

大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养

许熊飞 李润平* 李 泉 刘文武 练庆林 刘 昀 孙学军 蒋春雷

(第二军医大学海医系航海医学教研室, 上海 200433)

摘要 为了建立大鼠脑微血管内皮细胞体外培养模型, 探索纯度较高的大鼠脑微血管内皮细胞分离和原代培养的方法并进行形态学观察。采用2~3周龄的SD大鼠, 解剖得到大脑皮质, 两次酶消化及牛血清白蛋白或葡聚糖和Percoll梯度离心获得较纯的脑微血管段后, 接种于涂布基质的培养皿进行原代培养; 培养的细胞采用相差显微镜形态学观察、透射电镜观察及VIII因子相关抗原免疫组化检测鉴定。结果发现, 培养12 h即可见细胞从贴壁的脑微血管段周围长出, 细胞呈短梭形, 区域性单层生长, 5~7天内皮细胞融合, 内皮细胞纯度达90%以上; 内皮细胞的贴壁和生长有赖于所涂布的基质, 纤连蛋白/IV型胶原优于鼠尾胶和明胶; VIII因子相关抗原免疫组化检测内皮细胞表达阳性, 透射电镜观察可见相邻内皮细胞间存在紧密连接结构。提示该方法能成功进行纯度较高的大鼠脑微血管内皮细胞原代培养, 可用于脑微血管内皮的生理、生化及药理学研究, 亦可用于构建大鼠血脑屏障模型。

关键词 大鼠; 脑; 内皮细胞; 原代培养

脑微血管内皮细胞是构成血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的重要成分, 与外周血管内皮细胞不同, 它具有高跨内皮阻抗(transendothelial electrical resistance, TER)、细胞间紧密连接、极少的胞饮小泡、缺乏窗孔结构以及含有选择性双向跨细胞膜转运系统等独有的特征, 从而使血脑屏障形成一个限制大多数极性分子和蛋白质运动的选择性低渗透性的屏障^[1]。由于体外培养的脑微血管内皮细胞保持了较多的其体内固有的特点^[1], 因此目前脑微血管内皮细胞体外培养模型已被广泛应用于血脑屏障的研究、脑血管疾病的病理生理及分子生物学研究、新药筛选、脑微血管内皮细胞生理生化及药理学研究等领域。而大多数体内实验采用大鼠为动物模型, 而且大鼠具有较多的细胞生物学研究所需的抗体可用, 因此进行大鼠脑微血管内皮细胞的培养具有重要的意义。自从Panula等^[2]首次成功培养大鼠脑微血管内皮细胞以来, 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, 我们发现国内的方法多以组织匀浆、两次尼龙网过滤分离脑微血管段为主^[3,4], 也有采用酶消化、梯度离心及尼龙网过滤的^[5], 但细胞得率均较低, 而近些年来国外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^[6~11]。由于原代培养中无法避免地混杂成纤维细胞、周细胞、平滑肌细胞、星型胶质细胞等其他

细胞的生长, 而且工作量大、过程繁琐且费用高^[1], 进行较纯的大鼠脑微血管内皮细胞原代培养一直是国内外的一个难点。

本文参照文献[6]、[7]、[8]的方法, 成功地摸索出大鼠脑微血管内皮细胞分离和原代培养的方法, 并获得纯度较高的脑微血管内皮细胞。

1 材料与方法

1.1 实验动物

每次实验采用10只2~3周龄SD大鼠, 雌雄均可, 体重40~60 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 试剂

纤连蛋白(fibronectin), IV型胶原, 鼠尾胶, 葡聚糖(dextran, 分子量100~200 kDa), DNA酶I (DNaseI)购自Sigma公司; D-Hanks液, PBS, 10×PBS按配方自制; II型胶原酶购自Worthington公司; 明胶, 牛血清白蛋白(BSA), HEPES购自Amresco公司; Percoll购自Pharmacia公司; DMEM(高糖)购自Gibco BRL公司; 肝素钠, NaHCO₃购

收稿日期: 2004-08-05 接受日期: 2004-10-18

国家自然科学基金(No.39900172)和第二军医大学联合攻关项目(No.200301)资助

* 通讯作者。Tel: 021-25074454, Fax: 021-65492382, E-mail: smartpli@smmu.edu.cn

自中国医药集团上海化学试剂公司;青、链霉素购自上海生工生物工程有限公司;胎牛血清(FBS)购自PAA Laboratories;碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),胶原酶/分散酶(collagenase/dispase)购自Roche公司。

