

改良的两步复合酶消化法制备大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞

周玥华^{1,2}, 刘 星^{1,2}, 张艳军^{1,2}, 汪 辛^{1,2}, 陈渝萍^{1,2*}

(1. 西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031; 2. 西南交通大学材料科学与工程学院, 成都 610031)

【摘要】 目的 本文报道一种基于复合酶消化法进行改良的大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞的分离方法。**方法** 采用胶原酶、胰肽酶复合酶对胸主动脉进行初步消化去除内外膜、再对中膜进行二次消化释放血管平滑肌细胞。**结果** 细胞分离后贴壁生长, 多具梭形形态, 呈现典型的“峰-谷”生长状态, 1 周可进行传代; 多种收缩型血管平滑肌细胞的分子标记基因均在所分离培养的细胞中高表达; 超过 95% 的细胞为 α smooth muscle actin (α -SMA) 和 myosin-II 显著阳性。**结论** 本分离方法简捷易行、重复性好, 所得细胞活性佳、纯度高, 可确保短时间内获得大量收缩型血管平滑肌细胞。

【关键词】 血管平滑肌细胞; 复合酶; 两步消化法

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0017-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 07. 004

Preparation of rat thoracic aortic vascular smooth muscle cells by modified enzyme double digestion

ZHOU Yue-hua^{1,2}, LIU Xing^{1,2}, ZHANG Yan-jun^{1,2}, WANG Xin^{1,2}, CHEN Yu-ping^{1,2*}

(1. Key Lab for Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

2. School of Materials Science And Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031)

【Abstract】 Objective This paper reports a modified method for the isolation of rat thoracic aortic vascular smooth muscle cells based on combined enzyme double digestion. **Methods** An enzyme mixture containing collagenase II, soybean trypsin inhibitor and elastase was prepared and used to remove the aortic tunica intima and tunica adventitia, and then the tunica media was subjected to second digestion using the same enzyme mixture and to isolate vascular smooth muscle cells. **Results** The isolated VSMCs were cultured in vitro and the growing cells had an elongated spindle-shape, reached confluence within a week, and displaying a typical "hill-and-valley" pattern. After 1 week, the cells were passaged. Contractile smooth muscle markers (α -SMA, myosin-II and β -tubulin) were highly expressed in the isolated cells. More than 90% of the cells significantly expressed α smooth muscle actin and myosin-II. **Conclusions** The method established in this study has advantages of simple and easy to operate, and good reproducibility, with a high activity and purity of the separated cells. It can ensure to obtain a large amount of contraction-type vascular smooth muscle cells within a short time.

【Key words】 Vascular smooth muscle cells; Complex enzyme; Two step digestion

[基金项目] 国家自然科学基金(编号:81371675, 81330031)。

[作者简介] 周玥华(1990-), 女, 硕士研究生, 专业: 材料工程。Email: 734173594@qq.com

[通讯作者] 陈渝萍(1970-), 女, 教授。Email: yupingc@home.swjtu.edu.cn

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 参与了高血压、动脉粥样硬化和血管再狭窄等疾病的发生发展^[1-4], 关于 VSMC 的研究是心血管疾病细胞分子病理学的重要内容, 而其开展的前提是获得结构功能良好的 VSMC。

目前 VSMC 体外分离培养方法大致分为组织块贴壁法、酶消化法两大类。前者使用器械剥离内外膜、并将血管剪成小块进行贴壁培养, 最后 VSMC 从组织块爬出^[5-9]。该方法费用低廉, 是目前国内较为通用的 VSMC 分离方法。但是其缺点显而易见: 1) 组织块极易漂浮而造成分离失败^[2,10]。2) 内外膜容易有残留、中膜层容易被刮伤。因此, 使用该方法分离出的 VSMC 活力欠佳, 需要 2 ~ 4 周 (甚至 7 周) 才可传代; 且细胞纯度低, 传代培养 5 代左右才能达到 98% 纯度^[2,11,12]。更有研究显示, 使用该方法所分离的 VSMC 的收缩表型特征明显减弱^[13], 不能满足多种收缩型 VSMC 的研究工作^[3,14]。

