

运用植块法培养脑微血管内皮细胞

祝慧凤 万 东¹ 王建伟² 罗 勇¹ 徐晓玉*(西南大学药学院暨中药学院, 重庆 400716, ¹重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016;²重庆医科大学组胚教研室, 重庆 400016)

摘要 探讨简易可行的脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)培养方法, 为研究 BMECs 细胞在脑血管疾病中的重要作用提供技术支持。分离出生后 1~7 天内的 SD 乳鼠大脑皮质区, 植块法培养 BMECs 细胞。用倒置显微镜观察 BMECs 细胞的形态以及从皮质块迁出的过程; MTT 比色法检测 BMECs 细胞的生长曲线; 采用免疫组化染色检测 VIII 因子相关抗原和 CD34 抗原, 以鉴定内皮细胞。结果发现, 大脑皮质块植块法培养的大鼠 BMECs 细胞呈单层贴壁生长, 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, 经鉴定为内皮细胞, 第三代纯度达 95% 以上。提示该方法具有经济、简便、要求条件不高, 易于纯化的优点, 可作为大鼠 BMECs 细胞体外培养的良好模型。

关键词 大鼠; 脑微血管内皮细胞; 植块培养

内皮细胞是缺血缺氧性损伤的重要靶标, 其结构和功能的改变, 在血管性疾病的发生发展过程中具有重要作用。特别是在心、脑血管疾病中, 内皮细胞的作用更受到重视。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, 将为建立 BMECs 离体模型提供良好的支撑, 利于深入研究 BMECs 的生理、病理、病生以及药物作用机制。本研究运用植块法培养 BMECs, 与国内目前培养 BMECs 方法不同, 旨在探讨一种简易可行的 BMECs 培养方法。

1 材料与方

1.1 实验动物

1~7 日龄 Sprague-Dawley 乳鼠, 体重 5~18 g, 购自重庆医科大学实验动物中心, 合格证号: 检动字 2002A040。

1.2 试剂

RPMI1640 购自 Gibco BRL 公司; 明胶、琼脂糖、L-谷氨酰胺购自 Sigma 公司; NaHCO₃ 分析纯购自中国上海虹光化工厂; 青霉素购自华北制药股份有限公司; 链霉素购自上海生工生物工程有限公司; 肝素钠购自江苏万邦生化医药股份有限公司; 胎牛血清(FCS)购自美国 Hyclone 公司; 兔抗人 VIII 因子相关抗原多克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司; CD34 小鼠单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; FITC 标记羊抗小鼠 IgG(二抗)、SABC 羊抗兔二抗试剂盒和

DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.3 试剂配制

1% 明胶(用 0.02 mol/L PBS 液配制)高压蒸汽消毒后于 4 °C 保存; RPMI1640 完全培养液主要成分: 4 mmol/L L-谷氨酰胺、90 U/ml 肝素钠、100 U/ml 青霉素、100 µg/ml 链霉素和 3.7 g/L NaHCO₃, 配制后调 pH 7.4, 经 0.22 µm 滤膜过滤除菌后分装, -20 °C 保存备用, 用时加入 20% FBS, 于 4 °C 保存。

1.4 培养瓶处理

植块原代培养前一天用 1% 明胶包被瓶底, 4 °C 冰箱过夜。培养前取出, 用生理盐水洗 2 遍, 加入少许 RPMI1640 完全培养液放入培养箱, 植块植入时, 倾去培养液, 加少许 FBS, 利于植块黏附。

1.5 植块法原代培养 BMECs

主要步骤如下: ①获取大脑: 取 2 只出生 7 天内的大鼠乳鼠, 颈椎脱臼处死, 投入 75% 酒精中 30 s~1 min 后取出, 无菌操作下取出鼠脑, 放入 4 °C 预冷的生理盐水中; ②分离大脑皮质: 将鼠脑放在铺有 4 °C 预冷琼脂糖凝胶(起支撑作用)和生理盐水的培养皿中, 用消毒眼科镊仔细剥离脑组织表面血管, 小心分离大脑皮质, 再用 4 °C 预冷的生理盐水反复冲洗大脑

