维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)02-0151-02

大鼠脑皮质微血管内皮细胞的培养

吴文斌[1]，胡常林[1]，汤为学[2]

（1.重庆医科大学第二临床学院神经内科 重庆 400010；2.重庆医科大学基础医学院病理生理教研室 重庆 400016）

【摘 要】目的：培养脑皮质微血管内皮细胞。方法：取1～5d Wistar乳鼠脑皮质，经不同孔径的筛网过滤后，用胶原酶振荡消化获得的微血管内皮细胞进行培养，用Ⅷ因子相关抗原免疫组化鉴定。结果：培养的细胞呈单层贴壁生长、7～9d呈典型的铺路卵石样征象。结论：建立了一种简便易行的培养脑皮质微血管内皮细胞的方法。

【关键词】细胞培养；微血管内皮细胞；Wistar大鼠

【中国图书分类法分类号】Q2 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-03-06

Microvascular endothelial cell culture of Wistar rat cerebral cortex

WU Wenbin,et al

(Department of Neurology, the Second College of Clinical Medicine ,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To culture microvascular endothelial cells from Wistar rat cerebral cortex. *Methods*: Cerebral cortex from Wistar rats of 1~5days filtered by various diameter meshes. The pellets containing the microvessels were washed and collected by centrifugation.The microvessels obtained from above procedures were digested by collagenase Ⅶ.The isolated endothelial cells were cultured in M199 +15% fetal calf serum at a density of 3×10^4/ml and observed morphologically. *Results*:The cultured microvascular endothelial cells were stained positively for factor Ⅷ relative antigen. On the 7~9th day , the cells displayed monolayer growth and looked like " cobblestones", a typical appearance of cultured endothelial cells under inverted microscope. *Conclusion*: It is a simple and easy method to culture endothelial cells from brain microvessels.

【Key words】Cell culture; Microvascular endothelial cell; Wistar rat

脑微血管内皮细胞是构成血脑屏障的主要成分，具有特殊的形态结构和机能，在许多病理状态下起重要作用[1]。建立脑微血管内皮细胞体外培养，可获得大量比较单纯的内皮细胞，为研究血脑屏障和脑血管疾病以及新药筛选提供实验模型。本文报告大鼠脑皮质微血管内皮细胞培养的一种方法。

1 材料与方法

1.1 鼠脑皮质微血管内皮细胞培养

1.1.1 鼠脑皮质微血管内皮细胞的分离 取10～12只1～5d的Wistar大鼠（重庆医科大学实验动物中心提供），雌雄兼用，于超净工作台上操作者左手拇食二指持乳鼠颈部稍下处，常规消毒头皮后，右手持眼科剪沿正中线剪开头皮与颅骨，用眼科弯镊取出鼠脑。取出的脑立即放入盛有冰冷Hank's液的平皿中。去除大血管、软脑膜、脑干、小脑和大脑髓质。将收集到的大脑皮质，转入另一先放有170μm不锈钢筛网的冰冷Hank's液的平皿中，用玻璃吸管反复吹打呈脑匀浆，弃滤液，再用Hank's液反复冲洗网上的血管，将收集的血管段液再经孔径75μm尼龙网过滤，500转离心3min，弃上清，收集沉淀的血管段。

1.1.2 原代微血管内皮细胞培养 将微血管段移入0.1‰的Ⅶ胶原酶中37℃振荡消化20min，800r/min离心3min，弃上清，沉淀物加入含15%胎牛血清的M199（完全培养液）制成细胞悬液，接种于35ml塑料培养瓶(Nunclon)中（瓶底朝上），置37℃，5%CO_2培养箱孵育，2h后翻转培养瓶（瓶底朝下），1d后换全液，以剔除混杂的非内皮细胞，以后每3d换完全培养液1次进行细胞原代培养。

1.1.3 细胞传代培养 细胞原代培养7～9d后，细胞呈单层密集生长近亚融合时进行传代繁殖，以0.25%胰酶(含0.02% EDTA)消化细胞，见细胞大部分脱落时加入完全培养液终止消化，轻轻吹打，制成细胞悬液，按实验需要传代，传代时接种密度为3×10^4/ml。

1.2 特性鉴定

1.2.1 形态学 用Olympus倒置显微镜观察内皮细胞的形态及生长规律。

1.2.2 用MTT法测内皮细胞的生长率 传代培养至第3

作者介绍：吴文斌（1966- ），男，主治医师，博士，主要研究方向：脑血管疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

