

人脐带动脉与脐带静脉血管内皮细胞在体外 相同培养环境下的定性研究

刘倩 刘通海 叶进培*

(山西大学生物医学研究院, 太原 030006)

摘要 血管内皮细胞受损与许多心脑血管疾病的发生和发展有关, 已成为当今生命科学、药学领域的重要的研究对象。体外分离获得血管内皮细胞以及鉴定对于研究血管功能和为心脑血管疾病建立细胞模型极为重要。该研究通过了一种简便快捷、分离纯度高的人脐带动脉内皮细胞(human umbilical cord artery endothelial cells, HUAEC)和脐带静脉内皮细胞(human umbilical cord vein endothelial cells, HUVEC)的分离及培养体系, 同时从形态特征、增殖活力、成管能力、表面抗原和特异基因的表达等方面检测了二者在体外相同培养环境下的动态变化与差异。该研究发现, HUAEC和HUVEC在体外连续传代培养过程中形态特征、成管能力、表面抗原(CD144、CD31、CD309、CD133、CD34)这几个方面作为内皮细胞的基本特性没有明显差异, 尽管HUAEC相对于HUVEC增殖活力更高。对于新鲜分离的HUAEC和HUVEC, 二者特异性基因表达水平具有显著差异(HUAEC高表达EFNB2、DLL4、NRP1、CXCR4; HUVEC高表达EPHB4、COUP-TF II), 然而随着培养时间的延长(传代次数的增加), HUAEC丧失其特异性基因(P6)的表达之后, HUVEC仍保持其特异性基因的高表达。因此HUVEC特异性表达基因EPHB4、COUP-TF II可以作为区分体外培养的人脐带动脉或者脐带静脉来源的内皮细胞的可靠鉴定标志基因。

关键词 人脐带动脉内皮细胞; 人脐带静脉内皮细胞; 成管功能; 表面抗原; 特异性基因; 内皮细胞定性

Differential Characterization of Human Umbilical Artery and Umbilical Vein Endothelial Cells under Same Culture Conditions *In Vitro*

LIU Qian, LIU Tonghai, YE Jinpei*

(The Institute of Biomedical Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract The damage of vascular endothelial cells is related to the development of many cardiovascular and cerebrovascular diseases, which has become an important research subject in the fields of life science and pharmaceutical industry. *In vitro* isolation and identification of vascular endothelial cells is important for studying vascular function and establishing a cellular model for cardiovascular and cerebrovascular diseases. The present study has used a simple and rapid isolation and culture system for HUAEC (human umbilical cord artery endothelial cells) and HUVEC (human umbilical cord vein endothelial cells) with a high purity, and investigates systematically the dynamic changes in biological characteristics including morphology, proliferation, tube formation, surface antigen and the expression of specific genes of both HUAEC and HUVEC under the same culture conditions *in vitro*.

收稿日期: 2019-10-18

接受日期: 2020-03-11

*通讯作者。Tel: 13073585249, E-mail: jinpei.ye@sxu.edu.cn

Received: October 18, 2019

Accepted: March 11, 2020

*Corresponding author. Tel: +86-13073585249, E-mail: jinpei.ye@sxu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5226>

This research found that there was no significant difference in the morphology, tube forming ability, surface antigen (CD144, CD31, CD309, CD133, CD34) between HUAEC and HUVEC for a long-term continuous subculture, although HUAEC showed a higher proliferation activity than HUVEC. In freshly isolated HUAEC and HUVEC, the expression levels of the specific genes for artery and vein respectively were significantly different (HUAEC high expression in EFNB2, DLL4, NRP1, CXCR4; HUVEC high expression in EPHB4, COUP-TF II). However, during the prolonged culture period (after passage 6) HUAEC lost then its specific gene expression, whereas HUVEC remained its high expression of the specific genes. In conclusion, HUVEC-specific expression genes *EPHB4* and *COUP-TF II* can be used as reliable identification markers for distinguishing human umbilical cord artery- from umbilical cord vein-derived endothelial cells cultured *in vitro*.

Keywords human umbilical cord artery endothelial cells; human umbilical cord vein endothelial cells; tube forming capacity; surface antigen; vascular specific genes; characterization of endothelial cells

血管内皮细胞(endothelial cell, EC)是血管基底膜内侧的一种单层细胞^[1], 位于血液和平滑肌层之间, 呈不规则的多边形或纺锤形, 边缘不整齐, 细胞与细胞相互嵌合, 形成血管的内壁。内皮表面积超过1 000平方米, 是人体最大的代谢器官之一^[2]。内皮细胞在血液和周围组织之间建立双向的功能性渗透屏障, 可根据需要打开或关闭, 并且通过控制血管张力从而控制血压, 此外还能合成和分泌凝血蛋白和多种活性物质如内皮素、血管紧张素^[3]、内皮源性舒张因子等。动脉粥样硬化是一种慢性血管疾病, 其特征为脂质和复合糖类积累、血管炎症和动脉壁纤维成分的积聚^[3]。动脉粥样硬化的起始环节是血管内皮细胞受到损伤、内皮的功能丢失, 形态发生改变引起炎症反应^[4]、血管管腔缩小、平滑肌层增厚、血小板聚集及形成不溶性小块。最近心血管成像的突破进展促进了动脉粥样硬化斑块的解剖学和功能特征的体内表征的观察, 并突出了内皮剪切应力和心外膜和微血管内皮功能障碍在冠状动脉粥样硬化进程中的作用^[5]。此外, 内皮细胞功能障碍也与其他疾病有关, 如阿尔兹海默症^[6]、高血压、糖尿病^[7-8]。内皮细胞已成为当今生命科学、药学领域的重要的研究对象^[9], 保护血管内皮功能成为治疗心血管疾病的新策略之一^[10]。体外分离获得血管内皮细胞以及鉴定对于研究血管功能和为心脑血管疾病建立血管内皮细胞模型极为重要。

