

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.29.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 29-0001-05

基础研究 · 论著

豚鼠脑基底动脉平滑肌细胞的原代培养及鉴定*

肖靖杰¹, 张治平², 王洋¹, 司超¹, 张亮¹, 张伟³, 李丽¹, 李新芝⁴, 马克涛¹

[1. 石河子大学医学院 生理学教研室, 新疆 石河子 832003; 2. 石河子大学医学院第一附属医院 耳鼻喉科, 新疆 石河子 832008; 3. 石河子大学医学院第一附属医院 老干二科, 新疆 石河子 832008; 4. 石河子大学医学院 病理生理学教研室 (新疆地方与民族高发病教育部重点实验室), 新疆 石河子 832003]

摘要: 目的 本研究联合使用直接贴壁法和酶消化法培养细胞, 从豚鼠脑基底动脉中提取平滑肌细胞, 为相关实验研究提供材料。**方法** 从豚鼠颅内分离出脑基底动脉, 用 0.125% 胰蛋白酶进行消化并将组织块贴壁, 细胞用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基进行培养。采用自然纯化法, 并根据不同细胞贴壁能力的差异性对细胞进行纯化。通过形态学观察、免疫荧光、免疫组织化学法及 Western blot 检测对细胞进行鉴定。**结果** 85% 组织块存活, 第 4 代平滑肌细胞纯度达 95%。镜下可见细胞呈典型的“峰-谷”样生长, 免疫荧光、免疫组织化学法及 Western blot 检测显示, 平滑肌细胞特异性的肌动蛋白呈阳性表达。**结论** 通过本实验可以得到大量高纯度的豚鼠脑基底动脉平滑肌细胞, 有望为颅内动脉粥样硬化等病理生理变化的体外研究及脑血管平滑肌药物评价提供一个理想的实验材料。

关键词: 豚鼠; 脑基底动脉; 细胞培养; 肌动蛋白

中图分类号: R363

文献标志码: A

Primary culture and identification of smooth muscle cells of cerebral basilar artery from guinea pigs*

Jing-jie Xiao¹, Zhi-ping Zhang², Yang Wang¹, Chao Si¹, Liang Zhang¹,
Wei Zhang³, Li Li¹, Xin-zhi Li⁴, Ke-tao Ma¹

[1. Department of Physiology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 2. Department of Otolaryngology, 3. Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China; 4. Department of Pathophysiology (Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases), School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China]

Abstract: Objective To obtain cerebral basilar artery smooth muscle cells from guinea pigs in combination with two common cultural methods, and provide materials for related experimental studies. **Methods** Cerebral basilar arteries were separated from posterior cranial fossa of guinea pigs first and enzymatically digested with 0.125% trypsin solution, allowed to adhere subsequently, the cells were cultured in DMEM/F-12 with 20% fetal calf serum, then purified based on the comprehensive application of natural purification and differential adherence ability. Finally, they were identified by morphological observation, immunofluorescence and immunocytochemistry analyses, as well as by Western blot. **Results** 85% of the explants survived. The smooth muscle cells at passage 4 had a purity

收稿日期: 2018-03-12

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No: 31460264)

[通信作者] 马克涛, E-mail: maketao@hotmail.com

of over 95%. The cells were observed as a typical "hill-and-valley" growth pattern under microscope. Moreover, immunofluorescent and immunohistochemical staining, and Western blot showed positive expression of α -SM-actin, a smooth muscle cell-specific marker. **Conclusions** By this protocol, a large number of highly purified cerebral basilar artery smooth muscle cells can be obtained from guinea pigs, which can provide an ideal experimental material for study of pathogenesis of the diseases related to intracranial atherosclerosis *in vitro*, as well as evaluation of drug effect on cerebral vascular smooth muscle.

