

人和大鼠胸主动脉成纤维细胞的原代培养

鲍荣辉,周军*,周畅,姚志,廖磊

(三峡大学第一临床医学院宜昌市中心人民医院超声科,湖北宜昌 443000)

【摘要】 目的 培养成纤维细胞,建立不同种属来源的胸主动脉成纤维细胞的培养方法并比较其形态差异。方法 用消化法和贴壁法分离不同来源的成纤维细胞,利用差速培养法纯化成纤维细胞,并对所培养的细胞进行倒置显微镜观察和苏木素-伊红染色,观察成纤维细胞形态,并对培养细胞行波形蛋白免疫染色鉴定。结果 接种24 h后细胞全部贴壁,48 h后人胸主动脉成纤维细胞体积增大并伸出伪足,形状以梭形或不规则形为主;而大鼠胸主动脉的成纤维细胞生长的相对较慢。结论 用I型胶原消化动脉的成纤维细胞效果较好,用差速生长纯化的成纤维细胞可用于实验研究。

【关键词】 胸主动脉;成纤维细胞;原代培养

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)06-023-03

Primary culture of human and rat thoracic aortic fibroblast cells. BAO Rong-hui, ZHOU Jun, ZHOU Chang, YAO Zhi, LIAO Lei. Department of Ultrasound, the First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University (the Central People's Hospital of Yichang City), Yichang 443003, Hubei, CHINA

【Abstract】 Objective To set up the method for the culture of fibroblasts from different sources. **Methods** Human fibroblast cells were isolated through enzyme digestion and adherence, and then purified by differential attachment technique. The morphology and phenotype characterization of cultured fibroblasts was inspected by light microscopy after HE and immunocytochemical staining for vimentin. **Results** 24 h after inoculation, all the cells had attached. 48 h after inoculation, the volume of human artery fibroblast cell enlarged and pseudopodia stretched on, mostly in the shape of irregular or clostridial form. Rat thoracic aorta fibroblast cells grow relatively slower. **Conclusion** In the primary culture of human and rat thoracic aortic fibroblast cells, it is recommended to digest by type-I collagen and purify by differential attachment technique.

【Key words】 Thoracic aorta; Fibroblast cell; Primary culture

1925年, Wilson宣称“解决生物学问题的关键最终将在细胞中找到”,人们开始研究离体细胞的生命现象和规律,通过模拟生理条件的革新,减少体内外细胞的特征差异,从细胞水平上帮助人类防治疾病的手段或途径^[1]。本实验主要目的是在体外培养人和大鼠胸主动脉成纤维细胞,作为体外研究动脉粥样硬化形成的分子调控机制的细胞模型。本实验通过体外培养胸主动脉成纤维细胞,建立不同来源的原代成纤维细胞的培养方法并比较其形态差异。

1 资料与方法

1.1 培养液与消化液 DMEM培养液: Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)(Gibco);胎牛血清(FBS)(杭州四季青试剂公司);胰酶消化液的配制:含0.25%胰蛋白酶和0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)的PBS溶液,过滤除菌,分瓶(1 ml/支)保存于-20℃;胶原酶I:用DMEM配制成5 mg/ml,过滤除菌,分瓶(1 ml/支)保存

于-20℃;细胞冻存液:70%DMEM、20%胎牛血清和10%二甲基亚砷(DMSO)。

1.2 不同来源成纤维细胞的制备

1.2.1 人胚胸主动脉成纤维细胞的消化培养(图1A) 取人胚胸主动脉(三峡大学第一附属医院妇产科引产胎儿),用75%乙醇消毒皮肤,取出胸主动脉,用加有抗生素的PBS(青霉素100 IU/ml、链霉素100 lg/ml)冲洗、浸泡约10 min,剥其外膜,剪切成约1 mm×1 mm小块,转入培养瓶中加入1 mg/ml胶原酶I置于37℃温箱消化过夜,收集消化的细胞离心(约1 000 r/min, 5 min),细胞计数以(1~2)×10⁶接种,含20%FBS的DMEM培养液置于37℃ 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养;第2天团块四周细胞贴壁延伸,4~6 d长满平皿。

