

鲤血管内皮细胞的分离培养及初步鉴定

吴 康 薛明强 吴海琴 李 义 宋学宏 王裕兴

(苏州大学水产学院, 苏州 215151)

摘要: 鲤动脉球腔内灌注 0.1% 胶原酶消化, 分离到大量内皮细胞及少量成纤维细胞, 28℃, 在加入蛋白含量为: 350 μg/mL 鲤下丘脑粗提液的 1640 + 20% 小牛血清培养液中, 细胞生长良好, 7d 后, 接近单层。原代经三次 0.5% 柠檬酸胰酶消化逐步淘汰少量成纤维细胞, 10d 后, 得纯内皮细胞, 并顺利传至二代, 第二代细胞经血凝ⅧR 因子酶标检测发现, 培养细胞存在血凝ⅧR 因子相同抗原, 具有内皮细胞的一般特征, 从而得到初步鉴定。

关键词: 鲤; 血管内皮细胞; 培养; 初步鉴定

中图分类号: S965.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)02-0174-05

血管内皮细胞(Endothelial cell, EC)是血管壁通透性的重要屏障, 具有多种生理功能。现已证明, 内皮细胞功能异常与人和动物疾病, 如心血管疾病, 肿瘤扩散, 免疫疾病等都有直接关系, 因而, 内皮细胞的研究成为当今生物学、医学研究中的热点^[1]。70 年代初发展起来内皮细胞的培养方法^[2], 使进一步研究其生物学行为成为可能, 此后, 相继发现了前列腺环素、舒张因子(EDRF, 后证明为一氧化氮)、内皮素(Endothelin)等生物活性因子, 使内皮细胞的研究进入了崭新的阶段。而鱼类血管内皮细胞生理学和病理学的基础研究报道较少, 其体外培养至今未见正式报道, 鱼类血管内皮细胞培养, 不仅为鱼类血液循环生理的基础研究提供良好细胞动态模型, 也将为鱼类疾病(特别是草鱼出血病)致病机理研究提供良好的实验手段。为此, 以鲤作为实验材料, 开展了内皮细胞的体外培养工作, 以期建立细胞模型开展鱼类生理学病理学研究积累第一手资料。

1 材料和方法

1.1 实验用鱼 健康 1 龄鲤(*Cyprinus carpio* L.)(0.35kg/尾)12 尾, 购于苏州某渔场。

1.2 常用溶液的配制 ① D-hanks 修正液: 按常规 D-hanks 液的配制方法, 并通过改变 NaCl 的浓度, 调节渗透压至 225mmol/kg, 成为 D-hanks 修正液; ② 1640 液: 取 1640(GIBCO 产品)10.4g 加双蒸水至 1300mL 过滤除菌, 4℃ 冷藏; ③ 0.1% 胶原酶: 取胶原酶 I (Sigma 产品)10mg 加 D-hanks 修正液 10mL, 7.5% NaCO₃ 调节 pH 至 7.2, 过滤除菌分装, -20℃ 冷冻保存; ④ 0.5% 胰酶: 胰酶(日产 1:250)0.5g 溶于 100mL D-hanks 修正液

收稿日期: 1999-06-07; 修订日期: 1999-12-20

基金项目: 江苏省 1995 年农业重大攻关课题(编号: 96369-2)

作者简介: 吴 康(1965—), 江苏省南通市人; 硕士; 主要从事鱼病学研究。本试验得到上海医科大学放射研究所盛民立教授指导, 在此表示诚挚的谢意。吴海琴为本院毕业学生

中,7.5%NaCO₃ 调节 pH 至 7.2,过滤除菌分装, -20℃ 冷冻保存;⑤ 0.5% 柠檬酸胰酶:胰酶 0.5g,柠檬酸钠 0.296g,NaCl 0.415g,1% 酚红 1.5mL 加双蒸水 100mL 溶解,1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.2,过滤除菌分装, -20℃ 冷冻保存;⑥ 1% 戊二醛液:1mL 25% 戊二醛(日产)加 D-hanks 修正液至 25mL,分装,4℃ 冷藏备用;⑦ 羊抗人 VIII R 因子抗血清 1:40 (购自上海生物制品研究所);⑧ SPA-HRP 1:400(购自上海华美生物工程公司)。

