文章编号:1000-5404(2007)20-2011-03

技术方法

大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养

刘恺鸣,迟路湘,鲁向辉,何国祥 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立稳定的大鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)体外培养模型,并对其生物学特性进行初步研究。**方法** 取Sprague-Dawley大鼠脑组织,通过匀浆、酶消化和梯度离心获得纯化的脑微血管段后,接种于涂布明胶的培养瓶进行原代培养;培养的细胞采用相差显微镜形态学观察、Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学鉴定;采用跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)检测单层细胞通透性;Cell Counting Kit-8(CCK-8)方法测定细胞生长曲线。**结果** 细胞从贴壁的脑微血管段周围长出,呈短梭形和多角形,区域性单层生长,5~7 d细胞融合,经Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学检测证实培养的细胞是血管内皮细胞,原代培养的脑微血管内皮细胞表现出很强的屏障特性,随着传代次数的增加脑微血管内皮细胞的跨内皮阻抗减弱。**结论** 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,原代培养的脑微血管内皮细胞是研究脑部微血管和血脑屏障的可靠技术手段。

脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)是构成血脑屏障的最主要组成部分。它不仅在蛋白质组和基因组水平上与其他内皮细胞有显著差异[1],而且具有细胞间紧密连接、极少的胞饮囊泡、丰富的线粒体和特殊的跨膜转运系统等独有生理特点[2]。微血管内皮细胞的分离纯化方面难度较大,国内外虽有报道,但各自的培养方培养不同于大血管内皮,尤其在微血管段的分离纯化法及报道的细胞形态有较大的差异[3-7]。我们通过反复实验,对国内外有关方法进行改进,成功分离培养出了大鼠脑微血管内皮细胞,并对其生物学特性进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

DMEM干粉培养基、胎牛血清、Ⅱ型胶原酶(Gibco,美国),D-Hanks液(Hyclone,美国),血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、胶原酶/分散酶、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、明胶(Roche,德国),4′6′-二乙酰基-2-苯基吲哚(4′6′-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)、兔抗人/大鼠Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体(Chemicon,美国),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记驴抗兔IgG(三鹰生物),Millicell Culture Plate Inserts、MilliCell-ERS Volto-hmmeter(Millipore,美国),Model-550酶标仪(Bio-Rad,美国),DMI6000激光共聚焦显微镜(Leica,德国),Cell Counting Kit-8(CCK-8)(Dojindo,日本)。

作者简介:刘恺鸣(1982-),男,河南省信阳市固始县人,硕士研究生,主要从事缺血性心脑血管病方面的研究。电话:(023)68754118, E-mail:liu2005061@yahoo.com.cn

通讯作者:迟路湘,电话:(023)68754118, E-mail:chi68754271@126.com

收稿日期:2007-04-09;修回日期:2007-06-04

1.2 微血管段的分离与纯化

选取2周龄的Sprague-Dawley大鼠(第三军医大学实验动物中心),颈椎脱臼处死消毒后分离出大脑皮质,DMEM培养液漂洗后,用眼科剪将其剪碎,反复用D-Hanks液冲洗干净后剪成1 mm×1 mm×1 mm的小块,将其移入玻璃匀浆器中上下匀浆3次,再加入0.1% Ⅱ型胶原酶37 ℃水浴消化30 min,离心(1 000 r/min,5 min),弃上清,加入20%牛血清白蛋白悬浮混匀后离心(1 000×g,20 min),加入2 ml 0.1%胶原酶/分散酶悬浮混匀后37 ℃水浴消化30 min,离心(1 000 r/min,5 min),弃上清,再次加入20% BSA悬浮混匀后离心(1 000×g,20 min),即可获得底部黄白色的"微血管层"。

