

大鼠脑微血管内皮细胞培养及其药物转运体

Oatp2 和 P-gp 的表达

郭 艺 蒋 莉* 刘官信 陈恒胜

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014)

摘要 贴块法培养脑微血管内皮细胞(BMECs), 倒置显微镜动态观察细胞生长及形态, VIII因子相关抗原、CD34免疫细胞化学联合鉴定细胞并确定纯度。免疫细胞化学和 Western 印迹法检测药物转运体有机阴离子转运多肽亚型 2(Oatp2)及 P-糖蛋白(P-gp)在培养内皮细胞上的表达。结果显示, 获得的 BMECs 呈多角形或铺路石形, 单层贴壁生长; 培养细胞 VIII 因子相关抗原免疫细胞化学、CD34 免疫荧光染色均为阳性, 细胞纯度 90%; 培养细胞有 Oatp2 及 P-gp 表达, 且二者均主要表达于 BMECs 细胞膜。提示贴块法可获得原代培养 BMECs, 方法简便易行, 细胞纯度较高。原代培养的 BMECs 上有药物转运体 Oatp2 及 P-gp 的表达, 为血脑屏障上药物转运体的体外研究提供了可能途径。

关键词 大鼠; 脑微血管内皮细胞; 原代培养; 有机阴离子转运多肽亚型 2; P-糖蛋白

脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)是血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的主要组成部分, 具有特殊的形态及功能, 是各种生理、病理因素作用的靶细胞。由于体外培养的 BMECs 保持了较多的体内固有特点, 因此 BMECs 体外培养模型已被广泛应用于 BBB、脑血管疾病的病理生理及分子生物学、药理学研究等领域。目前国内关于 BMECs 的分离和培养均有较多报道, 但均不同程度地存在着细胞得率低, 杂细胞污染, 步骤繁琐, 耗费高等缺点。本组根据自己实验室的条件, 运用组织块法, 根据组织块细胞迁出速率差异, 总结出大鼠 BMECs 分离和原代培养的方法, 并获得纯度较高的 BMECs, 同时检测到培养细胞表达转运载体蛋白: 有机阴离子转运多肽亚型 2(organic anion transporting polypeptide2, Oatp2)及 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级出生不超过 7 天的 Wistar 新生大鼠, 雌雄不限, 购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要仪器、试剂 振动切片机(NVSLM1型, WPI 公司); M199 培养基(Hyclone 公司); 胎牛血清(FBS, PAA 公司); 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, Santa Cruz 公司); Oatp2 单抗(ADI 公司); P-gp 单抗

(Chemicon 公司); VIII 因子相关抗体、CD34 抗体(中杉公司); 免疫组化 SABC 试剂盒(博士德公司); RIPA 裂解液(碧云天公司); ECL 化学发光试剂(上海生工)。

1.1.3 培养液配制 以 M199 培养液(含 4 000 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 50 U/ml, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml, pH 值调至 7.4, 过滤除菌后分装保存于 4 °C)为基础培养基。A 液: 基础培养基加入 10%FBS; B 液: 基础培养基加入 20%FBS, 10 ng/ml bFGF。

1.2 方法

1.2.1 培养瓶处理 培养前一天加入 1 ml 1% 明胶(用 D-Hanks 液配制)于 25 ml 玻璃培养瓶, 置 4 °C 冰箱过夜。接种前 2 h, 用 D-Hanks 液漂洗 2 次, 加入 1 ml A 液, 置 37 °C 培养箱温育。移入组织块前倾去 A 液, 滴入 1 滴 FBS, 涂布全瓶待用。

1.2.2 原代培养 取 3~4 只出生 7 天内 Wistar 大鼠, 颈椎脱臼处死, 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), 软脑膜及脑膜大血管, 冰 D-Hanks

收稿日期: 2006-12-01 接受日期: 2007-02-12

重庆市教委(No.KT060305)和重庆市卫生局(渝卫科教[2006]34 号 06-2-157)资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-63624424, E-mail: dr_jiangli@126.com

