

大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养

李 华¹⁾, 马明义²⁾, 马红艳¹⁾

(1) 泸州医学院附属医院内分泌科, 四川 泸州 646000; 2) 泸州医学院医学细胞生物学与遗传学教研室, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的** 探索一种简便可行的脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 的培养方法, 为研究 BMECs 在脑血管疾病中的重要作用提供技术支持. **方法** 分离出生后 1~4 d 内的 Wistar 大鼠乳鼠大脑皮质, 用植块法培养 BMECs; 用倒置显微镜观察 BMECs 的形态以及从皮质块细胞迁出的过程; 通过形态学观察及第 VIII 因子相关抗原免疫荧光细胞化学法对培养细胞进行鉴定. **结果** 大脑皮质块植块法培养的大鼠 BMECs 呈单层贴壁生长, 细胞形态以长梭形、多角形、三角形、四边形为主, 呈典型的“铺路石”样征象, 第 3 代细胞经免疫荧光染色, 第 VIII 因子相关抗原呈阳性, 阳性率达 95% 以上. **结论** 植块法具有经济、简便、要求条件不高, 可成功培养高纯度的脑微血管内皮细胞的优点.

[关键词] 大鼠; 脑微血管内皮细胞; 原代培养

[中图分类号] Q813.1+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 12-0026-04

Primary Culture of Rat Brain Microvascular Endothelial Cells

LI Hua¹⁾, MA Ming-yi²⁾, MA Hong-yan¹⁾

(1) Dept. of Endocrinology and Metabolism, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou Sichuan 646000; 2) Dept. of Medical Cell Biology & Medical Genetics, Luzhou Medical College, Luzhou Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To develop a simple and reproducible method for the isolation and culture of brain microvascular endothelial cells (BMECs) of rats, and provide technical support for the studies of physiology, biochemistry and pharmacology of the brain endothelium and the studies of pathophysiology of cerebrovascular disease. **Methods** Relatively pure cortex explants were obtained from 1-to 4-day-old neonatal Wistar rats by careful dissection, we used cortex explant to culture BMECs and observed the morphology and migration of endothelial cells from cortex explant. The cultured cells were identified according to the morphology and immunocytochemistry of factor VIII-associated antigen. **Results** We found that the cultured cells began to migrate from cortex explant after 24 hours, showed the spindle-shaped morphology and reached the monolayer confluence after 10-14 days. Immunocytochemistry demonstrated more than 95% of the third generation cultured cells were positive for VIII factor protein, which indicated the cultured cells were vascular endothelial cells. **Conclusion** Explant culture is a economic and easy method for primary culture of pure BMECs.

[Key words] Rat; Brain microvascular endothelial cell; Primary culture

血管内皮细胞一直是研究的热点, 目前多数实验室采用人脐静脉内皮细胞和牛主动脉内皮细胞, 这种起源于通道血管的大血管内皮细胞不同于器官组织微循环系统起源的内皮细胞, 并且不

同器官和组织起源的血管内皮细胞也表现出不同的功能特性^[1]. 寻求获得可靠、大量的脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 的方法, 以便为研究 BMECs 在脑血管疾

[基金项目] 泸州医学院附属医院人才基金资助项目 (11179)

[作者简介] 李华 (1973~), 女, 四川自贡市人, 博士研究生, 主治医师, 主要从事糖尿病胰岛素抵抗及大血管病变研究工作.

病中的重要作用提供技术支持, 但 BMECs 的体外分离、培养难度较大, 因而给相关实验研究带来一定的困难. 笔者通过反复实验, 运用植块法这一简易可行的培养方法成功分离培养出了 BMECs.

1 材料与方法

1.1 实验动物

1~4 d 龄 Wistar 大鼠乳鼠, 购自四川大学实验动物中心.

1.2 主要试剂

DMEM 培养基 (高糖/低糖 Gibco)、胎牛血清 (Hyclone), 胰蛋白酶 (Sigma), 兔抗人 VIII 因子相关抗原 (Sigma)、FRITC 标记羊抗兔 IgG (ZF-0311, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 肝素钠、明胶、L-谷氨酰胺 (Sigma). DMEM 完全培养液含 20% 胎牛血清、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肝素钠、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素.

