

人脐静脉内皮细胞的培养和连续传代

江丽芳 刘乐和 郭辉玉

(微生物学与免疫学教研室)

提 要 本实验用新生小牛视网膜提取物作血管内皮细胞生长促进剂,成功地使人脐静脉内皮细胞在体外连续培养23代以上。细胞倍增时间平均为16.6h,细胞传代时间平均为5d,传代比率为1:2~1:3。用ABC法证明细胞内存在Ⅱ因子相关抗原(FⅡr-Ag),透射电镜下可见胞浆内含WP(Weibel-Palade)小体,证实所培养的细胞为血管内皮细胞。

关键词 人脐静脉内皮细胞; 传代培养; 牛视网膜提取物

中图分类号 Q2-33

血管内皮细胞(EC)是一种多功能细胞,其在多种疾病中所起的重要作用已越来越受到重视。血管内皮细胞已成为当今医学生物学领域的重要研究对象^[1]。利用体外培养法建立血管内皮细胞研究模型是研究血管内皮细胞的重要手段。但血管内皮细胞在体外不易生长,长期传代相当困难。近年来,国外曾有用内皮细胞生长因子(EGF)维持血管内皮细胞在体外培养和传代的报道,但国内此类报道甚少。作者用新生小牛视网膜提取物作内皮细胞生长促进剂,并用改良消化法成功地使人脐静脉内皮细胞在体外连续培养23代以上,为进一步研究人血管内皮细胞在出血性疾病,特别是在出血性病毒性疾病中的病理生理过程提供了一个接近人体的实验模型。

材 料 与 方 法

人脐静脉内皮细胞的原代培养

1. 培养基 ①H-1640培养基:含RPMI-1640(Gibco产品),Hepes(Merck产品)10mmol/L,0.03%L-谷氨酰胺,100U/ml青霉素,100μg/ml链霉素,50μg/ml卡那霉素,20%小牛血清。②H-1640完全培养基:该培养基在H-1640培养基的基础上加新生小牛视网膜提取物300μg/ml。该提取物由本研究室刘乐和等参照文献^[2,3]经过在缓冲液成份、pH、提取时间和温度等方面反复改良而制备。详细

方法参见另文。

2. 培养方法 无菌操作取正常分娩或剖腹产的新生儿脐带约30cm,置于HBS(Hepes-磷酸盐缓冲液)中,4℃保存,48h内使用。脐带先用37℃的HBS洗3~4次,然后在脐带一端找出脐静脉,沿脐静脉走向插入一带套管的针头,固定后注入50~100ml37℃的HBS冲洗管腔,驱尽腔内残血。用带硅胶套管的止血钳夹紧脐带另一端,缓缓注入胰蛋白酶-EDTA(0.25%胰蛋白酶,0.02%EDTA1:3)消化液15~20ml使静脉充盈。将脐带置于37℃温箱中消化10min,收集消化液,再用30mlHBS冲洗静脉管腔,使内皮细胞尽量脱落。将含有细胞的消化液和冲洗液混合,离心1000r/min,5min。弃上清,下沉细胞用H-1640完全培养基10ml制成细胞悬液。用0.4%台盼蓝染色后作细胞计数,以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种6孔细胞培养板。于37℃,5%CO₂的细胞培养箱中静置培养,3h后换液,以除去未贴壁的细胞及残留红细胞。

人脐静脉内皮细胞的传代培养

当培养的细胞长成致密单层后,弃去生长液,加入0.02%EDTA复盖细胞单层,室温下作用3~5min,待细胞单层呈疏松网状时,弃去EDTA,加入H-1640完全培养基,轻轻吹打细胞使之分散,制成细胞悬液,计数,以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种细胞培养瓶。早期传

代分瓶比率为 1:3, 后期传代比率为 1:2。

人脐静脉内皮细胞的鉴定

1. 倒置相差显微镜 镜下观察人脐静脉内皮细胞的形态及生长特征。

2. 透射电镜 镜下观察人脐静脉内皮细胞的超微结构: 分别取培养至第 2 代和第 10 代的内皮细胞, 常规固定、包埋和超薄切片, 透射电镜下观察其超微结构。

3. ABC 法检测 检测人脐静脉内皮细胞 FVII 因子相关抗原: 分别取原代、第 8 代和第 15 代的培养细胞, 用兔抗人 FVIIr-Ag 为第 1 抗体, 按 ABC-kit 介绍的方法染色, 并用 PBS 代替第 1 抗体作阴性对照。

