文章编号:1000-5404(2006)09-0907-03

论著

人胎盘微血管内皮细胞体外原代培养及鉴定方法

陈 黎,梁志清,李俊男 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 探索人胎盘微血管内皮细胞的体外培养方法,并对其进行鉴定,为构建体外人胎盘屏障极性模型奠定基础。**方法** 采用酶消化法,获取组织及细胞悬液,经密度梯度离心后,获得较高产量微血管内皮细胞,并进行体外培养。进一步对人胎盘微血管内皮细胞进行免疫细胞化学法的Ⅷ因子相关抗原及CD34鉴定,用透射电镜观察细胞质Weibel-Palade小体。**结果** 体外培养出纯度较高的微血管内皮细胞并培养了3~5代。此外,免疫组化显示Ⅷ因子相关抗原及CD34表达阳性,电镜下观察到Weibel-Palade小体。**结论** 成功分离并培养人胎盘微血管内皮细胞。

关键词: 胎盘;微血管内皮细胞;原代培养;鉴定
中图法分类号: R321.4;R322.13;R329-33 **文献标识码:** A

Primary culture and identification of human placental microvascular endothelial cell *in vitro*

CHEN Li, LIANG Zhi-qing, LI Jun-nan (Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the methods of culture and identification of human placental microvascular endothelial cells (HPMVEC) *in vitro*, aiming to construct the polar model of human placental barrier. **Methods** By proteolytic enzymes, the tissular and cellular suspensions were collected from the chorionic villi of pregnant and centrifugated over a preformed discontinuous Percoll gradient. The highly purified human placental microvascular endothelial cells were obtained and cultured in HG-DMEM with fetal calf serum and identified by immunocytochemistry (SP methods) and transmission electron microscope. **Results** The highly purified human microvascular endothelial cells were cultured *in vitro* and passaged for three to five generations. Factor Ⅷ-related antigen and CD34 were both positive by immunocytochemistry. Weibel-Palade body (W-P body) was observed by transmission electron microscope. **Conclusion** Human placental microvascular endothelial cells can be isolated and cultured successfully *in vitro* by our method.

Key words: placenta; microvascular endothelial cell; primary culture; identification

研究表明微血管内皮细胞具有多方面功能,既是被动屏障又主动参与机体许多生理和病理过程。目前多数体外研究应用是人脐静脉内皮或主动脉内皮细胞等容易获得的大血管内皮细胞,但鉴于内皮细胞的异质性[1],一般的内皮细胞不适合用于人胎盘血管生理功能的研究,建立人胎盘微血管内皮细胞体外培养体系是十分必要的。本研究探索一种人胎盘的微血管内皮细胞(microvascular endothelial cell, MVEC)体外培养方法,可以在体外较短时间内获取高产量的MVEC,且细胞纯度较高。

1 材料与方法

1.1 材料

高糖型DMEM,胎牛血清,新生小牛血清,ECGF,Ⅰ型胶原酶,Ⅱ型Dispase酶,Ⅰ型DNA酶,胰酶,Percoll细胞分离液,SP-9000试剂盒,鼠抗人CD34单克隆抗体工作液,鼠抗人Ⅷ相关抗原(FⅧRAg)单克隆抗体工作液。

1.2 方法

1.2.1 原代培养方法 取健康孕妇孕60~70 d行人工流产术后的绒毛组织(约15 g),置于预冷的含抗生素(包括青霉素、链霉素及两性霉素)生理盐水中浸泡30 min,剔除结缔组织,留取三级绒毛或是绒毛末端,以保证所取的组织绝大多数含微血管。将组织剪碎加入0.1% Ⅰ型胶原酶及0.2% Ⅱ型Dispase酶37 ℃水浴振荡消化40 min,再加入0.02% Ⅰ型DNA酶继续

基金项目:国家自然科学基金资助项目(03030404)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (03030404)
作者简介:陈 黎(1979-),女,安徽省滁州市人,硕士研究生,主要从事宫内感染发病机制方面的研究。电话:(023)68754409
通讯作者:李俊男,电话:(023)68754409
收稿日期:2005-10-09;修回日期:2006-02-03

