

原代人脐静脉内皮细胞分离培养模型的建立

黎胜苗 罗春芬 卢兰琴 朱 敏 於林军 刘昭蓉 苏宝利

摘 要 **目的** 建立一套稳定的原代人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的体外培养模型。**方法** 新鲜人脐带标本经三通管装置胶原酶灌注法消化获取 HUVECs, 分别进行细胞形态学观察、Ⅷ因子相关抗原鉴定及细胞生长曲线的测定。**结果** 从人脐静脉获取的 HUVECs 纯度较高, 4h 细胞即开始贴壁, 24h 基本贴壁完全, 3~6 天细胞生长迅速, 7~8 天开始融合生长, 倒置相差显微镜下呈特征性的“铺路石样”镶嵌排列; 传代细胞接种第 1 天细胞数量无明显变化, 3~6 天生长比较迅速, 7 天后进入平台期, 细胞数量无明显增加; Ⅷ因子相关抗原鉴定阳性。**结论** 采用三通管装置胶原酶灌注法可获取高纯度的 HUVEC, 是一种简单、实用、可推广的原代培养模型。

关键词 内皮细胞 脐静脉 原代培养

A Model for Isolation and Culture of Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Li Shengmiao, Luo Chunfen, Lu Lanqin, Zhu Min, Yu Linjun, Liu Zhaorong, Su Baoli. Taizhou Hospital of Zhejiang Province Affiliated to Wenzhou Medical College, Zhejiang 317000, China

Abstract **Objective** To establish a stable model for isolation and culture of primary Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in vitro. **Methods** Fresh umbilical cords were digested by collagenase solution to obtain a single cell suspension of HUVECs. HUVECs were identified for observation of morphological characteristics, identification of factor VIII related antigen and determination of cell growth curve separately with immunochemical method. **Results** The model helped to obtain high purity HUVECs from umbilical vein. Typical “cobblestone” morphology were showed under inverted microscope. Factor VIII related antigen was positive by immunostaining. **Conclusion** High purity of HUVECs could be obtained by collagenase solution perfusion. This model is a simple, practical and worth popularizing method of primary culture.

Key words Endothelial cells; Umbilical vein; Primary culture

血管内皮细胞因其特殊的解剖位置, 在人体生理病理学各个方面发挥着至关重要的作用, 与原发性和继发性心血管疾病的发生发展有着密切的关系。因脐带具有易于获得, 操作方便的优势, 脐静脉内皮细胞的研究得到了广大研究者的青睐。因此, 建立一套完善的 HUVECs 分离、培养模型具有至关重要的意义。

材料与方法

1. 材料和试剂: (1) 新鲜脐带: 来自笔者医院妇产科, 排除乙型病毒性肝炎等疾病, 并经孕妇同意及笔者医院伦理委员会同意。(2) 实验器材及试剂: 不锈钢弯盘, 三通管, 无菌丝线, 无菌手套, 50ml 注射器, 剪刀, 血管钳, 倒置相差显微镜, 台式低速离心机。I 型胶原酶 (Sigma 公司), MCDB131 培养基

及优质胎牛血清 (Gibco 公司), 兔抗人Ⅷ因子相关抗原抗体 (北京中衫公司), DAB 显色试剂盒 (Sigma 公司), 苏木素染液, 青链霉素, 明胶 (Sigma 公司)。

