

网络出版时间: 2020-2-19 12:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1528.030.html>

◇技术与方法◇

大鼠原代肺动脉平滑肌细胞的分离鉴定 及低氧对其增殖的影响

张凤玉^{1,2}, 姚德山¹, 李如君¹, 王军¹, 丁昌平¹

摘要 利用改良的组织贴壁法原代分离培养大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs), 探讨低氧对其增殖的影响。显微操作无菌下取SD大鼠肺组织, 分离肺动脉、剥离肺动脉中层, 用组织块贴壁法培养, 倒置相差显微镜观察细胞形态, 细胞免疫荧光法和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)鉴定PASMCs纯度。常氧和低氧下体外培养PASMCs, CCK-8法测定增殖。成功培养大鼠原代PASMCs, 细胞生长及传代稳定, 纯度高达90%以上。PASMCs在低氧下的增殖能力明显低于常氧($P < 0.05$)。可选择内径合适、雄性来源的PASMCs作为体外研究对象。

关键词 大鼠肺动脉平滑肌细胞; α -平滑肌肌动蛋白; 低氧; 增殖; 内径

中图分类号 R 543.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0305-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.030

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是由多病因所致, 主要以肺动脉压力增高为特点的进行性和致命性疾病, 通过血管收缩、肺血管重构, 最终诱发右心衰竭和死亡^[1]。一旦确诊, 生存时间一般仅为2~8年^[2]。目前PAH的判定标准是: 静息状态下平均肺动脉压力 ≥ 3.325 kPa, 运动状态下 ≥ 3.99 kPa^[3]。PAH主要分为动脉型、左心疾病型、呼吸系统疾病及低氧相关型等疾病类型, 其中低氧性或称缺氧性PAH最为常见^[4-6]。肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)作为肺血管壁的重要组成部分, 其异常增殖是肺血管重构的主要原因^[6]。近年来研究^[7]开始以PASMCs作为细胞模型来探讨PAH的分子机制。该研究改进组织块贴壁法原代分离及培养大鼠原代PASMCs, 通过 N_2 诱导低氧培养, 拟研究低氧对于原代分离培养PASMCs的增殖影响。为研究

PAH体外细胞水平研究提供良好的模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2只8~10周龄的清洁级Sprague-Dawley雌性大鼠由扬州大学医学实验动物中心提供, 体质量(160 ± 10)g, 普通饲料喂养, 自由采光, 饮食, 室温控制在20℃左右。

1.2 实验仪器与试剂 YCP系列三气厌氧培养箱购自长沙华曦电子公司; 倒置显微镜、荧光显微镜购自日本OLYMPUS公司; CO_2 孵育箱购自美国Thermo公司。水合氯醛购自生工生物公司; 高糖DMEM粉末和胰酶购自美国GIBCO公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 青-链霉素购自上海碧云天生物公司; 4%多聚甲醛购自北京索莱宝公司; anti- α -SMA抗体购自美国abcam公司, FITC标记的羊抗鼠二抗和DAPI染液购自美国CST公司, CCK-8试剂盒购自日本东仁化学公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠原代PASMCs分离培养 课题组根据实际操作改进如下: 水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射大鼠, 麻醉后大鼠75%乙醇浸泡5 min, 无菌手术台上开胸取出肺组织, 无菌PBS漂洗3次。固定肺叶两端, 手术显微镜下用显微弯镊顺着肺血管走向将肺动脉及三级以下分支分离出来, 剥净血管周围的肺组织、神经及筋膜等, 分离干净的肺血管转移至新100 mm平板中。显微剪纵行剪开肺血管, 内膜面向上, 用显微弯镊轻轻刮拭内层, 去除内皮细胞层。眼科剪剪成约1 mm³的小块, 再接种到含1 ml DMEM培养基(含20%血清、100 U/ml青-链霉素)的平皿中, 轻摇培养液, 使每块组织块间距约为0.8~1.0 cm。静置于37℃、5% CO_2 培养箱中2 h, 等组织贴牢后, 缓慢添加DMEM培养液(20%血清、100 U/ml青-链霉素)完全覆盖住组织块, 继续培养。