人脐带静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)是从正常分娩的人脐带静脉血管中分离出来的。HUVEC在体外具有一定的增殖能力、易于培养和传代, 常作为研究人员更准确地获得实验数据的理想工具^[10]。然而, 心脑血管疾

病多发于动脉, 相比于脐带静脉内皮细胞, 使用人脐带动脉内皮细胞(human umbilical cord artery endothelial cells, HUAEC)作为研究对象更能准确地反映和说明疾病发生发展的相关性。因此, 建立一种高效、快速、分离纯度高的人脐带动脉和静脉血管内皮细胞的分离方法对于研究血管内皮功能与疾病的关系具有重要意义。

已有文献报道, 不同部位血管的内皮细胞在形态、功能和基因表达方面都不相同^[12,14]。内皮细胞异质性表现在结构、功能、表面抗原以及对生长因子反应等方面, 是由于暴露于可变的微环境和在发育过程中通过内在遗传程序进行调节。在胚胎发育过程中, 动静脉命运的决定受到血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、Notch、EphrinB-EphB和血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等多种信号通路的调节。内皮的异质性始于内皮的发生, 因此, 内皮异质性是遗传上的^[15]。所以, 遗传分析可用于鉴定不同来源的EC^[16]。另外, 细胞外微环境会影响内皮细胞的特性, 最终导致EC的表型根据起源器官和血管树的相关区段, 甚至在相同器官和相同血管类型中的相邻细胞之间有所不同。此外, 内皮细胞在体外培养时会改变其表型, 包括它们的细胞形态以及细胞层的连续性和渗透性、基因表达、凝血蛋白的合成和分泌、对剪切应力的易感性和血管生成潜力。有研究表明, 对于微血管内皮细胞和淋巴内皮细胞^[17,20], 体外培养过程可能会消除它们的特异性表达谱。动脉和静脉来源的内皮细胞也存在有关基因的特异表达, 已有研究者对不同组织来源的动静脉内皮细胞, 进行RNA微阵列分析, 检测到HUAEC与HUVEC有着显著性差异, HUAEC

高表达肝配蛋白B2(ephrin-B2, *EFNB2*)、趋化因子受体4(*CXCR4*)、*HEY1*(hairy/Enhancer of split related with YRPW motif 1)、NOTCH配体*DLL4*(delta-like ligand4)和*JAG1*(Jagged1)以及NOTCH受体1(*NOTCH1*)和4(*NOTCH4*)等基因, HUVEC高表达EPH受体B4(EPH receptor B4, *EPHB4*)、神经纤毛蛋白-2(neuropilin 2, *NRP2*)、COUP转录因子2(COUP transcription factor 2, *COUF-TF II*)和爱帕琳肽受体(apelin receptor, *APLNR*)等基因^[21-22]。在体外长期培养内皮细胞模型过程中, 它们的相关特性是否会发生改变以及动静脉差异性是否持续存在, 人们对其知之甚少。为此, 本研究通过一种简便快捷、分离纯度高的人脐带动脉内皮细胞和脐带静脉内皮细胞的分离及培养体系, 从形态特征、增殖活力、成管能力、表面抗原以及特异基因的表达情况几个方面系统地研究了二者在相同培养环境下的差异性和动态特性变化, 以便确定可靠地鉴定和区分动脉和静脉来源内皮细胞的标志。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验组织 山西医科大学第一医院产科正常妊娠足月剖腹产分娩的新生儿脐带, 实验方案经山西大学伦理委员会批准, 且产妇及家属签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 ECM培养基购自ScienCell公司; 胎牛血清和EDTA购自Gibco公司; Matrigel基质胶购自Corning公司; II型胶原酶购自Sigma公司; 反转录试剂盒和Trizol购自日本TaKaRa公司; 多聚甲醛、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)和胰蛋白酶(trypsin)购自武汉Boster生物工程有限公司; Real-time PCR Super mix购自聚合美生物; 流式抗体购自BD Bioscience公司; CCK8购自上海翊圣生物科技有限公司。

倒置荧光显微镜购自德国Zeiss公司; 微孔板检测仪购自美国BioTek公司; 流式细胞仪购自美国BD bioscience公司; 实时荧光定量PCR仪购自瑞士Roche公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HUAEC和HUVEC的分离和培养 预先将T25培养瓶用2 mL明胶(0.1%)包被, 并在37 °C培养箱中放置30 min。在超净台中, 用无菌PBS溶液(室

