第42卷 第2期
2017年2月
贵州医科大学学报
JOURNAL OF GUIZHOU MEDICAL UNIVERSITY
Vol.42 No.2
2017.2

·专题研究1·

大鼠主动脉血管平滑肌细胞原代培养与鉴定*

刘姿麟[1**]，林慕之[1**]，况春燕[1,2***]，刘兴德[3***]
（1.贵州医科大学附属人民医院，贵州 贵阳 550002；2.贵州省人民医院 心内科，贵州 贵阳 550002；3.贵州医科大学，贵州 贵阳 550004）

[摘 要] **目的**：建立一种可行的原代血管平滑肌细胞（VSMC）培养方法。**方法**：严格无菌操作环境下取大鼠胸主动脉及腹主动脉中层组织，通过组织块贴壁法进行原代培养，胰酶消化法进行传代，应用倒置相差显微镜对不同培养时间的细胞进行形态学观察，使用免疫荧光法对培养细胞进行鉴定。**结果**：原代培养第4～6天时，组织块周围开始有长梭形细胞爬出；第7～9天时，细胞爬出较少的呈网状生长，组织块周围细胞爬出较多的呈漩涡状生长，致密排列呈束状；第10～14天时，细胞呈典型的“峰—谷”样结构，相互融合达80%，此时传代细胞生长速度增快，细胞变大，折光性减弱，免疫荧光染色鉴定可见VSMC特异性的α－平滑肌肌动蛋白（α-SM-actin）表达，表达的阳性细胞在95%以上。**结论**：成功建立一种可行的原代VSMC培养方法。

[关键词] 血管平滑肌细胞；原代培养；组织块贴壁法；免疫荧光；大鼠，Sprague-Dawley
[中图分类号] R363.1 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)02-0125-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.02.001

Culture and Identification of Primary Generation of Vascular Smooth Muscle Cell of Rat

LIU Zilin[1], LIN Muzhi[1], KUANG Chunyan[1,2], LIU Xingde[3]
(*1. People's Hospital Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. Department of Cardiovascular Diseases, the People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, Guizhou, China; 3. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a convenient and efficient method for culturing primary generation of aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) of rat. **Methods**: The aorta was isolated from SD rats under strict sterile conditions. The primary culture and subculture were obtained by tissue-piece inoculation and trypsin respectively. The cellular morphology was observed with inverted phase contrast microscope and identified by immunofluorescence. **Results**: The VSMC grew out on days 4～6 and showed fusiform; On days 7～9, some cells grew to form mesh, and more cells grew in whorled pattern and form compact sarciniform; On days 10～14, cells appeared typical "peak-valley" structure, and became nearly 80% integrated. At this time, passage cells grew faster, and cells became larger, and their refractivity weakened. The typical α-Smooth muscle actin (α-SM-actin) in SMCS could be found by immunofluorescent staining, and the positive rate of α-SM-actin in SMCS was more than 95%. **Conclusion**: A reliable and feasible culture method for primary generation of VSMC has been established successfully.

[**Key words**] vascular smooth muscle cell; primary culture; adherent culture; immunofluorescence; rats, Sprague-Dawley

*[基金项目]国家自然科学基金(81360034, 81560056)
**贵州医科大学2014级硕士研究生
***通信作者 E-mail:xiaokcy@sina.com; 2360040895@qq.com
网络出版时间:2017－02－16 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170216.2100.001.html

目前,心血管疾病已成为我国城乡居民总死亡原因之首,这类疾病发病的病理生理基础为血管损伤及损伤后的修复不良,主要有冠心病和高血压,但其发病机制至今仍不清楚[1]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)是血管壁的主要细胞之一,位于血管壁的中层,有收缩型和分泌型2种;正常状态时,以收缩型为主,主要维持血管的紧张度;当发生动脉硬化时,VSMC 分泌大量的因子,使其从收缩型转变为分泌型,而加重了动脉硬化的进程[2]。此外,VSMC 的过度增殖与冠状动脉介入术后再狭窄和动脉粥样硬化有紧密的联系[3]。因此,研究 VSMC 的生物学行为及其机制对研究此类心血管疾病至关重要,而建立一种培养 VSMC 的方法成为该研究的关键。本研究在传统的组织块贴壁法的基础上进行改进,对大鼠胸主动脉 VSMC 进行原代培养,并用免疫荧光法培养的原代细胞进行鉴定,成功获得了生长状态良好、纯度较高的 VSMC,报告如下。