消化 20 min 后，根据消化情况加适量 0.25% 胰酶继续消化，10～15 min 新生小牛血清终止胰酶反应，将所得消化液经 4 层无菌纱布过滤，收集滤液，4 ℃ 1 000 r/ min 离心 10 min，收集沉淀，用 D-Hanks 液或 DMEM 培养液重悬细胞，重悬液贴管壁缓慢加入 25%、30%、35% 不连续 Percoll 梯度中，20℃ 400 r/min 离心 20 min，收集距离液面 1.5～2.0 cm 白色絮状层，加入 D-Hanks 液或 DMEM 培养液重悬，4 ℃ 1 000 r/ min 离心 5 min，收集沉淀，细胞记数，将细胞浓度调至 1×10^5/ml，接种 12 孔培养板中静置于 37 ℃的 5% CO_2 饱和湿度培养箱孵育培养。培养液为含 20% 胎牛血清的 HG-DMEM（ECGF10 ng/ml 肝素 25 U/ml 氢化可的松 5 μl/ml）。24 h 后首次换液，其后，2～3 d 换液或是半换液。

1.2.2 原代细胞活力测定 消化离心后制备的单细胞悬液，并做适当稀释，取 9 滴单细胞悬液移入 0.5 ml EP 管中，加 1 滴 0.4% 台盼蓝溶液，混匀，用血球计数板计数活细胞和死细胞。

1.2.3 传代方法 原 1 代培养 12～14 d，待细胞以单层爬满培养孔孔底 2/ 3 左右培养面时，即可传代。0. 25 % 胰蛋白酶与 0. 02 % 乙胺四乙酸（ EDTA）以 1∶1 消化传代，1∶3 分孔传代培养。

1.2.4 细胞活性测定 选择第 3 代 HPMVEC，接种密度为 1×10^3 个细胞/cm^2，平均接种于 96 孔板内。1～7 d，每 24 h 取 4 孔细胞。每孔加入 20 μl MTT（5 mg/ ml），继续孵育 3 h，终止培养，小心吸弃孔内上清培养液，用无菌 0.01 mol/L PBS 轻轻冲洗 2 次，每孔再加入 150 μl DMSO，吹打混匀振荡 10 min，使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值，取其均值，以时间为横坐标，光吸收值为纵坐标绘制出 HPMVEC 生长曲线。

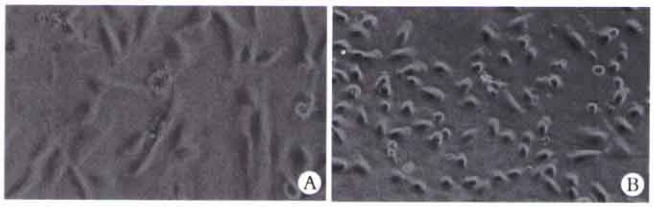
1.2.5 透射电镜检测 取第 1 代细胞，消化，戊二醛前固定，四氧化锇后固定，丙酮脱水，环氧丙烷置换，树脂浸透，经包埋、聚合后超薄切片，铀、铅染色，透射电镜观察。

1.2.6 Ⅷ因子相关抗原及 CD34 抗体的免疫细胞化学（ S-P 法）检测 取第 2、3 代爬满盖玻片的细胞用 0.01 mol/L PBS 轻轻漂洗 5 min×2～3 次，4 % 多聚甲醛固定 30 min，0.01 mol/L PBS 轻轻漂洗 5 min×3 次，加 0.3% H_2O_2-甲醇室温孵育 10min 以阻断内源性过氧化物酶，加正常非免疫动物血清保护抗原 37℃孵育 10 min，倾去，勿洗，加一抗 F Ⅷ- RA 4 ℃温盒孵育过夜，加生物素标记二抗 37 ℃孵育 15 min，加链霉菌抗生物—过氧化物酶溶液 37 ℃孵育 15 min，DAB 显色，乙醇脱水干燥，二甲苯透明，中性树胶封片。同时留取早孕的绒毛组织石蜡切片行免疫组织化学为阳性对照。CD34 步骤同前。

2 结果

2.1 培养细胞形态学观察

相差显微镜下观察，原 1 代培养细胞细胞形态、大小差异很大，呈纺锤形或不规则形，无明显“铺路石”征（图 1A）。传代细胞初种时为明亮的圆球形，悬浮于培养液中，1 h 后大部分细胞贴壁，6 h 后大部分伸展，5 d 后细胞能增殖铺满再传代；传代后细胞大小形态较为相似，呈短梭形，有明显“铺路石”征（图 1B）。原代及传代生长的细胞均紧密排列，互不重叠。目前细胞传 3 代后出现老化现象。