1.3 BMECs的培养

吸取出底部"微血管层",加入DMEM离心2次(1 000 r/min,5 min),弃上清,加入脑微血管内皮细胞培养液(DMEM高糖,20%胎牛血清,2 mmol/L谷氨酰胺,1 mg/ml肝素,1 ng/ml bFGF,10 ng/ml VEGF、100 U/ml青霉素和100 g/ml链霉素),悬浮后接种于涂有明胶的塑料培养瓶中,置于37 ℃、5% CO_2培养箱内孵育,每3天更换培养液,形成单层后,吸去培养液,0.125%胰酶-0.02%乙二胺四乙酸室温下消化传代,传代换液时采用分次收集消化液,只收集前5 min消化脱落的细胞进行培养。

1.4 免疫荧光细胞化学法

鉴定培养细胞的Ⅷ因子相关抗原蛋白表达:滴加一抗(兔抗人/大鼠Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体1∶100)4 ℃孵育过夜(同时用PBS代替一抗作阴性对照),滴加荧光标记二抗(FITC标记驴抗兔IgG)37 ℃孵育30 min,然后以DAPI(5 mg/L)衬染细胞核,清洗后在激光共聚焦显微镜下观察Ⅷ因子相关抗原蛋白表达。

1.5 BMECs生长曲线的测定

参照Ishitsuka等[8]的方法,常氧条件下将细胞按1×10^4/ml密度同时接种于8块96孔板,每孔接种200 μl,共设8个平行孔,每天收集一块96孔板,每孔加入10 μl CCK-8试剂孵育2 h后于酶标仪450 nm波长检测吸光度值[$D(450)$],可间接反

映活细胞数量。

1.6　跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)测定

参照 Chen 等[3]的方法,使用 MilliCell-ERS Voltohmmeter 测量 BMECs 单层的电阻值,将传至不同代系的细胞接种于孔径为 0.4 μm 的 Millicell Culture Plate Inserts 内,每天更换新鲜培养基同时测量 TEER 值,直至显微镜下确认细胞已完全融合且 TEER 值达到稳定,认为 BMECs 已经完全汇合,记录完全汇合后不同代系细胞的 TEER 值。每个代系细胞的电阻值重复测量 3 次。

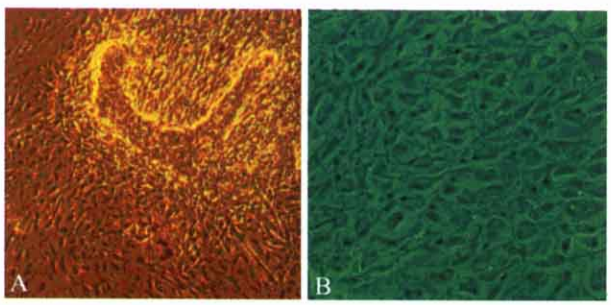
1.7　统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 12.0 软件先对各组数据进行方差齐性检验,再采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　BMECs 的形态

接种时可见串珠样脑微血管段,随后可见细胞从微血管段周围长出(图 1A),细胞未融合前呈短梭形或多角形,7 ~ 9 d 细胞可长满瓶底,互不重叠,并呈紧密连接的铺路石样单层生长(图 1B)。



A: 从脑微血管段中长出的 BMECs (LM × 40); B: 汇合后的 BMECs (LM × 200)