1　材料与方法

1.1　动物与试剂

雄性 SD 大鼠,体质量 150 g,购于贵阳医学院动物中心[合格证号 scxk(黔)2002 - 0001]。主要试剂有高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶(gibco 公司,美国),小鼠抗大鼠 α-平滑肌肌动蛋白(α-SM-actin)单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥公司),DAPI、封闭血清及 TritonX-100(索莱宝公司)。

1.2　方法

1.2.1　取材　取 2 只 SD 大鼠,麻醉后将其颈椎脱臼处死,动物固定、消毒后,暴露胸,腹、主动脉,沿脊柱剪取腹、主动脉到主动脉弓的一段血管,立即放入预冷的盛有 PBS 缓冲液的无菌离心管中。

1.2.2　细胞培养　将动脉血管转入盛有 PBS 的培养皿,去除血管外的血凝块及脂肪组织,剪开血管轻轻刮除血管内膜以除去内皮细胞,使用眼科弯镊以压、推血管中膜与外膜完全分离。夹取坚韧的中膜用 PBS 漂洗 3 次后,放入灭菌的青霉素小瓶中,同时加入血清 1 mL,将中膜剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 的组织块,将组织连同血清移入培养瓶中,待血清浸润整个瓶底后吸除剩余血清,将组织块均匀平铺于培养瓶中;加入含 20% 血清的 DMEM 培养基 3 ~ 5 mL,放入 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中,4 ~ 6 h 后缓慢翻转培养瓶,使已贴附在瓶底的培养瓶完全浸入培养基中静置培养 4 ~ 5 d,待部分组织块周围有细胞迁出即可换液,每 3 d 换液 1 次,直至传代。

1.2.3　传代培养　培养至 10 ~ 14 d 时(细胞融合达 80%)传代细胞,加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 1 mL,待细胞形状变圆,细胞间间隙变大时加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液 2 mL 终止消化,轻轻吹打细胞使细胞脱壁。收集培养液体,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清液,用含 20% FBS 的 DMEM 培养液 6 mL 重悬细胞,混匀细胞后接种于 2 瓶新的 25 cm^2 培养瓶中,平均每瓶 3 mL 重悬液,每 3 d 换液 1 次。

1.2.4　细胞冻存与复苏　细胞冻存:冻存前 24 h,给细胞换新鲜培养液,使细胞处于对数生长期。细胞密度为 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$/L,加入含 0.25% 胰蛋白酶消化,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液 2 mL 终止消化,收集培养液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液体,按 1∶9 比例,分别加入 DMSO 100 μL,血清 900 μL 重悬细胞,转移入冻存管, - 80 ℃ 冰箱保存。细胞复苏:取出冻存细胞后立即在 37 ℃ 水浴中迅速融化,完全溶解后移入离心管,加入含 10% FBS 的完全培养基 3 mL,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液体,用含 20% FBS 的 DMEM 培养液 3 mL 重悬细胞,加入培养瓶后在培养箱中培养。

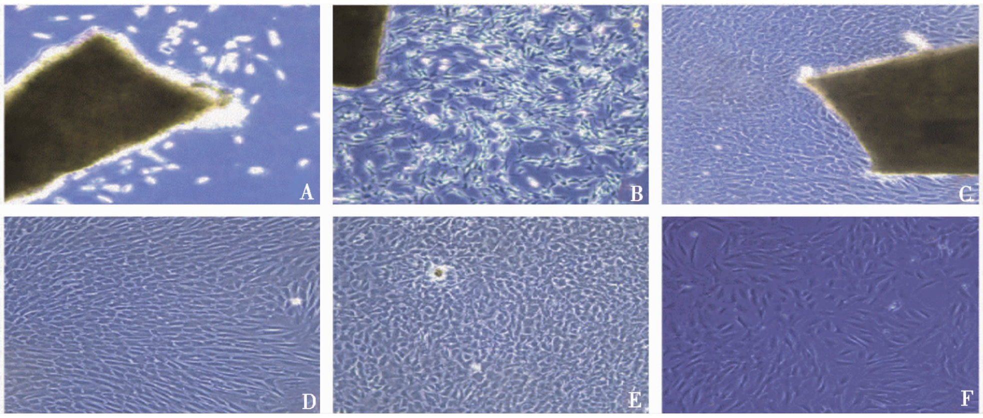
1.2.5　细胞鉴定　在倒置相差显微镜下观察细胞的大小、形状、生长特质以及排列情况。选取状态良好的细胞铺于激光共聚焦培养皿中,用 4% 多聚甲醛固定后加山羊血清孵育、加一抗小鼠抗大鼠 α-SM-actin(稀释比例 1∶100)、加入 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(稀释比例 1∶100)、加 DAPI 工作液、最后加入抗荧光猝灭剂,激光共聚焦照相。