1.3 动脉球内皮细胞的分离 取 1 龄健康鲤(0.35kg/尾)12 尾,无菌取其完整心脏和动脉球,于心室和动脉球间,无菌棉线扎紧,在动脉球另一端灌注 D-hanks 液,反复抽洗去除残留血细胞后,注入 0.1% 胶原酶 0.6mL,扎紧,D-hanks 洗涤心室和动脉球外表,以去除血细胞。将其浸入 D-hanks 液中,31—32℃ 消化 70min 后,吸掉 D-hanks,取动脉球剪碎,用少许 D-hanks 液打散细胞,1500r/min 离心 5min,1640 + 20% 小牛血清悬浮细胞,并取少许细胞染色计数。另外,按常规胰酶(0.5%)消化法分离细胞与上述方法对照。

1.4 鲤下丘脑粗提液的制备 取鲤下丘脑按张惕等^[3]方法制备鲤下丘脑粗提液,并根据 OD₂₈₀ 值测蛋白含量,过滤分装, -20℃ 冷冻备用。

1.5 鲤血管内皮细胞的培养 ① 原代培养是将两种不同酶消化与加 350μg/mL 鲤下丘脑提取液及正常培养液进行交叉试验,共 4 种处理,每组重复二瓶。在上述 8 瓶中均接种细胞数 $2.52 \times 10^4/\text{cm}^2$,加 1640 + 20% 小牛血清,28℃,无 CO₂ 培养,2—3d 换液一次,换液时,处理瓶中的下丘脑提取液含量不变,观察细胞生长情况。② 原代细胞中成纤维细胞的清除,胶原酶消化与加鲤下丘脑提取液处理瓶中细胞,接近长满单层时,按王毅^[4]等方法,用 0.5% 柠檬酸胰酶逐步消除成纤维细胞,并继续培养至单层。③ 经纯化后,长满单层原代细胞,用 0.1% 胰酶消化,按 1:4—5 分瓶培养、传代(培养液中均含 350μg/mL 鲤下丘脑粗提液)。

1.6 鲤动脉球内皮细胞的鉴定 在将传二代细胞瓶中,加入盖玻片,按常规传代细胞法接种内皮细胞,培养 2d 后,去除培养液,按徐宜为等^[5]方法作酶组化试验,D-hanks 洗涤 3 次,1% 戊二醛固定 2h,D-hanks 洗涤 3 次,羊抗人 VIII R 因子抗血清孵育 2h,D-hanks 洗涤 3 次,加 SPA-HRP 孵育 2h,D-hanks 洗涤 3 次,4 甲基对苯二胺 + H₂O₂ 作底物,反应 10min,0.1mol/L 磷酸盐 - 0.1mol/L 蔗糖(pH 7.4)缓冲液洗涤 3 次,常规脱水,洁净、封片、镜检。

2 结果

2.1 鲤动脉球内皮细胞分离

0.35kg 鲤动脉球平均为 250mg,用胶原酶和胰酶消化后得二类细胞平均数见表 1。

表 1 两种不同酶消化获得二类细胞数

Tab.1 Two kinds of cell obtained by two kinds of enzyme digestion

酶 Enzyme	内皮细胞数($\times 10^{-5}$) Number of endothelial cells	成纤维细胞数($\times 10^{-5}$) Number of fibro-cells	内皮细胞(%) Percentage of endothelial cells
0.1% 胶原酶 I Collagense(I)	8.25	0.51	94.18
0.5% 胰酶 Trypsin	3.13	2.14	59.39

表 2 原代内皮细胞平均增值数($1 \times 10^4/\text{cm}^2$)

Tab. 2 Average growth number of the endothelial cells in the primary culture

培养液 Media	培养瓶数 No of bottle	培养天数(d) Culture time							
		0	1	2	3	4	5	6	7
正常培养液 Normal medium	2	2.41	2.4	2.32	2.01	2.42	2.53	3.54	5.72
加下丘脑培养液 Hypothalamus medium	2	2.52	2.63	2.83	3.11	5.32	10.43	16.17	27.83

表 3 不同代次内皮细胞平均增值数($1 \times 10^4/\text{cm}^2$)