图 1　BMECs 的形态观察

2.2　BMECs 的Ⅷ因子相关抗原蛋白表达

免疫荧光细胞化学法检测Ⅷ因子相关抗原蛋白呈阳性表达(图 2),阳性率可达 95%,细胞质呈绿色荧光,DAPI 衬染的细胞核蓝色荧光。对照染色为阴性。

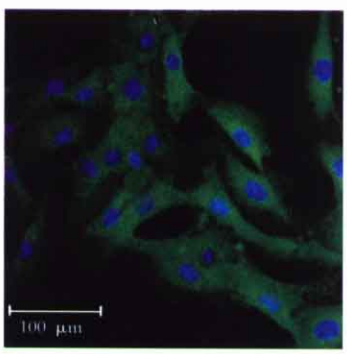
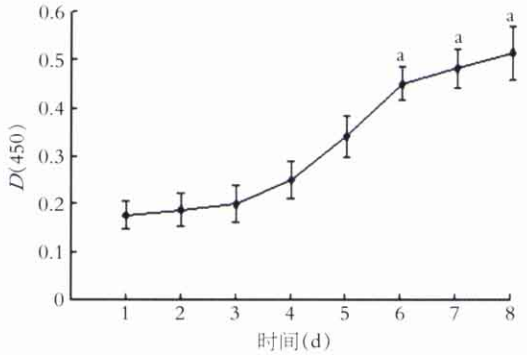


图 2　BMECs 的Ⅷ因子相关抗原染色　(激光共聚焦显微镜)

2.3　BMECs 生长曲线的测定

测定的脑微血管内皮细胞从第 3 天开始出现对数生长期,生长高峰在 3 ~ 6 d。6 d 后的 $D(450)$ 值与前 5 d 有显著差异($P < 0.05$),见图 3。

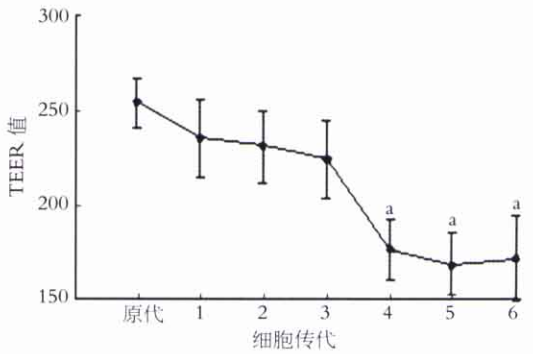


a: $P < 0.05$,与 1 ~ 5 d 相比

图 3　CCK-8 法测定脑微血管内皮细胞生长曲线($n = 8$)

2.4　跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)测定

跨内皮电阻测量反映生物屏障对带电离子的通透性,TEER 值与屏障的通透性成反比,是测量血脑屏障通透性的最敏感指标之一[9],原代培养的脑微血管内皮细胞表现出很强的屏障特性。与原代 BMECs 单层相比,第 4、5、6 代的 TEER 值有显著性下降($P < 0.05$),见图 4。



a: $P < 0.05$,与原代 BMECs 单层相比

图 4　不同代次 BMECs 单层通透性的变化($n = 6$)

3　讨论

脑微血管内皮细胞不仅是构成血脑屏障的主要成分,而且与脑水肿、脑血管疾病的发生发展、脑肿瘤的浸润和扩散、脑肿瘤的血管生成等病理过程紧密相关,脑微血管内皮细胞的培养对于研究脑部微血管和血脑屏障的生理功能和病理机制都具有十分重要的意义[10]。

脑微血管内皮细胞的培养始于 20 世纪 70 年代,主要建立在培养肾小球和视网膜的毛细血管的基础上,培养微血管内皮细胞的难点在于获取足够数量纯净的微血管段。与以往的单独使用匀浆法[7]或两次酶消化法[4]不同,我们将两种方法相结合,匀浆和Ⅱ型胶原酶消化能保证脑微血管片段彻底从脑组织中分

离，而使用胶原酶/分散酶进行第二次消化可以进一步将微血管片段上的杂细胞（周细胞、胶质细胞等）去除；在酶消化时间的把握上，我们发现以往文献[4]采用的 1 h 或 1.5 h 的消化时间过长，常常使获得的细胞活性大大受损，甚至得不到完整的微血管段，而我们通过反复实验发现 30 min 的消化时间既保证内皮细胞的活性又可以较好的将杂细胞去除，能获得完整的串珠样的微血管段；同时 20% 牛血清白蛋白密度介于微血管片段和杂细胞之间，能达到再次纯化微血管片段的目的。另外，高纯度 BMECs 的良好生长也是实验的关键：明胶涂布的塑料培养瓶可以较好地促进 BMECs 的贴壁；然而实验中我们发现，按以往的方法[4]培养基中仅仅添加 bFGF，常出现细胞不能顺利传代或酶消化传代后细胞不能良好生长，故我们将 VEGF 和 bFGF 联合添加，为内皮细胞提供了良好的细胞因子生长条件，也使细胞在传代以后继续保持良好的生长状态；而传代换液时采用分次收集消化液，只收集最先消化脱落的细胞进行培养，这是因为与其他杂细胞相比，内皮细胞具有在胰酶消化时容易脱落的特性。