收稿日期: 2006-12-18 接受日期: 2007-02-06

国家自然科学基金(No.30070915), 重庆市科委应用基础研究项目(渝科发计字[2002]18-99)资助

* 通讯作者。Tel: 023-68485275, Fax: 023-68251225, E-mail: xxy0618@sina.com.cn

皮质; ③制备植块: 配制3%琼脂糖凝胶, 4℃预冷后切成2 cm × 1 cm × 1 cm的琼脂糖块, 将大脑皮质平铺于琼脂糖块表面, 用间距为0.8 mm的双层双面刀片(中间用折叠小纸片隔开以确保两张刀片的间距)纵、横垂直切断脑皮质, 制备大小约0.8 mm × 0.8 mm的大脑皮质块(植块); ④植入植块: 将制备的植块放入盛有4℃预冷的生理盐水小培养皿中, 洗涤2次, 用巴氏管吸取植块分别放入3~4个1%明胶包被的25 ml培养瓶中, 每个培养瓶中植入8~10块; ⑤内皮细胞原代培养: 将植入植块的培养瓶于37℃, 5%CO₂、95%O₂的培养箱培养中干贴2 h后, 加入少许内皮细胞培养液, 继续培养60 h, 取出植块, 继后每2~3天半量换液1次, 直至细胞单层长满培养瓶底, 进行传代培养。

1.6 BMECs 传代培养

用2 ml 0.25%胰蛋白酶溶液消化细胞, 实时镜下观察, 见大部分细胞变圆并漂浮, 立刻加入2 ml新鲜培养液(含15% FCS、2 mmol/L-谷氨酰胺、50 U/ml肝素、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素)终止消化, 并将细胞悬液移入玻璃离心管中, 1 000 r/min离心5 min; 弃上清液, 用新鲜培养液重悬细胞, 按5 × 10⁵个/ml的浓度接种于1%明胶包被的培养瓶中培养。

1.7 倒置相差显微镜观察细胞

于原代接种0 h、12 h、24 h、48 h、60 h及其之后每天在倒置相差显微镜下观察细胞从植块迁移情况, 细胞大小、形态、生长特点及排列方式等。

1.8 BMECs 的鉴定

1.8.1 免疫荧光标记CD34抗原鉴定BMECs 将第3代对数生长期的细胞悬液稀释至浓度为1 × 10⁴个/ml, 接种到预先放有盖玻片的24孔板中; 培养2~3天后, 取出盖玻片, 用0.02 mol/L PBS漂洗3次, 每次5 min, 4%多聚甲醛室温固定20 min, 再用0.02 mol/L PBS漂洗3次, 每次5 min; 正常山羊血清室温封闭30 min; 滴加CD34一抗工作液, 置湿盒中4℃过夜; PBS漂洗后, 滴加FITC标记的羊抗小鼠IgG工作液, 置湿盒中37℃温育30 min; PBS漂洗后, 50%甘油封片, 荧光显微镜下观察并摄像。阴性对照为0.02 mol/L PBS液代替一抗工作液, 其余步骤相同。

1.8.2 免疫细胞化学检测VIII因子相关抗原鉴定BMECs 按照1.8.1的方法制备细胞爬片并固定, PBS漂洗后进行SABC法免疫细胞化学染色。正常

山羊血清封闭后, 滴加1:200稀释的兔抗人VIII因子多克隆抗体, 4℃过夜; PBS漂洗后, 滴加生物素化羊抗兔IgG工作液, 37℃温育60 min; PBS漂洗, 滴加SABC复合物, 37℃温育30 min; PBS漂洗4次后, 行DAB显色, 常规脱水、透明、封片后, 镜下观察并摄像。阴性对照设立同1.8.1的方法。

1.8.3 BMECs纯度的鉴定 采用1.8.2的方法标记BMECs, 显微镜下观察, 以胞浆内有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。在400倍镜下分别计数3个盖玻片上各5个视野的阳性细胞数和总细胞数, 计算阳性细胞的百分比, 代表BMECs纯度。