自 1978 年 Ives 等^[15]人采用蛋白酶直接消化血管组织来制备 VSMC 以来, 先后有人尝试了胶原酶、胰酶和胰肽酶等蛋白酶^[16-21]。传统的酶消化法用酶单一, 消化时间可从几个小时长至几天。组织的消化不均匀, 细胞产量少。除此之外, 胰酶对 VSMC 有损伤。后期进一步发展出多种蛋白酶联合消化的方法来改善细胞产量和活性以提高分离的成功率和稳定性^[22-24]。但是, 迄今报道的各种复合酶消化方法中, 所使用的酶的种类及数量较多, 操作步骤繁琐冗长, 污染率较高。而且, 因酶制品的差异, 消化时间不能得到统一。这些问题的存在使得该方法难以为初学者掌握、分离效果不一, 尚未为国内研究者大量采用^[16]。因此, 尚待建立一种成功率高、且更简便易行的 VSMC 分离制备方法, 以满足现今 VSMC 研究工作进行的需要。

为此, 我们考察了国内外各种 VSMC 分离方法^[16,17,25,26], 对实验细节反复摸索和优化, 建立了一种改良的复合酶消化法, 并成功地应用该方法进行了大鼠 VSMC 的分离制备。和报道的其它 VSMC 分离制备方法相比, 该方法操作简捷易行, 操作时间短。分离的重复性极好、成功率很高, 可确保所获得的 VSMC 的数量、活性、纯度及其收缩型表型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂

含钙镁 HBSS、不含钙镁的 PBS、DMEM-F12 高糖培养基均来自 Hyclone; 0.25% 的胰酶细胞消化液、双抗和胎牛血清来自 Gibco; 二型胶原酶 (collagenase II)、胰蛋白酶抑制剂 (soybean trypsin inhibitor) 和胰肽酶 E (elastase) 来自 Worthington Biochem; DMSO 和细胞计数试剂盒 CCK8 分别购自 Sigma 和北京庄盟; RNA 分析试剂包括 Trizol 试剂、逆转录试剂盒和 DNase I (Thermofisher, 美国) 和定量 PCR 试剂 (Bio-Rad, 美国); 基因引物于上海生工合成, 各基因的特异序列见表 1; 免疫分析试剂包括 DAPI 和 RIPA (Sigma, 美国)、正常兔 IgG (Santa Cruz, 美国)、 α -SMA、myosin-II 和 β -tubulin 的兔抗 (Abcam, 美国) 及 Alexa Fluor 594 羊抗兔二抗购自 (Invitrogen, 美国)。

表 1 引物序列
Tab.1 Sequences of the primers

基因 Genes	基因符号 Gene symbol	引物的序列 (5' - 3') Sequence of primer (5' - 3')
Myocardin	Myocd	GGGCCAGCATTTTCAACAT TCCCCATTTTTCTCCCTTTAT
Myosin-II	Myh11	CGGAAAGCAAGCCTGCATT CCAGGACTCCCGTACGAAAG
Smoothelin	Smtn	AAGGCCATGATTGAGAACTA GCACCAGGGCACAGAAAG
Transgelin (SM22 α)	Tagln	CGGCAGATCATCAGTTAGAAAG GGGCTGAGGCTGAGGATAGGT
α -SMA	Acta2	GTGGGGGACGAAGCGCAGAG GGCCTTAGGGTTCAGCGCG
Ribosomal protein S9	Rps9	GACTCCGGAACAAACGTGAGGT CTTCATCTTGCCCTCGTCCA

1.1.2 实验仪器

超净工作台 (苏州净化设备集团); 气浴恒温振荡器 (金坛市鸿科仪器厂); 细胞培养箱 (Thermo Forma, 美国); 倒置显微镜 (Leica DMIL, 美国); 荧光显微照相设备 (Leica, 美国); Image Lab (Bio-Rad, 美国); Real-time quantitative PCR detecting system (CFX96, Bio-Rad, 美国); Power Pac Universal (Bio-Rad, 新加坡)。

1.1.3 实验动物

健康的 SPF 级别 SD 雄性大鼠, 体重 90 ~ 100 g, 购自四川省人民医院实验动物研究所【SCXK (川)2013 - 15】。

1.2 方法

1.2.1 复合酶液的配制

实验开始前以 HBSS 新鲜配制复合酶消化液 (二型胶原酶, 1 mg/mL; 胰蛋白酶抑制剂, 1 mg/mL; 胰肽酶, 7.08 μ L/mL)。配制好的酶液置于

