

· 论 著 ·

大鼠心肌微血管内皮细胞的分离培养和鉴定

滕丽新¹, 刘胜学², 谢庭菊³, 何作云^{4△}

(1. 解放军第三二四医院干部病房, 重庆 400020; 第三军医大学; 2. 军事预防医学系分子毒理学教研室, 重庆 400038; 4. 新桥医院心内科, 重庆, 400037; 3. 成都军区衣冠庙干休所, 四川 610083)

摘要:目的 建立心肌微血管内皮细胞培养模型。方法 以 1%~2% 鼠尾胶原对培养皿作预处理, 采用胶原酶和胰蛋白酶两次消化法从 SD 大鼠心肌分离培养微血管内皮细胞。结果 通过形态学特征及微血管内皮细胞相关特异性抗原检测证实, 得到高纯度大鼠心肌微血管内皮细胞。结论 以鼠尾胶原对培养皿作预处理, 采用蛋白酶消化及机械剪切、过滤的方法培养大鼠心肌微血管内皮细胞, 纯度和获得率均较高。

关键词:微血管内皮细胞; 培养; 鼠尾胶原; 胶原酶; 胰蛋白酶

中图分类号: R365.543

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)04-0403-03

Separation culture and appraisalment of rat cardiac microvessel endothelial cells

TENG Li-xin¹, LIU Sheng-xue², XIE Ting-ju³, et al.

(1. Department of Geriatrics, 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China;

2. Department of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

3. Officer Sanitarium, Yiguanmiao, Chengdu Military Area, Sichuan 610083, China;

4. Department of Cordis, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective To establish the culture model of cardiac microvessel endothelial cells. **Methods** Used 1%—2% collagen of rats' tails to pretreat Petri dish. By protease digestion, machine shearing and filtration, isolated and cultured rat CMEC. **Results** Judged the CMEC by detecting morphologic feature of rat CMEC and its activating with its special related antigen under phase-contrast microscope, and by the expression of factor CD31-related antigen. These results suggested that these cells were rats' CMEC. **Conclusion** Using collagen of rats' tails to pretreat Petri dish, and protease digesting in two times, we can obtain more cells with higher purity.

Key words: microvessel endothelial cells; culture; collagen of rat's tail; collagenase; trypsinase

由于心脏所具有的特有形状和舒缩功能, 心肌内血管所受影响因素十分复杂, 其中血管内皮既是众多心血管疾病危险因素作用的靶器官, 其功能失调又可构成许多心血管疾病的病理基础。高胆固醇血症导致的血管内皮功能受损是 AS 的始动因素^[1]。应进一步对心肌微血管内皮细胞功能进行研究, 但因其分离和培养要求极高而受限。本研究对 Nishida 等^[2]建立的分离和培养方法进行了学习和改进, 成功分离培养了大鼠心肌微血管内皮细胞 (CMEC), 为下一步研究 CMEC 的功能奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 健康清洁级 SD 大鼠, 雄性, 购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心, 约 4 周龄, 体重 100~120g, 普通基础饲料饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 培养皿预处理^[3] 取大白鼠鼠尾 1 根, 置 75% 酒精中浸泡 3h, 将鼠尾切成 1.5cm 小段, 剔除皮毛, 抽出尾腱置平皿中, 取 1.5g 左右尾腱浸入 150mL 醋酸溶液 (0.01~0.25M), 并置于 4℃ 冰箱中, 48h 后移入无菌离心管中, 以离心半径 17.4cm, 4 000r/min 离心 30min, 取上清液, 高温、高压后分装使用; 吸少许鼠尾胶原涂于无菌培养皿的内底部, 不宜太厚, 以倾斜时不流动为准, 置 37℃ 温箱中过夜或室温下 48h, 待胶原凝固后, 用无菌蒸馏水冲洗培养皿底部, 凉干后即可使用。

1.2.2 SD 大鼠 CMEC 的分离和培养 在超净台装配灌流系统连接蠕动泵, 泵速度调至 10mL/min, 使硅胶管中充满含 Ca²⁺ 的 Krebs-Henseleit 碳酸氢盐缓冲液 (KHB), 关泵备用。将雄性 SD 大鼠 (150g) 予 10% 乌来坦/生理盐水麻醉, 开胸, 迅速切下心脏, 置于含 Ca²⁺ 的 KHB 中, 剪去附属器官 (胸腺) 和组织, 暴露主动脉, 迅速连接主动脉于灌流系统, 用蚊式止血钳夹着主动脉上端, 以固定住心脏, 用含 Ca²⁺ 的 KHB 灌注 5min, 使心脏内血液完全排出, 取下心脏, 剪除主动脉、右心室、所有瓣膜组织和其它周围相连组织, 只保留左室心肌组织, 沿前游离壁切开, 用缓冲液冲洗后浸在 70% 乙醇中 30s, 再用无 Ca²⁺ 的 KHB 冲洗, 切除左室游离壁外部 1/4 和中隔部分, 将剩下心肌组织剪碎, 置于 0.2% 胶原酶中, 放入恒温摇床, 37℃, 摇晃 30min, 加入 0.02% 胰蛋白酶 (上海生工公司生产) 1mL, 用尖嘴吸管剪切心肌组织 10 次, 37℃, 摇晃 30min, 经 100μm 网孔过滤器过滤, 用无 Ca²⁺ 的 KHB 冲洗, 再用移液器移至 50mL 离心管中, 用无 Ca²⁺ 的 KHB 冲洗培养皿, 同样移入离心管中, 1 000~1 500r/min 离心 5min, 去上清液, 重复洗涤细胞 1 次, 用含 Ca²⁺ 的 KHB 洗涤、离心 1 次, 将细胞悬浮于含 20% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程研究所生产) 和抗生素的 DMEM (Gibco, Grand Island, New York) 中 (青霉素 100IU/mL, 链霉素 100μg/mL), 浓度 15 000cells/mL, 将细胞种植在处理好的细胞培养皿中, 密度 2.5 × 10³/cm², 8h 后用 DMEM