Keywords: guinea pig; cerebral basilar artery; cell culture; actin

有研究表明, 血管平滑肌细胞 (smooth muscle cells, SMCs) 增殖、迁移及黏附等功能的变化在脑卒中、缺血缺氧性耳聋和 Meniere 综合症等疾病的发生、发展过程中扮演重要角色^[1-6]。因此, 建立一种简单而高效的脑血管 SMCs 的培养方法对研究上述疾病的发病机制有重要意义。脑基底动脉细小, 分离困难, 直接贴壁法操作难度大, 成功率低, 而酶消化法的时间和浓度不易掌握^[7-8]。本实验在参照国内外文献报道的基础上, 最终联合应用这 2 种常用的方法, 培养出大量脑基底动脉 SMCs, 经鉴定, 其纯度高, 生长状况良好。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 豚鼠约 2 周龄, 体重 145 ~ 185 g, 雌雄不限, 购自新疆医科大学动物实验中心。动物使用许可证批号: SCXK 新 (2003-0001), 动物质量符合一级标准。饲养和实验过程均严格遵守《石河子大学医学伦理委员会条例》。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素、链霉素购自美国 Hyclone 公司, 平滑肌肌动蛋白 (α -SM-actin) 抗体 (英国 abcam 公司)、 β -actin 一抗和二抗、即用型链霉亲和素-生物素复合物试剂盒、二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (美国 Blotopped 公司), 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (北京索莱宝科技有限公司), 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、Triton-x-100 购自上海生工生物工程股份有限公司, 其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 二氧化碳恒温培养箱 (美国 Thermo 公司), 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), 倒置相差显微镜 (美国 Motic 公司), 激光共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司), 电泳仪、电转膜仪、

GEL-DOC2000 凝胶成像仪购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 原代培养 豚鼠 3 只, 麻醉后断头处死, 无菌条件下迅速取出全脑, 分离出脑基底动脉并小心去除血管周围的结缔组织。将分离出的动脉放入预冷不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hank's 液中, 漂洗 2、3 次, 移入无菌台操作。

将基底动脉移入装含 Hank's 液的培养皿中, 剪成 3 ~ 5 mm 的片段, 将血管片段放入浓度为 0.125% 的胰蛋白酶中, 置于二氧化碳培养箱中消化 20 min, 每隔 5 min 轻轻晃动培养皿, 并轻轻吹打 3、4 次, 消化完成后, 立即终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。剩余血管片段加入几滴含 20% 胎牛血清的培养基, 轻轻混匀, 均匀铺在培养皿中。血管片段间隙 2 ~ 3 mm, 培养皿倒扣置于培养箱中 2 h。翻转培养皿, 加入含 20% 胎牛血清的培养基, 放回培养箱中, 静置 3 d。第 3 天进行首次换液, 第 6 ~ 8 天可见细胞由组织边缘长出, 约 2 周时长满培养皿, 并进行首次传代。

1.2.2 细胞传代 当细胞生长密度达 80% ~ 90% 时, 可进行传代^[9]。弃培养基, PBS 洗 2、3 遍, 取浓度为 0.25% 的胰蛋白酶 (含 0.02% 乙二胺四乙酸) 进行消化, 镜下可见细胞边缘折光增强, 成片皱缩变圆且细胞间隙逐渐变大。当见细胞大部分脱落时立即终止消化, 并夹弃较大的血管片段, 收集细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入培养基轻轻吹打混匀, 分别移入 2 个新的 35 mm 培养皿中, 置于培养箱中继续培养。

1.2.3 细胞纯化 由于脑基底动脉直径小, 不容易去除内膜和外层的纤维层, 所以在细胞传代的过程中, 根据成纤维细胞和 SMCs 不同的贴壁时间, 采用自然纯化法和差异贴壁法对细胞进行纯化。成纤维细胞的贴壁能力大于 SMCs, 而 SMCs 的贴壁能力大于内皮细胞^[10]。同时, 由于内皮细胞培养条件较严格, 在上述条件下无法存活^[11]。因此在传代时, 根据上述规律,

首先将细胞悬液移入 35 mm 培养皿中, 静置 30 min, 使部分细胞贴壁, 然后吸取上层细胞悬液移入另一个新的培养皿中, 再次静置 30 min, 最后吸取第 2 个皿中的细胞悬液移入第 3 个培养皿中, 收集第 3 个培养皿中的细胞即可获得较纯的平滑肌细胞。