2　结果

2.1　VSMC 体外培养生长情况

原代培养第 4 ~ 6 天时,少量组织块周围有 VSMC 细胞爬出,大部分呈长梭形,小部分呈多角形或不规则形(图 1A 或 1B);第 7 ~ 9 天时,细胞爬出较少的呈网状生长,组织块周围细胞爬出较多,呈漩涡状生长,致密排列呈束状(图 1C);第 10

~14 天时,细胞呈典型的“峰—谷”样结构,相互融合达 80%,此时即可传代(图 1D);原代细胞生长速度较慢、体积小及折光性强(图 1E),而传代细胞生长速度增快,细胞变大,折光性减弱(图 1F)。



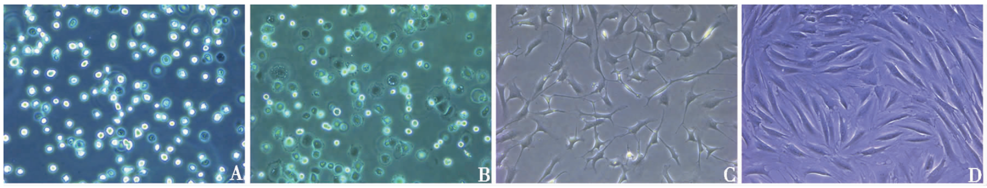
注:A 为原代培养第 5 天,B 为原代培养第 7 天,C 为原代培养第 9 天,D 为原代培养第 12 天,E 为原代细胞,F 为传代细胞

图 1　原代及传代培养的 VSMC 细胞(100 ×)

Fig. 1　The primary generation and passage cells of VSMC at different time points under phase contrast microscope

2.2　VSMC 冻存后复苏

冻存的第 3 代 VSMC 复苏后 0 h,大多数细胞呈圆亮点形态悬浮于培养基,仅有数个细胞呈贴壁状态(图 2A);复苏后 1.5 h,已有一小部分细胞处于贴壁状态,其形态呈圆饼状(图 2B);复苏后 10 h,细胞绝大多数已贴壁生长,且已形成平滑肌细胞故有长梭形形态(图 2C);复苏后 72 h,细胞已完全贴壁,且融合生长至 90%(图 2D)。



注:A 为复苏后 0 h, B 为复苏后 1.5 h,C 为复苏后 10 h, D 为复苏后 72 h

图 2　复苏后的第 3 代 VSMC(200 ×)

Fig. 2　The revived third generation of VSMC

2.3　VSMC 鉴定

α-SM-actin 是 VSMC 的标志性分子,培养的第 3 代 VSMC 经免疫荧光染色后,使用激光共聚焦观察 α-SM-actin 沿纵轴呈肌丝状排列于细胞质内(图 3A),细胞质发绿色荧光,细胞核蓝染,阳性细胞率达 95% 以上(图 3B),表明所培养的原代细胞纯度较高。

2.4　培养过程中的细胞污染

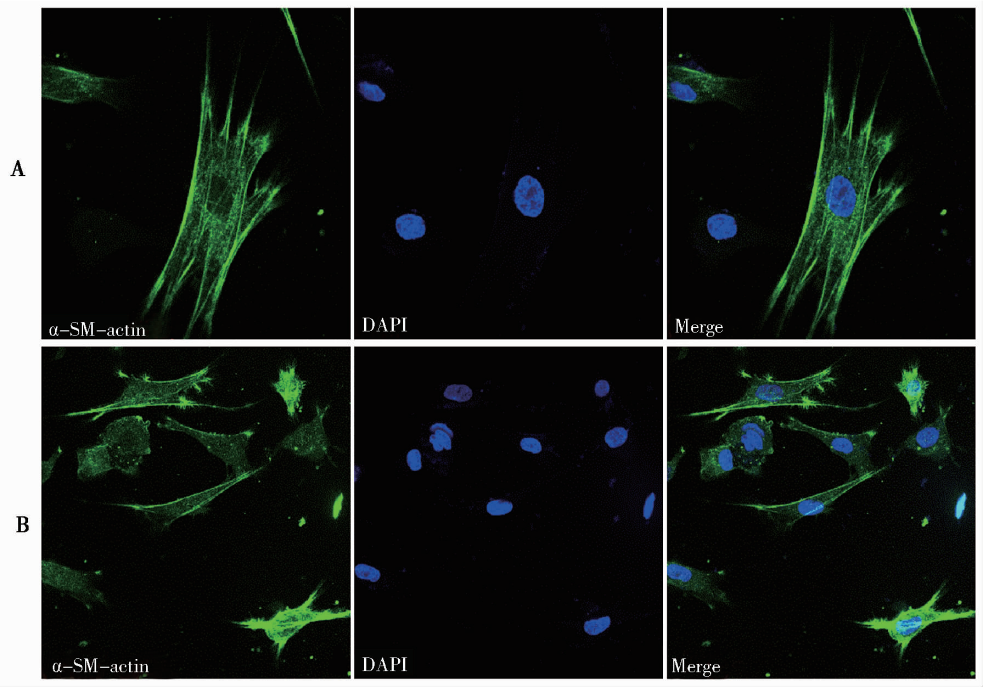
当在原代细胞培养过程中,无菌观念不强或操作不当,就会发生污染,本研究在原代细胞培养第 7 天时出现了霉菌污染(图 4)。