1.2.2 贴壁培养(图1B) 取人胚胸主动脉,用75%乙醇消毒皮肤,取出胸主动脉,用加有青霉素

作者简介:鲍荣辉(1980—),女,湖北省宜昌市人,医师,硕士,研究方向:心血管超声诊断。

*通讯作者:周军。E-mail:Zjsts8@163.com

10 000 U/ml、链霉素 10 000 ug/ml 的 PBS 处理后,剥其外膜,剪成 1 mm×1 mm 小块,将其贴于瓶底面并翻转朝上,加入少量培养液至瓶中,置于 37℃ 温箱静置培养,2~4 h 后,翻转培养瓶并使培养液刚好浸润组织块,第 2 天补足培养液,约 1 周,可见动脉周围不断增多的梭形细胞爬出。

1.2.3 大鼠成纤维细胞的培养(图 1C) 取大鼠主动脉,用 75% 乙醇消毒皮肤,取出胸主动脉,处理方法同人胚胸主动脉,收集消化的细胞-接种,置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.3 传代培养(图 1D、图 1E) 原代培养的细胞约占培养瓶的 80%~90% 时,加入 1:1 胰蛋白酶/EDTA 消化液消化汇合成片的单层贴壁细胞,待成纤维样细胞变圆并部分脱壁时,加入培养液终止消化,轻轻吹打,收集成纤维样细胞,制成终密度为 4~5×10⁵/ml 的细胞悬液,分瓶接种培养;细胞一般 3~4 d 传一代。

1.4 冷冻与复苏 传代后的成纤维细胞中加入冷冻保存液悬浮,计数,保存终密度为 10⁶~10⁷/ml,移入 1 ml 细胞冻存管,经过 4℃ 40 min, -20℃ 40 min, -70℃ 过夜-随后转入 -196℃ 液氮中长期保存。

复苏时,将取出的冻存管,迅速放入 37℃ 水浴中解冻后移入离心管,加培养液充分混合,离心 5 min (1 000 r/min),弃上清液,加入培养液稀释后致终密度约 1×10⁶/ml,接种于培养瓶中,于 5% CO₂ 箱 37℃ 饱和湿度培养。

1.5 苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色 细胞培养 3~5 d 后吸出,弃去皿中的培养液,磷酸缓

冲液轻轻冲洗,用苏木素染色-水洗-盐酸酒精分色-水中蓝化-伊红染色-水洗后,用于细胞形态的观察。

1.6 成纤维细胞的鉴定^[2] 用 Vimentin Ab-2 (Labvision 小鼠抗人的一抗),二抗免疫组化试剂盒(购于武汉晶美试剂公司),采用 ABC 染色法;具体的染色步骤如下:(1)标本制备:将细胞接种到盖玻片上培养。(2)染色:1)用 95% 的乙醇固定单层细胞 10 min;2)用 PBS 2 min/次×3 次,边洗边振荡;3)加一滴试剂 A 于玻片上(需完全覆盖待检细胞),孵育 10 min;4)倒掉液体;5)每张玻片上加适量一抗(需完全覆盖待检细胞),湿盒内孵育 60 min;6)用 PBS 2 min/次×3 次,边洗边振荡;7)每张玻片加一滴试剂 B(需完全覆盖待检细胞),孵育 10 min;8)用 PBS 2 min/次×3 次,边洗边振荡;9)每张玻片上加一滴试剂 C,孵育 10 min;10)用 PBS 2 min/次×3 次,边洗边振荡;11)制备 DAB 显色液(按比例混合试剂 D、E、F);12)每张玻片加一滴 DAB 显色液,室温显色 2~5 min (在显微镜下掌握显色程度);13)自来水冲洗;14)图像分析。