1.3.2 大鼠原代PASMCs形态及生长特点的观察 细胞从组织块周围爬出后, 换液间歇在倒置相差

2019-11-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81600202)

作者单位: ¹扬州大学附属医院中心实验室 扬州 225001

²复旦大学附属华山医院检验科 上海 200040

作者简介: 张凤玉, 女, 博士, 责任作者, E-mail: Zhangfengyu2019@163.com

显微镜下仔细观察 PSMCs 形态及生长特点 拍照。

1.3.3 细胞免疫荧光鉴定 PSMCs 消化后,以约 5×10^5 个/ml 的密度接种到放有盖玻片的 6 孔板中,待 PSMCs 贴壁且密度达到 30% ~ 50% 时,取出 6 孔板,弃去培养基, PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.3% Triton-X 100 室温破膜 10 min, 5% BSA(0.1% Triton-X 100 配制) 室温封闭 30 min, 200 μ l 一抗 α -SMA(1:400, 3% BSA, 0.1% Triton-X 100 配制) 滴加于盖玻片上, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。第 2 天室温平衡 1 h, PBST 清洗 5 min \times 3 次, FITC 标记的二抗室温避光孵育 1 h, PBST 清洗 5 min \times 3 次。DAPI 避光染色 10 min, PBST 清洗 5 min \times 3 次。荧光显微镜下拍照。

1.3.4 低氧培养 PSMCs PSMCs 消化后分为低氧组和常氧组培养。低氧组持续低流量通入纯 N_2 , 通过数字监控器实时控制 O_2 浓度为 1.0%, 而常氧组为正常 O_2 浓度培养。

1.3.5 CCK-8 检测 PSMCs 增殖 96 孔板中接种 PSMCs 约 10^3 个/孔, 分为常氧组和低氧组, 每组设 6 个复孔。分别在常氧和低氧下培养 0、2、4、6、8、24、48、72 h 后, 取出培养板, 每孔加入 100 μ l 含有 10 μ l CCK-8 溶液的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 2 h, 检测 425 nm 处的吸光度值 (optical density, OD)。

1.4 统计学处理 采用 Graphpad prism6.0 软件作图, 并对处理的数据进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组均数间比较采用 *t* 检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PSMCs 形态及生长特点 倒置相差显微镜下观察大鼠原代 PSMCs 在第 5 d 时从组织块周围爬出, 第 7 天时细胞呈放射状排列, 大小不等, 形态多样, 主要有梭形、多角形、纤维形等(图 1A)。细胞传代第 5 天, 部分融合交织成网状, 多数呈长梭形, 有分支状突起, 细胞部分区域多层重叠生长, 高低起伏, 成“峰-谷”样(图 1B)。反复传代 3 ~ 5 代均可保持良好的形态结构和功能。

2.2 PSMCs 的 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 免疫荧光鉴定 荧光显微镜检测 Dapi 标记的所有细胞核呈椭圆形发蓝色荧光(图 2B)。检测 FITC 标记的平滑肌中 α -SMA, 仅平滑肌细胞呈阳性反应, 发绿色荧光, 在平滑肌细胞胞质中平行于细胞长轴呈细丝状表达(图 2A)。细胞

平均纯度达 95%。

2.3 常氧与低氧组 PSMCs 形态差异 PSMCs 分别于常氧和低氧下培养, 培养 2 d 后如图 3 所示, 常氧下 PSMCs 正常稳定生长, 细胞形态呈梭形或多角形, 细胞比较圆润(图 3A)。低氧下 PSMCs 数量变少, 细胞变细变长, 细胞间隙增宽(图 3B)。

