

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, 以期为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;⑤0.5%柠檬酸胰酶:胰酶0.5g,柠檬酸钠0.296g,NaCl0.415g,1%酚红1.5mL加双蒸水100mL溶解,1mol/LNaOH调节pH至7.2,过滤除菌分装,-20℃冷冻保存;⑥1%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VWF因子抗血清1:40(购自上海生物制品研究所);⑧SPA-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2.52×10⁴/cm²,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VWF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(×10 ⁻⁵) Number of endothelial cells	成纤维细胞数(×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
正常培养液	2	2.41	2.4	2.32	2.01	2.42	2.53	3.54
Normal medium								5.72
加下丘脑培养液	2	2.52	2.63	2.83	3.11	5.32	10.43	16.17
Hypothalamic medium								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
原代 Primary	2	2.52	2.63	2.83	3.11	5.32	10.43	16.17
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, 内皮细胞脱落死亡, 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)。

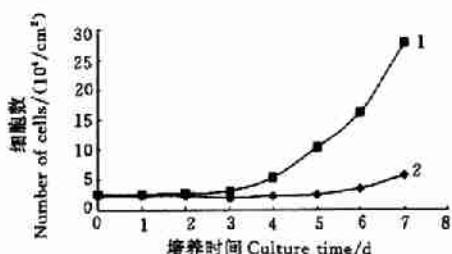


图3 脑粗提液组与一般培养液组中
原代动脉球内皮细胞增值的比较

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

1. 加脑粗提液 Hypothalamic medium
2. 未加脑粗提液 Normal medium

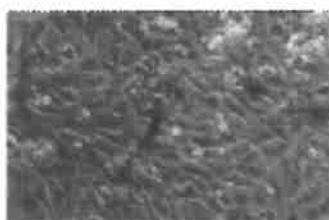


图4 原代纯内皮细胞 300×

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

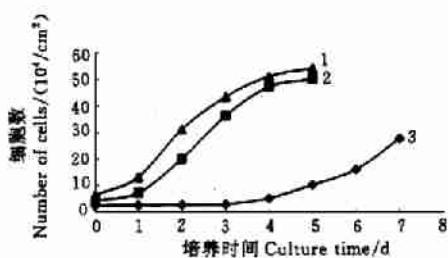


图6 原代及传代内皮细胞生长曲线

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 VWF 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VIII因子抗体酶标检测，发现鲤上皮细胞上存在着与人血凝VIII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VIII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 悅. 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 蓝. 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. 鲤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 VIII factor antigen by anti-VIII factor assay. These cells were identified with general biological character of endothelial cells.

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