1.3 培养瓶处理

植块原代培养前 1 d 加 1% 明胶于 25 mL 玻璃培养瓶中, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱包被过夜. 培养前取出, 弃去明胶, 用 D-Hanks 液冲洗 2 次, 加入少许 DMEM 培养液放入 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 孵箱内, 植块植入时, 倾去培养液, 加少许胎牛血清, 利于植块粘附.

1.4 细胞培养

取 1~4 d 的 Wistar 大鼠乳鼠, 75% 酒精浸泡消毒 3~5 min, 移入细胞室工作台 (和超净台同一屋, 紫外线照射 30 min), 背位固定乳鼠, 暴露大脑, 剥离脑组织表面软脑膜和大血管, 小心分离大脑皮质 (去除海马), 置无菌平皿内 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 D-Hanks 液体中漂洗 3 次, 分离剔除软脑膜和大血管, 去除脑白质等, 移入超净台内另一无菌平皿内, 剪切大脑皮质组织块成 1 mm^3 大小, 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 D-Hanks 液体中漂洗 2 次, 组织块中加入 1 滴胎牛血清混匀, 巴氏管吸取植块接种于培养瓶中, 放入 CO_2 孵箱内固化 2 h, 加少许培养液继续培养, 48~60 h 内取出植块, 加入足量培养液继续培养, 以后每 3 d 换液 1 次, 大约 7、8 d 细胞可长满 1 瓶. 用 D-Hanks 液洗两遍, 0.25% 胰蛋白酶 (含 0.02% EDTA) 镜下消化, 传为 2 瓶细胞.

1.5 大鼠 BMECs 的鉴定

1.5.1 细胞形态观察 将培养有原代和传代细胞的培养瓶置于倒置显微镜下观察细胞贴壁、生长情况及其形态, 并进行拍照.

1.5.2 免疫荧光细胞化学法 第 VIII 因子相关抗原免疫荧光染色, 主要操作如下: (1) 细胞准备与固定 单层生长细胞: 取对数生长第代细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶液消化, 制成单细胞悬液. 将细胞接种到 24 孔培养板中, 置 CO_2 箱培养 1~3 d, 待细胞接近长成单层, 取出 24 孔培养板, 用冷 PBS 缓冲液洗 3 次, 每次 5 min, 边洗边振荡. 用 95% 酒精固定 30 min; (2) 将已固定的细胞用冷 PBS 三缓冲液洗 3 \times 5 min; (3) 滴加 0.2% Triton-X100 10 min. 用冷 PBS 缓冲液洗 3 \times 5 min; (4) 滴加 1:50 稀释的一抗 (兔抗人 VIII 因子相关抗原), 置湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min. 用冷 PBS 缓冲液洗 3 \times 5 min; (5) 滴加 1:50 稀释的荧光素标记二抗 (FRITC 标记羊抗兔 IgG), 置湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min. 用冷 PBS 缓冲液洗 3 \times 5 min; (6) 荧光显微镜观察. 以 PBS 代替一抗作阴性对照.

2 结果

2.1 细胞形态学观察

植块法培养的皮质块内可见较多的脑微血管, 内有红细胞, 植块贴壁后, 最先游出的是血细胞 (球形), 血细胞从边缘向四周游出; 培养 52 h 后可见血管内皮细胞及神经元呈放射状游出, 最初游出的内皮细胞形态有三角形、四边形、多角形、梭形, 呈铺路石样排列, 部分细胞成簇成团, 形成内皮细胞集落, 随着时间的延长, 植块逐渐变薄, 边界变得模糊; 培养 60 h 取出植块后, 内皮细胞不断增殖, 可见“旋涡状”分布, 培养 10~14 d 铺满瓶底 (见图 1、图 2). 传代后的内皮细胞贴壁快, 随着传代次数的增加, 内皮细胞逐渐得到纯化, 至第 3 代时, 形态以梭形、多角形为主, 血细胞和神经元在传代过程中被去除 (见图 3).

2.2 大鼠 BMECs 细胞鉴定结果

取分离培养后的 BMECs, 免疫荧光细胞化学法检测内皮细胞标志物 VIII 因子 (Von Willebrand factor, vWF) 相关抗原, 在荧光显微镜下观察, 可见所培养的细胞胞浆内有明显的黄绿色荧光, 胞核呈空泡样, 显示 vWF 蛋白呈阳性表达, 符合 VIII 因子的分布特点, 证实所培养的细胞为脑微血管内皮细胞 (见图 4).