37℃、摇速 60 r/min 的气浴恒温振荡器里预热(备注:一条大鼠的胸主动脉约用 2 mL 的复合酶液)。

1.2.2 原代 VSMC 的分离

取乙醚麻醉大鼠,转至无菌动物手术台,用 75% 的酒精喷湿大鼠的胸腹部,剖开胸膛腔充分暴露胸主动脉血管。小心剔除粘附在血管上的组织和粘膜,迅速剪取胸主动脉置于高压灭菌、预冷的生理盐水中并转移到细胞培养室的超净工作台;反复冲洗血管表面的血污,用 2 mL 的注射器吸取生理盐水进一步冲洗管腔内的凝血块等(3 次左右)。在保证不伤害血管的前提下,小心剔净其表面黏附的纤维组织,立即放入含 1 mL 复合酶液的 4 mL 离心管中,在 37℃ 的气浴恒温振荡器里消化 45 min,摇速 60 r/min。随后将血管置于预冷的、带双抗的 DMEM 中,用弯头和直头眼科小镊子轻柔剥离血管外膜;漂洗后再用弯头的小剪刀纵向剪开血管,以弯头小镊轻轻刮除内膜,最后以 HBSS 漂洗剥离的中膜层。

将中膜层置于干净的培养皿,以弯头眼科剪快速剪成 1 ~ 2 mm³ 小块,转入放有 1 mL 复合酶液的 6 孔板,转移到孵箱中,37℃,5% CO₂,消化 1 h;每消化 20 min 后取出孔板轻轻晃动;消化 50 min 后开始观察细胞从组织碎块游离的情形。待多数组织块中的细胞开始脱落时加入预热过的含 20% FBS 的 DMEM-F12 培养基终止消化。随后用 10 mL 注射器抽打组织消化液以帮助细胞进一步从组织残片中脱离(大致 10 ~ 20 次),再用 40 μm 的细胞筛过滤悬液到 6 孔板的另一个孔内,获得 VSMC 细胞悬液。取滤网上的组织、重复抽打和过滤 1 次,将 2 次过滤后的细胞悬液一起转移到 15 mL 的离心管里,1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。最后取含 20% FBS 和抗生素的 DMEM-F12 重新悬浮细胞,种入 6 孔板进行培养(P0 代),静置 48 h 后开始观察。

1.2.3 原代 VSMC 的传代培养和冻存

一周后 P0 代细胞基本长满孔板(90%),以 0.25% 胰蛋白酶液消化 VSMC,重悬于含 20% FBS 的 DMEM,并于直径 10 cm 培养皿中进行传代培养(P1 代)。细胞再次长满后进行同样的消化传代(P2 代),从 P2 代开始进行 VSMC 冻存。P5 代以后的 VSMC 以含 10% FBS 的 DMEM/F12(1:1) 进行培养。

1.2.4 VSMC 的细胞形态学观察

VSMC 分离培养 2 d 后开始以倒置相差显微镜

观察培养状态下细胞的形态和生长情形。

1.2.5 VSMC 的生长活力测定

将 P2 代细胞以每孔约 1000 个细胞/100 μL 培养基接种于 96 孔板,置细胞培养箱内培养。以 CCK-8 试剂盒定期分析孔内细胞数量,检测细胞生长情形。每次测定 6 孔,连续测 3 d。

1.2.6 VSMC 的 ICC(细胞免疫荧光)

分析将 P2 代细胞接种于内置细胞爬片的 24 孔板中培养 1 d。取出爬片,以 4% PFA 于室温固定 20 min,后以甲醇于 -20℃ 透膜 10 min,然后用封闭液(1% BSA,4% 羊血清,0.1% Tween20,0.1 mol/L 甘氨酸)在室温下封闭 45 min。分别与 α-SMA 一抗(1:500)、Myosin-II 一抗(1:100)和相应等量的正常兔 IgG 在 4℃ 孵育过夜,然后再和 Alexa Fluor 594 偶联的羊抗兔二抗(1:1000)于室温避光孵育 1 h。每一步孵育前样品均以 PBS 漂洗三遍。最后以 DAPI 染核,并于荧光显微镜下进行观察。