液漂洗 3 次。用振动切片机切取脑片, 片厚 400 μm , 用吸管移入冰 D-Hanks 液漂洗 3 次, 并用眼科剪剪成约 1 mm^2 小块。再用 A 液浸洗 2 次。将组织块移入用 1% 明胶预处理并滴加少许 FBS 的 25 ml 培养瓶, 每小块间距 5 mm 左右, 量不要多, 以 1~2 块/ cm^2 为宜。组织块放置好后, 轻轻翻转培养瓶, 使瓶底朝上, 放入培养箱中固化 2 h 待其贴附后, 将培养瓶慢慢翻转放平, 然后加入少量 B 液, 液面不超过组织块高度。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内完全静置培养, 72~96 h 后除去组织块, 加入足量 B 液继续培养, 随后隔 2 天换液一次。

1.2.3 传代培养 原代细胞培养 10~14 天后, 细胞汇合成单层。用 D-Hanks 液洗 2 遍, 0.02% EDTA 洗一次, 按 1:1 比例加入 0.02% EDTA 及 0.25% 胰蛋白酶消化 3~4 min。见细胞连接松弛, 加入足量含血清培养基终止消化, 吸管轻轻吹打混匀, 显微镜下计数, 以 $(2\sim3)\times 10^4$ 个/ml 接种于 25 ml 培养瓶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内静置培养, 每 2 天换液 1 次。

1.3 鉴定

1.3.1 观察细胞形态和生长特性 用普通倒置显微镜观察 BMECs 的生长过程及形态特点, 并拍照记录。

1.3.2 HE 染色观察细胞形态 制作细胞爬片, 按照常规 HE 操作进行。

1.3.3 VIII 因子相关抗原免疫细胞化学检测 制作细胞爬片, 冰丙酮固定, 按照常规免疫细胞化学方法进行检测。VIII 因子按 1:100 稀释。DAB 显色, 封片后普通光学显微镜下观察。实验阴性对照: 一抗以 PBS 代替。

1.3.4 CD34 免疫荧光检测 制作细胞爬片, 冰丙酮固定, 按照常规免疫荧光法进行检测。兔抗大鼠 CD34 抗体为 1:100 稀释, 二抗为 FITC 标记羊抗兔抗体, 荧光显微镜下观察。实验阴性对照: 一抗以 PBS 代替。

1.4 培养细胞 Oatp2 及 P-gp 表达检测

1.4.1 免疫细胞化学检测培养细胞 Oatp2 及 P-gp 的表达 制作细胞爬片, 冰丙酮固定, 按照常规免疫细胞化学法进行检测。Oatp2 浓度为 3.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, P-gp 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。DAB 显色, 封片后普通光学显微镜下观察。实验阴性对照: 一抗以 PBS 代替。

1.4.2 Western 印迹法检测培养细胞 Oatp2 及 P-gp 的表达 原代细胞长至 12 天(细胞近融合)时, 取出培养瓶, 倾去培养基, 用 D-Hanks 液洗 3 次。按每 25 ml 培养瓶面积, 加入预冷蛋白质裂解液 200 μl 及终

浓度为 10 mmol/L PMSF, 让细胞与裂解液充分接触, 作用 30 s, 用细胞刮将细胞刮下, 收集裂解物, 15 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液得到组织总蛋白; 以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白质定量测定; 每样品取 20 μg 蛋白质经 10%SDS-PAGE 分离, 半干法转至 PVDF 膜。脱脂奶粉封闭, 一抗为兔抗大鼠 Oatp2(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 兔抗大鼠 P-gp(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 二抗为 HRP 标记羊抗兔 IgG(1:1 000), 室温温育 1 h。最后与 ECL 化学发光试剂作用后胶片显影图片扫描。

2 结果

2.1 细胞生长及形态观察

组织块植入后最先游出的是血细胞, 48~96 h 后可见血管内皮细胞及神经元呈放射状游出(图 1), 96 h 后成纤维细胞及胶质细胞才游出。最初游出的内皮细胞呈三角形或长梭形, 排列不规则; 取出组织块后呈“岛状”区域性单层生长, 随着培养时间的延长, 血细胞及神经元等杂细胞逐渐减少, 内皮细胞不断增殖, 呈多角形或铺路石形, 大约 10~14 天细胞达到汇合, 可见“旋涡状”分布(图 2), 以后出现生长抑制现象。多角形及短梭形的内皮细胞占 90% 以上。