Tab. 3 Average growth number of the endothelial cells in each generation

代次 Generations	培养瓶数 No. of bottle	培养天数(d) Culture time							
		0	1	2	3	4	5	6	7
原代 Primary	2	2.52	2.63	2.83	3.11	5.32	10.43	16.17	27.83
一代 1st generation	4	4.21	7.32	20.11	36.43	47.32	50.23	—	—
二代 2nd generation	5	6.35	13.25	31.24	43.53	51.24	54.32	—	—

2.2 动脉球内皮细胞的培养

2.2.1 原代培养 用胰酶消化后,内含大量成纤维细胞,1d后,内皮细胞和成纤维细胞贴壁率均达到90%,由于成纤维细胞生长速度远远超过了内皮细胞生长速度,2d后,内皮细胞脱落衰亡,3d后,90%以上内皮细胞死亡,5d后,成纤维细胞长满单层(图1)用胶原酶消化的细胞,接种后4h,细胞沉于培养面,呈岛状分布,8h后有部分贴壁和伸展,无论是否用下丘脑粗提液,24h细胞贴壁率都在90%以上。加下丘脑粗提液的细胞4d开始出现大量分裂相,7d后,基本长满单层,该单层混有10%成纤维细胞(图2)。而未加脑粗提液的细胞生长缓慢,细胞稀疏,不能形成单层,7d后,加脑粗提液细胞比对照增加了4倍以上。原代内皮细胞平均增值数见表2。原代细胞生长曲线(图3)。



图1 原代成纤维细胞 100×
Fig.1 Primary culture of fibro-cells



图2 原代培养细胞 100×
Fig.2 Primary culture cells

2.2.2 原代细胞中成纤维细胞的清除 按王毅^[4]法3次清除成纤维细胞后,原来含10%成纤维细胞的内皮细胞单层,其成纤维细胞含量降至1%以下(图4)。

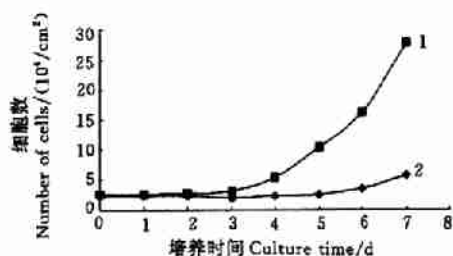


图3 脑粗提液组与一般培养液组中原代动脉球内皮细胞增值的比较

Fig.3 The comparison of primary endothelial cell growth in normal and hypothalamus media

1. 加脑粗提液 Hypothalamus meclium
2. 未加脑粗提液 Normal meclium

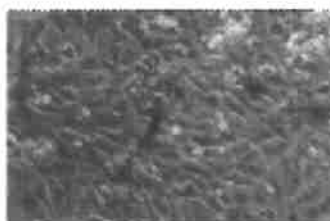


图4 原代纯内皮细胞 300×

Fig.4 Primary culture of pure endothelial cells

2.2.3 细胞传代 原代细胞密度达 $2.78 \times 10^5/\text{cm}^2$, 按 1:4 传代, 第一代实际平均接种细胞数为 $4.21 \times 10^4/\text{cm}^2$, 5d 后即长满单层, 一代细胞密度为 $5.02 \times 10^5/\text{cm}^2$, 第二代按 1:5 传代, 实际平均接种数为 $6.35 \times 10^4/\text{cm}^2$, 第二代细胞 4d 后长满单层, 二代细胞密度为 $5.43 \times 10^5/\text{cm}^2$, 细胞呈明显鹅卵石样(图 5)。原代及传代内皮细胞的平均增值数见表 3。原代及传代内皮细胞的生长曲线(图 6)。



图5 第二代内皮细胞 100×

Fig.5 The endothelial cells in 2nd generation culture

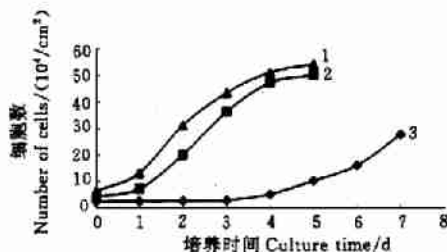


图6 原代及传代内皮细胞生长曲线

Fig.6 The growth curve of primary and subculture endothelial cell

1. 第二代(2nd generation)
2. 第一代(1st generation)
3. 原代(Primary culture)