1.2.7 VSMC 的收缩型表型基因的表达分析

取 Trizol 试剂分别裂解 P2 代 VSMC 和大鼠肝星状细胞株 T6 细胞,提取总 RNA;RNA 定量后以逆转录试剂盒制备 cDNA、随后进行定量 PCR 反应以分析细胞中各表型基因的 RNA 表达水平;并以 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段。以 RIPA 液裂解 P2、P3、P4 代细胞、T6 细胞和 Hela 细胞,分别制备细胞总蛋白;定量蛋白浓度后进行 Western Blot 分析,定量检测 α-SMA、myosin-II 和 β-tubulin 蛋白在细胞中的表达水平。

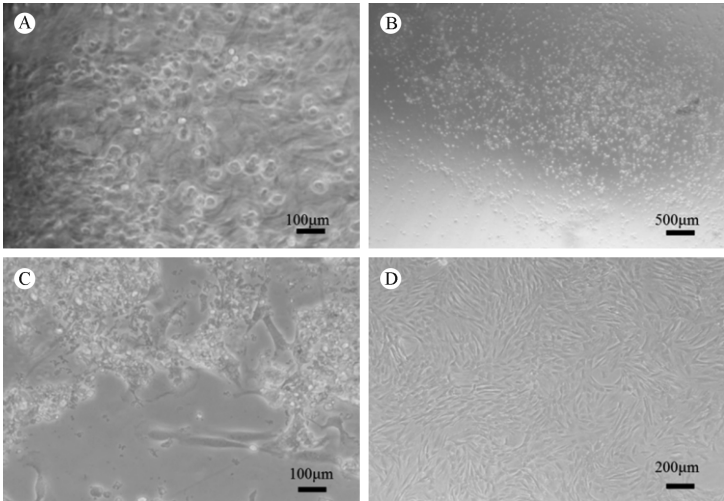
2 结果

2.1 VSMC 的分离制备

为获得高产量、高活性的 VSMC,我们采用复合酶二步消化的方法进行 VSMC 的分离制备。胸主动脉在以复合酶液初步消化 45 min 后,外、内膜可被轻松剥离和刮除,顺利获得完整的中膜。对剪碎的中膜组织块进一步进行二次消化,可解除内外弹性膜对 VSMC 的束缚。图 1A 显示了中膜组织碎块在两步酶消化结束时在显微镜下观察的情形。可见组织碎块中多个细胞正在逃逸胶原等蛋白纤维的束缚,呈葡萄串状贴附于组织块。将分离后的 P0 代细胞接种于 6 孔板,起初细胞呈球状(图 1B);12 h 后贴壁的细胞开始拉长,并呈明暗交替分布;培养 2 d 后细胞逐渐铺展开,初显 VSMC 形态,呈梭形、长条形和三角形生长(图 1C)。接种 7 ~ 8 d 后 P0

代细胞接近长满,密集生长处细胞重叠生长,可观察到明显的峰-谷生长态势(图 1D)。随后以胰酶消

化细胞、传代于 10 cm 培养皿中,约 1 周后 P1 代细胞再次长满,数量可达约 100 万。



注:(A)酶消化结束时被蛋白纤维缠绕的 VSMCs;(B)分离接种于 6 孔板的 P0 代 VSMCs;
(C)培养两天的 VSMCs;(D)体外培养 1 周后的 VSMCs。

图 1 VSMC 的分离和培养

Note. (A) VSMCs tangled with protein fibers at the end of digestion; (B) Isolated P0 VSMCs in 6-well plate;
(C) VSMCs after cultured for two days; (D) VSMCs were cultured for a week *in vitro*.

Fig. 1 Isolation and culture of VSMCs

2.2 VSMC 的生长活力

为了检测所分离的 VSMC 的生长能力,我们取 P2 代 VSMC 接种于 96 孔板,持续培养 4 d。培养期间定时取细胞以 CCK8 试剂盒处理、检测孔内生长的活细胞数。如图 2 所示,在培养的 96 h 内,细胞数量逐渐增多。细胞在经过接种初期的适应后,其增长开始显著加快,生长旺盛,显示出极佳的增殖活力。表明我们所分离的细胞具有良好的活力。