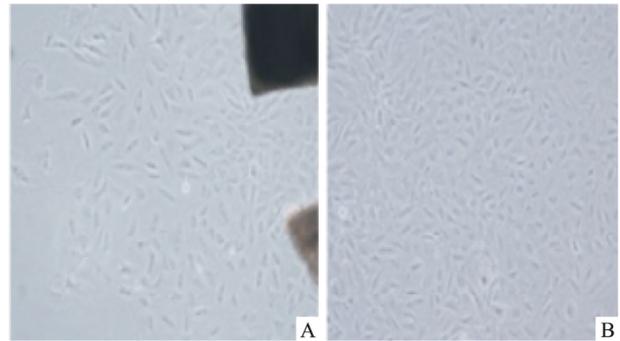


图 1 PSMCs 在倒置显微镜下的形态学特征 $\times 100$
A: 肺动脉组织爬块第 7 天 PSMCs 形态; B: 传代第 5 天 PSMCs 形态

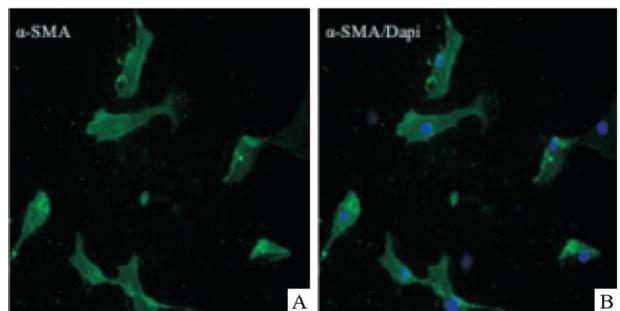


图 2 PSMCs 的免疫荧光结果 IF $\times 200$
A: α -SMA 细胞免疫荧光染色阳性; B: α -SMA 与 Dapi 染色后合并图

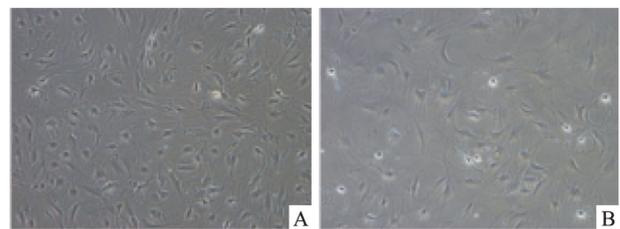


图 3 PSMCs 在常氧和低氧条件下细胞形态特征 $\times 100$
A: 常氧组 PSMCs 生长状态; B: 低氧组 PSMCs 生长状态

2.4 常氧与低氧组 PSMCs 增殖能力差异 CCK-8 法检测 PSMCs 生长曲线。如图 4 所示: 不论是否缺氧 PSMCs 的 OD 值都会随着时间增加而逐渐增高。但常氧组整体 OD 值 (1.3540 ± 0.2218 , $n = 8$) 显著高于低氧组 (0.8143 ± 0.08652 , $n = 8$), 常氧组 PSMCs 生长较低氧组快, 增殖速度也明显

强于低氧组($t = 2.268, P < 0.05$)。

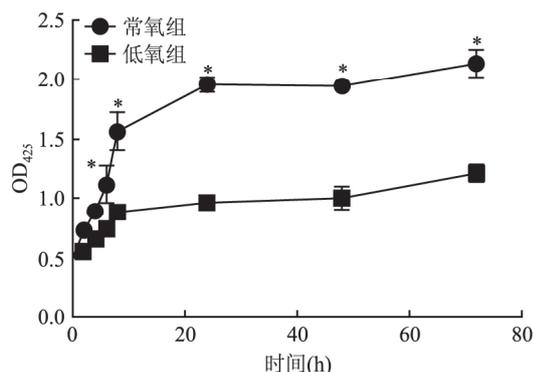


图4 PASMCs在常氧与低氧条件下生长曲线图
与低氧组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

体外原代分离培养细胞可以排除众多因素干扰,也可以模拟在体实验结果,故而大量疾病模型的体外试验开始应用体外原代分离组织细胞。本课题组为研究PAH的致病机制,改进组织贴壁法,成功分离并原代培养出PASMCs,利用 α -SMA鉴定第3代PASMCs的纯度高达90%以上。