人脐静脉内皮细胞增殖的研究

取生长至第 3 代的内皮细胞, 制成细胞悬液, 以 1×10^4 /孔的细胞数接种 24 孔细胞培养板, 实验分两组, 一组用 H-1640 完全培养基, 另一组则用不含新生小牛视网膜提取物的 H-1640 培养基作对照。在相同条件下 (37°C 、 $5\% \text{CO}_2$) 培养。每 24 h 每组取 4 孔细胞, 分别计数, 取均值, 绘制生长曲线。

结 果

人脐静脉内皮细胞的生长代谢特征

原代细胞接种后 3h 内, 95% 以上的细胞贴壁。3~5d 可长成致密单层。在含新生小牛视网膜提取物的 H-1640 完全培养基中, 细胞可连续培养 23 代以上。在 15 代以前, 细胞传代时间为 3~5d, 15 代以后为 5~7d。传至 23 代以后, 细胞生长缓慢, 体积变大, 胞浆内出现大量空泡, 最后自然脱落。细胞生长曲线显示, 细胞平均倍增时间为 16.6h。第 5 天出现接触抑制现象 (图 1)。未加新生小牛视网膜提取物的对照组, 细胞培养仅能维持 3 天左右, 且生长缓慢, 往往在长成致密单层以前就脱落。

人脐静脉内皮细胞的形态学特征

在倒置相差显微镜下, 内皮细胞呈略长的多角形, 长成致密单层的细胞呈鹅卵石状排列, 无细胞重叠现象 (图 2)。

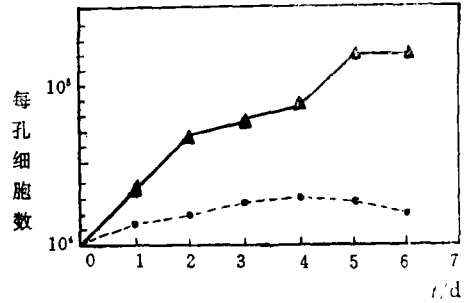


图 1 人脐静脉内皮细胞生长曲线

(—▲—) 代表在 H-1640 完全培养基上的生长曲线。(……) 代表在普通 H-1640 培养基上的生长曲线

透射电镜结果显示, 第 2 代和第 10 代的内皮细胞核膜清晰, 均含有丰富的内质网、线粒体和微管结构, 并可见一种直径 $0.09 \sim 0.11 \mu\text{m}$, 长 $0.4 \sim 2 \mu\text{m}$ 的致密杆状小体, 此即为内皮细胞特征性的 Weibel-Palade 小体 (WP 小体)。此外, 还注意到, 有些内皮细胞的胞浆内含有直径为 $0.6 \sim 0.7 \mu\text{m}$ 的自噬泡, 其出现是否与体外培养的人脐静脉内皮细胞的特殊代谢过程有关, 有待进一步研究。

内皮细胞 FVII 因子相关抗原的检测

ABC 染色结果显示, 受检的原代、第 8 代和第 15 代内皮细胞的胞浆均被染成棕褐色。阴性对照未见此反应, 说明所培养的细胞稳定地产生 FVII 因子相关抗原。

讨 论

为了研究血管内皮细胞的生理功能及其在多种疾病中的病理生理过程, 自 1963 年起, 人们便不断地开展内皮细胞体外培养的研究, 以便提供一个接近人体的研究模型。但由于人血管内皮细胞培养条件要求高, 不易在体外生长, 长期以来只能在体外维持培养 2~3 代^[4,5]。1981 年, Maciag 的研究使人血管内皮细胞的体外培养获得突破性进展, 他用从牛下丘脑提取的 ECGF 作为生长促进剂, 成功地使人血管内皮细胞在体外连续培养 15~20 代^[6,7]。国内张宝庚、魏少敏等也曾先后报道过人脐静脉内皮细胞的体外培养法, 但由于缺

乏有效的内皮细胞生长促进剂,所以,只能使细胞在体外维持2~3代^[8,9]。作者利用新生小牛视网膜提取物作为促生长剂,实现了人血管内皮细胞的长期传代培养,成功地建立了一个简便易行的人血管内皮细胞连续培养法。