1.9 MTT比色法检测BMECs生长曲线

将第3代微血管内皮细胞以10⁴个/ml浓度同时接种于12块96孔板, 每孔接种200 μl, 复种6孔, 每天收集一块96孔板将培养液吸去, 1 000 r/min离心2 min, 弃上清液, 每孔加入200 μl无血清培养液及20 μl MTT, 继续培养4 h。1 000 r/min离心2 min, 弃原液, 每孔加入200 μl二甲亚砜(DMSO), 震荡5 min, 在Bio-Rad 550全自动酶标仪中选择570 nm波长测各孔光吸收值(A值)。重复实验3次。

1.10 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS13.0统计软件处理, 组间差异采用t检验, 检验水准双侧 $\alpha=0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

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, 血细胞便从边缘向四周游出; 培养24 h, 可见较多内皮样细胞迁出, 同时可见到部分迁出的神经元及其伸出的突起(图1); 培养48 h, 可见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(图2); 随着时间的延长, 植块变薄, 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, 部分形成管腔样结构, 培养10~14天铺满瓶底(图3)。

此外, 在内皮管腔样结构内可见生长状态良好的神经元。传代后的内皮贴壁快, 随着传代次数的增加, 内皮细胞逐渐得到纯化, 形态以梭形、多角形、三角形、四边形为多, 至第3代时, 形态以梭形、多角形为主(图4), 血细胞和神经元在传代过程中被去除。

2.2 BMECs 细胞鉴定结果

免疫细胞化学 SABC 法检测内皮细胞标志物Ⅷ因子相关抗原, 可见第 3 代 BMECs 胞浆内有明显的黄棕色颗粒沉积, 胞核未着色, 高倍镜下可见胞浆内丝状结构, 呈放射状分布; 经免疫细胞化学鉴定, 内

皮纯度达 95% 以上(图 5)。免疫荧光标记检测 CD34 抗原, 可见培养第 3 代细胞胞浆内显示明显绿色荧光, 进一步证实为血管内皮细胞(图 6)。

2.3 BMECs 生长曲线

MTT 比色分析结果显示, BMECs 在第 2 天有所

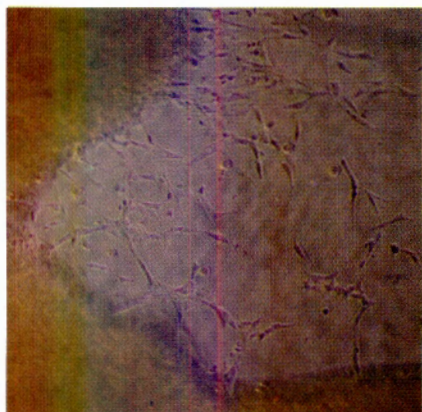


图 1 植块培养第 1 天见 BMECs 从植块迁出(20 ×)

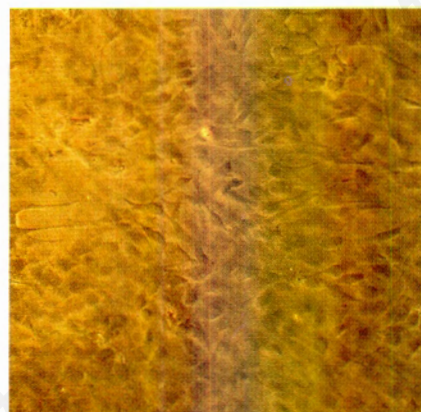


图 4 传至第 3 代的 BMECs 得到纯化(20 ×)

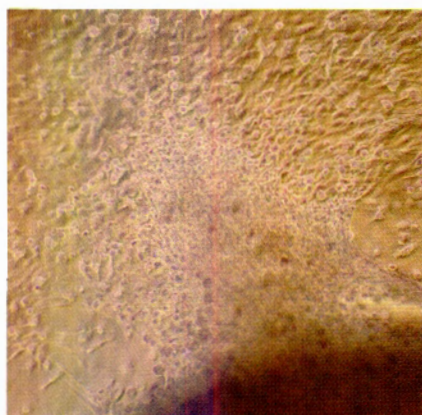


图 2 植块培养第 2 天迁出的 BMECs 明显增加(20 ×)