温)将脐带表面黏液及血液冲洗干净, 找到管壁薄、腔略大的脐静脉。用去掉针头的10 mL无菌注射器吸取PBS溶液冲洗脐静脉, 至流出液无血色。然后用止血钳结扎静脉一段, 注射器吸取II型胶原酶溶液(1 mg/mL)注入静脉内部, 充满整个静脉, 将另一端也用止血钳结扎。在37 °C培养箱中孵育15 min后, 打开一端收集酶溶液倒入离心管中, 再注入中和液冲洗静脉, 一并收集^[23-24]。将收集的溶液1 000 r/min离心5 min。弃去上清液, 加入1 mL ECM培养基制成细胞悬液。然后接种到用明胶(0.1%)包被好的T25培养瓶中, 在37 °C、5% CO₂培养箱中进行培养, 每隔2~3天换液。当细胞达到80%融合状态时进行传代。传代时先把培养液去掉, 然后加入2 mL PBS洗2次, 再加入1 mL 0.05%的胰酶在37 °C培养箱中消化1 min, 在显微镜下观察细胞回缩变圆时, 加入2 mL中和液终止酶消作用, 反复吹打后收集到离心管中, 1 000 r/min离心5 min。去掉上清液, 加入1 mL ECM培养液重悬, 以1:3~1:5的比例进行传代。分离动脉内皮细胞需提前将动脉从脐带一端剥离, 再进行胶原酶消化分离细胞, 其余步骤同脐静脉。

1.2.2 HUAEC和HUVEC的形态学观察 用荧光倒置显微镜观察细胞的形态特征和生长状态, 每隔24 h进行拍照。

1.2.3 HUAEC和HUVEC增殖活力检测 HUAEC和HUVEC达到80%~90%融合时, 胰酶消化1 min, 1 000 r/min离心5 min, 用ECM培养基制备细胞悬液, 以 3×10^3 个细胞/孔接种于96孔板, 然后加ECM培养基至100 μ L(每组3个重复孔)。培养24 h后, 每孔加入10 μ L CCK8溶液, 培养2 h后, 酶标仪检测450 nm波长吸光度(*D*)值。连续测定5天, 各组设与实验平行不加细胞只加培养液的空白对照孔。

1.2.4 HUAEC和HUVEC表面抗原表达检测 细胞传代时, 取出一定量细胞悬液过细胞筛(44 μ m), 1 100 r/min离心5 min。弃上清, 将细胞混匀(微振荡)加入3 mL FACS洗涤缓冲液(PBS+2% FBS+0.2% 0.5 mol/L EDTA), 1 100 r/min离心5 min。弃上清, 加入200 μ L的FACS洗涤缓冲液。分别加入同型对照抗体Isotype 5 μ L和实验组抗体5 μ L, 并吹打多次, 避光放置30 min。加入1 mL FACS Washing Buffer, 1 100 r/min离心5 min, 洗2次。倒掉上清液, 加入等体积的4%的多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定流式细胞仪检测表面抗原表达情况。

1.2.5 HUAEC和HUVEC成管能力检测 实验前1天, 将96孔板、Matrigel基质胶、需用到的枪头放入4 °C冰箱中进行预冷, 并使Matrigel基质胶溶解。在冰上使用预冷的枪头吸取Matrigel基质胶50 μ L加入到96孔板中, 不要产生气泡。将96孔板放入37 °C培养箱中凝胶30 min。在凝胶的等待时间中, 将所需要的细胞消化, 制备细胞悬液。添加1个孔50 μ L的细胞悬液, 细胞数为 1×10^5 个, 同样注意是否有气泡产生, 枪头不能触碰到胶。培养一段时间(2 h、4 h、6 h、8 h)后拍照。拍照, 图像分析, 并且对其成管长度、成环数、结点数、覆盖面积进行测量和记录, 并且对其进行统计分析(分析软件使用ImageJ)。

1.2.6 HUAEC和HUVEC特异性基因表达检测(Real-time PCR) 采用TRIzol法提取全基因组RNA。根据反转录试剂盒说明书进行反转录, 使用定量PCR试剂盒检测目的基因的表达。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析基因表达情况。

Real-time PCR引物序列如下。*EFNB2*-F: 5'-TAT GCA GAA CTG CGA TTT CCA A-3', *EFNB2*-R: 5'-TGG GTA TAG TAC CAG TCC TTG TC-3'; *EPHB4*-F: 5'-CCA CCG GGA AGG TGA ATG TC-3', *EPHB4*-R: 5'-CTG GGC GCA CTT TTT GTA GAA-3'; *CXCR4*-F: 5'-CGC CTG TTG GCT GCC TTA-3', *CXCR4*-R: 5'-ACC CTT GCT TGA TGA TTT CCA-3'; *NRP1*-F: 5'-CAT CTC CTG GTT ATC CTC ATT C-3', *NRP1*-R: 5'-GTC ATA CTT GCA GTC TCT GTC C-3'; *COUP-TF II*-F: 5'-CCA TAG TCC TGT TCA CCT CA-3', *COUP-TF II*-R: 5'-GGT ACT GGC TCC TAA CGT ATT C-3'; *DLL4*-F: 5'-TGT CAT GAA CAG AAT GGC TAC T-3', *DLL4*-R:

