

鸡肺动脉平滑肌细胞培养及免疫组化鉴定

董世山* 乔健 赵立红 孙茂红 张建军 田勇

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要 应用组织贴块法、贴块配合差速贴壁法成功培养不同日龄鸡的肺动脉平滑肌细胞。一般需 4~ 7 d 细胞从组织块边缘长出, 再经 5~ 10 d 长成细胞单层。鸡日龄越小培养的肺动脉平滑肌细胞生长越旺盛。培养的肺动脉平滑肌细胞呈梭形、三角形, 圆形核位于中央, 胞浆丰富致密。用兔抗鸡 α -actin 多克隆抗体为一抗做免疫组化染色, 平滑肌细胞占 95% 以上。

关键词 鸡; 肺动脉; 平滑肌细胞; 细胞培养; 免疫组化; 鉴定

中图分类号 S858.31; Q813.11

Culture and Immunohistochemistry Detection of Chicken's Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells

Dong Shishan Qiao Jian Zhao Lihong Sun Maohong Zhang Jianjun Tian Yong

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The purpose of this experiment was to find some methods of culturing chicken's pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). In this experiment, explants culture, explants culture combined with differential attachment were used. The primary culture of Chicken's PASMC was successfully done by using the two methods. The successive transfer culture was easily grasped. The α -actin of cultured cells was detected by immunohistochemistry. The younger the chicken was, the easier the PASMC grows. The growing period of cells was about 10~ 15 d.

Key words chicken; pulmonary; arterial smooth muscle cell; cell culture; immunohistochemistry; detection

平滑肌细胞是研究动脉粥样硬化、高原缺氧、肺动脉高压、肺心病、缺血再灌注损伤及自由基损伤等病理过程发生发展的主要环节。平滑肌细胞的培养有助于揭示各种心肺疾患的病理机制。在人类医学中, 以培养的平滑肌细胞为对象进行研究已成为心血管系统疾病的主要研究手段^[1~4]。哺乳动物动脉和胎儿动脉平滑肌的培养方法已经成熟, 肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC) 的培养也有报道^[1,5~8]。但对禽类 PASMC 的培养在国内外尚未见报道。培养禽 PASMC 对于阐明禽类心血管系统疾病譬如肉鸡肺动脉高压综合征的发病机理具有重要作用, 同时也是相关研究的必要前提。因此, 需要建立 PASMC 的培养方法。本研究参照哺乳动物平滑肌细胞培养和鉴定方法并加以改进^[5,9~11], 形

收稿日期: 2001-12-03

国家自然科学基金资助项目 (30070567) 及河北省自然科学基金资助项目 (302432)

* 董世山, 博士生, 研究方向为禽类心血管系统病理生理。北京圆明园西路 2 号

成比较稳定可靠的鸡PASMC培养和鉴定技术,能够提供足量PASMC用于研究工作。

1 材料和方法

1.1 试验材料

10, 20, 60, 80日龄鸡各8只。

1.2 细胞培养试剂

M 199 培养液: M 199 (Sigma) 15.1 g 溶于 1 000 mL 三蒸水中, 过滤除菌, 使用前加入胎牛血清 200 mL (浙江三利生物制品厂) 并加入 10^5 U 青霉素和 100 mg 链霉素, 调节 pH 7.0~7.2。

组织漂洗液: 乳-Hank's 液

消化酶: 含 0.05% 胰蛋白酶(北京天象人生物工程公司), 0.02% EDTA (北京化工厂)。

细胞固定剂: 4% 中性福尔马林固定液。

1.3 免疫组化试剂

兔抗鸡 α -actin 多克隆抗体, 兔 SP kit, DAB kit (均购自北京中山生物技术有限公司)。

1.4 培养方法

1.4.1 贴块配合差速贴壁法 取 10, 20 日龄鸡各 8 只, 放血处死后, 立即剪开胸腹部皮肤, 用酒精消毒胸腹部肌肉。剪开胸壁, 用另一套器械将心脏连同肺动脉主动脉剪下, 放入冰块上的平皿中。仔细剥离血管, 分离剪下肺动脉。用冷乳-Hank's 液漂洗 2 次, 移入另一平皿中剪开血管壁, 用刀片轻刮血管内壁去掉内皮细胞。用冷乳-Hank's 液漂洗 1 次, 将血管置平皿中用眼科弯头剪剪成 1 mm^3 碎块。用吸管将血管壁碎块种植于培养瓶, 碎块间距为碎块大小的 3 倍左右。将其放入 37°C 培养箱中干孵 2 h, 使组织块贴壁牢固。加入含血清 M 199 培养液, 放入二氧化碳培养箱 37°C 静置培养 2 d, 然后观察换液。

