

· 简 报 ·

脑动脉平滑肌细胞培养

宜全³, 关永源¹, 贺华¹, 吴金浪²

(中山医科大学 1. 药理教研室 2. 电镜室, 广东 广州 510089; 3. 广州医学院药理教研室, 广东 广州 510182)

关键词: 细胞; 肌, 平滑; 脑动脉

中图分类号: R329.2; R322.121 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)05-0400-01

脑血管平滑肌的舒缩是引起脑血管疾病发生的重要病理变化。血管平滑肌细胞功能的调节依赖于胞浆游离 Ca^{2+} 浓度。用共焦激光显微镜可以测试一个细胞内的 Ca^{2+} 动态, 但所用细胞需粘附在培养皿上且不能被液体冲掉, 因此即使使用原代细胞也需培养一段时间。如没有共焦激光显微镜, 使用 RF-5000 荧光分光光度计只能测定悬浮细胞内 Ca^{2+} 浓度的动态变化, 这就需要大量的活细胞才能测试。因此必须建立脑血管平滑肌细胞培养方法。本实验用改进的组织贴块法培养牛脑血管平滑肌细胞, 方法简便, 经济, 通过电镜鉴定, 台盼蓝染色证实活细胞占 90% 以上, 可用于 RF-5000 荧光分光光度计观察细胞内 Ca^{2+} 浓度的动态变化。

1 材料和方法

1.1 标本

乳牛脑由广州市奶牛研究所提供(纯种荷斯坦牛)。

1.2 培养基

牛血清白蛋白(BSA)购于 Boehringer Mannheim 公司, DMEM/F₁₂ 购于 Gibco 公司, 胎牛血清(FCS)购于杭州四季青生物研究所, 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 脑血管平滑肌分离与细胞培养

新生 1~2 d 健康小牛, 颈动脉放血处死、断头、开颅。无菌条件下取出全脑, 仔细分离出基底动脉和大脑中动脉条, 放入含有抗菌素(青霉素 $100 \times 10^3 U \cdot L^{-1}$ 、链霉素 $100 mg \cdot L^{-1}$)和 BSA($10 mg \cdot L^{-1}$)的 DMEM/F₁₂ 营养液中, 在倒置显微镜下剪去分枝, 小心去除血管周围结缔组织及外膜, 然后纵向剪开管腔, 去除血块和内皮, 再把血管剪成 $1 mm^3$ 左右大小, 植入 15 mL 培养瓶中, 各块间隔约 $1 mm^2$, 均匀分散平铺瓶底, 放入 $37^\circ C$ 含体积分数为 5% CO_2 培养箱中约 2 h, 待组织块贴壁后, 加入含 $200 mL \cdot L^{-1}$ FCS 的 DMEM/F₁₂ 培养液, 覆盖组织块, 拧松培养瓶盖, 绝对静置培养。10 d 左右见有细胞从组织块边缘跳出, 去除组织块, 换液, 待 18 d 左右细胞融合成片, 长满瓶底, 进行传代。传代时倒去培养液, PBS 轻轻洗涤 1 次, 用消化液($0.5 mg$ Trypsin + $0.53 mmol \cdot L^{-1}$ EDTA)在 $37^\circ C$ 消化贴壁细胞, 镜下见细胞收缩变圆, 立即倒去消化液, 加含 $100 mL \cdot L^{-1}$ FCS 的 DMEM/F₁₂ 营养液终止反应, 轻轻吹打使之形成细胞悬液, 以 $(0.3 \sim 0.5 \times 10^9)$ L^{-1} 细胞密度分装入新的培养瓶进行传代培养。2~3 d 换液 1 次, 7 d 左右细胞长满瓶底, 再依同法做传代培养。

2 结果

倒置相差显微镜下观察乳牛脑基底动脉和大脑中动脉平滑肌细胞呈梭形, 平行生长, 束状排列。电镜下可见第 II 代细胞均富含肌丝, 肌束间可见许多密体。电镜下可见第 IV 代细胞肌丝减少, 胞浆中充满细胞器, 有大量的高尔基复合体和内质网, 还可见线粒体, 核糖体, 溶酶体等。

3 讨论

脑血管动脉壁薄, 平滑肌细胞数目少, 生长环境条件要求高, 对 pH 值的改变敏感, 培养时必须使培养液的 pH 7.4~7.5 左右。传代是培养成功的关键, 要注意掌握好传代时细胞消化的程度, 且必须高密度接种。由于本实验材料是新生乳牛, 其脑血管尚未经过血流动力的长期冲击, 电镜下可见很多肌丝偏向细胞一侧, 而成年动物脑血管平滑肌已对外界环境的改变做出了适应的调节, 因而肌丝通常成环行, 在细胞两侧均匀分布。

参考文献:

- [1] 赵基, 张彩英, 徐德敏, 等. 动脉平滑肌细胞培养[J]. 中华病理学杂志, 1983, 12(2): 150.
- [2] 鄂征. 组织培养技术[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 100~130.
- [3] Julie H, Gordon R. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle[J]. Clin Sci, 1993, 85(5): 501.
- [4] Ikeuchi Y, Nishizaki T. Dual effects of ATP on the potassium channel and intracellular Ca^{2+} release in smooth muscle cells of the bovine brain arteries[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 216(3): 1071.

(编辑 黄小延)

收稿日期: 2000-09-26

基金项目: 国家自然科学基金(39970849); 广东省自然科学基金资助项目(98-302)

作者简介: 宜全(1965-), 女, 山西临汾人, 硕士, 现任广州医学院药理教研室讲师。