1.3 试剂配制

1 mg/ml 鼠尾胶(用0.2%乙酸配制),1%明胶(用D-Hanks液配制),1%II型胶原酶(用DMEM配制,用时稀释成0.1%的浓度),1%胶原酶/分散酶(用DMEM配制,用时稀释成0.1%),15%葡聚糖(用PBS配制),20%BSA(用DMEM配制,调pH值至7.4后用0.45 μ m滤膜过滤除菌),DNaseI(用冷PBS配制成2 u/ μ l),以上试剂经0.22 μ m滤膜过滤除菌后分装保存于-20℃;50%Percoll(配12 ml,需6 ml Percoll原液,0.67 ml 10 $\times$ PBS,0.4 ml FBS,4.93 ml PBS);DMEM培养液(含4000 mg/L D-葡萄糖,4 mmol/L L-谷氨酰胺,添加3.7 g/L NaHCO₃,20 mmol/L HEPES,肝素钠100 mg/L,100 u/ml青霉素,100 μ g/ml链霉素),pH值调至7.4,过滤除菌后分装保存于4℃,用时加入20%FBS,1 ng/ml bFGF。

1.4 培养皿处理

涂布3种不同的基质:培养前一天加入1 ml 1%明胶于35 mm塑料培养皿,置于37℃培养箱过夜,接种前用D-Hanks液漂洗2次;接种前4 h,加入6~10 μ g/cm²鼠尾胶,在密闭的器皿里用氨气熏5~10 min后,置于室温1~2 h晾干后,用D-Hanks液漂洗2次;50 μ l 0.1%纤连蛋白、50 μ l 1 mg/ml IV型胶原和400 μ l双蒸水混合后,加入到每个培养皿中涂布均匀后吸出,可涂布10个培养皿,置于37℃培养箱1~2 h晾干后,用D-Hanks液漂洗2次。

1.5 脑微血管段的分离与脑微血管内皮细胞原代培养

大鼠颈椎脱臼处死后浸泡于75%乙醇中消毒3~5 min后断头置于玻璃培养皿中,打开颅腔后取出全脑置于盛有冷D-Hanks液的玻璃培养皿中解剖去除小脑、间脑(包括海马),随后将大脑半球在干滤纸上缓慢滚动以吸除软脑膜及脑膜大血管后置于新的含冷D-Hanks液玻璃培养皿中,用细解剖镊去除大脑白质、残余大血管和软脑膜,保留大脑皮质,用D-Hanks液漂洗3次后,加入1 ml DMEM培养液,用虹膜剪将其剪碎成1 mm³大小,加入0.1% II型胶原酶(含30 u/ml DNaseI,1 ml/大脑)混匀后37℃水浴消化1.5 h,离心(1000 r/min,8 min,室温),去上清液,加入20%BSA悬浮混匀后离心(1000 g,20 min,4℃)或加入15%葡聚

糖悬浮混匀后离心(4000 r/min,20 min,4℃),去除中上层神经组织及大血管,保留底部沉淀,加入2 ml 0.1%胶原酶/分散酶(含20 u/ml DNaseI)悬浮混匀后37℃水浴消化1 h,离心(1000 r/min,8 min,室温),去上清液,加入2 ml DMEM培养液悬浮后铺于经离心形成连续梯度的12 ml 50% Percoll(25 000 g,60 min,4℃),离心(1000 g,10 min,4℃),靠近底部的红细胞层之上的白黄色的层面即为纯化的微血管段,吸出后用DMEM漂洗两次(离心1000 r/min,5 min,室温),去上清液,加入DMEM完全培养液(含20%FBS,100 μ g/ml肝素钠)悬浮后接种于涂布基质的35 mm一次性塑料培养皿(1.5 ml/培养皿,可接种1个培养皿/大脑),置于37℃、5%CO₂培养箱内静置培养,12~24 h后换液,并加入1 ng/ml bFGF,随后隔天换液。

1.6 倒置相差显微镜观察细胞

于接种当时、6 h、12 h后及其之后每天在倒置相差显微镜下观察细胞贴壁、生长情况及其形态,并摄像。

1.7 VIII因子相关抗原免疫组织化学检测

培养第6天的大鼠脑微血管内皮细胞用0.01 mol/L PBS简单漂洗后,4%多聚甲醛固定30 min。按照DakoCytomation公司EnVision法说明书进行VIII因子相关抗原的检测。一抗为兔抗人VIII因子相关抗原多克隆抗体(DakoCytomation公司产品)(1:200),对照组为PBS;二抗为EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit(DakoCytomation公司产品)二抗系统。DAB显色后用90%甘油封片,光学显微镜下观察内皮细胞染色情况。

