

管上皮细胞的生理和病理提供了一个十分有用的模型。

关键词: 气管上皮细胞 无血清培养基
气液界面培养 兔

参 考 文 献

- [1] Yamaya. M. Finkbeiner WE, Chun SY, et al., 1992, *Am. J. Physiol.*, **262**:L713-724.
- [2] Armelle BS, Emmanuelle BU, Guiliandlli C, et al., 1994, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **30A**: 56-67.
- [3] Harris CC, 1987, *Cancer Res.*, **47**:1-10.
- [4] Kondo M, Finkbeiner WE, Widdicombe JH., 1991, *Am. J. Physiol.*, **261**: L106-117.
- [5] Wu R. Smith D, 1982, *In Vitro*, **18**: 800-812.
- [6] Scott MR Lee NP, Yankaskas, JR et al., 1988, *Am. J. Physiol.*, **255**:c237-245.
- [7] Widdicombe JH, Coleman DL. Finkbeiner WE, et al., 1987, *Cell Tissue Research*, **247**: 95-103.
- [8] Adler KB, Cheng PW, Kim DC, 1990, *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **2**:145-154.
- [9] Whitcutt MJ, Adler KB, Wu R. 1988, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **24**:420-428.
- [10] Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, et al., 1996, *Cell*, **86**:299-236.
- [11] Goldman MJ, Andersern GM, Stolzenberg ED, et al., 1997, *Cell*, **88**:553-560.

STUDIES ON PRIMARY CULTURE OF RABBIT TRACHEAL EPITHELIAL CELLS IN SERUM-FREE HORMONE-SUPPLEMENTED MEDIUM IN A BIPHASIC CHAMBER SYSTEM

HUANG Ning WU Qi LI Sheng Fu TANG Bin WANG Bo Yao

(Department of Pathophysiology, West China University of Medical Science Chengdu, Sichuan 610041)

ABSTRACT

In order to study the physiology and pathophysiology of tracheal epithelium, a primary culture of tracheal epithelial cells at air-liquid interface has been established in our laboratory. Rabbit tracheal epithelia were isolated by using low temperature protease digestion, which was not harmful to the cell viability and could almost eliminate fibroblastlike cells. Coating human placenta collagen was beneficial to the attachment of epithelial cells. Serum-free hormone-supplemented medium could promote cell multiplication and differentiation. Biphasic chamber system provided an air-liquid interface, an environment closely resembling to the in vivo situation, allowing multicellular layers of epithelium to grow. The nature of the tracheal epithelial cells was confirmed by morphology and immunocytochemistry. This culture system provided an ideal model for more sophisticated in vitro modelling of in vivo functions and thus would be useful in the study of physiology and pathophysiology of tracheal epithelium.

Key words: Tracheal epithelial cell Biphasic cultivation Serum-free medium Rabbit

鼠脑微血管内皮细胞的分离与长期培养

钱志远 黄强 周丽英 孙志方

(苏州医学院附属第二医院神经外科 苏州 215004)

近年来,关于大血管内皮细胞的体外培养已有大量报道,而对机体内含量最丰富,机能最复杂的微血管内皮细胞培养的研究却较少。本文报告对Rupnick^[1]法加以改进后建立的一种简便易行的鼠脑微血管内皮细胞(BMEC)的分离方法,长期进行细胞培养,对其生物学特性进行初步观察。

材 料 和 方 法

一、脑微血管内皮细胞的分离

取8-10只5-7日龄的SD鼠(苏州医学院实验动物中心提供),雌雄兼用。颈动脉放血处死后,随即置入75%的乙醇中浸泡3-5分钟,进入操净工作台无菌操作。沿鼠脑正中线剪开颅骨,剔除硬脑膜,取出两侧