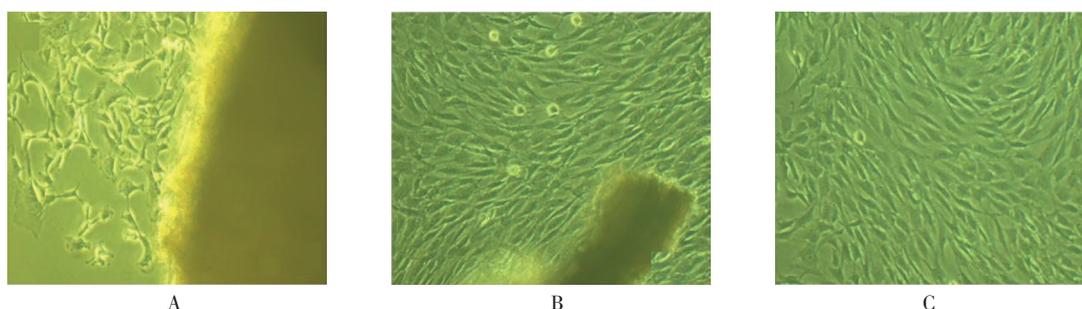
1.2.4 细胞鉴定 ①形态学观察: 应用倒置相差显微镜观察并拍照记录细胞的大小、形态、生长方式及肌丝排列特点等。②免疫荧光染色: 取第 4 代处于对数生长期的细胞, 均匀种植到放置玻片的 6 孔板中, 使细胞爬片。3 d 后, 弃培养基, 37℃ 预温的 PBS 洗 3 次, 5 min/次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次, 0.2% Triton-x-100 透化细胞 3 min, PBS 洗 3 次, 在含 5% BSA 的 37℃ 恒温箱封闭 30 min, PBS 洗 3 次。加入一抗 α -SM-actin (1 : 300), 湿盒置入 4℃ 冰箱中过夜。次日, 37℃ 恒温箱复温 30 min, PBS 洗 3 次。暗室中, 加入二抗 (1 : 50), 37℃ 恒温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, PI 染核, 抗荧光淬灭剂封片, 用激光共聚焦显微镜采集图像, 分析结果。③免疫组织化学法染色: 细胞爬片, 透化, 3% H_2O_2 - 甲醇封闭 5 min, PBS 洗 3 次。加入 α -SM-actin, 4℃ 过夜。PBS 洗 3 次, 滴加二抗类似物 (山羊抗兔 IgG/HRP 聚合物), 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, DAB 溶液显色, 蒸馏水冲洗, 苏木精复染, 自来水反蓝, 中性树胶封片, 收集

图像。④ Western blot 检测: 收集细胞, 裂解并提取总蛋白质, BCA 法测蛋白浓度。加入适量上样缓冲液煮沸, 冻存备用。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至硝酸纤维素膜, 5% BSA 封闭 2 h, 加入 α -SM-actin (1 : 1 000), 4℃ 过夜, 三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 (tris buffered saline and tween 20, TBST) 洗膜, 二抗 (1 : 20 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 于暗室中滴加发光试剂, 压片、显影、定影, 采集图像后用 Quantity One 软件进行分析。

2 结果

2.1 细胞培养结果

脑基底动脉血管片段贴于培养皿 6 d 后, 约 85% 组织块存活, 镜下可观察到大量细胞从组织块边缘游离出来 (见图 1A); 至 10 d 左右, 随着细胞的增殖, 培养皿内可见大量平行生长的细胞; 18 d 左右可见细胞铺满皿底 (见图 1B)。细胞大小形态不一, 呈梭形、三角形或带状, 有长短不一的胞突, 胞质丰富, 胞核呈卵圆形, 居中, 部分可见双核甚至多核。细胞密度较低时, 常交织成网状, 而培养至 22 d 左右, 细胞密度较高, 呈螺旋状或栅栏状, 表现为典型的“峰-谷”样生长 (见图 1C)。利用细胞的生长特点进行反复纯化, 平滑肌细胞的纯度越来越高, 第 4 代后细胞纯度 >95%。



A: 培养第 6 天; B: 培养第 18 天; C: 培养第 22 天

图 1 脑基底动脉平滑肌细胞生长过程 (×100)

2.2 平滑肌细胞的鉴定结果

2.2.1 免疫荧光染色鉴定结果 取第 4 代细胞, 爬片后经平滑肌细胞特异的肌动蛋白 (α -SM-actin) 抗体进行细胞免疫荧光染色, 结果显示肌动蛋白阳性表达率达 95% (见图 2A)。经 PI 染核, 胞核呈红色 (见图 2B)。图 2C 为图 2A 和图 2B 合并。

2.2.2 免疫组织化学法染色鉴定结果 取第 4 代细

胞, 爬片后经肌动蛋白抗体进行免疫组织化学法染色, 镜下可见胞质内含大量棕黄色颗粒, 呈线性排列且与细胞长轴平行, 细胞核呈卵圆形, 居中。(见图 3)。

2.2.3 平滑肌肌动蛋白的表达 收集第 4 代细胞, 裂解并提取总蛋白, Western blot 检测平滑肌特异性的肌动蛋白的表达, 结果显示肌动蛋白呈阳性表达。见图 4。