1.8 透射电镜观察细胞

培养第6天的内皮细胞用细胞刮刀刮下后离心收集去上清液后用4%多聚甲醛浸泡固定4 h,1%锇酸4℃后固定2 h,再经逐级浓度酒精脱水,EPON-812包埋,包埋的细胞块用LKB3型超薄切片机切片,切片经铀铅片染后在日立H-800型透射电镜下观察拍片。

2 结果

2.1 细胞形态观察

接种当时可见由圆形的内皮细胞构成的呈单枝状或分枝状的脑微血管段,并可见散在的单细胞及组织碎片(图1-1);培养12~24 h后可见培养的细胞从贴壁的微血管段周围长出,细胞呈短梭形,区域性单层生长,经换液后微血管段的残余部分不断减少,成纤维细胞、周细胞等杂细胞含量较少;随着培养时间的延长,内皮细胞不断增殖,可见“旋

涡状”分布,大约5~7天细胞达到融合,短梭形的内皮细胞占90%以上,但可见少量周细胞等杂细胞生长于内皮细胞单层表面或细胞克隆间隙(未示)。细胞生长过程见图1,细胞接种于纤连蛋白/IV型胶原涂布的培养皿。

2.2 涂布不同基质的细胞生长情况

明胶及鼠尾胶涂布的培养皿微血管段贴壁时间较长,6 h可见少量微血管段贴壁但无内皮细胞长出,12~24 h可见一些内皮细胞长出,24 h后脑微血管段完全贴壁并有较多的内皮细胞长出,两者无明显差异(图2-1,图2-2);纤连蛋白/IV型胶原涂布的培养皿培养后6 h即可见微血管段贴壁并有一些内皮细胞长出,12~24 h内基本完全贴壁并有较多的内皮细胞长出(图2-3,图2-4)。

2.3 免疫组化

VIII因子相关抗原免疫组化检测可见培养的脑微血管内皮细胞的胞浆及核周有棕黄色着色,胞核呈空泡状结构(图2-5);对照染色为阴性。

2.4 透射电镜观察

可见内皮细胞完整的细胞膜,线粒体、内质网等细胞器,相邻细胞间可见接触平直且局部融合的“紧密连接”(图2-6)。

3 讨论

我们采用两次酶消化、梯度离心分离得到脑微血管段,探索各种不同的培养条件,成功地进行较纯的大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养,内皮细胞纯度可达90%以上,而且细胞得率较高,10只动物可培养8~10个35 mm一次性塑料培养皿,培养面积大约80~100 cm²,与国内的一些方法^[3-5]相比,细胞得率有明显的提高。

由于新生鼠易于混有较多的杂细胞且大脑较小以及哺乳期大鼠优于超过1月龄的大鼠^[9],我们采用2~3周龄哺乳期的SD大鼠作为培养材料。脑微血管内皮细胞原代培养的关键是首先分离获得纯度较高且活力好的脑微血管段。在解剖过程中仔细去除软脑膜、大血管及大脑白质收集大脑皮质,可减少成纤维细胞和平滑肌细胞的生长,对于提高内皮细胞的纯度具有重要意义。由于胶原酶对内皮细胞的损伤较小,我们采用0.1% II型胶原酶消化剪碎后的大脑皮质分散组织,同组织匀浆法^[3,12]相比,酶消化法可避免组织匀浆对内皮细胞的损伤,从而有利于提高细胞的活力。经胶原酶消化后采用20% BSA或15%葡聚糖离心可分离脑微血管段与神经组织及大血管,得到底层的脑微血管段,这种方法被广泛应用于脑微血管段的分离^[5-11],我们发现20%