在培养方法上,本实验对传统的酶消化法作了改良,用低浓度的胰蛋白酶-EDTA作为消化液,取得了较好的效果,每条脐带约可收获 10^6 个内皮细胞,其中活细胞数在97%以上。对传代细胞,又采用EDTA代替胰酶消化法,利用EDTA与细胞间桥二价阳离子的螯合作用使细胞分散,避免了酶消化法对细胞的损伤,有利于细胞增殖。目前认为,内皮细胞生长因子是维持血管内皮细胞在体外长期培养的必要条件,国外已有商品出售。本实验用新生小牛视网膜提取物作为生长促进剂也收到满意的效果,说明该提取物具有促人血管内皮细胞生长的作用。

WP小体仅见于内皮细胞,被认为是鉴定内皮细胞最好的形态学标志。FⅧr-Ag除存在于内皮细胞外仅见于巨核细胞和血小板内,也被认为是内皮细胞的可靠标志。本实验在透射电镜下观察到WP小体,用ABC法检出FⅧr-Ag,从而证实所培养的细胞为人血管内皮细胞。目前我们正应用传代培养的人血管内皮细胞研究乙型脑炎病毒和登革病毒与人血管内皮细胞的相互作用。

(本文图2、3见插页4)

参 考 文 献

1. 吴庆宇,等. 血管内皮细胞研究进展. 生理科学进展 1987;18(4):332
2. Wacker WB, et al. Experimental allergic uveitis: isolation, characterization and location of soluble uveitophathogenic antigen from bovine retina. J Immunol 1977;199:1949
3. Maciag T, et al. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: Identification and partial characterization. Proc Natl Sci USA 1979;76(11):5674
4. Gimbrone MA, et al. Human vascular endothelial cells: growth and DNA synthesis. J Cell Biol 1974;60:673
5. Jaffe EA, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J Clin Invest 1973;52:2745
6. Maciag T, et al. Serial propagation of human endothelial cells in vitro. J Cell Biol 1981;91:420
7. Patrick S, et al. Methods for the initiation and maintenance of human endothelial cells culture. Vascular Surgery 1987;21(6):391
8. 魏少敏,等. 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定. 中国病理生理杂志 1987;3(3):188
9. 杨小平,等. 人脐静脉内皮细胞的培养及形态观察. 中华心血管杂志 1988;16(5):298
(1992-12-28收稿 1993-07-05修回)

PRIMARY AND SERIAL SUBCULTIVATIONS OF THE ENDOTHELIAL CELLS FROM HUMAN UMBILICAL VEIN IN VITRO

Jiang Lifang Liu Lehe Guo Huiyu

(Department of medical microbiology and immunology)

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were grown for more than 23 passages in medium RPMI-1640 supplemented with 20% calf serum and bovine retinal extract prepared by authors lab. The cells exhibited population doubling time by an average of 16.6 hours. Serial subcultivations were made with an average of 5 days and split ratio of 1:2~3. Immuno-histochemical and transmission electron microscopic examination of the cells showed that the human endothelial cells contained F VIII r-Ag and Weible-Palade's (WP) bodies.

Key words human umbilical vein endothelial cell; serial subcultivation; bovine retinal extract

· 简 报 ·

中国人中发现的 6 种 G6PD 基因点突变

杜传书¹ 王 菁¹ 陈路明¹ 华小云 赵崇义² 左 琳³ 曹乐冬³

(1. 医学遗传学研究室 2. 台湾长庚医学院 3. 美国奥克兰儿童医院)

关键词 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症; 点突变; 遗传性疾病; 聚合酶链反应; 变异型

中图分类号 Q343

作者对产检夫妇中查出葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症的男性患者39例作了生化变异型鉴定(按1967年WHO统一法)。并研究了其G6PD基因突变的性质。方法是,在分别扩增G6PD编码的13个外显子的基础上,用其PCR产物作非对称