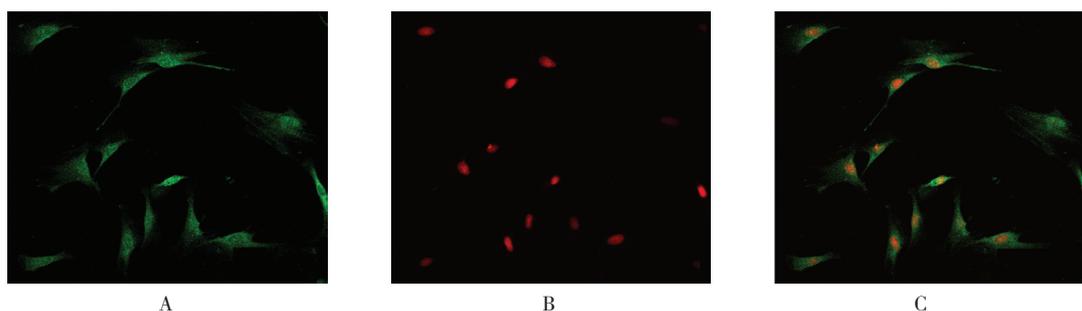
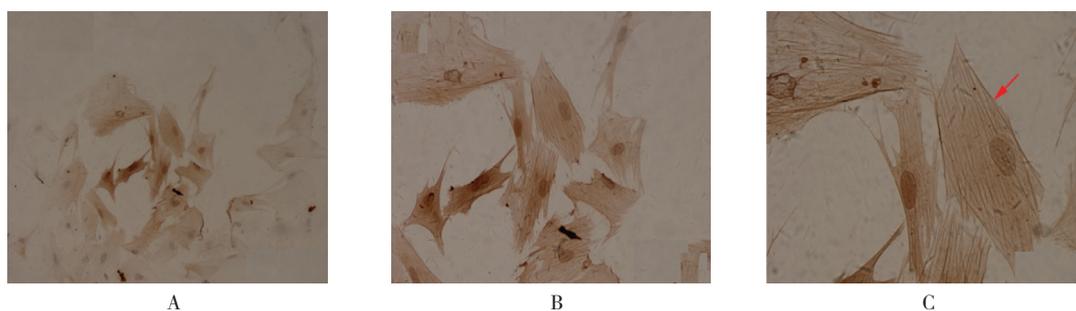
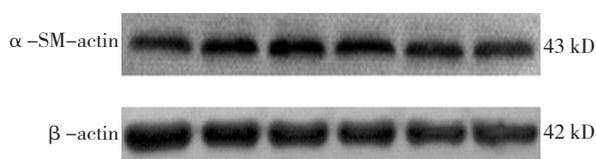
A: α -SM-actin; B: PI 染核; C: 合并图 2 平滑肌细胞 (免疫荧光染色 $\times 200$)A: ($\times 100$); B: α 肌动蛋白丝 ($\times 200$); C: ($\times 400$)。箭头示 α 肌动蛋白丝图 3 平滑肌细胞中 α 肌动蛋白丝 (免疫组织化学法)

图 4 平滑肌细胞肌动蛋白的表达

3 讨论

动脉粥样硬化是缺血性脑卒中、缺血缺氧性耳聋及 Meniere 综合征等疾病的重要病因。近年来研究显示, 颅内、外动脉粥样硬化可能具有不同的危险因素和发病机制^[12]。SMCs 是血管中膜的主要组成成分, 当血管发生损伤时, SMCs 可发生表型转化, 从静息态的收缩表型转变为增生态的合成表型, 重新获得向内膜迁移、增殖的能力。同时, 血管 SMCs 表型转化引发的增殖、迁移及黏附等功能变化为脑动脉粥样硬化、术后再狭窄等病理演变过程中的共同特征。

众所周知, 耳蜗螺旋动脉是供应耳蜗血流的唯一动脉, 其上游依次是小脑前下动脉和脑基底动脉, 且耳蜗螺旋动脉侧枝循环较少, 一旦发生堵塞, 不易代偿, 可造成耳蜗微循环的障碍及病理性的损害。因此, 一方面, 脑基底动脉发生动脉粥样硬化是造成缺血性

脑卒中的重要因素; 另一方面, 脑基底动脉和耳蜗螺旋动脉的血流供应对维持正常听力十分重要。

就培养颅内动脉 SMCs 而言, 多取材于牛、猪、犬、兔等较粗大的脑血管, 而对于豚鼠, 其脑基底动脉细小, 分离困难。由于目前缺乏简单、经济的 SMCs 培养方法, 大大制约对其相关病理生理变化的研究。本实验详细描述脑基底动脉的分离, 原代细胞的培养、纯化及鉴定方法, 从而建立一种简单经济、高效的脑基底 SMCs 培养方法。本实验发现, 6 d 左右组织块边缘有 SMCs 游离出来, 18 d 左右可铺满皿底, 第 3 代即可得到较纯的 SMCs。经鉴定, 在形态上, 细胞呈典型的“峰-谷”样生长。经免疫荧光和免疫组织化学法染色结果显示, 第 4 代细胞的肌动蛋白阳性表达率达 95%, 而 Western blot 检测结果亦同样显示肌动蛋白呈阳性表达。