培养的 BMECs 呈短梭形和多角形，待细胞汇合并形成紧密接触后细胞呈较均一的铺路石样，细胞呈单层生长，这些均符合内皮细胞的形态特征；而Ⅷ因子相关抗原作为内皮的特异性标志，在培养的细胞中呈高度阳性表达，进一步证实了所培养细胞为内皮细胞。CCK-8 的测定表明，细胞生长高峰在 3 ~ 6 d；而 TEER 测量的结果表明培养的细胞具有脑微血管内皮细胞高跨内皮阻抗的特性，但传至四代以后 TEER 值明显下降，故对于构建血脑屏障模型，宜采用第四代以前的细胞。

本研究通过匀浆、酶消化和梯度离心等技术手段分离和获取纯度较高的大鼠脑微血管内皮细胞，为进一步研究脑微血管和血脑屏障的生理、病理机制和药理研究提供了有力工具。

关键词：脑；微血管内皮细胞；细胞培养；大鼠

中图法分类号：R329 - 33　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Kallmann B A, Wagner S, Hummel V, *et al*. Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells [J]. FASEB J, 2002, 16(6): 589 - 591.

[2] Hawkins B T, Davis T P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. Pharmacol Rev, 2005, 57(2): 173 - 185.

[3] Chen L, Kis B, Hashimoto H, *et al*. Adrenomedullin 2 protects rat cerebral endothelial cells from oxidative damage in vitro [J]. Brain Res, 2006, 1086(1): 42 - 49.

[4] 许熊飞，李润平，李　泉，等. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养[J]. 细胞生物学杂志，2005，27(1)：84 - 88.

[5] Lou J, Gasche Y, Zheng L, *et al*. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(12): 3989 - 4000.

[6] Jeliazkova-Mecheva V V, Hymer W C, Nicholas N C, *et al*. Brief heat shock affects the permeability and thermotolerance of an *in vitro* blood-brain barrier model of porcine brain microvascular endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2006, 71(2): 108 - 114.

[7] 王建民，施永德，步燕芳，等. 大鼠脑血管内皮细胞的分离培养与形态学观察[J]. 解剖学杂志，1998，21(6)：495 - 499.

[8] Ishitsuka K, Hideshima T, Hamasaki M, *et al*. Honokiol overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase-dependent and -independent apoptosis[J]. Blood, 2005, 106(5): 1794 - 1800.

[9] Inglis V I, Jones M P, Tse A D, *et al*. Neutrophils both reduce and increase permeability in a cell culture model of the blood-brain barrier [J]. Brain Res, 2004, 998(2): 218 - 229.

[10] 陈剑鸿，张玉琪，卞修武. 血脑/血瘤屏障体外模型的构建、形态与功能特性[J]. 中华神经外科杂志，2006，22(5)：303 - 305.

（编辑　栾　嘉）

《军医大学学报（英文版）》欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊，是中国英文版科技论文统计源期刊，并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。国内统一刊号：31 - 1002/R，国际标准刊号：ISSN 1000 - 1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图，无需缴纳版面费；亦不收取审稿费；无稿酬。投稿要求：中（或大摘要）、英文稿各 1 份，照片提供 3 份。电子投稿 E-mail：kimliu@ mail. tmmu. com. cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部（400038）　　**电话**：（023）68752782