2. 方法: (1) HUVECs 的分离和原代培养: 无菌条件下产房或手术室剪取新鲜脐带标本, 长约 20cm, 放入盛有无菌预冷 PBS 的无菌容器内, 包装好后迅速带入实验室超净工作台, 组织剪将脐带两残端修剪平整, 剪除破损或有夹痕及血肿的部分。去掉三通管连接头, 并用无菌 7# 细线将其固定在脐带一端的脐静脉管腔。无菌 PBS 反复冲洗脐静脉管腔至 PBS 清亮为止; 血管钳夹闭脐带另一端, 再用 PBS 灌注脐静脉管腔检查脐静脉两端是否关闭完好, 无渗漏后将 37℃ 0.1% I 型胶原酶灌注于脐静脉管至充盈, 关闭三通管阀门, 放置在盛有 37℃ PBS 的不锈钢弯盘中, 37℃ 培养箱 10~15min。轻轻按摩脐静脉数次, 再用注射器将消化液吸出并注入装有 5ml 10% 胎牛血清的 MCDB131 完全培养基的 50ml 离心管中, 等量 PBS 轻轻来回冲洗脐静脉管腔, 冲洗液一并注入离心管中。300g × 5min 离心, 弃上清, 15ml PBS 清洗 1 遍后加入含 20% 胎牛血清的 MCDB131 完全培养基, 轻轻吹打使细胞重悬, 根据细胞计数接种至 25cm² 培养瓶中。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24h 后给予换液, 用 PBS 清洗 2~3 遍, 弃去漂浮的红

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2012KYB235)

作者单位: 317000 温州医学院附属台州医院小儿外科 (黎胜苗、罗春芬、於林军、刘昭蓉、苏宝利), 产科 (卢兰琴), 公共科研平台 (朱敏)

通讯作者: 罗春芬, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: luocf@enzemed.com

细胞及沉渣等杂质。之后每 2~3 天给予换液或半换液 1 次。

2. HUVECs 的传代培养:待原代细胞融合 80%~90% 后,用 PBS 或胰酶清洗 2 遍,再用 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA) 2ml, 37℃ 培养箱中消化 90~120s,倒置显微镜下观察细胞皱缩变圆,或轻轻晃动瓶身见细胞开始呈“泥沙样”脱落后,立即加入完全培养基终止消化,轻轻吹打细胞使其全部脱落下来,离心 $300g \times 5\text{min}$,弃上清,加入完全培养基轻轻吹打混匀成单细胞悬液,根据细胞数量接种至新的培养瓶中,37℃、5% CO_2 培养箱中培养。

3. HUVECs 的鉴定:形态学观察:Ⅷ因子相关抗原检测Ⅷ因子相关抗原检测检测:将细胞接种至预铺有盖玻片的 6 孔板,37℃、5% CO_2 培养至细胞完全贴壁后,弃培养基,PBS 清洗 3 遍,4% 多聚甲醛 4℃ 下固定 15~20min;PBS 清洗 3 遍,0.5% H_2O_2 室温孵育 10~20min;PBS 再次清洗 3 遍,滴加 1% 小牛血清去蛋白,室温孵育 15min 左右,封闭非特异性抗原;分别设计实验组和对照组:实验组滴加兔抗人Ⅷ因子相关抗原抗体(1:100),对照组滴加 PBS 做对照,4℃ 过夜;PBS 清洗,滴加羊抗兔抗体,室温孵育 1~2h;PBS 清洗,DAB 显色,显微镜下观察显色后再用苏木素染色 1min,镜下观察并拍照。

4. HUVECs 生长曲线的测定:取各个阶段的细胞,分别接种至 24 孔板,37℃、5% CO_2 培养箱培养,每天用胰酶消化 3 孔,倒置相差显微镜下用细胞计数板计数,连续 8 天。结果以时间为横坐标,细胞数量为纵坐标,绘制成细胞生长曲线。

结 果

1. HUVECs 形态学观察:最初分离出的 HUVECs 呈圆形,单个或聚集成团。一般 4h 即开始贴壁,24h 基本贴壁完全,3~6 天细胞生长迅速,7~8 天开始融合生长。细胞融合呈特征性的“铺路石样”镶嵌排列,有些细胞则呈鱼贯状相连或旋涡状排列(图 1A)。因 HUVECs 为非永生细胞,随着传代次数的增加,HUVECs 会逐渐衰老,传代至第 5 代后,细胞形态多不规则,分裂增殖能力减慢(图 1B)。

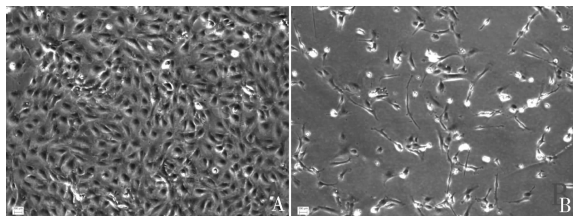


图 1 细胞形态($\times 100$)