2 结果

2.1 形态学观察 于倒置显微镜下观察到人动脉成纤维细胞汇合成片后细胞成梭形/束状排列,也有部分呈不规则形,细胞间以细长突起相互交联。

2.2 Anti-vimentin 着色检验(图 1F~图 1H) 此方法被认为是鉴定成纤维细胞最可靠的标志^[2]。阳性结果为在 Ag 定位处染棕黄或棕褐色。由形态学观察和波形蛋白阳性反应的结果可得出:培养的原代细胞为人动脉成纤维细胞。

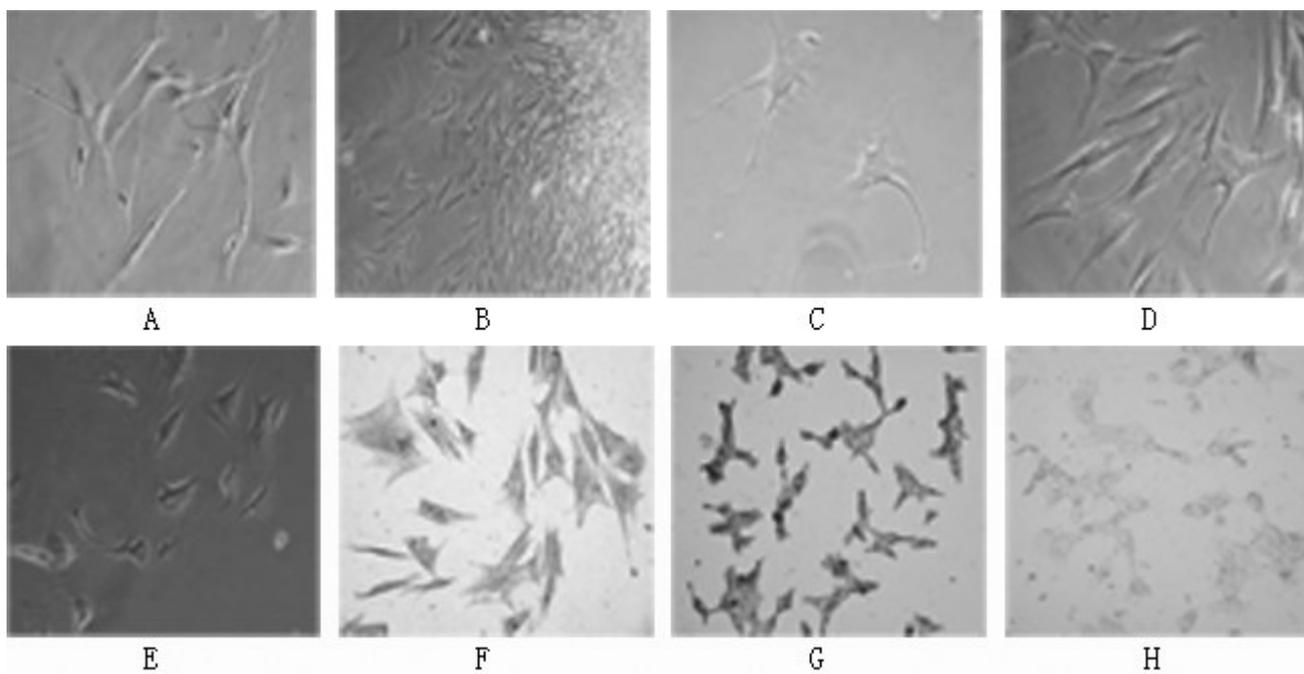


图1 细胞培养(×400)

坎地沙坦治疗老年高血压病合并阵发性房颤的临床观察

何东明, 陆永光, 陈丽媛

(钦州市第二人民医院心血管内科, 广西 钦州 535000)