A：原代培养 9 d 的细胞形态；B：传代培养 2 d 后细胞形态

图 1 人胎盘微血管内皮细胞体外原代培养原代及传代生长的细胞形态（相差显微镜×100）

2.2 原代细胞活力测定

镜下观察，死细胞被染成淡蓝色，而活细胞拒染，计算其活力 >85%。

2.3 细胞活性测定

显示人胎盘微血管内皮细胞的生长曲线近似倒“S”形，在传代后第 1 天细胞活性稍减少，经过 3 ～4 d 的潜伏期后进入对数生长期，约在第 6 天到达平台期。

2.4 原代细胞透射电镜检查

内皮细胞的细胞质中可见特定标志物 Weibel-Palade 小体，该小体横断面可见细管呈涡状排列，纵断面为棒状，亦可见细管呈涡状排列。同时也可见内皮细胞有丰富的微丝（图 2）。

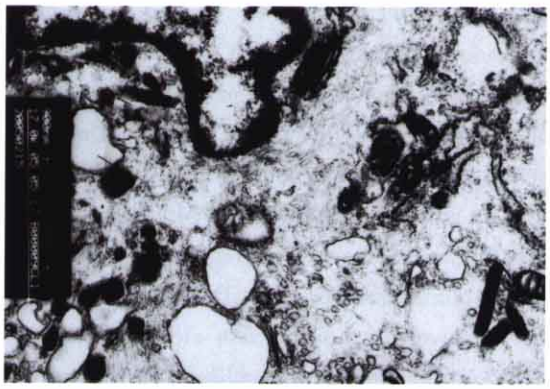
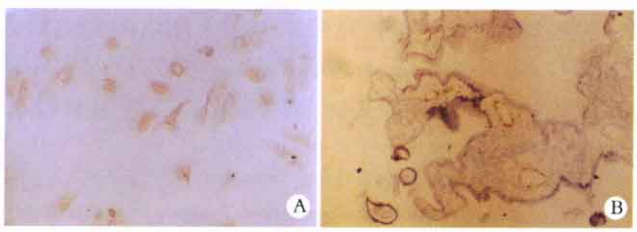


图 2 原代培养细胞超微结构（透射电镜×17 000）

2.5 Ⅷ因子相关抗原及 CD34 免疫组化鉴定

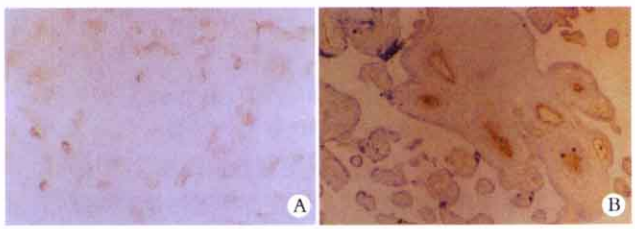
2.5.1 Ⅷ因子相关抗原 培养细胞的细胞质和核膜周围被染成棕褐色（图 3A），证实培养的细胞为血管内皮细胞。任选 3 张细胞爬片染色，每张盖玻片任选 3 个视野计数，得出Ⅷ因子染色阳性细胞百分率约为 80%，而组织上表达的阳性率不超过 80%（图 3B）。



A：人胎盘微血管内皮细胞原代培养阳性表达 （S-P × 200）；
B：早孕绒毛组织石蜡切片阳性表达 （S-P × 100）

图 3 Ⅷ因子相关抗原免疫组化鉴定

2.5.2　CD34　培养细胞的细胞膜和细胞质周围被染成棕褐色(图 4A)，证实培养的细胞为血管内皮细胞。任选 3 张细胞爬片染色，每张盖玻片任选 3 个视野计数，得出 CD34 染色阳性细胞百分率约为 90%，提示细胞纯度较高，而组织上阳性表达为 100%(图 4B)。



A：人胎盘微血管内皮细胞原代培养阳性表达　(S-P × 200)；
B：早孕绒毛组织石蜡切片阳性表达　(S-P × 100)

图 4　CD34 免疫组化鉴定

3　讨论

实验证明，微血管内皮细胞不仅是血管内衬还有多方面的功能，如调节血管通透性、物质代谢、合成与分泌作用以及与凝血及免疫调节相关的作用等。由于内皮细胞的异质性，不同动物，不同组织和器官，不同血管的内皮细胞，它们在结构、功能、抗原成分、代谢特性及对生长因子的反应等方面均不同，甚至在同一微循环单位内的不同节段的内皮细胞也表现出明显的差异[1,2]。因此，建立不同动物，不同组织器官 MEC 体外培养体系是十分必要的。