5'-CTC ATC ACA AGT ACA TTG CCA G-3'。

1.2.7 数据统计分析 采用 SPSS IBM 统计软件进行分析。组间比较采用独立样本 t 检验; * $P < 0.05$ 具有显著性差异, ** $P < 0.01$ 具有极显著性差异。

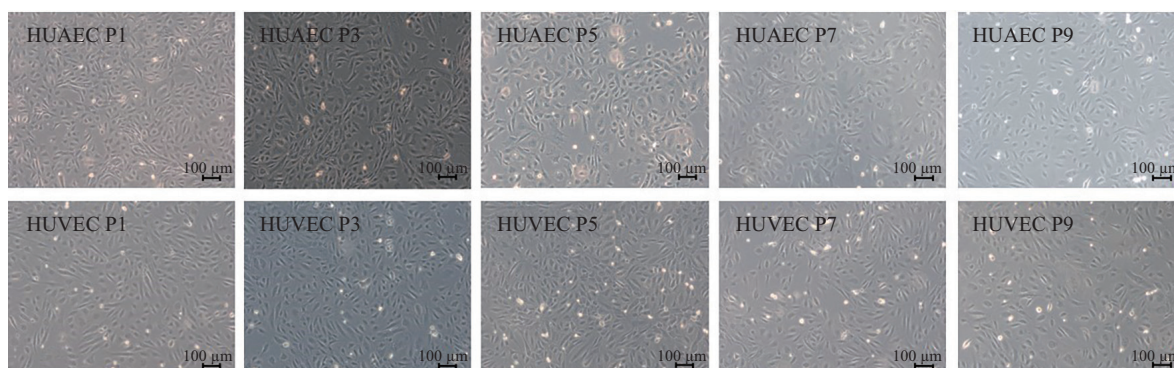
2 结果

2.1 HUAEC和HUVEC的细胞形态和增殖活力

倒置显微镜下观察HUAEC和HUVEC的形态特征, 二者均为单层贴壁生长, 呈纺锤形或多边形, 细胞质丰富, 细胞核呈明显的椭圆形, 细胞膜边缘不整齐, 并呈典型的铺路石状镶嵌(图1)。经II型胶原酶消化法分离的原代HUAEC和HUVEC呈游离的单个或者形成细胞群, 在培养瓶底部均匀分布。接种24 h后, 大部分细胞已经贴壁, 随后细胞膜扩张, 细胞增殖速度加快, 单个细胞形态发生改变, 由原来的圆形变得不规则, 呈多边形或纺锤形, 聚集的细胞增殖向四周扩展形成中心部位排列密集, 周围游离生长的细胞集落, 呈漩涡状或纹理状(图1)。传代培养后细胞增殖速度较快, 传至10代时细胞生长速度明显减慢(图2)。原代分离的人脐动脉内皮细胞与静脉内皮细胞形态并无明显区别; 刚分离的细胞活力旺盛, 经过传代后活力明显下降, HUAEC的增殖活力略高于HUVEC($P < 0.05$)。

2.2 HUAEC和HUVEC成管实验

我们继而在Matrigel基质胶上进行了体外的血管生成实验, 对比了人脐带动脉内皮细胞和静脉内皮细胞在体外功能方面的差异。经ImageJ软件分析成管长度等参数, 结果发现HUAEC和HUVEC都具有在体外良好的成管能力, 没有显著差异。在第9



P1、P3、P5、P7、P10代表原代人脐带动脉内皮细胞和静脉内皮细胞的不同代数的细胞形态。

P1, P3, P5, P7, P10 represent different passages of cell morphology of primary HUAEC and HUVEC.

图1 HUAEC和HUVEC的P1、P3、P5、P7、P9代细胞形态

Fig.1 HUAEC and HUVEC P1, P3, P5, P7, P9 cell morphology

代之后, 尽管HUAEC的成管能力低于HUVEC(图3) ($P<0.05$), 二者仍具有形成管状结构的能力。

2.3 HUAEC和HUVEC表面特异膜蛋白表达情况比较

我们又通过流式细胞仪对HUAEC和HUVEC进行表面抗原测定, 发现在经II型胶原酶分离的原代细胞中, 内皮细胞纯度高, CD31阳性细胞可达96%以上, HUAEC和HUVEC都高表达CD144和CD31, 低表达CD34和CD133, 基本不表达CD309, 但大体上二者不具有差异(图4和表1)