2.2 培养 BMECs 鉴定及纯度测定

培养细胞经 VIII 因子相关抗原免疫组化染色后, 可见 BMECs 胞浆尤其核周有棕褐色颗粒(图 3A), 对照染色为阴性; 经 CD34 免疫荧光检测, 荧光显微镜下见胞浆内存在 FITC 标记的 CD34 绿色荧光颗粒(图 3B)。阴性对照均无着色。两种检测方法阳性细胞均达 90% 以上。

2.3 培养 BMECs 上 Oatp2 及 P-gp 检测

免疫细胞化学及 Western 印迹检测均发现, 原代及传代培养 BMECs 上存在 Oatp2 及 P-gp 表达, 二者主要表达于 BMECs 的细胞膜(图 4), 阴性对照均无着色; Oatp2 的相对分子量为 75 kDa, P-gp 相对分子量为 170 kDa(图 5)。

3 讨论

微血管是指直径小于 0.3 mm 的血管, 包括微动脉、微静脉和毛细血管, 内皮细胞是其主要细胞成分。内皮细胞培养的方法主要有酶消化法、组织块法、机械刮取法等。对于 BMECs 的原代培养目前国外报道多采用酶消化结合尼龙网过滤、梯度离心^[1],

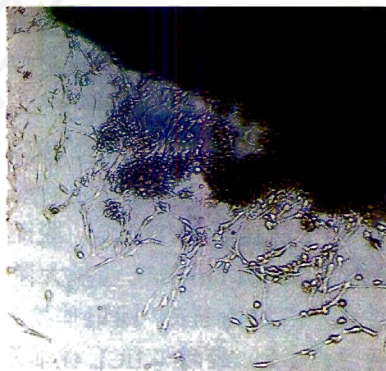


图1 组织块植入后 72 h (100 ×)

脑片边缘见细胞呈放射状迁出, 迁出细胞呈三角形或长梭形。

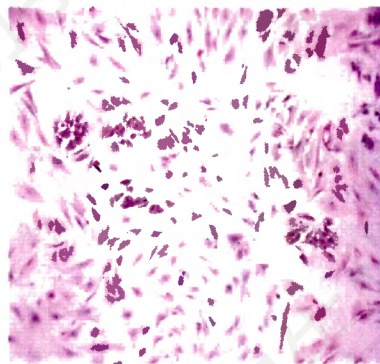


图2 培养 14 天细胞 HE 染色(200 ×)