大脑半球,保留小脑和脑干。将取出的脑组织立即放入盛有 D-Hank's 液的平皿中,用小刀片尽量去除脑皮质后切碎,体积约 1mm^3 。用 D-Hank's 液反复漂洗 3 次,以去除红细胞。用 0.2% II 型胶原酶(Sigma 公司产品)消化(37℃水浴,20min),离心(室温,10min, $100\times g$),弃除上清液,重复消化一次。以 15% Dextran(分子量 12 万)磷酸缓冲液(pH7.4)悬浮细胞混合物,离心(室温,20min, $200\times g$),弃除中间层及其上清,保留离心管底的细胞混合物。再用完全培养基(RPMI-1640,谷氨酰胺 0.9g/L、HEPES 10mmol/L、ECGF20mg/L <Boehringer Mannheim 公司产品>、肝素 50mg/L、青霉素 10^5U/L 、链霉素 10^5U/L 20%胎牛血清)2ml 悬浮,以 $\Phi 74\mu\text{m}$ 的尼龙网过滤。将所获取的鼠脑微血管内皮细胞悬液接种到涂有 2%明胶(Sigma 公司产品)的塑料培养瓶中静置培养(37℃,5% CO_2),1%台盼蓝法计算活细胞率。静置温育 4 小时后换全液,以剔除混杂的非内皮细胞。再加入完全培养液进行原代培养。

二、细胞培养

将上述分离到的细胞静置培养 24 小时后换全液,以后每 2 天换液一次,待细胞长成单层时传代:以 0.05%胰酶-0.02%EDTA 消化细胞(室温,7min),见细胞变形即吸除消化液,注入新鲜培养液,吹打,制成细胞悬液,按实验需要传代或冻存细胞。传代时接种密度 $5\times 10^3/\text{cm}^2$,传代后的细胞静置培养,初代(2-4 代)仍以完全培养基培养,5 代后的细胞以普通培养液(RPMI 1640,20%新生小牛血清,谷氨酰胺 0.09g/L,HEPES 10mmol/L,青霉素 10^5U/L ,链霉素 10^5U/L),每 2-3 天换液一次,每隔 4-6 代冻存一次细胞。

三、特征鉴定

1. 形态学 用普通倒置显微镜观察内皮细胞的形态及生长规律。离心包埋法制备透射电镜检查标本。

2. 免疫组化 以 1%多聚甲醛固定 5 分钟,PBS 漂洗,按第 VIII 因子相关抗原(VWF:Ag)免疫组化试剂盒(DAKO 公司)ABC 法检测细胞 VWF:Ag 的表达情况。采用免疫组化法检测 GFAP、抗 $\alpha\text{-sma}$ 、NSE 和 S-100 蛋白,并以人脑胶质瘤 SHG-44 细胞作为 GFAP、NSE 和 S-100 的阳性对照,以免主动脉平滑肌细胞作为抗 $\alpha\text{-sma}$ 的阳性对照,以检测 BMEC 的纯度。

3. 生化指标及染色体检查 紫外吸收法测定培养细胞的血管紧张转换酶 I (ACE)的含量。速率法测定细胞硷性磷酸酶(ALP)和 γ -谷氨酰胺转酶(γ -GT)的含量。Lowry 法测定细胞蛋白质,放免法测定内

皮细胞生长液中前列环素(PGI₂)含量。低渗法制备染色体标本和 G 带分析。

结 果

一、细胞生长情况

静置培养 1 小时后可见细胞贴壁,4 小时贴壁细胞明显增多。细胞倍增时间约为 60 小时,约需 7-9 天形成致密的细胞单层,12-14 天即不再增殖,出现生长接触抑制现象。传代培养的细胞生长明显快于原代细胞,每隔 5-14 天传代一次(平均 5.5 天),经 176 天长期培养、传至 30 代。在第 12 代之前,需 6-8 天形成单层细胞,第 16 代后细胞生长较规律,4-6 天即形成连续的单层细胞,细胞生长曲线见图 1。

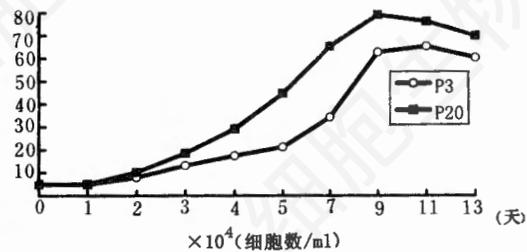


图 1 传代的 BMEC 生长曲线

二、细胞形态学观察

原代细胞刚贴壁时呈长梭形或多角形,排列不规则,核淡,胞膜明显。不断增殖后的细胞紧密镶嵌,形态以短梭形或多角形为主,待形成致密的单层细胞时,则见“铺路石”征象(图版图 1),偶见到混杂的星形细胞。继代细胞多呈多角形或短梭形,核卵圆形,胞浆丰富,细胞彼此紧密排列成单层,未见到重叠生长现象。透射电镜下观察第 3 代培养的鼠脑微血管内皮细胞(图版图 2)细胞呈多角形和梭形,胞质内见大量粗面内质网和线粒体,质膜表面见吞饮小泡,核染色质丰富,相连细胞间接触平直且紧密,局部融合,未见到 Weibel-Palade 小体。

