的波形蛋白染色为阳性(图 1),是间皮细胞的特征;透射电镜下可见细胞表面存在大量的微绒毛,细胞浆内有丰富的内质网和线粒体,未见 Weibel palade 小体(图 2)。



图 1 免疫组化波形蛋白($\times 10, \times 20, \times 40$)

3 讨论

间皮细胞是最难培养的上皮细胞之一,且不易

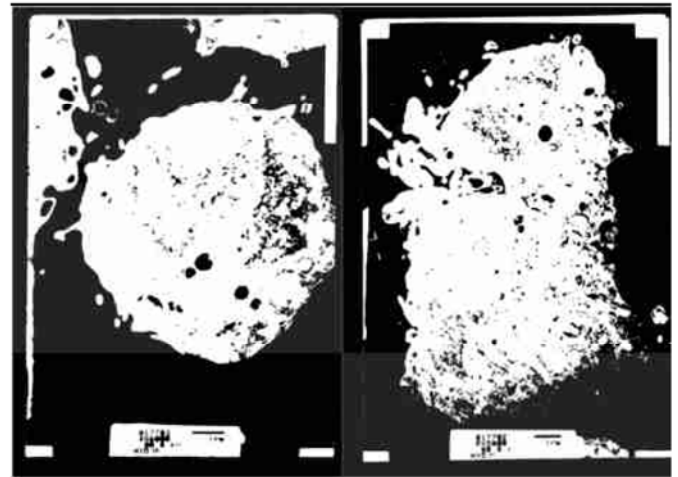


图 2 透射电镜下间皮细胞超微结构

与成纤维细胞鉴别,两者在相差显微镜下都呈梭形,而间皮细胞融合后呈多边形,形成铺路石样外观,有别于成纤维细胞的外形。根据免疫组化结果和电镜结果排除了培养细胞为成纤维细胞(波形蛋白抗原阳性,细胞表面无微绒毛),内皮细胞(第 8 因子抗原阳性,细胞表面无微绒毛)和白细胞(CD45 抗原阳性)的可能。证实本实验培养的细胞是 RPMC。因此本研究成功地建立了 RPMC 体外培养模型。

间皮细胞培养中要注意以下几点:(1)正确确定首次换液时间,避免换液过早,最好第 3 d 进行,动作轻柔,减少振荡,以免干扰细胞贴壁,换液越早丢失的细胞数目越多;(2)消化时间不宜超过 30 min,否则成纤维细胞出现的可能性增大;(3)培养瓶用明胶或鼠尾胶原包被,更利于细胞贴壁;(4)注入培养瓶中的间皮细胞要具备一定细胞密度,生长良好的细胞可促进其它细胞生长。

目前国内外的文献已介绍了多种包括人和大鼠在内的间皮细胞培养方法,本实验室也尝试过这些方法,通过比较,认为这些培养方法均存在一定的瑕疵,不能满足科学研究的需要。胰蛋白酶消化组织培养法^[2-3]将网膜组织剪碎易于损伤细胞,而且增加了成纤维细胞污染的机会;网膜组织块直接培养法,培养周期长达 20 d 之久,同样造成了成纤维细胞的大量污染;腹水培养法,需收集大量腹水,对大量液体的离心需要特殊的离心设备,实用性不高;胶原酶消化法^[4]则费用昂贵;腹腔灌注消化液法^[5]在实际操作中容易染菌,而且抽取灌注液并非易事。本实验所建立的体外 RPMC 培养模型,操作简单,培养迅速,可重复性强,纯度高,确实为一种经济实用的培养方法,为进一步研究腹腔粘连的防治提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] 刘洪斌,李东华,郭世铎. 腹腔粘连形成机制及治疗研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2005, 11(1): 84-86.
- [2] Stylianou E, Jenner LA, Davies M, *et al.* Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells[J]. *Kidney Int*, 1990, 37: 1563-1570.
- [3] Akiba T, Ota T, Fushimi K, *et al.* Water channel AQP-1 in the primary cell culture of rat peritoneum[J]. *Adv Perit Dial*, 1999, 15: 3-6.
- [4] 董柯,陈香美,傅博,等. 高糖和抗生素对鼠腹膜间皮细胞表达 PAF-1, TGF β mRNA 的影响[J]. 中华内科杂志, 1997, 10(36): 68-692.
- [5] 樊敏,刘伏友,段绍斌,等. 改良法培养鼠腹膜间皮细胞[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(6): 542-544.