PAH形成主要归因于PASMCs的异常增殖等。目前所有在体实验均证实,低氧可促进PASMCs异常增殖,诱发PAH。但体外细胞培养结果却不一致^[1]。研究^[8-9]显示低氧会抑制新生小牛PASMCs增殖;有研究者认为低氧不直接诱导体外培养的PASMCs增殖,只有预先用佛波酯激活细胞的蛋白激酶C,低氧培养的PASMCs数目才会明显增加^[9-11];徐敦全等^[12]也认为雌激素会显著降低低氧下PASMCs的增殖。本实验显示低氧培养不同时间点,PASMCs的增殖情况有较大差异,相对于常氧培养,短期低氧并不会改变PASMCs的生长状况,而长时间低氧培养对PASMCs的增殖并没有促进作用。众所周知,应对同样的低氧环境,肺动脉对低氧的收缩反应会因血管内径大小的不同而有差异,有研究者发现低氧下内径200~600 μm 的猫肺动脉收缩反应最明显,而内径>800 μm 的猫肺动脉平滑肌细胞肌球蛋白轻链对低氧的刺激不发生磷酸化,基本无收缩反应^[10-11]。于天正等^[8]发现内径为300~400 μm 的PASMCs在低氧下增殖反应最明显,500~800 μm 的PASMCs次之,而内径>1000 μm 的PASMCs基本无增殖,提示低氧对PASMCs的促增殖作用会因内径的不同而不同。

本文分离的原代PASMCs来源于雌性大鼠肺血

管,研究^[12-14]显示,雌性大鼠的肺血管对低氧表现出较轻的收缩反应,细胞水平试验亦证实,取自雌激素水平较高的动物的原代PASMCs低氧增殖反应较低,则是因为离体的肺动脉血管与原代细胞仍表达或分泌一定水平的雌激素^[12];膜性受体介导内源性雌激素降低低氧性肺动脉血管的收缩作用。雌激素抑制低氧反应增殖的可能机制为:①内源性雌激素在大鼠PAH发生过程中发挥拮抗性作用,通过非基因组作用途径(GPR30受体途径)降低肺动脉压力和基因组途径抑制肺血管重构和PASMCs的增殖,发挥其拮抗PAH的作用^[12];②雌激素刺激血管生成NO,通过PI3K信号途径激活cAMP,从而抑制平滑肌细胞的增殖迁移^[13];③雌激素通过调节miR-NA-21来调控雌激素受体对肺血管的保护作用^[14]。故而雌激素可抑制低氧诱导的肺血管增殖。

参考文献

- [1] Prins K W, Duval S, Markowitz J, et al. Chronic use of PAH-specific therapy in world health organization group III pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis [J]. *Pulm Circ*, 2017, 7(1): 145-55.
- [2] Jiang D M, Han J, Zhu J H, et al. Paracrine effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells: cyclooxygenase-2/prostaglandin pathway in pulmonary arterial hypertension [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79215.
- [3] Hoeper M M, Bogaard H J, Condliffe R, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(25 Suppl): D42-50.
- [4] Sommer N, Richter M J, Tello K, et al. Update pulmonary arterial hypertension: Definitions, diagnosis, therapy [J]. *Internist (Berl)*, 2017, 58(9): 937-57.
- [5] Simonneau G, Montani D, Celermajer D S, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(1): 1801913.
- [6] Crosswhite P, Sun Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling [J]. *Mol Med*, 2014, 20: 191-201.
- [7] 王静, 戴爱国. 原代大鼠肺动脉平滑肌细胞的提取和鉴定以及缺氧对其增殖的影响 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2012, 11(2): 147-52.
- [8] 于天正, 马传桃. 低氧对培养的不同内径的肺动脉平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2001, 17(1): 58-60.
- [9] Ahmed M, Miller E. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the development and progression of pulmonary arterial hypertension [J]. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2018, 2018(2): 14.
- [10] Dempsey E C, Stenmark K R, McMurtry I F, et al. Insulin-like growth factor I and protein kinase C activation stimulate pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through separate but syner-