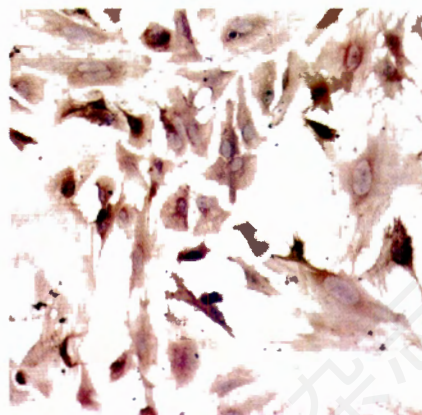


图 5 Ⅷ因子相关抗原阳性鉴定为内皮细胞(20 ×)

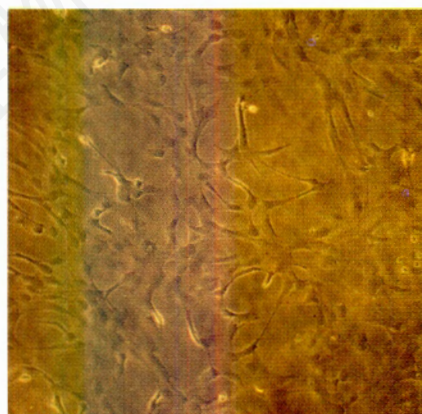


图 3 移出植块后 6 天 BMECs 生长良好(20 ×)

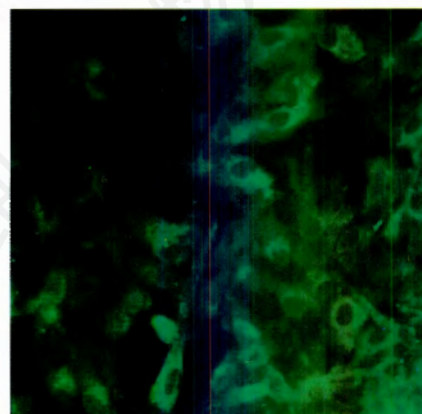


图 6 FITC 标记 CD34 抗原阳性鉴定为内皮细胞(20 ×)

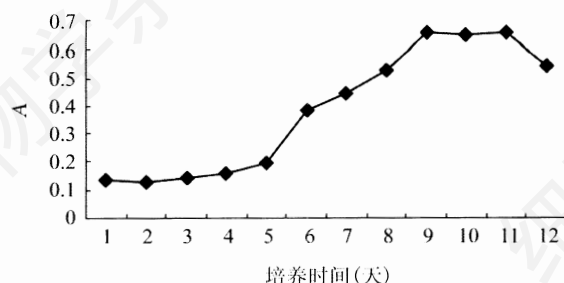


图7 BMECs生长曲线(MTT法)

下降,之后加速生长;第6天处于对数生长期,与1~5天组比较有显著差异($P<0.05$);第10天生长进入平台期;12天后细胞数开始下降,见图7。

3 讨论

内皮细胞不仅是一种细胞,而且是一种内分泌器官。BMECs以星形胶质细胞为桥梁,与神经元进行对话与信息交流(cross talking),发挥着重要作用。既往对内皮细胞在中枢神经系统(CNS)中的作用重视程度不够,随着脑保护策略中“血管神经单元(neurovascular unit)”概念的提出及对脑血管疾病研究的深入,神经元、胶质细胞与脑微血管内皮细胞的伙伴关系,日益受到重视。“血管神经单元”旨在细胞水平整合神经元、胶质细胞、BMECs以及其他基质细胞的相互作用,将其作为脑的结构和功能单元来进行研究并加以保护^[1]。因此研究更好获取原代培养脑微血管内皮细胞的方法,将为离体研究神经元、胶质细胞等与内皮细胞的关系提供技术手段。

我们课题组曾经尝试过组织匀浆、两次尼龙网过滤分离脑微血管段以及酶消化、低分子右旋糖酐梯度离心和尼龙网过滤培养BMECs的方法^[2,3],但上述方法程序较复杂,难以获得数量多且状态好的脑微血管段;此外,还需昂贵的内皮生长添加物,且细胞纯化亦是一个难以解决的关键问题。目前采用的内皮细胞纯化方法均不十分令人满意。如机械刮除法增加污染机会^[4,5];原代内皮细胞传代纯化,容易被其他存活力旺盛的细胞所抑制;免疫磁珠法太昂贵等。国外的培养方法更加繁琐,条件更加苛刻,国内研究条件不能满足要求^[6]。因此寻找简易可行的获取BMECs的培养方法成为必要。

