

肉鸡肺动脉内皮细胞的体外培养和鉴定

潘家强^{1,2}, 孙卫东¹, 李锦春¹, 谭 勋¹, 王金勇¹, 王小龙^{1*} (1. 南京农业大学 畜禽营养代谢病研究室, 江苏 南京 210095; 2. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 分别采用组织贴块法和胶原酶消化法培养肉鸡肺动脉内皮细胞, 并对其进行传代。采用形态学和凝血VIII因子相关抗原免疫组化染色法对所培养的细胞进行鉴定。结果表明, 2种方法均能够获得原代肉鸡肺动脉内皮细胞, 采用贴块法培养2周左右可获得单层生长的细胞, 而采用胶原酶消化法3~5d即可获得单层生长的细胞。原代肉鸡肺动脉内皮细胞在体外可传5~6代。倒置显微镜和HE染色观察培养细胞的形态符合血管内皮细胞的特征, VIII因子抗原免疫组化染色结果呈阳性进一步证明培养的细胞是肺动脉内皮细胞。

关键词: 肉鸡; 肺动脉内皮细胞; VIII因子相关抗原

中图分类号: S852.1; S856

文献标识码: A

文章编号: 1005-4545(2007)01-0070-04

Culture and identification of pulmonary artery endothelial cells of broiler

PAN Jia-qiang^{1,2}, SUN Wei-dong¹, LI Jin-chun¹, TAN Xun¹, WANG Jin-yong¹, WANG Xiao-long^{1*}

(1. Institute of Nutritional and Metabolic Disorder in Domestic Animals and Fowls, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Pulmonary artery endothelial cells (PAEC) of broiler were isolated by the methods of tissue transplantation and collagenase digesting. Obtained cells were subcultured. Identifications of the cells were performed with the morphological feature and immunohistochemical stain using specific antiserum against factor VIII related antigen. The result showed that both methods could obtain the primary PAEC. A confluent monolayer of cells was formed 2 weeks after tissue transplantation. Cells obtained by collagenase digesting formed monolayer 3-5 days after isolation. Primary PAEC could be subcultured and had been survived for 5-6 passages *in vitro*. Phase contract microscopy and HE stain of the cultured cells demonstrated the morphological characteristics of endothelial cells. Immunohistochemical stain revealed that factor VIII related antigen was positive in the cultured cells, indicating the specific characteristic of endothelial cells.

Key words: broiler; pulmonary artery endothelial cells; factor VIII related antigen

* Corresponding author, E-mail: wangxiaolong888@sohu.com

肺动脉内皮细胞(pulmonary artery endothelial cells, PAEC)是覆盖于肺动脉内表面的单层细胞,具有多种重要的生物学功能。PAEC功能与结构的完整性与多种疾病相关,如呼吸窘迫综合征和肺动脉高压等。对肉鸡的研究表明,肺血管内皮损伤可能在肉鸡肺动脉高压综合征的发生、发展过程中起着重要的作用^[1]。哺乳动物如大鼠、新生犊牛和猪的PAEC的分离培养方法已有报道^[2-4],但鸡PAEC的

体外培养国内外均未见报道。因此建立肉鸡PAEC体外培养方法将为进一步研究肉鸡肺动脉高压综合征的发病机理和防治方法提供有效的研究手段。

1 材料与方法

- 1.1 实验动物 1日龄或20日龄健康AA肉鸡。
- 1.2 主要设备 超净工作台(苏州净化设备厂),倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂),二氧化碳培养箱(Thermo Forma 3111),水浴震荡器(江苏太仓实验仪器厂),显微照相系统(Nikon E200)。
- 1.3 主要试剂 M-199培养基(GIBCO BRL),新生牛血清(杭州四季青公司),L-谷氨酰胺(AM-

收稿日期: 2005-03-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371061; 30600440)

作者简介: 潘家强(1978-),男,博士。

* 通讯作者, E-mail: wangxiaolong888@sohu.com



RESCO), 明胶(AM RESCO), II型胶原酶(WORTHINGTON), 胰蛋白酶(1:250, AM RESCO), EDTA(国产分析纯), 兔抗VIII因子相关抗原抗体(北京中杉金桥公司), SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德公司), DAB显色试剂盒(武汉博士德公司), TritonX-100(SIGMA)。