代，接种于24孔培养板中，接种密度为3×10^4/ml，在1～11d内，每天收集3孔的细胞进行MTT法测细胞的活力。即细胞培养至所选时间，弃上清，每孔加入400μl M199，40μl MTT继续培养4h后，离心2000转，5min，弃上清，每孔加入400μl二甲基亚砜溶解紫色结晶，再转入96孔板，于自动酶标仪上测定OD_{570}值，吸光度值的大小反映内皮细胞成活数量及活性。

1.2.3 免疫组化 将长有细胞的盖玻片取出，用浓度为0.1 mmol/L PBS漂洗后，4℃丙酮固定10min，滴加Ⅷ因子相关抗原的抗体(博士德，即用型)，再按通用型SP kit (北京中山)说明进行操作，DAB显色，封片后镜下观察和照相。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察

倒置显微镜观察分离的微血管段形态各异，长短不等，呈单枝或多枝状。经胶原酶消化后，微血管管壁不清，壁上内皮细胞清晰可见。2h后翻转培养瓶，目的是去除首先贴壁的长梭形成纤维细胞。混悬液内还有未分离干净的神经组织碎片和红细胞，1d后换全液即可清除，换液后可见大部分微血管片段已贴壁，边缘长出单个内皮细胞，呈三角形或长梭形，排列不规则，核淡，胞膜明显，2～3d可见细胞分裂增殖形成散在细胞群落，7～9d融合成片状，细胞紧密排列，互不重叠，呈典型的铺路卵石样结构(见图1)。传代细胞初种时为明亮的园球形，悬浮于培养液中，4h后大部分细胞贴壁，呈扁平状，24h后细胞胞体变大，随培养时间延长，细胞多呈三角形或长梭形，7d后细胞增殖成单层片状。传至第4代时细胞轮廓欠清。测定第三代内皮细胞的生长率表明内皮细胞的生长高峰在7～9d(见图2)，以后不再增殖，出现生长接触抑制现象。

2.2 免疫组化

原代、第三代内皮细胞进行ⅧF：Ag免疫组化检查，95%以上细胞的胞浆和核膜周围被染成棕褐色(见图3)，证实培养的内皮细胞为血管内皮细胞。



图1 培养第8d（Olympus倒置显微镜 ×200）

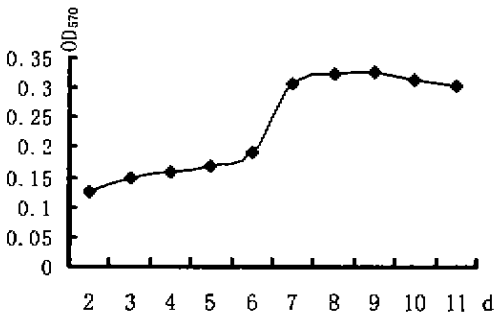


图2 纯化内皮细胞生长率曲线



图3 ⅧF:Ag免疫组化（LAB-SA法,DAB显色 ×200）

3 讨 论

血管内皮遍布全身，位于整个循环系统的内表面，它不仅是血管的被动衬里，而且是肌体最大的内分泌腺[2]。由于它所处的特殊位置，可通过不同的机制和生化信息，来释放血管活性物质、细胞因子和生长因子，以调节免疫反应、血液流动性、凝血过程、血管床张力及通透性，参与正常和新生组织的血管形成。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。它是构成血脑屏障的主要成分，同时与脑水肿、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形成等病理过程紧密相关。我们对鼠脑皮质微血管内皮细胞培养的偿试，为体外研究各种颅脑疾病提供一种崭新的实验工具。由于不同来源的血管内皮细胞之间存在较大的差异性，人们常根据不同的研究目的选取不同的血管内皮细胞进行培养。国外对脑微血管内皮细胞的分离培养始于70年代末，难点主要在于脑微血管分离步骤繁杂、内皮细胞难以纯化，建立与维持微血管内皮细胞很难，且有些方法不适合于国内普通实验室，如需要高速冷冻离心机和价格昂贵的内皮细胞生长因子等[3]，故国内关于脑微血管内皮细胞培养方法的报

(下转第155页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

是镇痛和意识分离药物、具有有效的镇痛作用，抑制呼吸轻；戊巴比妥钠可起镇静作用；利多卡因可有效预防恶性室性心律失常发生而降低死亡率，并不影响心肌梗塞范围[3]；阿托品可减少呼吸道分泌物以防止气道阻塞。