图7 内皮细胞的鉴定 300×

Fig.7 The identification of endothelial cells

2.3 动脉球内皮细胞鉴定

第二代细胞用间接酶组化法鉴定ⅧRAg 因子, 结果均有阳性棕色颗粒, 其主要分布于胞浆内, 近核部位更加明显(图 7)。该细胞均具有内皮细胞的一般特征, 初步证明为内皮细胞, 而对照鲤成纤维细胞无颗粒存在。

3 讨论

血管内皮细胞体外培养成功与否, 关键在于首先能否分

离到大量较纯内皮细胞。从胶原酶与胰酶消化比较发现:胰酶消化由于混有大量纤维细胞(结缔组织细胞),该细胞生长速度远远超过了内皮细胞,从而使内皮细胞无法培养。胶原酶消化是获得纯内皮细胞重要手段。但其价格相当昂贵,无法进行内皮细胞大批量的培养,用柠檬酸胰酶清除原代内皮细胞中成纤维细胞能达到满意结果,纯化后原代内皮细胞可以用胰酶作为消化液传代。其次,内皮细胞体外增殖需要生长刺激因子,参照张惕等方法制备鲤下丘脑粗提液作为生长刺激因子,用该液后,细胞增殖提高了4倍以上,并继续添加该液,成功将内皮细胞传至二代,鲤下丘脑内生长因子与报道的75kd酸性蛋白内皮细胞生长因子(ECGF)是否相类似,需要作进一步的证实。本实验室通过抗人血凝ⅧR因子抗体酶标检测,发现鲤上皮细胞上存在着与人血凝ⅧR因子抗原同源性很强的因子,作为初步鉴定鱼类内皮细胞的指标,可以说明,血凝ⅧR因子在生物进化过程中,具有一定的保守性。

目前,鲤上皮瘤细胞(EPC)已成为研究水产动物病毒重要的细胞模型^[6],该细胞对许多水产动物病毒具有很强的易感性,作为与EPC胚胎发生同源的血管内皮细胞,是否对水产动物病毒具有易感性、广谱性,有待于作进一步探索。

参考文献:

- [1] 盛民立. 血管内皮细胞与疾病[M]. 上海:上海医科大学出版社. 1993,214
- [2] Jaffe E A, et al. culture of human endothelial cells derived from umbilical vein, identification by morphologic and immunologic criteria[J]. *J Clin Invest.*, 1973, (52):2745—2756
- [3] 张 惕. 人血管内皮细胞生长因子的提取及活性测定[J], 细胞生物学杂志, 1992, 14(2):75—78
- [4] 王 毅. 内皮细胞培养中清除成纤维细胞的新方法[J], 细胞生物学杂志, 1991, 13(1):6,47
- [5] 徐宜为. 免疫检测技术(第二版)[M]. 北京:科学出版社. 1991,416
- [6] 张奇亚、李正秋. 鳊鱼病毒病原的检测及组织病理分析[J], 水生生物学报, 1999, 23(2):151—154

SEPARATION CULTURE AND PRELIMINARY IDENTIFICATION OF THE ENDOTHELIAL CELL OF *CYPRINUS CARPIO*

WU Kang, XUE Ming-qiang, WU Hai-qin, LI Yi, SONG Xue-hong and WANG Yu-xing
(Aquaculture College, Suzhou University, Suzhou 215151)

Abstract: Many endothelial cells and few fibro-cells were separated from the artery ball *Cyprinus carpio* injected with 0.1% collagense(I). At 28℃, in the 1640 + 10% calf bovine serum medium which was supplemented with 350μg/mL carp hypothalamus-derived growth substance, these cells grew well and the cell monolayers were obtained within 7-days period. By three times digestion of 0.5% trypsin-citric acid solution, the pure endothelial cells were gained after 10 days and they were subcultured to which. The second generation were proved to have ⅧR factor antigen by anti-ⅧR factor assay. These cells were identified with general biological character of endothelial cells.

Key words: *Cyprinus carpio*; Endothelial cells; Culture in vitro; Preliminary identification