1.4 培养器皿的处理 培养瓶或培养皿用1%明胶液进行包被, 包被方法按参考文献进行^[5]。培养前1 d加入1%明胶于培养瓶或培养皿中, 置于4℃冰箱内过夜, 临用前2 h置入37℃CO₂培养箱, 用时倾掉明胶液, 用培养液清洗3次。

1.5 肉鸡PAEC的原代培养

1.5.1 组织贴块法 取1日龄健康肉鸡, 颈动脉放血处死。将肉鸡用针头固定在操作台上, 70%酒精消毒胸腹部, 逐层打开胸腹腔, 无菌取出肺动脉主干, 置于37℃预热含青霉素200 IU/mL, 链霉素200 mg/L的D-Hanks液中备用。在超净台内取出肺动脉, 放在盛有D-Hanks液的培养皿中。分离外膜的脂肪和结缔组织, 用D-Hanks液反复冲洗, 并用注射器将血管内的血液冲净。用眼科剪纵行剪开肺动脉平展在平皿内, 用双面刀片将其切成1 mm × 1 mm的小动脉片, 用弯头针挑起, 以其内膜面贴入经1%明胶液预包被的25 mL培养瓶中, 块间距离约0.5 cm左右。加塞置37℃、饱和湿度二氧化碳培养箱1~2 h, 使之贴牢, 之后加入含20%小牛血清的M-199培养基约2 mL, 使培养基刚好可以淹没组织块, 放入37℃、5%二氧化碳培养箱中培养, 2~3 d换1次液。当肺动脉片周围有细胞生成并达到一定密度时, 将小动脉片取出, 继续培养, 直至形成单层细胞。

1.5.2 胶原酶消化法 取20日龄健康肉鸡, 无菌取出肺动脉, 其法同贴块法。在超净台内冲净血管后, 用眼科镊从血管一端插入另一端, 夹住另一端翻转, 使血管内膜朝外, 外膜朝内, 用丝线将血管两端扎牢。将血管置于100 mL三角瓶内, 加5 mL含0.1%胶原酶的D-Hanks液(pH 7.2, 37℃), 37℃水浴振荡器内震荡以促进内皮细胞解离。30 min后加等量含20%小牛血清的M-199培养液终止消化。将收集到的细胞装于10 mL带塞离心管内, 800~1 000 r/min离心5 min, 去上清液, 用含20%小牛血清的培养液稀释沉淀细胞, 并用吸管轻轻吹打使细胞重悬浮。再次离心细胞, 去上清液, 用2~3 mL含20%小牛血清的培养液重悬浮细胞, 显微镜下计数, 用含20%小牛血清的培养液调整细胞至(20~30) × 10⁴/mL, 以3 mL细胞液接种于经1%明胶液预处理的25 mL培养瓶中, 放入37℃、5%二氧化碳培养箱

中培养。

1.6 肉鸡PAEC的传代 当肉鸡原代PAEC长成单层后即可进行传代。以0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA液室温下进行消化, 镜下观察, 当细胞开始收缩变圆, 细胞间连接疏松时立即翻转培养瓶, 使液体脱离接触细胞, 移至超净台内倒出消化液, 加入6 mL含10%小牛血清的培养基, 用吸管吹打使细胞脱落并混合均匀, 以3 mL细胞液接种于25 mL培养瓶, 一般1瓶传2瓶, 继续培养, 至细胞长成单层后按上述方法依次传代。