A. 原代细胞;B. 第 5 代细胞

2. Ⅷ因子相关抗原检测:对照组细胞质未见棕色沉淀,呈阴性(图 2A);实验组细胞质可见棕黄色沉淀,呈阳性(图 2B)。

3. 细胞生长曲线:早期生长活跃的细胞接种第 1 天细胞无明显生长,3~6 天生长比较迅速,7 天后进

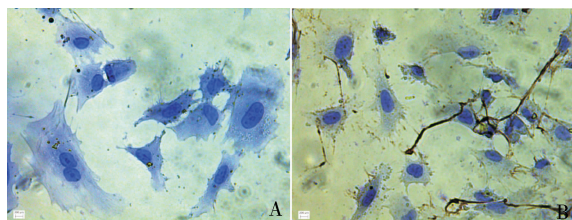


图 2 Ⅷ因子相关抗原检测($\times 400$)

A. 对照组;B. 实验组

入平台期,细胞数量无明显增加。而随着传代次数的增加,细胞增殖能力明显较早期细胞缓慢(图 3)。

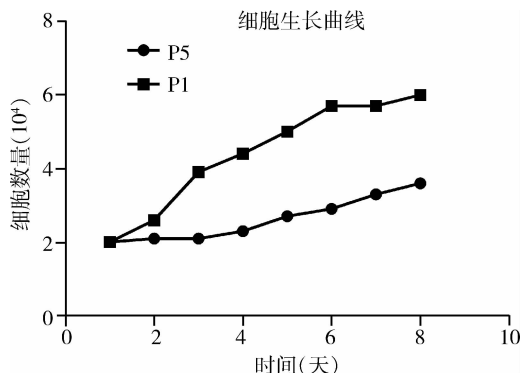


图 3 细胞生长曲线

P5. 第 5 代细胞;P1. 第 1 代细胞

讨 论

血管内皮细胞在人的生理病理各个方面发挥了重要作用,如维持血压、选择性渗透、止血及抗血栓形成、介导白细胞向炎症反应部位趋化、调节免疫反应等。而诸多疾病如动脉粥样硬化、妊娠期高血压、糖尿病、血管新生与肿瘤发生发展、组织损伤修复与血管内皮细胞的功能有着密切的关联^[1]。因此,为了研究内皮细胞在生理病理状态下所扮演的角色,动物及人类的微血管和大血管内皮细胞得到了不同程度的应用,而 HUVECs 应用最为广泛。

笔者在前人多年研究的基础上,并经过自己反复多次的实践,总结了一套较为完善的 HUVECs 体外分离、培养的方法,并总结了如下经验以供交流:(1)首先,脐带越新鲜越好:有研究强调脐带 4℃ 保存时间最好不得超过 3h,我们发现脐带在离体超过 2h 后即开始肿胀,表面出现黏丝样物,不便于操作,且消化出的细胞活性较低^[2]。因此,笔者建议脐带越新鲜越好,在运输的过程中最好保持 4℃ 环境。(2)消化前,PBS 冲洗脐静脉应冲洗至 PBS 清亮为止,最大程度的减少杂细胞如红细胞、血小板的数量,过多的杂细胞不仅影响 HUVECs 的贴壁,而且竞争性消耗