待细胞长成单层后, 用消化酶消化至胞间出现裂隙, 轻轻倾去消化液。加入 M 199 吹打使细胞悬浮, 37°C 静置培养 40~50 min, 使成纤维细胞贴壁。移出富集 PASMC 悬液于另一培养瓶中, 再次使成纤维细胞贴壁。将细胞悬液 $900\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 浓缩平滑肌细胞。以 5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度移入培养瓶或内置盖玻片的培养皿中, 在二氧化碳培养箱 37°C 培养。

1.4.2 贴块法 60, 80 日龄鸡无菌取材同上。分离剪下肺动脉。用冷乳-Hank's 液漂洗 2 次, 移入另一平皿中剪开血管壁, 用刀片轻刮血管内壁去掉内皮细胞。用钟表镊撕下血管中膜, 用冷乳-Hank's 液漂洗后置平皿中, 用眼科弯头剪剪成 1 mm^3 碎块。用吸管将血管壁碎块种植于培养瓶, 碎块间距为碎块大小的 3 倍左右。将其放入 37°C 培养箱中干孵 2 h, 使组织块贴壁牢固。加含血清 M 199 培养液, 放入二氧化碳培养箱 37°C 静置培养 2 d, 然后观察换液。

1.4.3 PASMC 的传代培养 当细胞在组织块周边爬出较多, 各组织块间单层细胞几乎汇合时进行传代。用 0.05% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 室温消化 2~3 min, 在倒置显微镜下观察胞间出现裂隙时中止消化。轻轻弃去消化液, 用 M 199 培养液洗下细胞按 1:2 传代于培养皿中培养。

1.5 培养细胞的免疫组化鉴定

从培养皿中取出长满细胞单层的盖玻片, 用 PBS 漂洗后, 加入 4% 中性甲醛固定液固定 3~5 min。蒸馏水洗去固定剂。用 0.25% TritonX-100 和 5% DM SO 溶液孵育 20 min, 然后按免疫组化试剂盒提供方法染色。

2 结果

2.1 细胞培养

2.1.1 原代细胞培养 贴块配合差速贴壁法: 贴块培养 4 d 后, 用倒置显微镜观察可见有细胞从组织块边缘呈放射状爬出。其后 4~5 d 细胞生长较快, 形成细胞单层。邻近组织块的细胞密集, 胞体较小, 形态不清晰。较远的细胞为单层细胞, 有些细胞胞体较大, 呈梭形、三角形等多种形态, 圆形胞核位居中央, 胞浆丰富致密。有些细胞边缘不整齐, 胞体大, 胞浆稀薄透明。2 次差速贴壁后, 绝大多数细胞呈梭形、三角形和星形, 核近似圆形。

贴块法: 贴块培养 6 d 后, 有细胞从组织块边缘爬出。其后 10 d 长成细胞单层。邻近组织块的细胞密集, 胞体较小, 形态不清晰。较远的单层细胞, 胞体较大, 呈梭形、三角形等多种形态, 中央有圆形细胞核, 胞浆丰富致密。

2.1.2 PA SMC 的传代培养 细胞传代培养 12~24 h 细胞贴壁伸展成小短杆状。48 h 后细胞呈梭形。3~4 d 细胞单层汇合。本试验 PA SMC 传 5 代后生长仍然良好。

2.2 免疫组化染色

免疫组化染色后, α -actin 阳性细胞在显微镜下呈梭形、三角形, 胞核蓝染位于细胞中央, 胞浆有细小均匀的棕黄色颗粒分布。 α -actin 阳性细胞占 95% 以上。用血管壁石蜡切片为阳性对照染色, 可见平滑肌细胞内密布棕色颗粒。血管壁平滑肌细胞中的颗粒较培养细胞内的颗粒稍大。用 PBS 替代一抗的阴性对照片中, 细胞内未见棕黄色颗粒, 胞浆清晰。

3 讨论

3.1 培养方法的选择

经过反复试验, 基本建立了鸡 PA SMC 的培养方法。通过免疫组化染色鉴定证实培养细胞为平滑肌细胞。2 种方法都可以培养出 PA SMC。贴块配合差速贴壁法适用于低日龄鸡 PA SMC 的培养, 雏鸡肺血管壁非常薄, 很难将中膜撕下, 只能将血管全壁培养, 然后利用成纤维细胞贴壁快的特点去除成纤维细胞而获得平滑肌细胞。这种方法操作步骤多, 生长周期较长。