1.7 肉鸡PAEC的形态学观察

1.7.1 活细胞形态的观察 在倒置显微镜下观察肉鸡原代和传代PAEC的形态。

1.7.2 HE染色观察 将传代时消化下来的细胞以2 × 10⁴/mL的密度种植于直径3 cm的细胞培养皿内, 培养皿内放置一块经1%明胶液预处理的盖玻片, 至细胞融合成单层, PBS冲洗, 80%乙醇固定30 min, 作HE染色后观察。

1.8 肉鸡PAEC的免疫组化鉴定 采用凝血VIII因子相关抗原免疫组化法鉴定。将消化下来的细胞种植于1%明胶液预处理的盖玻片上, 盖玻片置于直径3 cm细胞培养皿内, 至细胞长至80%融合时停止培养, PBS清洗3次, 每次1 min。4%多聚甲醛固定15 min, PBS清洗3次, 每次2 min。0.5% Triton X-100孵育20 min, PBS清洗3次, 每次2 min。3% H₂O₂孵育15 min消除内源性过氧化物酶, PBS清洗3次, 每次2 min。滴加1:100兔抗人VIII因子相关抗原抗体, 于4℃湿盒内过夜, 以PBS液作为阴性对照。PBS清洗3次, 每次5 min, 滴加二抗工作液, 于37℃湿盒内孵育30 min, PBS清洗3次, 每次5 min。DAB显色5~8 min, 镜下观察至棕色时用蒸馏水终止显色。蒸馏水洗2次, 梯度酒精脱水, 取出盖玻片用吹风机吹干, 用中性树脂胶封固于载玻片上。

2 结果

2.1 细胞生长情况 贴块法培养肉鸡PAEC, 约在培养3~5 d后肺动脉片周围开始有细胞游出(图1A), 培养5~8 d后细胞生长达到一定密度(图1B), 此时将小动脉片取出, 继续培养6~10 d, 形成细胞单层。