2.4 HUAEC和HUVEC传代过程中特异基因表达变化

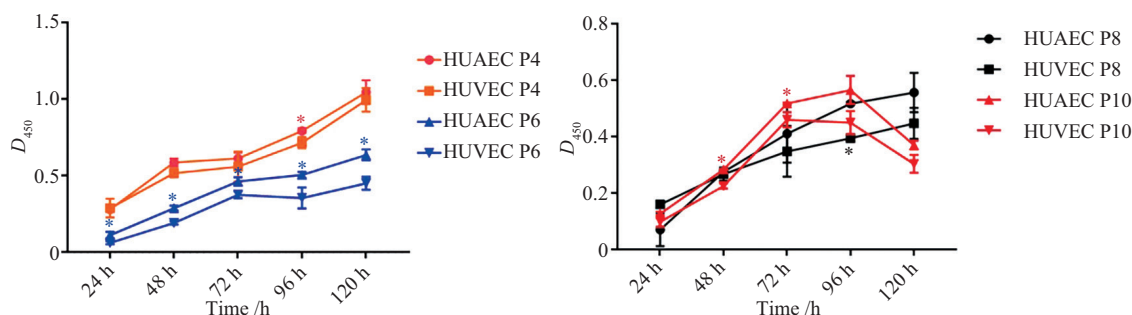
通过real-time PCR检测二者的特异性基因的表达发现, HUVEC(P2)高表达静脉内皮细胞特异性基因*COUP-TF II*和*EPHB4*; HUAEC(P2)高表达动脉特异性基因*EPNB2*、*CXCR4*、*DLL4*和*NRP1*(图5)。

但是, HUAEC和HUVEC在相同的体外培养条

件下, 经过传代培养, 从P2到P10, HUVEC的特异性基因*COUP-TF II*和*EPHB4*相对表达量一直远高于HUAEC, 保持其显著性差异; 而HUAEC的特异性基因*CXCR4*、*DLL4*、*NRP1*和*EFNB2*的相对表达量显著下调, 丧失其动脉特异性差异(P6代)。

3 讨论

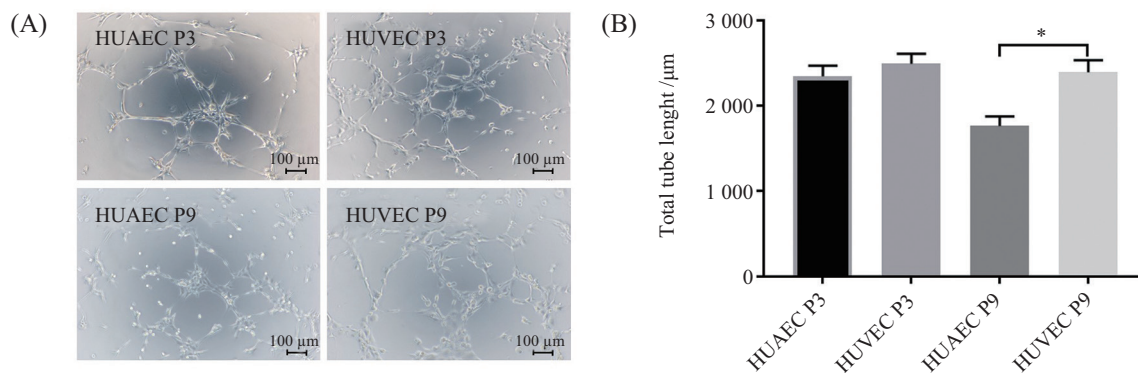
血管内皮细胞与周围组织形成动态环境并介导许多生理和病理过程, 从而成为各种心脑血管疾病研究的模型。传统上, 内皮细胞常用于研究动脉粥样硬化、全身炎症、糖尿病和肿瘤血管生成, 并研究药物的作用及其穿透血液-组织屏障的能力。此外, 内皮细胞模型也已经发展为生物材料研究中广泛使用的工具, 因为植入材料总是直接或间接通过降解产物与内皮细胞接触。而且, 生物材料与组织工程领域中绝大多数研究仅集中于HUVEC获得的数据^[25]。但是心血管常见疾病的血管病变通常发



A: HUAEC(P4、P6)和HUVEC(P4、P6)增殖曲线; B: HUAEC(P8、P10)和HUVEC(P8、P10)增殖曲线, * $P<0.05$, 与HUVEC组比较。

A: growth curves of HUAEC (P4,P6) and HUVEC (P4,P6); B: growth curves of HUAEC (P8,P10) and HUVEC (P8,P10), * $P<0.05$ compared with HUVEC group.

图2 HUAEC和HUVEC的细胞增殖活力
Fig.2 Cell proliferation activity of HUAEC and HUVEC



A: HUAEC(P3、P9)和HUVEC(P3、P9)体外成管形态; B: 成管长度定量分析; * $P<0.05$ 。

A: HUAEC (P3,P9) and HUVEC (P3,P9) *in vitro* tube formation; B: quantitative analysis of tube length; * $P<0.05$.

图3 HUAEC和HUVEC体外成管能力对比
Fig.3 Comparison of tube formation ability between HUAEC and HUVEC *in vitro*