SMCs 培养过程中最大的问题就是细胞的纯化, 即如何去除混杂在其中的内皮细胞和成纤维细胞。文献报道, 酶消化法和组织贴块法是培养平滑肌细胞最常用的 2 种方法^[7-8]。虽然酶消化法培养细胞周期较短, 但是消化酶作用的时间和浓度不易掌握, 且酶本身对细胞就有一定的毒性作用; 相比较而言, 组织贴块法操作简便, 不易发生污染, 但培养周期较长。微

小动脉的血管由 3 层细胞组成: 外层的成纤维细胞, 中间层的平滑肌细胞和内层的内皮细胞。培养大血管 SMCs 时, 可以通过机械刮除的方式去除成纤维细胞和内皮细胞, 但脑基底动脉较细小, 不宜采用上述方式。经过尝试, 本实验最终选择将 2 种方法联合使用。

实验中有以下几个关键步骤需要注意: ①选择动物时, 由于豚鼠具有与人类类似的耳蜗解剖结构, 在相同条件下, 年幼豚鼠的组织块较年长豚鼠有更好的增殖潜能, 在保证组织足够的情况下, 本实验选用约 2 周龄的新生豚鼠; ②分离脑基底动脉时动作一定要轻柔, 避免对血管过度牵拉造成损伤; ③细胞生长具有密度依赖性, 组织块以 1 mm × 1 mm 为宜, 间距 2 ~ 3 mm, 以保证细胞有足够的生长空间, 且能保持合适的生长密度; ④组织贴块时, 培养皿倒扣的时间为 2 h, 时间过短贴壁不牢, 过长则会导致组织块干涸; ⑤原代细胞培养时选用含 20% 胎牛血清的培养基, 血清浓度过低会降低培养的成功率, 而传代培养时, 开始几代血清浓度可降为 15%, 以后传代则为 10%。

通过本研究方法可以得到大量高纯度的豚鼠脑基底动脉 SMCs, 有望为缺血性脑卒中和缺血缺氧性耳聋等疾病的病理生理变化的体外研究及脑血管平滑肌药物评价提供一个理想的实验材料。

参 考 文 献:

- [1] YC C, JM S, WL H, et al. Polyphenols and oxidative stress in atherosclerosis-related ischemic heart disease and stroke[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, (5): DOI: org/10.1155/2017/8526438.
- [2] MALCOLM K, CHEN J C, JUEN-HAUR H. Risk of peripheral artery occlusive disease in patients with vertigo, tinnitus, or sudden deafness: a secondary case-control analysis of a nationwide, population-based health claims database[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): DOI: org/10.1371/journal.pone. e0162629.
- [3] KUMAR A, KAUR H, DEVI P, et al. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome[J]. *Pharmacology Therapeutics*, 2009, 124(3): 259-268.
- [4] 王竟悟, 于杨, 王大新, 等. 血管平滑肌细胞与动脉粥样硬化关系的研究新进展 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(21): 3661-3663.
- [5] 杨佳音, 简蓉蓉, 许雅丽, 等. CD73 对动脉粥样硬化中血管平滑肌细胞的作用 [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2015, 42(3): 300-306.
- [6] LAO K H, ZENG L, XU Q. Endothelial and smooth muscle cell transformation in atherosclerosis[J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2015, 26(5): 449-456.
- [7] 朱宁, 赵旭勇, 向贻佳, 等. 大鼠肺细动脉平滑肌细胞培养新方法的建立及血小板衍生因子对其增殖迁移的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(4): 343-346.
- [8] 梁志浩, 吴康, 金颖康, 等. 一种大鼠肺静脉平滑肌细胞快速培养方法的建立及评价 [J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(1): 45-50.
- [9] LIU J, ZHANG Y, LI Q, et al. An improved method for guinea pig airway smooth muscle cell culture and the effect of SPFF on intracellular calcium[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(3): 1309-1314.
- [10] SA B, Y S, JP S, et al. Different sensitivity of human endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts to topography in the nano-micro range[J]. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5(7): 2460-2466.
- [11] ZHANG J, CHU L F, HOU Z, et al. Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived arterial endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(30): 6072-6078.
- [12] KUCHER A N, NAZARENKO M S, MARKOV A V, et al. Variability of methylation profiles of CpG Sites in microrNA genes in leukocytes and vascular tissues of patients with atherosclerosis[J]. *Biochemistry*, 2017, 82(6): 698-706.

(童颖丹 编辑)