胶原酶消化法培养肉鸡PAEC, 刚消化下来的细胞呈椭圆形, 6 h后即开始贴壁。培养细胞约在接种后4~5 d长成单层。传代细胞每5~7 d传代1次,

传代次数越多, 细胞生长越困难, 本方法培养的肉鸡

PA EC 在体外可传 5~ 6 代。

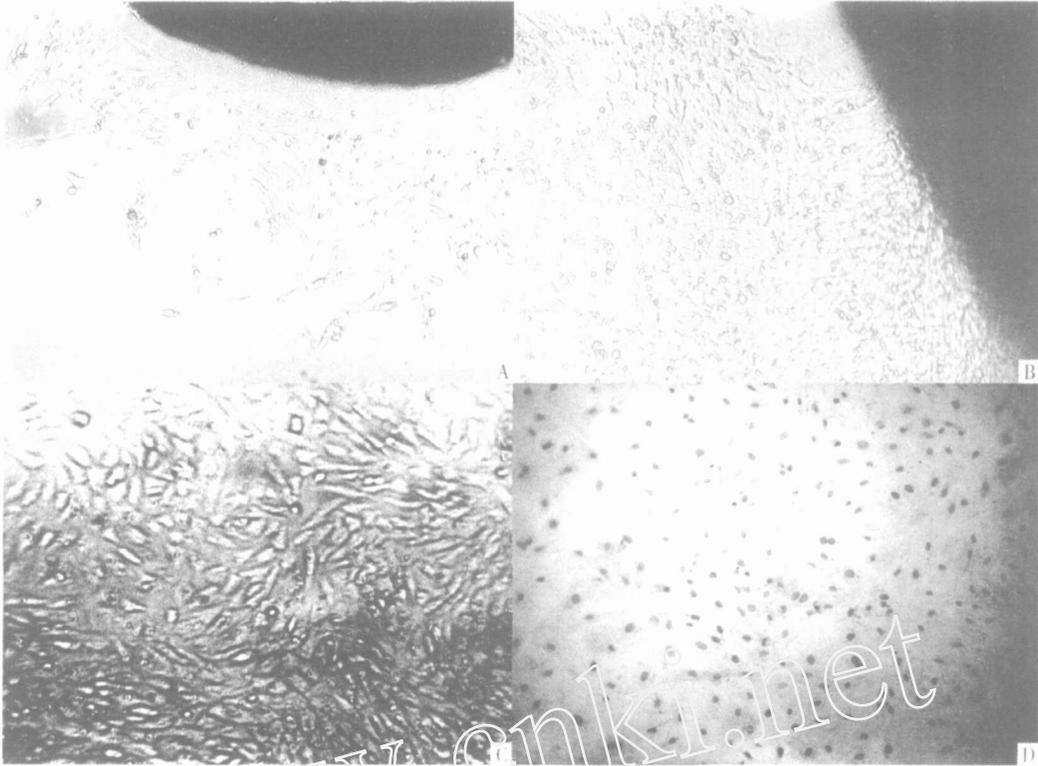


图1 A. 肺动脉片周围有细胞游出, 倒置显微镜, 10×10 ; B. 肺动脉片周围细胞大量生长, 倒置显微镜, 10×10 ; C. 肉鸡 PA EC 呈短梭形或多角形, 长成单层的细胞呈典型的铺路石样外观, 倒置显微镜, 10×10 ; D. 肉鸡 PA EC HE 染色, 细胞核椭圆形, 呈深蓝色, 胞浆呈淡红色, 光镜, HE, 10×10

2.2 细胞形态观察 活细胞形态的观察: 倒置显微镜下观察肉鸡 PA EC 呈短梭形或多角形, 长成单层的细胞呈典型的铺路石样外观(图1C)。

HE 染色: 细胞呈短梭形或多角形, 细胞核椭圆形, 呈深蓝色, 轮廓清楚, 胞浆丰富呈淡红色(图1D)。

2.3 免疫组化鉴定 VIII因子相关抗原免疫组化检测可见培养细胞胞浆内有棕黄色颗粒(图2), 证实培养的细胞为 PA EC。经计数统计, PA EC 的阳性率在

90% 以上。

3 讨论

大量的研究表明, 血管内皮细胞不仅是覆盖于血管内表面的屏障, 也是一个重要的内分泌器官, 它能分泌多种血管活性物质, 如一氧化氮(NO)、前列环素(PGE)、内皮素(ET)等, 从而参与多种血管相关的生理和病理过程。因此, 运用体外培养的血管内皮细胞作为研究模型已成为近年来心血管疾病研究领域的一个热点^[6-7]。

大动物如牛和猪的血管内皮细胞培养主要采用酶灌注消化法^[3-4], 而大鼠由于血管较小, 多采用组织贴块法^[2]。家禽肺动脉较细, 同时家禽 PA EC 在体外生长活力较差, 因此, 体外培养肉鸡 PA EC 在取材、培养上有一定难度, 不易成功。本研究以 1 日龄和 20 日龄肉鸡为取材对象, 分别采用组织贴块法和翻转血管胶原酶消化法, 都能成功的培养出 PA EC。两者相比较, 组织贴块法操作简便易行, 适用于日龄较小、血管比较细小的肉鸡, 但细胞长成单层需要长达 2 周左右的时间。胶原酶消化法操作上比较繁琐, 容易损伤血管壁, 仅适用于大日龄、血管腔较大的肉

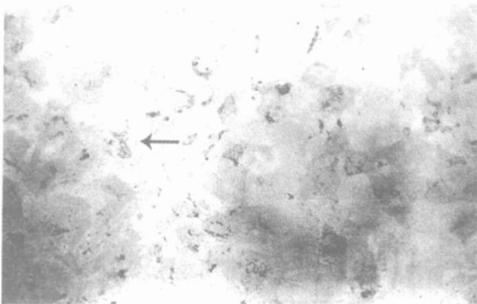


图2 肉鸡 PA EC 的鉴定, VIII因子相关抗原免疫组化染色呈阳性, 阳性细胞胞浆中出现棕黄色颗粒, 阳性率在 90% 以上, 10×40

鸡, 胶原酶消化法所用的胶原酶价格昂贵, 但能够在短时间内获得大量的PA EC。

培养器皿表面的特殊处理是肉鸡PA EC能够在体外贴壁和增殖的关键因素。原代培养的肉鸡PA EC在玻璃器皿内能够贴壁生长, 但明显的表现出生长不良。传代的PA EC在未经特殊处理的玻璃器皿内几乎不贴壁生长。培养血管内皮细胞常用的基质有纤维连接蛋白(Fn), 鼠尾胶原和商品明胶等^[8], 本试验中使用1%明胶作为包被液, 能够使肉鸡PA EC良好的贴壁生长。