细胞呈多角形或短梭形, 单层生长, 呈现“铺路石”及“旋涡状”征象。

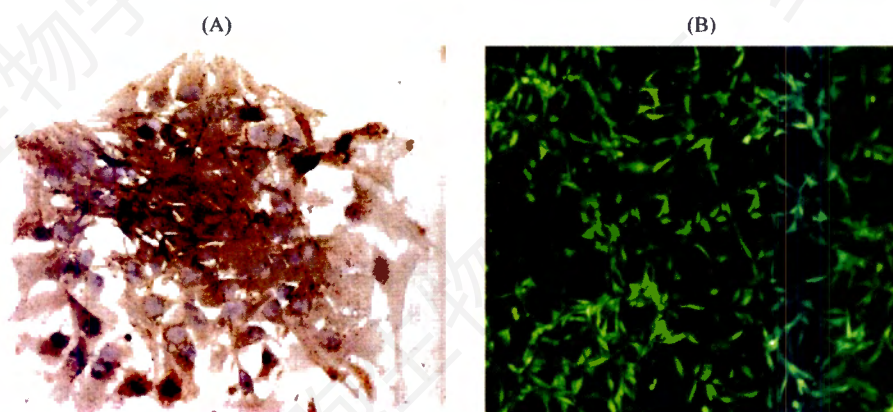


图3 培养 BMECs 鉴定

A: Ⅷ因子相关抗原免疫组化(400 ×); B: CD34 免疫荧光 (100 ×)。

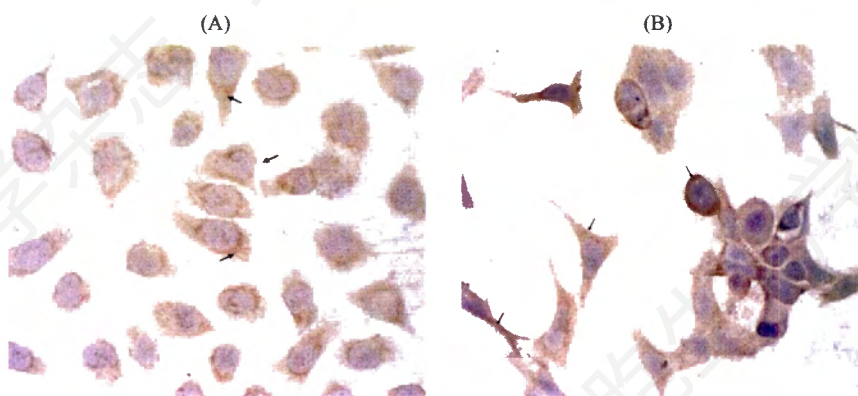


图4 免疫组化检测培养 BMECs 药物转运体

A: Oatp2 免疫细胞化学染色 (400 ×); B: P-gp 免疫细胞化学染色(400 ×)。阳性物质(如箭头所示)主要表达于细胞膜。



图5 Western 印迹检测培养 BMECs 上药物转运体表达

A: Oatp2, 相对分子量 75 kDa; B: P-gp, 相对分子量 170 kDa。

但操作复杂,过程繁琐,技术要求及费用高,同时无法避免混杂成纤维细胞、周细胞、平滑肌细胞、星型胶质细胞等杂细胞的生长,且有些方法不适合于国内普通实验室。与酶消化法相比,组织块法则更为简单、经济,且成功率较高^[2,3]。但该方法目前主要用于肺微血管内皮细胞的培养^[4],鲜见用于BMECs培养的报道。鉴于脑组织亦存在丰富的微血管,本组结合自身实验室条件,尝试运用组织块法培养大鼠BMECs。以下将主要就本组组织块培养获取大鼠BMECs的3个重要环节:组织块活性、贴壁的有效性 & 细胞的纯化进行阐述。

组织块培养的关键之一是获得活力好的组织块。既往多采用眼科剪、刀片等器械直接剪切获取组织块,因普通剪切对组织损伤大,并非每个组织块都能长出细胞。本组采用振动切片机切取适当厚度的皮层脑片进行培养,由于振动切取方式对组织损伤小,且切片在液槽中进行,可使刀片润滑,并及时散热,利于反复切取,从而大大保存了组织块的活性,为细胞的迁出提供了重要前提;此外,采用出生1周内的Wistar乳鼠大脑皮质用于组织块制作,其BMECs已经分化且具有较强的增殖分化能力,加之此阶段乳鼠BBB的结构较薄弱,更易于内皮细胞的迁出。

组织块培养的另一关键是有有效贴壁。我们采用明胶包被,血清涂布及固化的方法,增加组织块植入后的稳定性;同时,在整个实验操作及观察过程中均应动作轻柔、缓慢,且加入培养液不可过多,尽量不要引起液体振荡而产生冲力使组织浮起。

获取高纯度的内皮细胞是BMECs培养的基本要求。组织块培养的原理是利用组织块内不同细胞的迁出速率差异进行原代细胞培养,因此,把握目的细胞的迁出规律是获取高纯度目的细胞的关键。我们观察发现,对比同样培养条件下的肺组织块,脑组织块血细胞的迁出较少,内皮细胞的迁出较晚,故可适当推后组织块取出时间,以72~96 h为宜,此期迁出的细胞以内皮细胞和神经元为主,而神经元可通过后续培养和传代除去,组织块取出时间不应长于108 h,否则将有较多成纤维细胞及胶质细胞迁出。此外,取材过程中仔细剥除脑膜也是防止杂细胞污染的重要手段。我们选用M199选择性培养基,并添加20%胎牛血清,因其不含血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),可大大抑制杂细胞的迁