2.5　原代细胞培养翻转培养瓶的时间

由于直接浸在培养基中的组织不容易让细胞爬出,所以组织培养一定时间后需要将培养瓶翻转,实验结果显示,2 h 翻转培养瓶几乎没有细胞爬出,4 ~6 h 翻转均有细胞爬出,但此后翻转时间越长,细胞爬出需要的时间越长,12 h 翻转瓶底,尽管有细胞从组织中爬出,但细胞状态不好。因此,4 ~6 h 为最佳翻转培养瓶的时间。

3　讨论

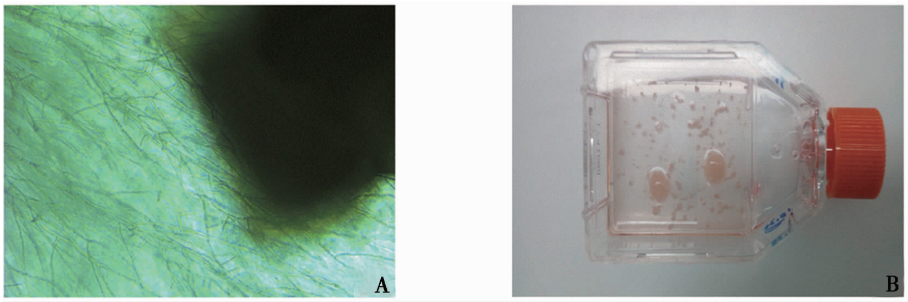
VSMC 是构成血管组织的重要细胞成分,其主要作用为维持血管张力。VSMC 的异常增殖和迁移是动脉粥样硬化、冠状动脉介入术后血管再狭窄及高血压等疾病的主要病理特征[3-4]。VSMC 共有 2 种表型:收缩型和分泌型。生理状态下,VSMC 表现为收缩型以维持正常的血管张力;病理情况下,其转化为分泌型并具有更强大的增殖和迁移活性[5-7]。同时高钙高磷可使VSMC转化为成骨样



注:A 为 FITC 标记的 α-SM-actin,B 为 α-SM-actin 在 VSMC 中的阳性率为 95% 以上

图 3　免疫荧光检测 α-SM-actin 在 VSMC 中的表达(630 ×)

Fig. 3　The α-SM-actin expressed in VSMC showed by immunofluorescence staining.



注:A 为丝状菌(霉菌)污染,菌体呈丝状;B 肉眼可见培养瓶中有 2 处霉菌呈团蔟状生长

图 4　原代细胞培养第 7 天时的霉菌污染(200 ×)

Fig. 4　The primary generation of VSMC contaminated by fungus on the 7^{th} day of culture

细胞导致血管钙化[8]。因此,探讨 VSMC 的生物学行为及其调控机制成为业界专家学者的研究热点,建立一种成熟的 VSMC 培养方法成为研究的必备条件。VSMC 的培养分原代和细胞株培养,而原代培养又分为胰酶消化法和组织块培养法[9-11]。胰酶消化法虽有培养周期短的优点,但因其操作复杂、酶消化时间较难掌控及组织块需要量大等缺点而不被诸多研究者采用[12-14]。组织块培养法操作简便、细胞产率高且细胞活性好等优点而被业界研究者广泛应用[15]。因此,本研究采用组织块培养法。VSMC 的组织块培养一般分 2 部分:一是动物取材,二是细胞培养。动物取材严格在 SPF 及动物实验室进行,所有器械均需高压灭菌,操作每一环节则更换一套剪刀和弯镊,从而避免污染[16]。细胞培养部分则在细胞功能实验室的生物安全柜中完成,且整个过程均在冰上操作。