【摘要】 目的 探讨坎地沙坦治疗老年高血压病合并阵发性房颤患者的临床疗效及对复发情况及左房内径的影响。方法 选择老年高血压病合并阵发性房颤84例,随机分为治疗组(n=42)和对照组(n=42),治疗组给予坎地沙坦治疗,对照组给予拉西地平治疗,两组均视血压情况酌情加用利尿剂,随访18个月,比较两组对老年高血压控制情况、房颤的复发次数、复发持续时间及左房内径的影响。结果 治疗后两组血压均较治疗前明显降低;两组治疗后降压疗效差异无统计学意义($P>0.05$),治疗组心房颤动复发次数明显低于对照组[(5.36±1.04)次 vs (9.54±1.24)次, $P<0.01$];治疗组发作持续时间短于对照组[(15.3±4.9)h vs (23.3±5.9)h, $P<0.01$];治疗组左房内径比治疗前明显缩小,对照组无明显变化,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 坎地沙坦治疗老年高血压病合并房颤患者能有效降低血压,并减少房颤复发和房颤的持续时间,同时能明显抑制左房重构。

【关键词】 坎地沙坦;老年高血压;心房颤动

【中图分类号】 R544.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)06-025-03

Clinical observation on candesartan in the treatment of senile hypertension complicated with paroxysmal atrial fibrillation. HE Dong-ming, LU Yong-guang, CHEN Li-yuan. Department of Cardiology, the Second People's Hospital of Qinzhou City, Qinzhou 535000, Guangxi, CHINA

【Abstract】 Objective To observe the clinical effect of candesartan on patients with senile hypertension complicated with paroxysmal atrial fibrillation, and to investigate its effect on recurrence situation and left atrial diameter alteration. **Methods** Eight-four patients with senile hypertension complicated with paroxysmal atrial fibrillation were randomized into the study group (n=42, treated with candesartan) and the control group (n=42, treated with lacidipine). Diuretics was added according to the blood pressure of patients. All the patients were followed up for 18 months. The blood control situation, atrial fibrillation recurrence frequency and duration time, alteration of left atrial inner diameter were compared between the two groups. **Results** The level of blood pressure in both groups after treatment was significantly decreased than baseline, and there was no statistically significant difference in the decrease of blood pressure after treatment between the two groups ($P>0.05$). The atrial fibrillation recurrence frequency in the

作者简介: 何东明(1976—),男,广西钦州市人,主治医师,本科。

3 讨论

动脉粥样硬化的损伤表现出一系列高特异性细胞和分子反应,慢性炎症的进展与动脉粥样硬化斑块的不稳定进展有关。目前临床治疗炎症的方法主要集中在抑制促炎因子的产生和压制炎症反应的起始阶段,因此,动脉炎症机制的阐明,将有助于动脉粥样硬化症及其并发症的有效治疗^[3-4]。

本实验体外培养人和大鼠胸主动脉成纤维细胞,通过不同培养方法比较其差异,(1)消化液:对于动脉来源的成纤维细胞,本实验用 I 型胶原酶消化的效果较胰蛋白酶和 EDTA 的混合液的效果好;(2)消化时间:因 I 型胶原酶性质温和,一般可 37℃ 温箱中消化过夜;而胰蛋白酶和 EDTA 的混合液消化力较强,对动脉成纤维细胞的消化效果也不理想,时间也不好掌握,在原代培养中,消化时间的掌握是关键;(3)生长快慢:实验中发现,在相同的实验条件下,原代人胸主动脉的成纤维细胞生长的相对较快些,一般 5~7 d 即可传代;而大鼠的成纤维细胞生长

的慢些,一般要 10 d 左右才可传代,而传代后两者的时间差不多;(4)关于细胞纯化:因主动脉外膜中重要由成纤维细胞组成,平滑肌细胞和内皮细胞,而且成纤维细胞较另两者更容易生长,本实验利用差速培养法使得培养的细胞主要由纯度较高的成纤维细胞构成。

参考文献

- [1] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 235-316.
- [2] Schoneveld AH, Oude Nijhuis MM, Middelaar B, et al. Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development [J]. Cardiovascular Research, 2005, 66(1): 162-169.
- [3] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340(34): 115-126.
- [4] Barillari G, Albonici L, Incerpi S, et al. Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and function [J]. Atherosclerosis 2001, 154 (12): 377-385.

(收稿日期:2011-11-01)