PCR(APCR)。将获得的单链产物以双脱氧链终止法进行DNA顺序测定。结果:除2例未定出突变性质外,共发现了6种不同点突变。见附表。

值得指出的是:①39例分属19种生化变异型,但从DNA水平仅见6种突变型,即一种DNA突变型可见于不同的G6PD生化变异型;偶见二种DNA突变型为单一生化突变型。这除生化鉴定技术性原因外,可能与翻译后的修饰有关。②生化鉴定的指标中,除脱氢NADP利用率增高与C₁突变型似有一定联系外,其他如酶活性,电泳迁移率、热稳定性、脱氧C6P和半乳糖-6-磷酸利用率与DNA突变之间均未见明显相关。③C₃突变除1311位有一同义突变外,均见第11内含子的第93位有一碱基置换(C→T)。此二突变似都难以解释G6PD活性降低的现象,有待进一步探讨。

附表 6种突变性变及频率

命名	cDNA位置	碱基改变	氨基酸置换	例数	%
C ₁	1376	G→T	精→亮	11	28.2
C ₂	1388	G→A	精→组	11	28.2
C ₃	1311	G→T	无	4	10.3
C ₄	392	G→T	甘→缬	3	7.7
C ₅	1024	G→T	亮→苯丙	2	5.1
C ₆	94	A→G	精→组	6	15.4
未鉴定				2	0.1

(1993-06-04收稿)

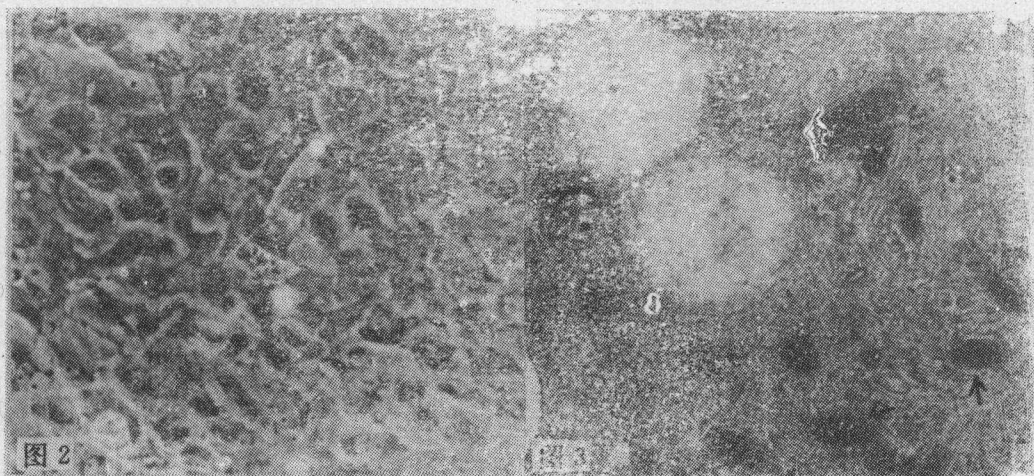


图2(左) 人脐静脉内皮细胞
第2代光镜图, ×200

图3(右) 人脐静脉内皮细胞
第10代光镜图, 箭头所指为WP小体, ×2 000

(上接第Ⅷ页)

Z

乙型肝炎病毒	(3):175	自身免疫	(1): 17
	(3):232	正常孕妇	(1): 16
	(3):183	杂交瘤细胞	(1): 35
	(4):255	左室充盈功能	(1): 48
乙酰胆碱	(3):200	自发变动性	(1): 58
烟碱型乙酰胆碱受体	(3):200	昼夜节律	(1): 58
诱发单位放电	(3):200	铸造	(1): 77
隐神经	(3):200	早期发现	(2): 90
诱变	(3):204	载脂蛋白A I 基因	(2):120
DNA印迹	(3):226	组织培养	(2):129
预激	(3):240	阻生牙	(2):140
乙型肝炎抗原抗体	(4):255	主动脉瓣下狭窄	(2):148
异质性	(4):256	整码缺失	(2):160
异源双链	(4):282	转录载体	(3):197
遗传性多态性	(4):285	组织病理学	(3):207
遗传性疾病	(4):291	脂蛋白脂酶	(3):217
氧自由基	(4):292	治疗	(4):241
预激综合征	(4):296	最后区	(4):252
乙型肝炎病毒e抗原	(4):306	pBR322质粒DNA	(4):266
乙型肝炎病毒e抗体	(4):306	猝死	(4):277
原发性细菌性腹膜炎	(4):314	重症病毒性肝炎	(4):314