三、免疫组化

原代、3 代和 30 代细胞进行 VWF:Ag 免疫组化检查,均见到细胞的胞浆和核膜周围被染

成棕褐色,证实培养的细胞为血管内皮细胞(图版图3)。用免疫组化法鉴定细胞的纯度,第3代细胞ⅧF:Ag阳性率为90%,NSE、FAP、 α -SMA、S-100均阴性,偶见到GFAP阳性细胞。第五代细胞中未见到GFAP阳性细胞。表明,传至第三代的细胞已为较纯的BMEC,纯度达90%。

四、长期培养细胞的酶活性和生化指标检测

取传代培养的细胞 4×10^5 进行破膜处理后测定内皮细胞酶活性和相关指标的观察,结果列于附表1,提示培养至第30代的细胞仍保持着内皮细胞的基本特征。染色体仍为二倍体,未见异倍体现象。

表1 长期培养的鼠BMEC特征观察*

细胞特征	P3	P5	P10	P20	P30
形态	多角形	多角形	多角形	多角形	多角形
ⅧF:Ag	++	++	++	+	+
GFAP	±	—	—	—	—
ACE(U/mg)	12.43	26.21	47.52	59.96	74.88
ALP(U/mg)	32.70	5.21	1.07	0	0
γ -GT(U/mg)	16.42	2.70	0	0	0
PGI2(ng/ml)	24.54	20.26	19.82	16.71	18.92
染色体	2n=42	/	/	/	2n=42

*生化检测细胞数为 4×10^5 ,检测前经破膜处理。测定结果为平均值, $n=3$,0为无法检测出酶活性。P3即第3代培养细胞。

讨 论

脑微血管内皮细胞是位于毛细血管微循环的一种特殊细胞,具有极其重要的功能。它不仅是构成血脑屏障的主要成分,而且在脑的物质代谢、纤溶与止血、免疫应答等方面发挥特殊的作用,与脑水肿、脑血管疾病的发生发展、脑肿瘤的浸润和扩散尤其是脑肿瘤的血管生成等病理过程紧密相关。我们对鼠BMEC分离与长期培养的尝试,既为体外研究血脑屏障提供了较适宜的培养体系,更为研究各种颅脑疾病提供了一种崭新的实验工具。

培养用脑微血管内皮细胞的来源,传统的分离方法多先进行脑微血管的分离,然后用胶原酶消化获取内皮细胞。此法不仅操作繁琐,而且所获细胞存活率较低。Rupnick 1988年首次采用梯度离心的方法成功进行了鼠BMEC的培养,将微血管分离和消化两过程结合在一起,不仅简化了操作程序,而且将获得细胞的存活率提高至83%。但是,由于多次离心增加了细胞受损伤的机率及分离时间太长,使细胞存活率下降。我们对此进行了改进,将其使用Per-

coll分离液超速离心的过程改用尼龙网滤过,有效地缩短了操作流程,并将细胞存活率提高至92%。Brendel^[2]的研究发现鼠脑微血管的直径在6—80 μ m之间,分离脑微血管时多选用 $\Phi 80\mu$ m左右的尼龙网筛选。我们在微血管组织进行消化、差速离心后,选用 $\Phi 74\mu$ m的网眼过滤,使残存的大血管碎片及少量微血管成分得以有效去除。文献报告,BMEC接种后1小时即开始贴壁,4小时贴壁率约60%^[3]。而胶质细胞贴壁高峰常在接种6小时后,其他细胞贴壁更迟。因此,我们在接种4小时后给予换液,24小时再次换液,使所获BMEC的纯度接近90%。