我们采用植块法成功培养出高纯度的脑微血管内皮细胞。取出生后7天内乳鼠皮质块,摒弃含胶

质细胞丰富的胼胝体和皮层下灰质块等组织,既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。我们摸索发现,只要在72 h内取走植块,极少混杂成纤维细胞,同时在培养的初始阶段,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,这可能是植块法培养BMECs不需要昂贵的培养条件的原因之一。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,这可能与内皮分泌的因子(如血管内皮生长因子、促红细胞生成素)有利于其生长和存活有关^[7],但神经元传代后很快死亡,从而使内皮细胞得到纯化。本研究显示植块法培养BMECs不需使用昂贵的内皮生长因子及其添加物,也不需要使用昂贵的胶原酶和对细胞有毒性的胰蛋白酶,且无需组织剪碎、匀浆、过滤等复杂程序,具有经济、简便、要求条件不高,易于纯化的优点。

采用植块法培养BMECs应注意以下要点:①植块培养前培养瓶的处理。脑组织含脂类较多,质量轻,明胶和少量血清的包被有助于组织块的黏贴;②培养过程中需选择质量较好的血清,并添加肝素和谷氨酰胺。植块法没有额外使用内皮生长添加物,所以血清质量要求较高,以提供一些因子,支持内皮的迁移和生长,本研究采用的Hyclone胎牛血清能满足培养的要求。另外,肝素和谷氨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;④足够的细胞数量是保证传代成功的必要条件。细胞之间的相互联系可以相互支持生长,当部分组织块周围细胞密集、重叠,停止增殖时,即使整瓶细胞未达到传代标准,仍可用酶消化,吹散密集细胞,将几瓶合并,可以解决细胞数量不足,不利于传代生长的难题。⑤避免细菌污染。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,因此操作中要特别注意无菌操作和抗生素的使用,以减少甚至避免污染。

参考文献(References)

- [1] Iadecola C. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5: 347
- [2] 鲍欢等. *苏州大学学报(医学版)*, 2004, 24: 657
- [3] 许鹏飞等. *细胞生物学杂志*, 2005, 27: 84
- [4] 钱志远等. *细胞生物学杂志*, 1999, 21: 42
- [5] 陈彬等. *卒中与神经疾病*, 2005, 12: 80
- [6] Szabo CA et al. *Neurobiology (Bp)*, 1997, 5: 1
- [7] Jin K et al. *J Neurobiol*, 2006, 66: 236

Explant-culture Method to Culture Rat Brain Microvascular Endothelial Cells

Hui-Feng Zhu, Dong Wan¹, Jian-Wei Wang², Yong Luo¹, Xiao-Yu Xu*

(The School of Pharmaceutical Sciences & School of Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400716, China;

¹Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Department of Histology and Embryology of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To explore rat brain microvascular endothelial cells (RBMECs) culture model, we used cortex explant to culture RBMECs and observed the morphology of endothelial cells. After relatively pure cortex explant were obtained from 24 h to 1 weeks old SD rats by careful dissection, cortex explants were putted into the culture flask coated by 1% gelatin. After 2 h cultured in 37 °C, 5%CO₂ incubator, we move a bit of RPMI 1640 culture solution into the culture flask including 90 U/ml heparin sodium, 20% fetal calf serum (FCS), 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 4 mmol/L Gln-glutamine and continue to culture. 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. Attachment and growth of the cultured cells were depended on the substrata gelatin provided and high-quality FCS. Immunocytochemistry demonstrated more than 95% of the third generation cultured cells were positive for VIII factor associated antigen and CD34 antigen, which indicated the cultured cells were vascular endothelial cells. The results indicated that relatively pure cortex explant of primary culture of RBMECs was successfully established, which is more simple and cheap than other methods. 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 the studies of pathophysiology of cerebrovascular disease.

Key words rat; brain microvascular endothelial cell; explant-culture

Received: December 18, 2006

Accepted: February 6, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070915) and the Application Basic Research Program of Chongqing Science & Technology Commission (No.2002-18-99)

*Corresponding author, Tel: 86-23-68485275, Fax:86-23-68251225, E-mail: xxy0618@sina.com.cn