BSA较15%葡聚糖而言,其分离获得的脑微血管段数量更多,而且脑微血管段状态更好更易贴壁生长。由于周细胞是脑微血管内皮细胞原代培养中最常见的杂细胞,它会明显抑制内皮细胞的生长^[7],因此原代培养中应尽量减少周细胞的数量,我们采用两次酶消化方法^[7],控制两次酶消化的时间,用0.1%胶原酶/消化酶分散出内皮细胞外围的周细胞,最后采用一定浓度的连续梯度的Percoll分离以去除周细胞和红细胞得到较纯的脑微血管段。在酶消化过程中加入适量的DNA酶可分散消化过程中释放的DNA所引起的微血管段凝块,有利于增加微血管段的得率。对于Percoll离心,我们尝试了3个浓度(33%、45%及50%)后发现,浓度越大,脑微血管段离靠近离心管底的红细胞及周细胞越远,分离效果也越好,因此采用50%Percoll效果最好,并且最好采用水平转头的低温离心机以提高离心效果。内皮细胞纯化的其他方法有机械刮除法、克隆培养法、FACS分类法^[13]、Thy1.1免疫反应杀伤法^[7,14]、采用血浆来源的胎牛血清^[8]、磁珠结合法^[9]等,但是我们发现机械刮除法和克隆培养法并不适合大鼠脑微血管内皮细胞的纯化,因为原代内皮细胞传代后状态不佳且易被杂细胞所抑制^[7],而后面几种方法比较昂贵不予推荐;血浆来源的胎牛血清不含PDGF,不促进杂细胞的生长,但是其较昂贵,可选择胎牛血清用于原代培养。

脑微血管内皮细胞的原代培养需要涂布明胶、鼠尾胶、纤连蛋白等基质以利于脑微血管段贴壁和内皮细胞的生长。我们尝试不同基质后发现其对脑微血管段的贴壁和内皮细胞的生长作用不同,纤连蛋白/IV型胶原优于鼠尾胶,而鼠尾胶比明胶好,而且接种密度的要求前者比后两者要低,后两者需要达到一定密度才有利于脑微血管段贴壁。另外我们发现内皮细胞不易生长于玻片上,而较易生长于塑料培养皿上,这与文献报道基本相符^[8,14]。内皮细胞生长需要添加内皮细胞生长因子以促进内皮细胞的增殖抑制杂细胞的生长,我们采用bFGF可有效促进内皮细胞的生长,同时添加100 μg/ml肝素协同bFGF的作用并可抑制平滑肌细胞的生长^[9]。同时为了保证内皮细胞的营养,并去除脑微血管段的残余碎片,我们采用20%FBS的血清浓度并隔天换液。

我们培养的脑微血管内皮细胞呈短梭形,区域性单层生长,随着培养时间的延长及内皮细胞的增殖,可见“旋涡状”分布,约5~7天后,各区域之间可逐渐融合,其形态和生长特点与大多数文献报道相似^[6-11]。根据内皮细胞的短梭形的形态特