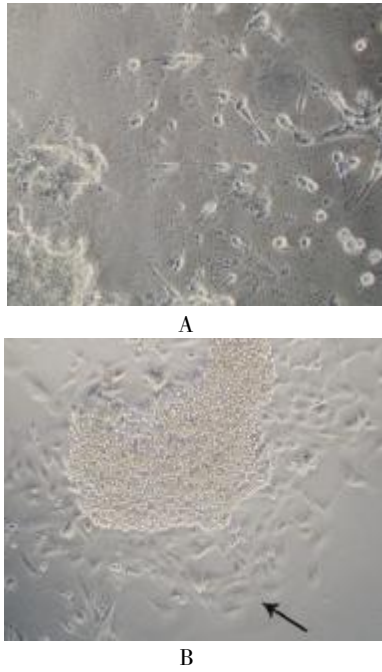


图 1 植块培养 52 h 后见 BMECs 从植块中迁出 (× 10 倍)

Fig. 1 BMECs migrate from explant after explant culture for 52 h (× 10 倍)

A: 组织块植入后最先游出的是血细胞 (球形), 52 h 后可见血管内皮细胞及神经元呈放射状游出, 最初游出的内皮细胞呈三角形或长梭形, 排列不规则; B: 箭头示植块周围形成生长晕.

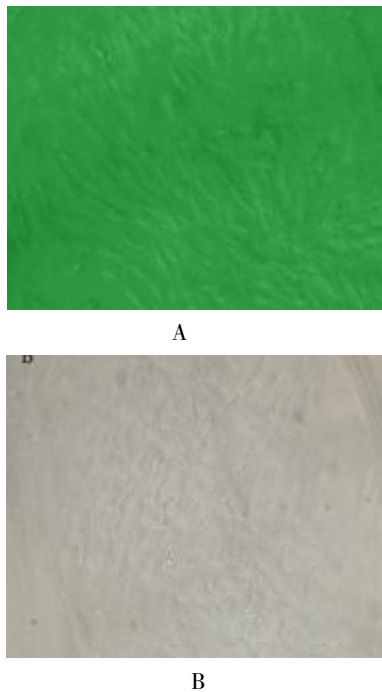


图 2 培养第一代的 BMECs

Fig. 2 The first generation of BMECs

A: × 10 倍; B: × 20 倍. 培养第一代的 BMECs 形态呈梭形, 三角形, 多角形, 内皮细胞不断增殖, 可见“漩涡状”分布.



图 3 培养第 3 代的 BMECs (光镜 × 10 倍)

Fig. 3 The third generation of BMECs

注: 培养第 3 代的 BMECs 得以纯化, 形态以梭形、多角形为主, 血细胞和神经元在传代过程中被去除.

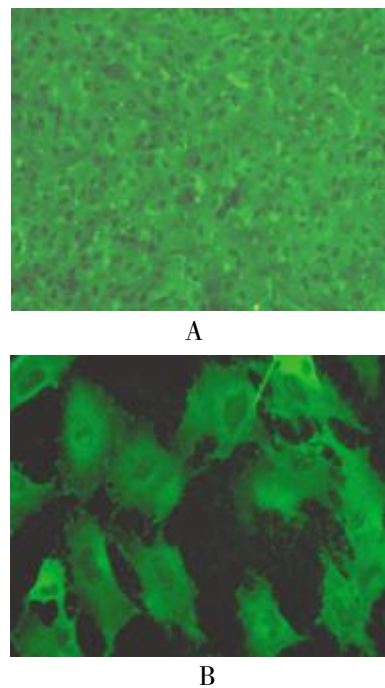


图 4 FITC 标记 VIII 因子相关抗原阳性鉴定为内皮细胞
Fig. 4 The identification of endothelial cells by immunofluorescent staining with FITC tagged VIII antibody

A: 荧光显微镜 × 10 倍; B: 荧光显微镜 × 20 倍.

3 讨论

神经血管单元 (neurovascular unit, NVU) 认为缺血性脑卒中的治疗必须跨越脑缺血后单一细胞损害的理念, 而应将神经元、血管内皮细胞、星形胶质细胞以及维持脑组织完整性的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 作为一个统一体, 这一统一体被称为 NVU. 最早由 Lo EH 提出^[2], 这一概念模式主要强调白质和灰质内血管、细胞和基质之间信号传导的动态性. 维持 NVU 处于一个稳定状态是脑细胞发挥正常功能的基础. 脑缺血后各种

神经保护措施只有针对 NVU 这一整体才能起到作用. 神经血管单元的提出进一步强调血管内皮细胞在调节脑血流动力学以及维持正常血脑屏障的重要性. 故微血管内皮细胞的培养技术越来越受到人们的重视, 但 BMECs 的体外分离、培养难度较大, 因而给相关实验研究带来一定的困难. 本文参阅文献加以改进, 并通过反复实验, 运用植块法^[3]这一简易可行的培养方法成功分离培养出了 BMECs.