测了 α -SMA 这一最常用的 SMC 分子标记蛋白。其次,考虑到近期研究发现一系列传统的 SMC 分子标记(包括 α -SMA, SM22, h1-calponin 和 smoothelin 等)在其它类型细胞中也有较高表达,我们还选择了检测 myosin-II 这一目前公认的更特异的 SMC 分子标记^[3]。如图 3 显示, α -SMA 和 myosin-II 蛋白抗体均在所分离的 P2 代 VSMC 细胞中产生了清晰的红色荧光信号,表明细胞表达收缩型 VSMC 的特征性蛋白。荧光显微镜下可见 α -SMA 肌动蛋白丝状纤维与细胞长轴平行、向两头成放射分散,胞质均匀、细胞核轮廓清晰可见;尤其是 myosin-II 免疫荧光信号在细胞中也非常显著,意味着该蛋白在细胞内水平很高(图 3)。对两个平行培养孔内各 4 处视野里的细胞进行计数和统计,发现 ICC 检测 α -SMA 和 myosin-II 蛋白阳性细胞的比率可达 95%,表明在传至 P2 代时所分离的细胞中收缩型 VSMC 的纯度已经达到 95%。这些结果说明使用本方法主要获得的是高纯度的收缩型 VSMC。

2.4 VSMC 的 mRNA 和蛋白的表达分析

我们对分离培养的 VSMC 表型基因的表达情形还进行了 RNA 和蛋白的定量分析。首先以实时定量 PCR 分析了所分离的细胞中各类收缩型 VSMC 典型性状基因的表达情形。如图 4A 所示,两次单

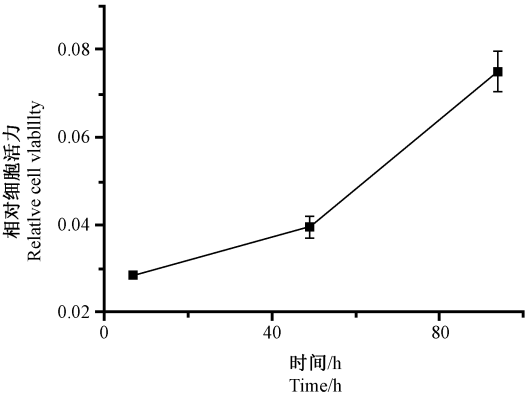
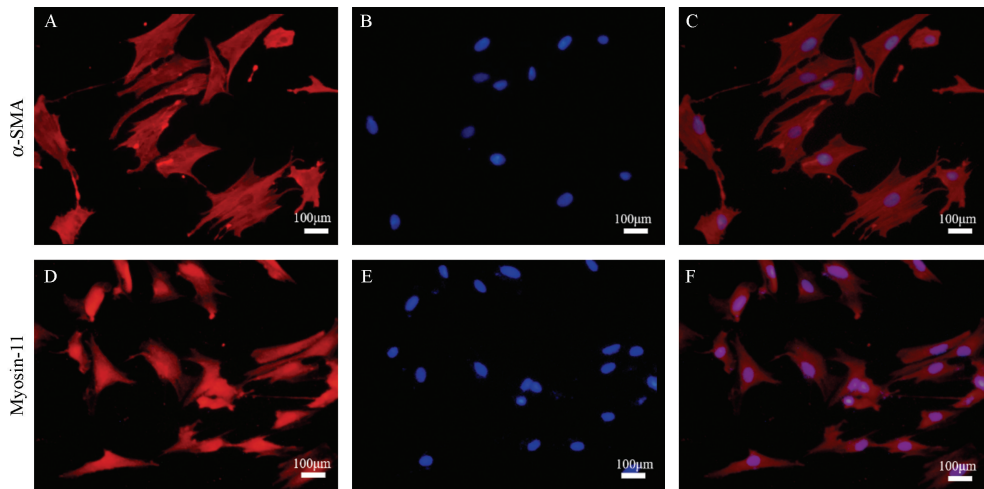


图 2 第二代 VSMCs 的增殖分析

Fig. 2 Proliferation analysis of the P2VSMCs

2.3 VSMC 的 ICC 分析(细胞免疫荧光)

取培养的 P2 代 VSMC 细胞作免疫荧光分析,进一步对所分离的 VSMC 细胞进行鉴定。我们首先检



注: (A) 蛋白 α-SMA; (B) 对应 (A) 的细胞核 DAPI 染色; (C) 合并 A & B; (D) 蛋白 myosin-II; (E) 对应 (D) 的细胞核 DAPI 染色; (F) 合并 D & E。

图 3 细胞免疫荧光

Note. (A) α-SMA; (B) DAPI-stained cell nuclei of (A); (C) Merge of A & B; (D) Myosin-II; (E) DAPI-stained cell nuclei of (D); (F) Merge of D & E.