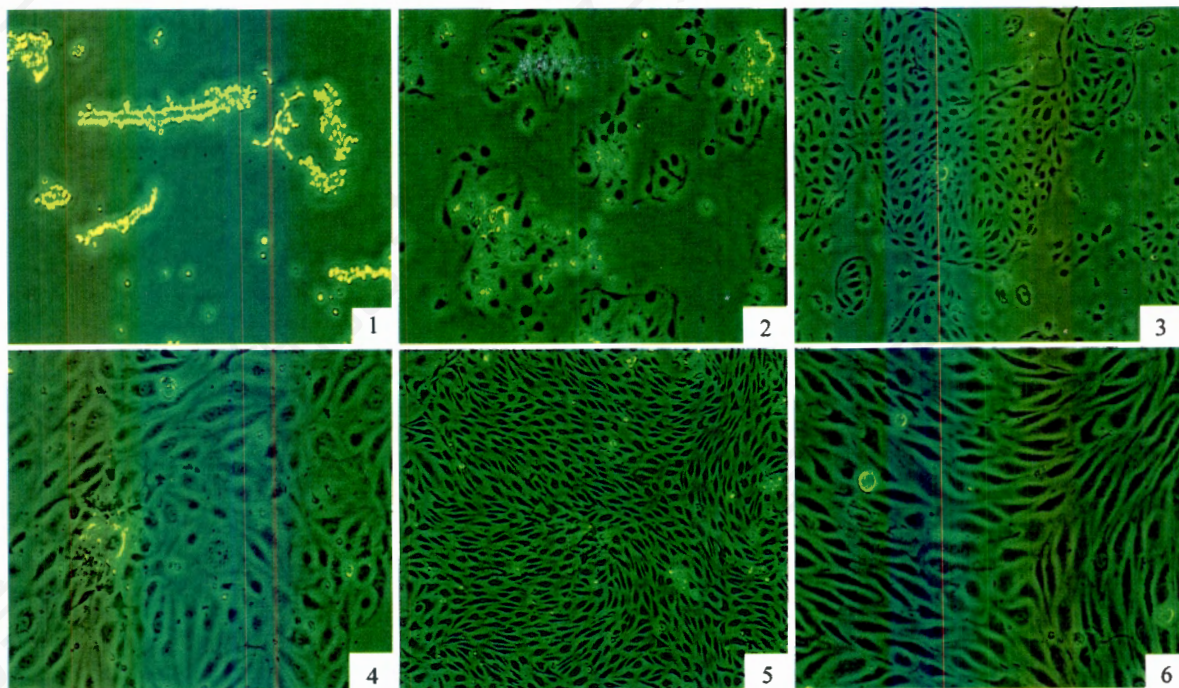


图1 大鼠脑微血管内皮细胞原代培养过程中的生长与形态变化

1:接种后当时,可见单枝状及多枝状脑微血管段, $\times 100$; 2:培养12 h后,可见内皮细胞从贴壁的微血管段游离长出, $\times 100$; 3:培养第4天,细胞不断增殖,呈短梭形,单层生长, $\times 40$; 4:培养第4天,同3, $\times 100$; 5:培养第7天,细胞单层达到融合,可见“旋涡状”分布, $\times 40$; 6:培养第7天,同5, $\times 100$ 。

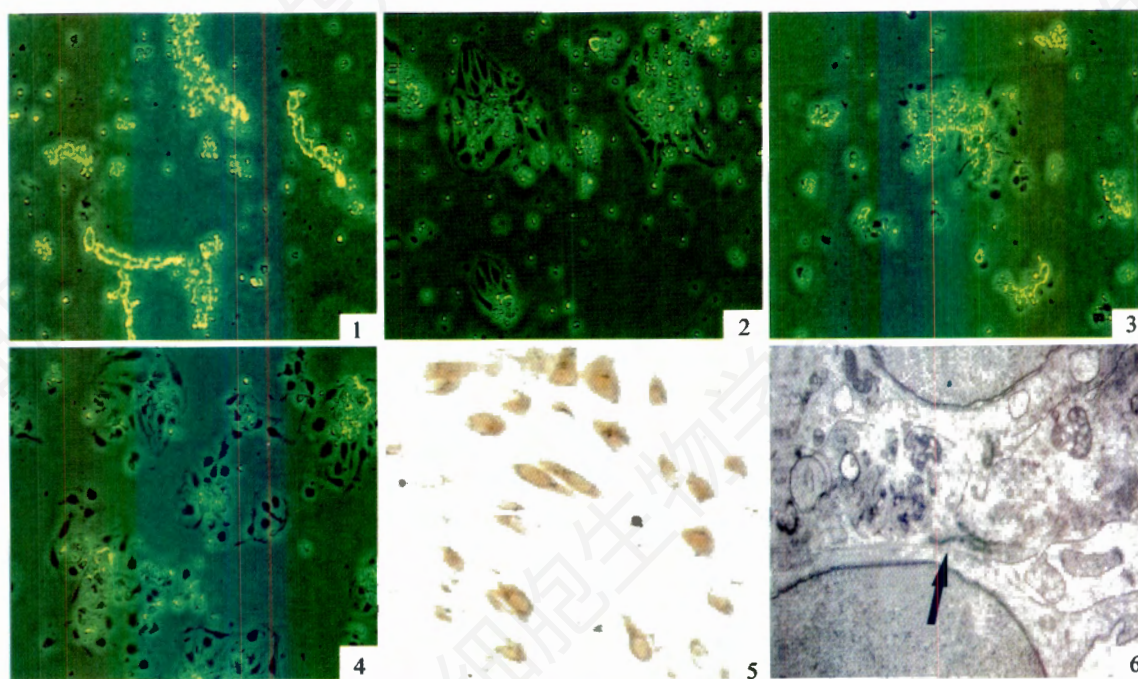


图2 两种不同基质下内皮细胞的贴壁和生长情况、免疫组化及透射电镜图片

1:1%明胶涂布的培养皿接种后6 h,可见少量微血管段贴壁不牢, $\times 100$; 2:1%明胶涂布的培养皿接种后12 h,可见一些内皮细胞游离长出, $\times 100$; 3:纤连蛋白/IV型胶原涂布的培养皿接种后6 h,可见一些微血管段贴壁并有内皮细胞游离长出, $\times 100$; 4:纤连蛋白/IV型胶原涂布的培养皿接种后12 h,可见大多数微血管段贴壁及内皮细胞游离长出, $\times 100$; 5:Ⅷ因子相关抗原免疫组化检测,可见内皮细胞胞浆及核周有棕黄色着色,胞核呈空泡状结构, $\times 100$; 6:透射电镜检测,可见细胞间接触平直,局部融合,箭头示局部融合的“紧密连接”, $\times 8000$ 。