(下转第311页)

infection resistance, and to provide suggestions for clinical prevention and treatment. Case control and retrospective analysis were used to study the reported cases of *Acinetobacter baumannii* (Ab) infection. Patients were divided into MDR-Ab and non-MDR-Ab groups based on drug resistance. Univariate and Logistic regression analysis were used to analyze the risk factors of intracranial drug resistance in MDR-Ab with multiple drug resistance. Univariate analysis showed that hospitalization time, ICU stay, pulmonary infection, cerebrospinal fluid (CSF) leakage, CSF drainage obstruction, antibiotics use before infection Ab and hormone use after surgery were all related risk factors of MDR-Ab intracranial infection resistance ($P < 0.05$). Logistic multivariate analysis showed that hospitalization time, ICU stay, inpatency of CSF drainage and antibiotics use before infection with Ab were all independent risk factors for MDR-Ab intracranial infection resistance ($P < 0.05$). For patients with long hospital stay, ICU stay, unobstructed CSF drainage and antibiotics use before Ab infection, drug resistance was easy to occur. Therefore, in the process of clinical treatment, the hospital stay should be shortened as far as possible and the patients should be moved out of ICU in time. The drainage channel should be maintained unobstructed and antibiotics should be reasonably applied.

Key words *Acinetobacter baumannii*; intracranial infection; drug resistance; influencing factors

(上接第 307 页)

- gistic pathways[J]. *J Cell Physiol*, 1990, 144(1): 159–65.
- [11] Madden J A, Vadula M S, Kurup V P. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol*, 1992, 263(3 Pt 1): L384–93.
- [12] 徐敦全. 雌激素减轻大鼠低氧性肺动脉高压的作用及机制研究[D]. 西安: 第四军医大学 2014.
- [13] 刘莉, 叶鹏. 性别差异对野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2013, 21(7): 637.
- [14] 沈丽晓, 袁博云, 王丽, 等. 17 β -雌二醇/微小核糖核酸-21 信号通路抑制低氧性肺动脉高压肺血管重构的机制研究[J]. *中国循环杂志*, 2018, 33(11): 1118–23.

Isolation and identification of primary rat PSMCs and effects of hypoxia on their proliferation

Zhang Fengyu^{1,2}, Yao Deshan¹, Li Rujun¹, et al

(¹Dept of Central Lab, Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225001;

²Dept of Laboratory Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040)

Abstract The modified tissue adherent method was used to extract and culture rat pulmonary arterial smooth muscle cells (PSMCs), and the effects of hypoxia on the proliferation of PSMCs were explored. The lungs of SD rats were separated from chest under aseptic condition. Pulmonary artery was isolated and pulmonary artery tissue was planted with the adherent method of tissue explants. The cellular morphology was observed by inverted phase contrast microscope. The purity of the cells was identified by immunofluorescence assay using α -smooth muscle actin (α -SMA). The primary in vitro cultured PSMCs were exposed to normoxic and hypoxia condition respectively, then CCK-8 assay was used to detect the proliferation of PSMCs. The primary rat PSMCs were isolated and cultured successfully, the cell growth and passage were stable. Immunofluorescence assay showed that the positive rate of α -SMA was beyond 90%. The cells grew stably, culture and purification could perform in the same time. Immunology results showed that the positive rate of α -SMA was beyond 90%. CCK-8 assay demonstrated that the proliferation of PSMCs expose to hypoxia was lower than that of normoxia. The primary culture model of rat PSMCs was built successfully *in vitro*. PSMCs with appropriate inner diameter and separated from the male rats will be selected as the study object *in vitro*.

Key words rat pulmonary arterial smooth cells; α -smooth muscle actin; hypoxia; proliferation; inner diameter