本实验中采用非连续 Percoll 密度梯度离心，此法分离细胞，最高纯度可达 80% ~85%，细胞活力均大于 85%。本研究在 Ugele 等[3]建立的 14 个 Percoll 不连续密度梯度分离纯化方法基础上进行改进，人胎盘分离的细胞中Ⅷ因子相关抗原表达阳性的细胞主要处在密度为 1.037 ~1.048 g/ml 的层面中，相应 Percoll 不连续密度梯度将分离梯度简化为 3 层，即 25%、30%、35%，以使所要分离的胎盘微血管内皮细胞处于 3 层之间。

关于胎盘微血管内皮细胞的鉴定中，文献提示形态上差异较大，有的呈纺锤形，有的呈铺展开的多角形，有的呈典型的“铺路石”征[1,4]。免疫组化鉴定中FⅧRAg 是血管内皮细胞一个可靠的标记物，而 CD34 可鉴定内皮细胞，其可重复性较好。FⅧRAg 虽是内皮细胞特有但并非所有 MEC 都表达，据报道其阳性表达率为 10% ~80%，本实验中，其阳性率约 80%，与组织上的表达阳性率相似。通过透射电镜在细胞质中可见内皮细胞特定标志物 Weibel-Palade 小体，这是内皮细胞特异性的细胞结构器，但组织离心脏越远，血管越小，其含量越少。而且有报道，随着离体培养时间延长，这种细胞结构器会消失。在体内随着微血管系统增殖加速，W-P 小体也会增多[5]。

在原代和传代培养条件中，内皮细胞专用培养液中一般需添加一定量的血清和促进内皮细胞生长的生长因子，以促进内皮细胞的生长，抑制周细胞及成纤维细胞等混杂细胞生长[6]，如内皮细胞生长补充物(ECGS)，表皮生长因子(EGF)，内皮细胞生长因子(ECGF)，碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)，血管内皮生长因子(VEGF)等；本实验采用的是 ECGF。实验中发现 20% 的胎牛血清为最适浓度，适合原代及传代的要求，也有报道加入人血清可提高 MEC 体外培养的产量[1,7-9]。

人胎盘微血管内皮细胞分离过程较繁琐，所需时间也长，且标本也不是绝对无菌的，很容易污染，所从取材到消化、分离，每步小心谨慎，尽量缩短操作时间。抗生素一般含有青霉素、链霉素及两性霉素[4]。

胎盘微血管内皮细胞作为胎盘屏障的组成部分，对于母婴之间物质交换起着非常重要的作用，但到目前为止关于这方面的研究还较少。体外分离培养胎盘微血管内皮细胞为研究各种物质通过胎盘屏障进入胎儿的具体机制奠定了细胞学基础。

参考文献：

[1] 成令忠，钟翠平，蔡文琴. 现代组织学[M]. 上海：上海科学技术文献出版社，2003：670 -672.

[2] GARGETT C E, BUCAK K, ROGERS P A. Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells[J]. Hum Reprod, 2000, 15(2): 293 -301.

[3] UGELE B, LANGE F. Isolation of endothelial cells from human placental microvessels: effect of different proteolytic enzymes on releasing endothelial cells from villous tissue[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 2001, 37(7): 408 -413.

[4] KACEMI A, CHALLIER J C, GALTIER M, *et al*. Culture of endothelial cells from human placental microvessels[J]. Cell Tissue Res, 1996, 283(2): 183 -190.

[5] BENSCH K G, DAVISON P M, KARASEK M A. Factors controlling the in vitro growth pattern of human microvascular endothelial cells [J]. J Ultrastruct Res, 1983, 82(1): 76 -89.

[6] GARRICK R A. Isolation and culture of capillary endothelial cells from the eel, Anguilla rostrata[J]. Microvasc Res, 2000, 59(3): 377 -385.

[7] MARELLI-BERG F M, PEEK E. Isolation of endothelial cells from murine tissue[J]. J Immunol Methods, 2000, 244(1 -2): 205 -215.

[8] RICHARD L, VELASCO P, DETMAR M. A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells[J]. Exp Cell Res, 1998, 240 (1): 1 -6.

[9] WU Z, HOFMAN F M, ZLOKOVIC B V. A simple method for isolation and characterization of mouse brain microvascular endothelial cells [J]. J Neurosci Methods, 2003, 130(1): 53 -63.

(编辑　薛国文)