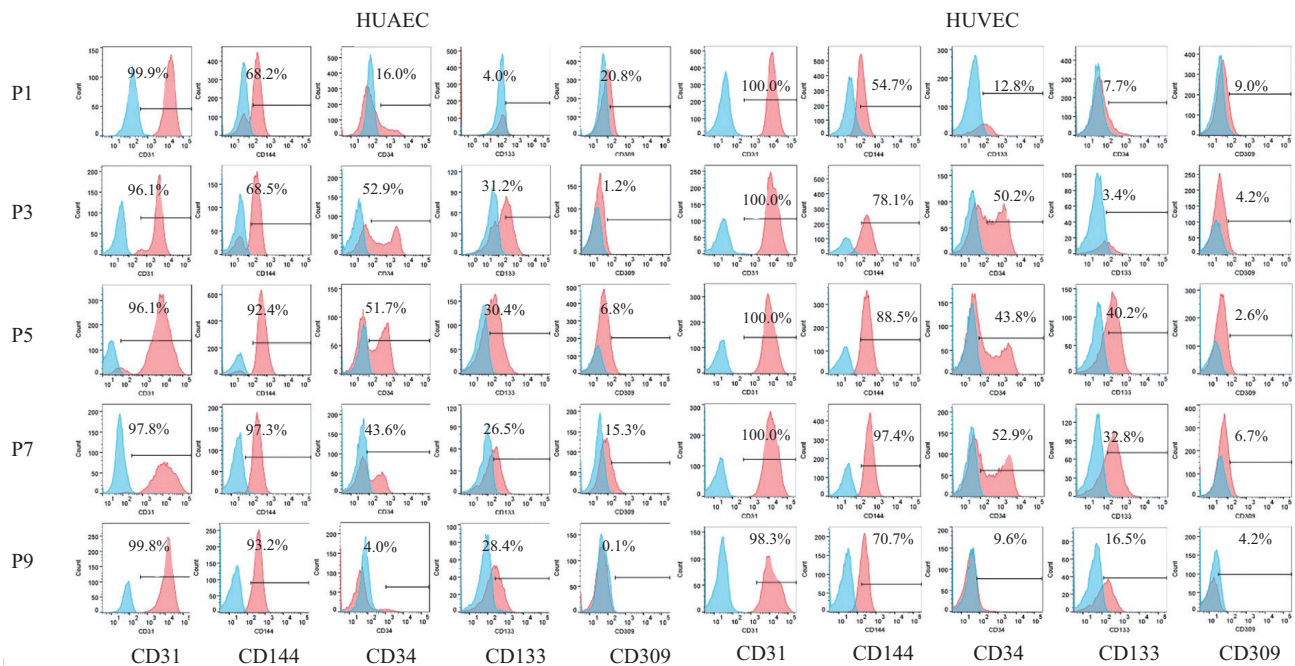


图4 流式细胞术分析HUAEC和HUVEC表面标记的表达

Fig.4 The expression of HUAEC and HUVEC surface markers was analyzed by FACS

表1 流式细胞术分析HUAEC和HUVEC表面标记的表达

Table 1 The expression of HUAEC and HUVEC surface markers was analyzed by FACS

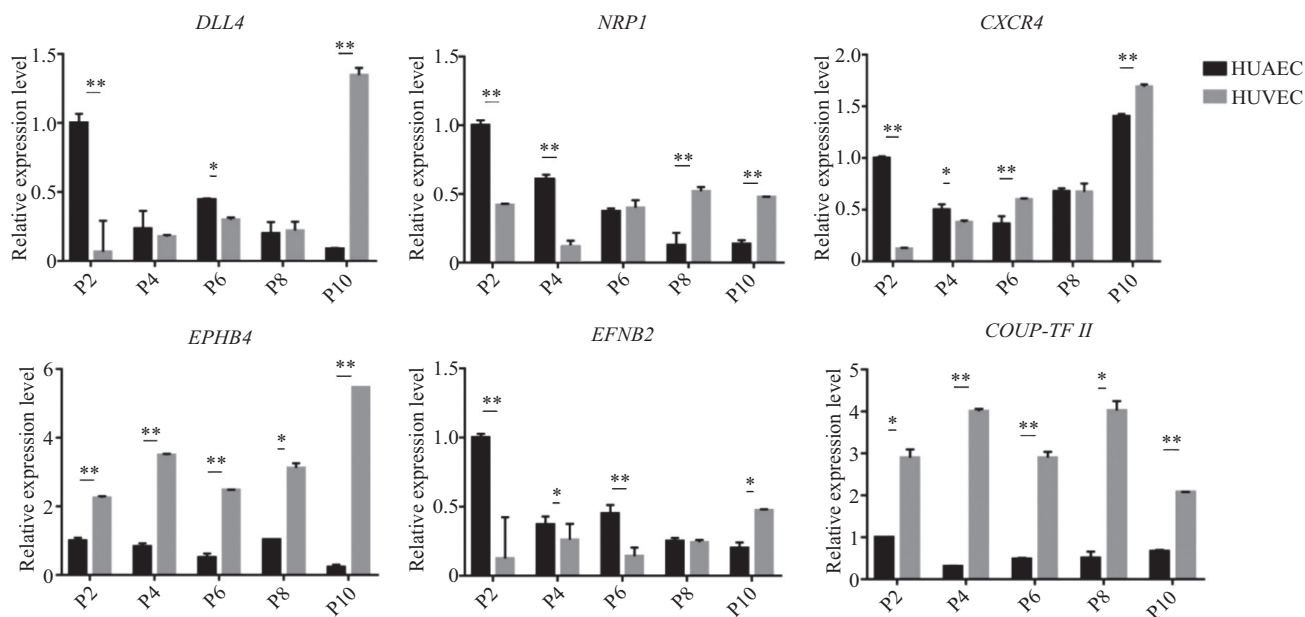
表面标记 Surface marker	人脐带动脉内皮细胞代数 Human umbilical artery endothelial cell passage					人脐带静脉内皮细胞代数 Human umbilical vein endothelial cell passage				
	P1	P3	P5	P7	P9	P1	P3	P5	P7	P9
CD31	99.9%	68.2%	16.0%	4.0%	20.8%	100.0%	54.7%	12.8%	7.7%	9.0%
CD144	96.1%	68.5%	52.9%	31.2%	1.2%	100.0%	78.1%	50.2%	3.4%	4.2%
CD133	96.1%	92.4%	51.7%	30.4%	6.8%	100.0%	88.5%	43.8%	40.2%	2.6%
CD34	97.8%	97.3%	43.6%	26.5%	15.3%	100.0%	97.4%	52.9%	32.8%	6.7%
CD309	99.8%	93.2%	4.0%	28.4%	0.1%	98.3%	70.7%	9.6%	16.5%	4.2%