贴块法比较简便, 容量掌握, 成功率高, 但关键是撕下的中膜要纯, 不能混杂外膜, 以避免成纤维细胞污染。适用于肺动脉壁较厚的大日龄鸡。组织块应尽量剪碎, 细碎的组织块容易贴壁不易脱落, 同时在实验中发现细小的组织块细胞生长快, 空间利用率高, 细胞产率也高。

3.2 日龄对培养 PA SMC 的影响

试验发现不同日龄对鸡 PA SMC 的培养有很大影响。低日龄鸡肺动脉培养细胞容易生长, 10~20 日龄鸡培养一般 4 d 即可有细胞爬出, 80 日龄鸡贴块则需 7~8 d。而且低日龄鸡培养的细胞生长旺盛, 20 日龄以内鸡培养 8 d 即可长成汇合单层, 而 80 日龄鸡需 13 d 才能长成细胞单层。

3.3 免疫组化鉴定

在免疫组化染色时, 由于 α -actin 阳性部位在细胞浆中, 一抗不易透过细胞膜, 因此需要用 TritonX-100 和 DM SO 对膜进行处理增加渗透性。组织贴块和细胞组织较厚, 内源性过氧化物酶不易灭活, 操作时应比试剂盒提供的时间延长 10~20 min。许多文献报道对盖玻片进行粘片剂处理, 本试验中由于组织块细小贴壁牢固, 无需对盖玻片进行特殊处理, 在染色过程中操

作轻缓,未发生脱落现象。

参 考 文 献

- 1 Campbell J H, Campbell G R. Culture techniques and their application to studies of vascular smooth muscle. *Clinical Science*, 1993; 85: 5012
- 2 冯晓东,蔡英年. ET-1和NO对肺动脉平滑肌细胞DNA合成的作用及缺氧对其调制的研究. *中国医学科学院学报*, 1995, 17(3): 172~ 177
- 3 姜志胜,符民桂,赵文,等. 几种扩血管多肽对bFGF促血管平滑肌细胞增殖作用的影响. *中国应用生理学杂志*, 2000, 16(2): 161~ 164
- 4 王培勇,刘健,于中和,等. 缺氧时肺动脉内皮细胞与肺动脉平滑肌细胞增殖的相互调节. *Chin J Tuberc Respir Dis April*, 1997, 120(2): 126
- 5 汪浩川,刘秉文. 人动脉平滑肌细胞胶原酶解离培养方法. *中华病理学杂志*, 1995, 24(3): 186
- 6 汪浩川,刘秉文,付明德. 人动脉平滑肌细胞贴块培养法. *华西医科大学学报*, 1995, 26(1): 1053
- 7 黄培堂译. *细胞实验指南*. 北京: 科学出版社, 2001
- 8 唐槐静,段胜仲,洪嘉玲. 胎儿动脉平滑肌细胞培养方法的研究. *湖北医科大学学报*, 1999, 20(2): 89~ 91
- 9 Omar Skalli, Patricia Ropraz, Arnold Trzeciak, et al. A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: A new probe for smooth muscle differentiation. *Cell Bio*, 1986, 103(6): 2787
- 10 赵秀兰,刘术娟,孙保存,等. 免疫组化技术在检测培养的内皮细胞中应用. *临床与实验病理学杂志*, 1997, 13(1): 82
- 11 李智,张庆利,丛华,等. 大鼠肺动脉平滑肌细胞的培养. *中国医科大学学报*, 1996, 25(3): 221~ 224

简讯

陈文新院士、吴常信院士获国家奖

我校陈文新院士主持的“中国豆科植物根瘤菌资源多样性、分类及系统保存的理论与技术”荣获国家自然科学基金二等奖;吴常信教授主持的“畜禽遗传资源保存的理论与技术”荣获国家科技进步二等奖。

另外,我校资环学院参加的“北方旱农区域治理与综合发展研究”和植保学院蔡祝南教授参加的“主要花生病毒株系,病害发生规律和防治”分别荣获国家科技进步二等奖。

第八届霍英东青年教师基金和青年教师奖公布

资源与环境学院左强教授、管理学院教师田志宏获得霍英东青年教师基金;动物医学院教师陈耀星获得青年教师二等奖。