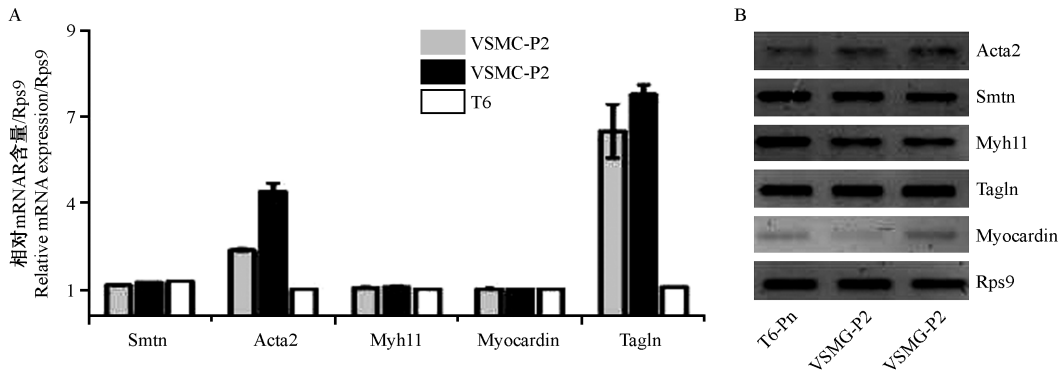
Fig. 3 Immunofluorescence assay of the P2 VSMCs

独分离的 P2 代 VSMC 细胞均高水平表达一系列 VSMC 收缩型表型标记物基因, 如 *Acta2*、*Myh11*、*Tagln* 等; 且控制这些表型基因表达的主要转录调控因子 *Myocardin* 的基因也在细胞中表达^[27]。较 T6 这种肌纤维化样的肝星状细胞, 分离的 VSMC 中 *Acta2* 和 *Tagln* 的表达水平明显增高, 表明这些细胞维持更强的收缩型 VSMC 基因表达。以 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 发现它们均为单一条带 (图 4B), 说明基因扩增的特异性。

随后取 P2 ~ P4 代 VSMC、T6 和 HeLa 细胞总蛋白进行 Western blot, 定量分析细胞中 α-SMA 和

myosin-II 的蛋白表达情形。如图 5 所示, 两种蛋白在所有被检细胞中都有一定表达, 但在分离的 VSMC 中的表达水平显著高于 T6 和 HeLa 细胞, 说明所分离的 VSMC 在传至 P4 代时仍然维持极好的收缩型 VSMC 表型性状。

最后, 鉴于分离的原代 VSMC 在培养过程中逐渐从收缩型表型向合成型表型转变, 我们比较了培养至 P4 代和 P8 代时, 所分离的 VSMC 中表型基因表达情形的差异。从图 6 可以清楚地看见, 较 P4 代 VSMC, P8 代细胞中 *Myh11* 的 RNA 水平急剧下降, α-SMA 的 RNA 表达也下调但幅度小。图 6 还显示



注: (A) P2 代 VSMCs 各基因 RNA 水平的定量 PCR 分析; (B) PCR 产物的 2% 琼脂糖凝胶电泳结果。

图 4 VSMCs 的 mRNA 表达分析

Note. (A) Quantitative PCR analysis of RNA levels of genes in the P2 VSMCs; (B) Results of 2% agarose gel electrophoresis of the PCR products.

Fig. 4 mRNA expression analysis of the VSMCs

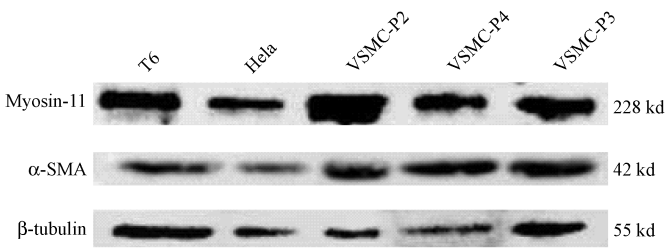


图 5 VSMCs 的蛋白表达分析

Fig. 5 Protein expression analysis of the VSMCs

了 myocardin 和 Kruppel-like factor 4 这对调控 SMC 收缩表型基因表达的正负转录调控因子的表达情形。它们的 RNA 表达水平在 P4 代和 P8 代分别逆转,前者水平由高变低,后者水平从低到高,共同调控着细胞从收缩型表型向合成型表型的转变。