消化法培养肉鸡PA EC时, 酶的选择和消化时间至关重要。常用的胰蛋白酶很难将PA EC消化下来, 而且对细胞有一定的毒性作用, 消化下来的细胞也难以贴壁成活。胶原酶则很容易将PA EC消化下来。胶原酶的消化时间应控制在30 min以内, 时间太长容易将结缔组织和中层的平滑肌细胞消化下来, 影响内皮细胞的纯度。

肉鸡PA EC传代培养显示, 原代细胞传至5~6代即开始衰退, 因此利用肉鸡PA EC为材料进行相关的研究时, 应选择5代以内的细胞为宜。

血管内皮细胞来源于间充质, 在体外培养可呈成纤维细胞型, 因此要与来自血管壁的平滑肌及成纤维细胞相区别。首先可从形态学上初步鉴别, PA EC呈短梭形或多角形, 单层生长, 长满的细胞呈典型的铺路石样。成纤维细胞呈长梭形, 而血管平滑肌细胞可重叠生长, 长满的细胞形成“峰-谷”样的典型外观。血管内皮细胞的特异鉴定有2种方法, 一是透射电子显微镜下可见Weibel-Palade小体(W-P小体), 二是内皮细胞含有凝血VIII因子相关抗原^[8]。W-P小体在电镜下不易找到, 而且有的动物血管内

皮细胞没有W-P小体, 因此电镜检查结果并不确实。VIII因子相关抗原只存在于血管内皮细胞, 巨核细胞及血小板中, 因此VIII因子相关抗原的存在是血管内皮细胞最可靠的标志, 已成为鉴定血管内皮细胞的公认标准。本研究通过免疫组织化学鉴定及形态学观察, 证明所培养的细胞为PA EC, 这为进一步深入研究肉鸡肺动脉高压综合征及家禽的其他心血管疾病提供了更为广泛的研究手段。

参考文献:

- [1] 向瑞平, 孙卫东, 王小龙, 等. 日粮中添加V_E和V_C对肺动脉高压综合征患鸡自由基代谢的影响[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(1): 73-78
- [2] 谢 崧, 钱桂生, 杨晓静, 等. 大鼠肺动脉内皮细胞的简易培养鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(3): 475-476
- [3] 于忠和, 李继成, 孙秉庸, 等. 缺氧和牛黄酸对牛肺动脉内皮细胞血管收缩肽的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1997, 20(1): 25-29
- [4] 魏 琴, 李万镇, 黄丽英, 等. L-精氨酸及L-硝基精氨酸对缺氧肺动脉内皮细胞内皮素的影响[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(4): 215-217
- [5] David L S, Robert D G, Leslie A L. Cells A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
- [6] Rainer V H, Martin B, Wolfgang K. Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells[J]. Histochem Cell Biol, 2000, 113: 379-387
- [7] Hui Y Y, McAmis W C, Baynes J W, et al. Effect of advanced glycation end products on oxidative stress in endothelial cells in culture: a warning on the use of cells studied in serum-free media [J]. Diabetologia, 2001, 44: 1310-1317
- [8] 王 琪, 吴中立, 郑 尊, 等. 肺动脉内皮细胞的分离、培养和鉴定[J]. 细胞生物学杂志, 1991, 13(1): 31-34

(上接69页)

- [8] Diomede L, Sozzani S, Luini W, et al. Activation effects of a prion protein fragment [PrP^{Sc} (106-126)] on human leucocytes [J]. Biochem J, 1996, 320: 563-570
- [9] Brown D R, Schmidt B, Groschup M H, et al. Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment [J]. Eur J Cell Biol, 1998, 75: 29-37
- [10] Prusiner S B. Prions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13363-13383
- [11] Brandner S, Isenmann S, Raeber A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity [J]. Nature, 1996, 379: 339-343
- [12] Kimberlin R H, Walker C A. Pathogenesis of scrapie

(strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly [J]. J Comp Pathol, 1986, 67: 255-263

- [13] McKinley M P, Bolton D C, Prusiner S B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion [J]. Cell, 2002, 35(1): 57-62
- [14] Meyer R K, McKinley M P, Bowman K A, et al. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 83: 2310-2314
- [15] Gabizon R, McKinley M, Prusiner S. Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84 (12): 4017-4021