BMECs 的培养精于 20 世纪 70 年代末^[4], 国内外有关大鼠脑微血管内皮细胞的分离和培养方法已有较多的报道^[5-10], 而大多数方法采用以大脑皮质为材料、酶消化及梯度离心分离脑微血管段并进行原代培养, 但上述方法程序较复杂、繁琐、条件苛刻、价格昂贵. 笔者采用植块法成功培养出高纯度的 BMECs. 首先在取材方面, 笔者选用出生 1~4 d 的 Wistar 大鼠乳鼠皮质块, 这时期的 BMECs 已经分化且分裂增殖能力强, 保证了从组织块迁移出来的内皮细胞具有较好的增殖潜能, 又减少了其他细胞污染的可能性; 其次, 植块内各种细胞的共存为内皮细胞的生长提供了较为稳定的生长环境, 培养过程中可见有神经元从植块迁移出来, 迁出时间比内皮早, 而且生长状态佳, 但神经元传代后很快死亡, 从而使内皮细胞得到纯化, 通过细胞形态学观察及检测 VIII 因子相关抗原—这一血管内皮细胞最可靠标志的表达可鉴定笔者所培养、纯化的细胞为脑微血管内皮细胞. 显示植块法培养 BMECs 具有经济、简便、要求条件不高、易于纯化的优点.

脑微血管内皮细胞的原代培养过程中要注意以下几点: (1) 脑微血管内皮细胞的原代培养需要涂布明胶, 明胶和少量血清的包被有助于组织块的粘附; (2) 培养过程中需选择质量较好的血清, 并添加肝素和谷胺酰胺有助于内皮的存活、生长和纯化; (3) 干贴 2 h 是为了保证组织块的贴壁, 有利于内皮细胞的迁出和贴壁生长, 组织块贴附不佳, 加培养液后容易漂浮; (4) 足够的细胞数量

是保证传代成功的必要条件. 原代培养的细胞相互联系可能通过产生一些促生长活性物质来互相促进存活与生长, 当部分组织块周围细胞密集, 停止增殖时, 即使整瓶细胞未达到传代标准, 仍可用酶消化, 将几瓶合并; (5) 植块法培养内皮细胞过程中植块的制备、植入和移出, 均会增加细菌污染的机会, 要严格无菌操作及使用合适浓度的抗生素.

[参考文献]

- [1] 娄晋宁. 微血管内皮细胞的培养及其在医学研究中的应用[J]. 微循环学杂志, 2004, 14(3): 5-8.
- [2] LEE S, LO E. Interactions between p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3 in cerebral endothelial cell death after hypoxia-reoxygenation [J]. Stroke, 2003, 34: 2 704 - 2 709.
- [3] 祝慧凤, 万东, 王建伟, 等. 运用植块法培养脑微血管内皮细胞[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29: 449 - 453.
- [4] SPATZ M, BEMB J, DODSON R F, et al. Endothelial cell cultures derived from isolated cerebral ierovessels [J]. Brain Res, 1980, 191(2): 577 - 582.
- [5] 鲍欢, 包仕尧, 张志琳. 体外分离、培养大鼠脑微血管内皮细胞的若干问题[J]. 苏州大学学报(医学版), 2004, 24(5): 657 - 660.
- [6] 许鹏飞, 李润平, 李泉, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27: 84 - 88.
- [7] 陈彬, 罗勇. 大鼠脑微血管内皮细胞的体外培养[J]. 卒中与神经疾病, 2005, 12(2): 80 - 83.
- [8] 王义宝, 刘云会, 刘丽波, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养及其生物学行为初步探讨[J]. 神经解剖学杂志, 2006, 22(2): 224 - 228.
- [9] 刘恺鸣, 迟路湘, 鲁向辉, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(20): 2 011 - 2 013.
- [10] 白慧云, 穆祥, 丁库克, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的培养[J]. 微循环学杂志, 2011, 21(1): 3 - 5.

(2012-09-21 收稿)