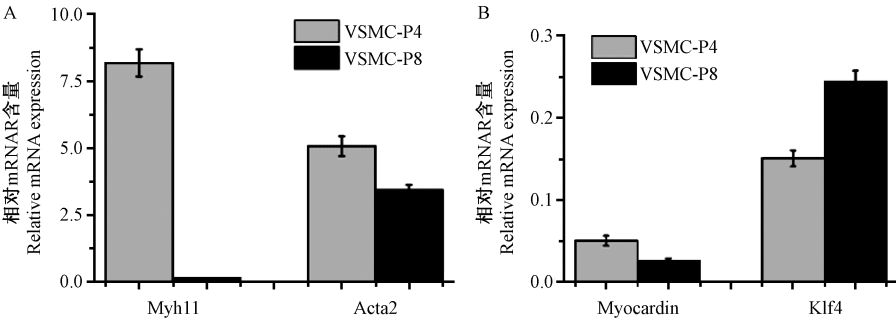
3 讨论

在实验中我们对传统的复合酶消化方法进行反复摸索改良,精确调制了复合酶的配制和消化时间以提高消化效果,获得了很好的分离效果;同时还对每一步操作细节加以细化,使其可为初学者轻松掌握。主要的改进点为:(1)选择 90 ~ 100 g 的大鼠作为胸主动脉取材对象,既保证了 VSMC 的增殖分化潜能,又满足了操作要求;(2)选取胶原蛋白酶和胰酶配制复合酶,保证中膜层中 VSMC 的释放;(3)在酶消化液中添加了胰酶抑制剂,改善所分离细胞的活力;(4)利用空气摇床震荡进行初步消化,促使血管内外膜充分接触混合酶液、消化时间减少为 45 min,利于内外膜的剥离,减少内外膜与中膜层的牵拉,提高了细胞活性和细胞纯度;(5)将剥离的中膜层剪成组织碎块,转入 6 孔板在细胞培养箱内进行再消化,每间隔 20 min 略加晃动,充分

保证酶的消化效果,消化时间也被缩短为 1 h;(6)接种 P0 细胞到 6 孔板、长满后传至 10 cm 培养皿进行 P1 代 VSMC 培养。这样的接种密度可以使得 VSMC 维持较好的增殖速率。经过这些改进,可在 2 周左右获得百万量的 P1 代收缩型 VSMC、P2 代时纯度高达 95% 以上。

我们在摸索过程发现,确保所分离的 VSMC 活力的关键是维持中膜层的完整。在剥离外膜时,动作要轻柔;在刮除内膜时,用力要均匀,一般两次刮除就足够了。过多刮除会损坏中膜层,降低细胞产量和活力。使用我们建立的复合酶配方及其作用条件进行初步酶消化,可适当降解内外膜组织间的蛋白成分、使得内外膜的去除轻松易行,对中膜层的损伤大为降低。二步消化的设计不仅可以较好地消除内外膜中其它细胞成分的污染、提高分离的 VSMC 细胞纯度,还可以大大缩短制备 VSMC 的时间^[5,19]。

有研究者发现,以组织块贴壁法制备 VSMC 虽然所获得的细胞数量较多,但多为合成型表型;而采用酶消化法制备的 VSMC 则保留了收缩型表型^[3,13,14]。为了确定使用我们的改良方法所分离的细胞的表型,我们考察了 P2-P4 代细胞中多个收缩型表型分子标记基因及收缩表型调控转录因子的 RNA 和蛋白表达情形,证实细胞均高水平地表达这些标记基因。进一步分析传至 P8 代的细胞,我们确定典型的收缩型 VSMC 分子标记和调控转录因子的表达水平随培养时间增长而下降,尤其是 myosin-II 这一分子标记,其 RNA 水平的降低幅度远超 α-SMA 基因,是较 α-SMA 更为准确的 SMC 分子标记。因此,使用我们改良的方法可分离制备高纯度的收缩型大鼠 VSMC。



注:(A)收缩表型基因;(B)转录调控因子基因。

图 6 P4 和 P8 代 VSMC 的 RNA 表达水平比较

Note. (A) contractile gene; (B) the gene of transcription regulatory factors.