左侧第3、4肋间开胸、可不剪断肋骨、胸大肌和前锯肌，创伤轻；术后经缝合胸大肌和前锯肌关胸，保持了大鼠胸部正常解剖结构，不影响呼吸功能有利于大鼠长期存活。关胸前用注射器抽吸胸腔，可清除胸腔内血块和快速恢复胸腔负压，有利于自主呼吸的恢复。

本实验结果显示，鼠心肌梗死后21天时，肉眼观察梗死区由瘢痕组织替代而变薄、苍白、非梗死区心肌肥厚，左心室腔扩张，心脏重量/体重比率增加；组织学上有梗死区和非梗死区I型、III型胶原蛋白表达增加，与假手术组比较均有非常显著性差异（$P<0.01$）。而且梗死区比非梗死区明显，邻近梗死区的非梗死心肌比远离梗死区的非梗死心肌明显，这表明鼠心肌梗死后出现了相应的病理形态学改变。

采用本技术复制的慢性心肌梗塞大鼠模型，术后72h内的死亡率仅为6.67%，3周以上存活率可达到78.1%。术中用体表心电图记录较其他指标能更早反映心肌损伤变化，且可活体动态观察，其结果与心脏病理形态学结果相符，而且与文献报道的结果一致[4]。

本项实验技术操作简单，创伤轻，成功率高，结果可靠。

参 考 文 献

[1] Esther Lutgens, Mat J.A.P.Daemen, Ebo D.de Muinck, et al. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes[J]. Cardiovasc Res,1999;41:586-593.

[2] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 第1版，北京：中国中医药出版社，1997;193-194.

[3] 赵 学，富维骏，袁文俊，等. 清醒大鼠冠状动脉阻断再通技术及其应用[J]. 第二军医大学学报，1996;17(5):415-418.

[4] 黄 坚，郭兆贵. 豚鼠心肌梗塞的实验模型[J]. 湖南医科大学学报，1991;16(1):19-22.

（上接第152页）

道较少。我们根据本校条件，探讨了培养大鼠脑微血管内皮细胞的方法、成功进行了Wistar 乳鼠大脑皮质微血管内皮细胞的体外培养。根据我们的体会，培养时应注意以下几点：(1)仔细剥离软脑膜、去除脑干、大血管、小脑和大脑髓质后，吹打成匀浆的脑组织经过 170 μm和75 μm两种孔径滤网过滤，这样既可去除较大组织块和大血管，又可达到收集微血管段的目的，因据Brendel等[4]研究发现鼠脑微血管的直径在6～80 μm之间，分离脑微血管多选直径80 μm左右的滤网筛选。(2)胶原酶充分消化。我们用0.1‰的Ⅶ胶原酶在37℃恒温摇床振荡消化20min即可。酶充分消化有助于内皮细胞的迁移、去除周皮细胞。消化时间的长短因胶原酶的类型与不同的浓度而有所不同。(3)原代培养时需收集到足够量的微血管，否则培养难以成功。(4) 原代培养2h后，翻转培养瓶以去除先贴壁的成纤维细胞，24h后换液一次以去除未贴壁的杂质，净化培养环境。开始培养的2～5d，在倒置显微镜下用机械方法(细胞刮刀)刮去可疑的细胞或细胞群落。(5)传代培养时，只收集最先脱落的细胞进行培养，这是因为内皮细胞具有贴壁早，而在酶消化时易脱落的特性[5]。(6)培养内皮细胞最好选用含15%胎牛血清的M199培养液来培养，这样有利于内皮细胞的生长、逐渐淘汰混杂的神经元和胶质细胞。

参 考 文 献

[1] Chi OZ, Wei NM, Sinha AK, et al. Effects of inhibition of nitric oxide synthase on blood-brain barrier transport in focal cerebral ischemia[J]. Pharmacology,1994;48:367-373.

[2] Inagami T, Naruse M, Richard H. Endothelium as an endocrine organ[J]. Annu Rev Physiol,1995;57:171-189.

[3] Gordon EL, Danielsson PE, Hguyen TS, et al. A comparision of primary cultures of rat cerebral microvascular endothelial cells to rat aortic endothelial cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol,1991;27A:312-326.

[4] Brendel K, Meezan E, Carlson EC. Isolated brain microvessels: a purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex[J]. Science, 1974;185:953-955.

[5] Browman PD, Betz AL, Diane AR,et al. Primary culture of capillary endothelium from rat brain[J]. In Vitro,1981;17(4):253-262.