我们培养的鼠BMEC多呈多角形,单层生长,可见“铺路石”征象,具有正常细胞的生长接触抑制现象,而且细胞具有合成内皮细胞标志酶ACE的功能,符合普通血管内皮细胞的一般特征。同时,电镜下见到相邻细胞间接触平直且紧密,局部出现融合征象,与Gerhart等的观察结果相似^[4]。ALP、 γ -GT作为BMEC特征酶在我们培养的初代细胞中也检测到。至于长期传代细胞中ALP、 γ -GT无法检测出,有学者推

测系缺乏胶质细胞的介导作用所致^[5,6]。

ⅧF:Ag 的存在是血管内皮细胞最可靠的标志^[7]。我们对长期培养的 BMEC 经免疫组化检测,均为阳性表现。在我们的研究中,还采用 GFAP 免疫组化的方法来鉴定细胞的纯度,结果表明,第 3 代细胞,其纯化率达 90% 以上,少量 GFAP 阳性细胞(即胶质细胞)随着培养时间的延长渐被淘汰,第 5 代细胞中未见 GFAP 阳性细胞。可见,我们所培养的 BMEC 纯度较高。

国外报道对 BMEC 的最长培养时间为 6 个月,传至 35 代^[8]。国内尚未见到长期培养成功的报道。我们对鼠 BMEC 的培养时间长达 176 天。传代至 30 代的 BMEC 仍保持着多角形、单层生长的特征,能合成和分泌 ⅧF:Ag, ACE, PGI₂ 等活性物质,染色体仍为二倍体。但有些酶活性已丧失,说明要维持 BMEC 的全部特征是否需要胶质细胞的参与,有待进一步研究证实。

摘 要

采用胶原酶消化、差速离心、尼龙网滤过技术分离和获取鼠脑微血管内皮细胞,接种后 4h

换液使获得的内皮细胞纯化,体外进行长期培养。细胞在体外生长 176 天,传至 30 代,细胞初期成活率为 92%,纯度近 90%。经形态学、超微结构和免疫组化鉴定,培养细胞为血管内皮细胞。培养至第 30 代的细胞仍能合成和分泌 PGI₂、ACE 等,ⅧF:Ag 阳性表达,染色体为二倍体(2n=42),基本保持着细胞的主要特征。该分离和培养方法的建立,将为研究与脑血管相关疾病提供有用工具。

关键词:脑 微血管内皮细胞 细胞分离技术
细胞培养 大鼠

参 考 文 献

- [1] Rupnick, M. A. et al., 1988, *In vitro Celluler and Development Biology*, 24:435-444.
- [2] Brendel, K. et al., 1974, *Science*, 185:953-955.
- [3] Mc Carthy, K. D. et al., 1980, *J Cell Biology*, 85:890-902.
- [4] Gerhart, D. X. et al., 1988, *Brain Res. Bull.*, 21:785-793.
- [5] Maxwell, K. et al., 1987, *Brain Res.*, 410:309-314.
- [6] Janzer, R. C. et al., 1987, *Nature*, 325:253-259.
- [7] 山本 清高, 1988, *细胞*, 20:329-333.
- [8] Tontxsch, U. et al., 1989, *Microvascular Res.*, 37:148-161.

ISOLATION AND LONG-TERM CULTIVATION OF RAT BRAIN MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS

QIAN Zhi Yuan HUANG Qiang ZHOU Li Ying SUN Zhi Fang

(Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital, Suzhou Medical College. 215004)

ABSTRACT

Brain microvascular endothelial cells (BMECs) from spnaque-Dawley weanling rats were prepared by collagenase digestion, differential centrifugation and filtering through nylon mesh. Endothelial cells were further purified through discarding the culture medium at 4 hours after seeding and cultivated in vitro for 176 days, about 30 passages. Viability of both primary dissociated and cultivated BMEC was over 92% with our method, and the purity reached 90%. It was verified that cultivated cells were vascular endothelial cells by morphology, ultramicrostructures and immunohistochemistry studies. Passage 30 cells could still synthesize and secrete PGI₂ and ACE, and were positive for ⅧF:Ag, their chromosomal figure remained diploid (2n=42) too, which implicated that BMECs maintained their primary biological characteristics after long-term in vitro cultivation. This foundation would provide a useful tool for studying diseases related to cerebral vessels.

Key words: Brain Microvascular endothelial cell Cells isolation technique Cell culture Rat