生在动脉, 包括动脉内膜脂质沉积、内膜灶状纤维化、粥样斑块形成, 致使管壁变硬, 并引起一系列继发性缺血。因此, 对动脉内皮细胞的深入了解可以为治疗心脑血管疾病提供更充分的数据。

本研究通过采用胶原酶消化法分离得到HUAEC和HUVEC, 同时从形态特征、增殖活力、成管能力、表面抗原和特异基因的表达等方面检测了二者在体外相同培养环境下的动态变化与差异。在培养的过程中, 使用倒置显微镜对二者的形态特征进行观察和比较, 发现二者均呈不规整的多边形或纺锤形, 细胞集落为漩涡状排列, 细胞与细胞之间相互嵌合形成典型的铺路石状镶嵌。从P2~P10, HUAEC的增殖活力要高于HUVEC。在成管实验

中, HUAEC和HUVEC均能在体外形成网状结构, 且成管面积、成管长度、结点数等方面均没有明显差异, 尽管在第9代之后, HUAEC的成管能力低于HUVEC。HUAEC和HUVEC均高表达细胞表面抗原CD144和CD31, 低表达或不表达CD309、CD34、CD133。因此, 两种细胞在这五种表面抗原的表达并没有明显差异。

内皮细胞是一种异质性很强的细胞, 通常表现在形态、成管能力、对剪切应力的敏感性以及基因表达方面。本研究进而探讨其基因表达的差异性, 通过real-time PCR检测特异基因的表达情况, 发现HUVEC(P2)高表达静脉特异性基因*COUP-TF II*和*EPHB4*; HUAEC(P2)高表达动脉特异性基因*EFNB2*、



* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图5 q-PCR分析HUVEC和HUAEC传代培养过程中特异基因表达情况

Fig.5 The expression of specific genes in subculture of HUVEC and HUAEC was analyzed by q-PCR

CXCR4、*DLL4*和*NRPI*。我们进一步用real-time PCR检测二者在相同的体外环境培养过程中,其特异基因表达的差异性是否持续存在。结果发现, HUVEC在传代过程中(P2~P10)其特异性基因的表达相对于HUAEC,差异稳定存在,而对于HUAEC在传代过程中,相对于HUVEC二者的差异性逐步丧失,呈现相反趋势。因此对于体外鉴定HUAEC和HUVEC,二者的特异性基因不能完全作为二者的特异性基因标志物(在P6代之后)。在鉴定人脐带动脉或者脐带静脉来源的内皮细胞时, HUVEC特异性表达基因*EPHB4*、*COUP-TF II*可以作为更可靠鉴定标志基因。

2013年,已有文献报道了内皮细胞在体外培养的过程中可以快速“擦除”HUAEC和HUVEC的某些特定表达谱而没有发现作为二者可靠的确定标志基因;认为这种差异性显著丧失不是由于血清的存在,其可能在培养时诱导内皮-间充质转变,而且动脉的特异性表达谱的维持依赖于持续的转录因子过表达^[22]。也有研究者则强调了血液流动状态对于动静脉特性维持的重要性^[26]。因此,在体外培养环境中重建体内适当的微环境应有助于维持EC特性。此外,我们还需要考虑氧气水平也可能影响动脉特性的维持^[27]。

目前,国内外区分动脉和静脉来源的内皮细胞通常从基因层面上和一些功能方面的差异来进行鉴

定,而且对于在体外环境下细胞特性是否会发生变化很少有人进行系统地研究。而我们的研究进行了全面的、严谨的和系统的对比动脉内皮细胞和静脉内皮细胞两种细胞在体外环境下差异和动态变化,从而提出了更加可靠的鉴定区分标志物,为在体外培养规范应用内皮细胞提供更加全面的数据。

总而言之,对HUAEC和HUVEC在体外特性和基因特征的更多了解为心血管疾病更充分的治疗以提供依据及在临床上更加规范应用。另一方面,已有文献报道人胚胎干细胞能够自发分化为血管内皮细胞^[28],探究动脉静脉细胞表面特异性抗原表达的差异,也将有助于胚胎干细胞分化结果的鉴定,对于临床应用具有重要价值。本研究通过比较HUAEC和HUVEC在形态、成管能力、表面抗原、特异基因表达几个方面,最终发现在基因表达方面二者存在较为显著的差异,对于新鲜分离的HUAEC和HUVEC(P6之前),二者特异性基因表达水平具有显著差异(HUAEC高表达*EFNB2*、*DLL4*、*NRPI*、*CXCR4*, HUVEC高表达*EPHB4*、*COUP-TF II*),但是随着在体外培养时间的延长,基因*COUP-TF II*和*EPHB4*可以作为鉴定动脉或静脉来源的内皮细胞更稳定的标志物。

参考文献 (References)

- [1] AIRD W C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I.