培养基的营养。(3)我们采用了独特的三通管装置,脐静脉一端用三通管连接并用丝线固定,充分利用了其阀门的作用,有利于脐静脉的冲洗、消化及灌洗;避免插入钝性针头对内皮细胞造成损伤甚至穿破脐静脉造成液体外漏,消化出的细胞纯度亦不高。脐静脉另一端直接用血管钳夹闭,不仅牢固,又节约了大量的时间,而其他方法如缝扎脐动脉等不仅浪费时间,且不一定牢靠。(4) I 型胶原酶 37℃ 消化时间在 10~15 min 为宜,时间太少,消化出的细胞太少;时间太长,细胞外的基质亦会一同被消化下来,混杂在细胞一起,影响 HUVECs 的贴壁。另外,配制好的胶原酶不宜存放过久,使用 -20℃ 存放超过 2 个月的胶原酶溶液消化出的细胞存活率大大降低,存活率最高只有 30%,可能是存放时间过久产生的细胞毒性的影响,因此,胶原酶最好新鲜配制, -20℃ 存放最好不要超过 1 个月。(5) HUVECs 本身为贴壁细胞,且其贴壁速度较快。通过实验观察发现,培养瓶未铺明胶和铺有明胶相比,细胞贴壁速度及贴比率无明显差异。因此,笔者的实验中培养瓶均未预铺明胶。(6)为防止细胞污染,几乎所有的研究者常规在培养基中加入青链霉素双抗,经过多次的研究发现,不加双抗也不

会发生细胞污染,但操作过程中需严格注意无菌原则。(7)随着 HUVECs 传代次数的增加,特别是当细胞传至第 5 代后,细胞逐渐衰老,分裂增殖能力大幅度降低,这与其他研究结果相似^[2,3]。有研究在培养基中加入内皮生长因子后,细胞可传至 10 代以上,但因其价格较为昂贵,笔者并未尝试使用^[4]。

通过反复的尝试,三通管装置胶原酶灌注法模型可以获取较高纯度(可达 95% 以上)的 HUVECs,不仅为后续的相关研究奠定了基础,也为其他研究者提供了较好的模型。

参考文献

- 1 张清,张玲玲.人脐静脉内皮细胞体外培养及相关研究[J].医学综述,2010,16(3):333-336
- 2 Cheung AL. Current protocols in microbiology [M]. Hanover: John Wiley & Sons, Inc, 2007: A.4B.1 - A.4B.8
- 3 Mitry RR, Hughes RD. Human cell culture protocols, methods in molecular biology [M]. Luxemburg: Springer Science + Business Media, LLC, 2012: 265 - 274
- 4 王志华,何志旭,汪浩文,等.人脐静脉血管内皮细胞的培养和鉴定[J].贵阳医学院学报,2006,31(6):499-501

(收稿日期:2012-11-08)

(修回日期:2012-11-29)

SOCS3 和 Th1/Th2 相关细胞因子在非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义

何蓓晖 陈芝芸 严茂祥 陈 瑜

摘要 目的 研究 SOCS3 和 Th1/Th2 相关细胞因子在非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 中的表达及其相互关系和临床意义。**方法** 取 30 例 NAFLD 患者 (NAFLD 组) 和 30 例健康体检者 (对照组) 为研究对象,分别应用实时荧光定量 PCR 法 (RT-PCR) 法和 ELISA 法检测外周血 SOCS3 mRNA 和 Th1/Th2 相关细胞因子 IFN- γ 、IL-4 的表达,观察并比较两组之间的差异。**结果** NAFLD 组 SOCS3 mRNA 的表达较对照组显著升高 ($P < 0.01$); NAFLD 组 IFN- γ 的水平较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 而 IL-4 的水平则无明显变化 ($P > 0.05$)。**结论** NAFLD 患者外周血 Th1 型细胞因子占优势, Th1/Th2 失衡, IFN- γ 的大量表达导致炎症反应,进而促进了 NAFLD 的发生发展; SOCS3 可能是导致 NAFLD 进展的危险因素。

关键词 非酒精性脂肪性肝病 SOCS3 Th1/Th2 IFN- γ IL-4

Expression of SOCS3 and Cytokines of Th1/Th2 in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. He Beihui, Chen Zhiyun, Yan Maoxiang, et al. Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To observe the expression of SOCS3, IFN- γ and IL-4 in serum of patients with nonalcoholic fatty liver dis-

基金项目:浙江省医药卫生科技计划基金资助项目(2011KYB058)

作者单位:310006 浙江省中医院消化研究室(何蓓晖、陈芝芸、严茂祥);310003 浙江大学医学院附属第一医院(陈瑜)

通讯作者:何蓓晖,电子邮箱:graf303@sina.com