出及生长。另外在培养基中加入10 ng/ml bFGF,可起到促进内皮细胞增殖并抑制杂细胞生长的作用,同时,添加50 U/ml肝素可协同bFGF的作用并抑制平滑肌细胞的生长^[5]。经过上述处理,可获取高纯度的内皮细胞。

鉴别内皮细胞的方法有多种,主要是依据生长特征和特异性抗原的表达,倒置显微镜下可进行初步鉴定。光镜下原代培养的内皮细胞呈多角形或短梭形,单层生长,有接触抑制的特点,形成单层细胞时呈现“铺路石”征象。我们的观察结果基本符合上述特征,同时联合运用内皮细胞特异性标志物Ⅷ因子相关抗原及CD34进行检测,进一步证实该方法培养的细胞是血管内皮细胞,且其纯度达到90%。

许多组织的生物膜存在特殊的转运蛋白系统介导药物的跨膜转运,称为转运体(transporters)。由于大脑结构的特殊性,BBB成为限制药物进入脑内的有效屏障,而内皮细胞膜上存在的药物转运体可调节内外源性物质通过BBB的量,在很大程度上决定了脑内药物浓度的高低^[6]。P-gp是目前研究比较广泛的一种转运体,脑内P-gp主要分布于BBB内皮细胞,它对包括多种抗肿瘤药,抗生素类药、抗癫痫药等药物起外排泵作用,从而降低药物进入脑内的量^[7]。Oatp2是另一种重要的转运体,国外^[8]及我们的前期体内实验^[9]均证明其也表达于脑组织的BMECs上,但是在原代培养的BMECs上是否也有着两种转运体的表达尚不清楚。而我们采用免疫组化和Western印迹方法均检测到原代培养的BMECs上有P-gp和Oatp2的表达,且其主要表达于细胞膜,进一步证实体外培养的原代内皮细胞具有与体内BMECs相同的转运体表达特性。为体外研究BBB对药物转运的影响提供了重要依据。

参考文献(References)

- [1] Kis B et al. *Neuroreport*, 2001, 12: 4139
- [2] Chen SF et al. *Microvasc Res*, 1995, 50: 119
- [3] 司徒镇强等. *细胞培养(修订版)*, 西安: 世界图书出版社, 2004, 72
- [4] 姜明志等. *实用口腔医学杂志*, 2004, 20: 24
- [5] 许熊飞等. *细胞生物学杂志*, 2005, 27: 84
- [6] Abbott NJ et al. *Novartis Found Symp*, 2002, 243: 38
- [7] Kwan P et al. *Epilepsia*, 2005, 46: 224
- [8] Gao B et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 510
- [9] 郭 艺等. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21: 490

Cultivation of Rat Brain Microvascular Endothelial Cells and the Expression of Drug Transporters in Primary Rat Brain Microvascular Endothelial Cells

Yi Guo, Li Jiang*, Guan-Xin Liu, Heng-Sheng Chen

(Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract Rat brain microvascular endothelial cells (BMECs) were cultured with brain segment sticking mass methods. The BMECs were identified by observing under phase-contrast microscope, and by using immunocytochemical methods with anti-rat factor VIII antibody and CD34. The expression of organic anion transporting polypeptide2 (Oatp2) and P-glycoprotein (P-gp) were detected by immunocytochemical methods and Western blot analysis. In this study, the BMECs showed regular cobblestone and polygonal morphology and positive for VIII-F-Ag and CD34. The purity of positive stained cells was 90%. Both Oatp2 and P-gp expressed in the primary BMECs, and preminantly along the plasma membrane of endothelial cells. It is suggested that the rat BMECs were successfully cultured *in vitro* by brain segment sticking mass methods. The primary BMECs expressed the Oatp2 and P-gp. This experiment provide a possible pathway for studying transporters of the blood-brain barrier.

Key words rat; brain microvascular endothelial cells; primary culture; organic anion transporting polypeptide2; P-glycoprotein

Received: December 1, 2006 Accepted: February 12, 2007

The work was supported by Chongqing Municipal Education Commission (No.KT060305) and the Chongqing Municipal Health Bureau (No.06-2-157)

*Corresponding author. Tel: 86-23-63624424, E-mail: dr_jiangli@126.com