点、VIII因子相关抗原表达阳性及内皮细胞间紧密连接结构可鉴定我们所培养的细胞确为脑微血管内皮细胞^[3,5,8]。

我们的大鼠脑微血管内皮细胞体外培养模型的建立,对于研究脑内皮的生理、生化及药理研究是一个较好的工具,同时可与星型胶质细胞共培养用于构建血脑屏障模型^[1]。相信随着技术方法的不断改进,脑微血管内皮细胞体外培养模型将逐渐接近于其在体特征,并被广泛应用于相关研究^[1]。

衷心感谢匈牙利科学院生物物理研究所分子神经生物学实验室 Maria A. Deli 教授和原中国科学院脑研究所鲍璐教授对本研究的悉心指导和帮助;感谢第二军医大学长海医院病

理科倪灿荣老师协助进行免疫组化检测以及第二军医大学电镜室协助进行透射电镜检测。

参考文献 (References)

- [1] Grant GA *et al.* *News Physiol Sci*, 1998, **13**: 287
- [2] Panula P *et al.* *Experientia*, 1978, **34**: 95
- [3] 王建民等. *解剖学杂志*, 1998, **21**: 495
- [4] 许彦钢等. *微循环技术杂志*, 1997, (2): 63
- [5] 钱志远等. *细胞生物学杂志*, 1999, **21**: 42
- [6] Kis B *et al.* *Neuroreport*, 2001, **12**: 4139
- [7] Szabo CA *et al.* *Neurobiology (Bp)*, 1997, **5**: 1
- [8] Abbott NJ *et al.* *J Cell Sci*, 1992, **103**: 23
- [9] Gordon EL *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, **27A**: 312
- [10] Rupnick MA *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol*, 1988, **24**: 435
- [11] Ichikawa N *et al.* *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1996, **36**: 45
- [12] Diglio CA *et al.* *Lab Invest*, 1982, **46**: 554
- [13] Scott PA *et al.* *J Cell Sci*, 1993, **105**: 269
- [14] Domotor E *et al.* *Neurochem Int*, 1998, **33**: 473

Isolation and Primary Culture of Rat Cerebral Microvascular Endothelial Cells

Xiong-Fei Xu, Run-Ping Li*, Quan Li, Wen-Wu Liu, Qing-Lin Lian, Yun Liu, Xue-Jun Sun, Chun-Lei Jiang
(Department of Nautical Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract To establish rat cerebral microvascular endothelial cells (RCMEC) culture model, we developed a method for isolation and primary culture of RCMEC and observed the morphology of endothelial cells. After relatively pure cerebral microvessel fragments were obtained from 2–3 weeks old SD rats by careful dissection, two steps of enzyme digestions and gradient centrifugation with BSA or dextran and Percoll, they were seeded on dishes coated with the substrata. RCMEC were identified according to the morphology of the cultured cells, immunocytochemistry of factor VIII-associated antigen and transmission electron microscopy. We found that the cultured cells began to migrate from microvessel fragments after 12 hours, showed the spindle-shaped morphology and reached the monolayer confluence after 5–7 days. Attachment and growth of the cultured cells depended on the substrata provided and fibronectin/type IV collagen was superior to collagen from rat tail and gelatin. The cultured cells had factor VIII-associated antigen and showed tight junction-like cell-cell appositions at the electron microscopic level. The results indicated that relatively pure primary culture of RCMEC was successfully established using this method and the model system could be applicable to the studies of physiology, biochemistry and pharmacology of the brain endothelium and could also be used to develop an in vitro model of the rat blood-brain barrier.

Key words rat; brain; endothelial cells; primary culture

Received: August 5, 2004 Accepted: October 18, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39900172) and Joint Research Fund of Second Military Medical University (No.200301)

*Corresponding author. Tel: 86-21-25074454, Fax: 86-21-65492382, E-mail: smartrppli@smmu.edu.cn