Fig. 6 Comparison of RNAs expression levels between the P4 and P8 VSMCs

参考文献:

- [1] 王生兰,刘辉琦,王丽华,等.酶消化法分离培养家兔血管平滑肌细胞[J].青海医学院学报,2008,29(4):249-252.
- [2] 刘红梅,黄体钢.血管平滑肌细胞的培养及其在心血管疾病研究中的应用[J].实用心脑血管病杂志,2005,13(6):364-68.
- [3] Owens GK. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004,84(3):767-801.
- [4] 丁洪飞,黄胜超,李建文,等.改良大鼠血管平滑肌细胞的原代培养[J].医学研究杂志,2011,40(1):71-73.
- [5] Freed D. Induction of protein synthesis in cardiac fibroblasts by cardiotrophin-1: integration of multiple signaling pathways [J]. *Cardiovasc Res*,2003,60(2):365-75.
- [6] Tsuruda T. Cardiotrophin-1 stimulation of cardiac fibroblast growth: roles for glycoprotein
- 130/ leukemia inhibitory factor receptor and the endothelin type A receptor [J]. *CIRC RES*,2002,90(2):128-134.
- [7] 卓致远,黄茂,崔学范,等.组织贴块法培养小鼠气道平滑肌细胞[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2007,16(2):247-50.
- [8] 吴海亚,戴元荣,尹娟.改良组织贴块法培养大鼠气道平滑肌细胞[J].温州医学院学报,2010,40(6):571-73.
- [9] 叶致豪,许文豪,刘庆华,等.小鼠气管平滑肌原代细胞的分离、培养与鉴定[J].中国实验动物学报,2016,24(4):364-368.
- [10] 张正杨,王含彦,易芳,等.小鼠原代血管平滑肌细胞改良分离方法的建立.海南医学院学报[J].2014,20(3):302-312.
- [11] Asrih M, Mach F, Quercioli A, et al. Update on the pathophysiological activities of the cardiac molecule cardiotrophin-1 in obesity [J]. *Mediat Inflamm*, 2013, 2013; Article ID 370715.
- [12] 周晓莉,雷寒,柳青.血管平滑肌细胞的培养及鉴定[J].重庆医学,2005,34(6):877-878.
- [13] Siow RC, Pearson JD. Vascular smooth muscle cells: isolation, culture, and characterization [J]. *Methods MolMed*, 2001, 46: 237-245.
- [14] Parmacek MS. Myocardin: Dominant driver of the smooth muscle cell contractile phenotype [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008,28(8):1416-1417.
- [15] Ives HE, Schultz GS, Galardy RE, et al. Preparation of functional smooth muscle cells from the rabbit aorta [J]. *J ExpMed*, 1978, 148(5):1400-1413.
- [16] 辛毅,张耀中,林笋,等.小鼠主动脉血管平滑肌细胞分离培养及鉴定[J].新乡医学院学报,2012,29(1):5-10.
- [17] Kim KG, Sung EG, Kim JY. An effective isolation of the vascular endothelial and smooth muscle cells from the mouse aorta [J]. *Korean J Anat*, 2009, 42(2):93-104.
- [18] 王志勇,邹祖玉,刘维新.血管平滑肌细胞的表型标志 α -SM-actin 的表达与调控的研究进展 [J]. *数理医药学杂志*, 2001, 14(05):443-445.
- [19] 涂永生,黄红林,朱炳阳,等.Ⅱ型胶原酶/弹性蛋白酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9(5):438-440.
- [20] Shunsuke M, Wataru N, Mako N, et al. Role of Bagpipe, a member of NK homeobox genes, in regulating smooth muscle-specific expression of SM22 α [C]. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology, 日本大阪,1998:1.
- [21] 李宏伟,姜维良.酶消化法分离培养大鼠血管平滑肌细胞方法的改良[J].哈尔滨医科大学学报,2011,45(1):58-60,63.
- [22] Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. et al. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1988, 62: 749-756.
- [23] Gunther S, Alexander RW, Atkinson WJ, et al. Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Biol*, 1982, 92(2):289-298.
- [24] Owens GK, Loeb A, Gordon D, et al. Expression of smooth muscle-specific α -isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation [J]. *J Cell Biol*, 1986, 102(2):343-352.
- [25] Ray JL, Leach R, Herbert JM, et al. Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta [J]. *Methods Cell Sci*, 2001, 23(4):185-188.
- [26] Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, et al. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2005, 12(3):138-142.
- [27] Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(2):1561-1564.

[修回日期]2016-12-05