- Structure, function, and mechanisms [J]. *Circ Res*, 2007, 100(2): 158-73.
- [2] JAFFE EA. Cell biology of endothelial cells [J]. *Hum Pathol*, 1987, 18(3): 234-9.
- [3] WU C, DAUGHERTY A, LU H S. Updates on approaches for studying atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(4): 108-117.
- [4] SHODA T, FUTAMURA K, ORIIHARA K, et al. Recent advances in understanding the roles of vascular endothelial cells in allergic inflammation [J]. *Allergol Int*, 2016, 65(1): 21-9.
- [5] SIASOS G, TSIGKOU V, ZAROMYTIDOU M, et al. Role of local coronary blood flow patterns and shear stress on the development of microvascular and epicardial endothelial dysfunction and coronary plaque [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2018, 33(6): 638-44.
- [6] MEAMAR R, DEGHANI L, GHASEMI M, et al. Enalapril protects endothelial cells against induced apoptosis in Alzheimer's disease [J]. *J Res Med Sci*, 2013, 18(Suppl 1): S1-5.
- [7] UCCI M, DI TOMO P, TRITSCHLER F, et al. Anti-inflammatory role of carotenoids in endothelial cells derived from umbilical cord of women affected by gestational diabetes mellitus [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8184656.
- [8] MAEZAWA Y, TAKEMOTO M, YOKOTE K. Cell biology of diabetic nephropathy: Roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes [J]. *J Diabetes Investig*, 2015, 6(1): 3-15.
- [9] YAO Y, JIA H, WANG G, et al. miR-297 Protects Human umbilical vein endothelial cells against LPS-induced inflammatory response and apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(4): 696-707.
- [10] 霍迎庆, 王雷, 贺淑君, 等. 一种高效分离和培养人脐动脉内皮细胞方法的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*(HUO Y Q, WANG L, HE S J, et al. An effective method of isolation and primary culture of human umbilical arterial endothelial cells [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*), 2014, 30(7): 759-62.
- [11] LEI J, PENG S, SAMUEL S B, et al. A simple and biosafe method for isolation of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Anal Biochem*, 2016, 508: 15-8.
- [12] AIRD W C. Endothelial cell heterogeneity [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(1): a006429.
- [13] AIRD W C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds [J]. *Circ Res*, 2007, 100(2): 174-90.
- [14] Nolan D J, Ginsberg M, Israely E, et al. Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration [J]. *Dev Cell*, 2013, 26(2): 204-19.
- [15] MONAHAN-EARLEY R, DVORAK A M, AIRD W C. Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11 Suppl 1: 46-66.
- [16] ZHANG J, CHU L F, HOU Z, et al. Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived arterial endothelial cells [J]. *PNAS*, 2017, 114(30): E6072-8.
- [17] CALABRIA AR, SHUSTA EV. A genomic comparison of *in vivo* and *in vitro* brain microvascular endothelial cells [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(1): 135-48.
- [18] GERAUD C, SCHLEDZEWAKI K, DEMORY A, et al. Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1 [J]. *Hepatology*, 2010, 52(1): 313-326.
- [19] AMATSCHEK S, KRIEHLER E, BAUER W, et al. Blood and lymphatic endothelial cell-specific differentiation programs are stringently controlled by the tissue environment [J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4777-85.
- [20] WICK N, SAHARINEN P, SAHARINEN J, et al. Transcriptomal comparison of human dermal lymphatic endothelial cells *ex vivo* and *in vitro* [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 28(2): 179-92.
- [21] WANG H U, CHEN Z F, ANDERSON D J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin B2 and its receptor Eph-B4 [J]. *Cell*, 1998, 93(5): 741-53.
- [22] ARANGUREN XL, AGIRRE X, BEERENS M, et al. Unraveling a novel transcription factor code determining the human arterial-specific endothelial cell signature [J]. *Blood*, 2013, 122(24): 3982-92.
- [23] CRAMPTON S P, DAVIS J, HUGHES C C. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) [J]. *J Vis Exp*, 2007, (3): 183.
- [24] MORGAN DM. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Methods Mol Med*, 1996, 2: p.101-9.
- [25] HAUSER S, JUNG F, PIETZACH J. Human endothelial cell models in biomaterial research [J]. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(3): 265-77.
- [26] BUSCHMANN I, PRIES A, STYP-REKOWSKA B, et al. Pulsatile shear and Gja5 modulate arterial identity and remodeling events during flow-driven arteriogenesis [J]. *Development*, 2010, 137(13): 2187-96.
- [27] HIRASHIMA M, SUDA T. Differentiation of arterial and venous endothelial cells and vascular morphogenesis [J]. *Endothelium*, 2006, 13(2): 137-45.
- [28] CONWAY E M, CARMELIET P. The diversity of endothelial cells: a challenge for therapeutic angiogenesis [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(2): 207.