本研究通过观察 VSMC 体外培养生长情况、VSMC 冻存后的复苏情况及培养的第 3 代 VSMC 经免疫荧光染色鉴定,证实本研究在实验室成功建立了一种可行的原代 VSMC 培养方法。总结经验如下:(1)由于 VSMC 位于血管中膜,所以尽量去掉内膜,外膜,因内膜由内皮细胞组成,相对 VSMC 不易爬出,仅仅使用弯镊轻轻来回 3 次刮除剪开的血管即可;纵向剖开血管,利用中膜相对坚韧,而外

膜较软似一滩泥的特点,固定血管一端,使用弯镊轻压,推向血管另一端即可分离中膜与外膜;(**2**)因原代培养最常见的细胞污染有细菌,支原体,霉菌污染污染后有其各自特点[17-20];本研究在原代培养时多次出现过霉菌污染,按文献方法处理后第2天霉菌仍有生长[18],本研究总结的更好方式是立即丢掉细胞,并对细胞培养室和培养箱进行严格的消毒杀菌处理;(**3**)通过尝试2~12 h的翻转培养瓶,发现4~6 h的时间段翻转培养瓶,可使细胞迁出更快,细胞活性更好。本研究还发现,对培养的原代VSMC传代之后的细胞冻存,因VSMC相对脆弱,复苏后难以存活等特点,所以,冻存VSMC时应严格按照冻存时间操作,并且不能使用掺杂有培养基的胎牛血清作为冻存液。

4　参考文献

[1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2015》概要[J].中国循环杂志, 2015(31): 521-528.

[2] Takaoka M,Uemura S,Kawata H,et al. Inflammatory response to acute myocardial infarction augments neointimal hyperplasia after vascular injury in a remote artery[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006(9):2083-2089.

[3] Bibd M, Sala-Newby GB, Wu YJ, et al. Biphasic effect of p21Cip1 on smooth muscle cell proliferation: role of PI 3-kinase and Skp2-mediated degradation Cardiovasc Res [J]. Cardiovasc Res, 2006(1):198-206.

[4] Duran-Prado M, Morell M, Delgado-Maroto V,et al. Cortistatin inhibits migration and proliferation of human vascular smooth muscle cells and decreases neointimal formation on carotid artery ligation[J]. Circ Res, 2013(11): 1444-1455.

[5] 付艳琪,伍宇思,罗丹. Cx43在血管平滑肌及血管重构中的研究进展[J].重庆医科大学学报, 2016(12): 1254-1257.

[6] Schwencke C,Schmeisser A,Walter C,et al. Decreased caveolin-1 in atheroma: loss of antiproliferative control of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. Cardiovascular Research, 2005(1):128-135.

[7] Rensen SS,Doevendans PA,van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity[J]. Netherlands heart journal, 2007(3):100-108.

[8] 傅碧玲,邹世海,彭鑫,等.高磷、高钙诱导人血管平滑肌细胞钙化的研究[J].贵阳医学院学报, 2015(6): 603-608.

[9] Choe N, Kwon JS, Kim JR, et al. The microRNA miR-132 targets lrrfip1 to block vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia[J]. Atherosclerosis, 2013(2):348-355.

[10]司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].2版.北京:世界图书出版西安公司, 2006:1-110.

[11]徐丽华,严金川,伍超,等.小鼠血管平滑肌原代培养及体外钙化模型的制备[J].江苏大学学报, 2014(2):110-113.

[12]郝思雨,田江天,刘洋,等.小鼠主动脉平滑肌细胞的分离培养及鉴定[J].现代生物医学进展, 2016(27): 5237-5240.

[13]倪伟,刘涛,王浩宇,等.酶联合消化法培养小鼠主动脉平滑肌原代细胞[J].西部医学, 2013(7):968-970.

[14]申红远,白静,汤喆,等.SD大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞组织贴块法培养及鉴定[J].中华老年心脑血管病杂志, 2014(8):850-852.

[15]谭元生,唐文利,王顺民,等.组织块贴壁法培养SD大鼠腹主动脉平滑肌细胞及鉴定[J].中西医结合心脑血管病杂志, 2015(3):285-286.

[16]曾羽,董泽天.大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞原代培养与鉴定[J].健康必读, 2013(8):155.

[17]段超,陈鑫,邱志兵,等.大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞的原代培养和鉴定[J].临床肺科杂志, 2010(4): 468-469.

[18]邵荣标,钱虎,吴巨飞,等.细胞培养法真菌污染控制初探[J].南通医学院学报, 2002(3):278-280.

[19]武昱孜,张旭,华利忠,等.支原体对细胞污染的研究概况[J].动物医学进展, 2013(9):112-117.

[20]安芳兰,张荣,武发菊,等.大规模细胞培养过程中污染的类型及控制策略探讨[J].动物医学进展, 2016(19):27-30.

(2016-11-22收稿,2017-01-25修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