△ 通讯作者。

冲洗贴壁细胞,在含 20% 胎牛血清 DMEM 中 O₂ 95%、CO₂ 5%、37℃ 培养。

1.2.3 SD 大鼠 CMEC 增殖生长力的测定 取 SD 大鼠传代 CMEC 第 2 代或第 3 代,其增长至接近汇合,生长状态良好,向培养皿内加 1mL 0.25% 胰蛋白酶液,37℃ 温箱中消化,至细胞接近脱离培养皿底壁前吸出消化液,加入新培养液,轻吹打制备成细胞悬液,计数;取无菌 24 孔细胞培养板,向每孔中接种等量细胞,共接种 21 孔,置温箱中培养,从次日起,即开始检测,21 孔分 7 组,每组 3 孔,培养 1 周,其间逐日检测 1 组,计数每个孔细胞总数,每组取 3 个孔均值;用座标图纸绘成生长曲线。

1.2.4 SD 大鼠 CMEC 存活率的测定 用 96% 酒精冲洗计数板后用酒精棉球擦净,另擦净盖玻片 1 张,把盖玻片覆在计数板上,使之微微移向一侧,露出计数板台面少许,以便滴加细胞悬液,取吸管 1 支,伸入培养皿中,轻轻反复吹打细胞悬液,使细胞重悬均匀后,立即吸细胞悬液少许,向另一离心管中滴入细胞悬液 9 滴,再滴入台盼蓝染液 1 滴,混匀,置 2~3min,把计数板平放在显微镜台上,立即从计数板边缘轻轻加 1~2 滴已染色的细胞悬液,使之充满计数板和盖玻片间空隙,镜下观察可见细胞分散各处,健康细胞胞体完整,透明不着色,凡着色细胞均为不健康者。计算四角大方格内的细胞数,压线者计算压左线和上线者,然后按公式计算:细胞数/原悬液(毫升) = 4 大格细胞总数/4 × 10⁴ × 稀释倍数。

1.2.5 SD 大鼠 CMEC 的鉴定 采用免疫组化方法进行鉴定,用 4% 多聚甲醛固定 10~30min。蒸馏水洗,在 3% 过氧化氢/甲醇中室温孵育 30min,以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗后,用 0.01M PBS 漂洗 5min × 3 次,滴加正常山羊封闭血清(或 2% 牛血清白蛋白),室温孵育 30min,甩去多余液体,不洗,加一抗(兔抗大鼠 CD31,武汉博士德公司生产),在 37℃ 下作用 90min,用 0.01M PBS 漂洗 5min × 3 次,加生物素化山羊抗兔 IgG(武汉博士德公司生产),在 37℃ 下作用 30min,用 0.01M PBS 漂洗 5min × 3 次;滴加试剂 SABC(武汉博士德公司生产),在 37℃ 下作用 30min,用 0.01M PBS 漂洗 5min × 4 次,予 DAB(武汉博士德公司)显色,显微镜下控制显色时间(5~30min),然后予蒸馏水冲洗终止染色,予苏木精轻度复染,1% 盐酸酒精分化,自来水充分漂洗,逆酒精梯度脱水,依次在 70%、75%、85%、95%、100% 乙醇 I、II 中各脱水 3min,切片干燥后,用中性树脂封片。

2 结果

2.1 SD 大鼠 CMEC 培养结果 在分离 SD 大鼠 CMEC 并种植后第 1 天(4~8h)可在数个视野中观察到梭形贴壁细胞,平均每 2~3 个视野 1 个细胞(图 1),种植后 4~8h 换液,轻轻冲洗培养皿后,保留下来的贴壁细胞继续生长增殖;种植 CMEC 第 2 天,可在多个视野中观察到梭形或三角形贴壁细胞,平均 3~5 个细胞/视野,贴壁细胞呈群居势生长,增值较快(图 2);种植 CMEC 第 3 天,可观察到大量三角形或四角形贴壁细胞,平均 30~60 个贴壁细胞/视野;种植 CMEC 第 5 天,可观察到平均 80~100 个贴壁细胞/视野;培养至第 6~7 天,可见细胞呈铺路石状生长,并有细胞间相连成管样态势的生长方式(图 3,4),为内皮细胞生长特点,微血管源内皮细胞在标准培养介质中比较典型^[2]。对于培养的 SD 大鼠 CMEC,种植 4h 后冲洗,可使其同种同质性更加明显。

2.2 SD 大鼠 CMEC 鉴定结果 在显微镜下观察到 CD31 阳

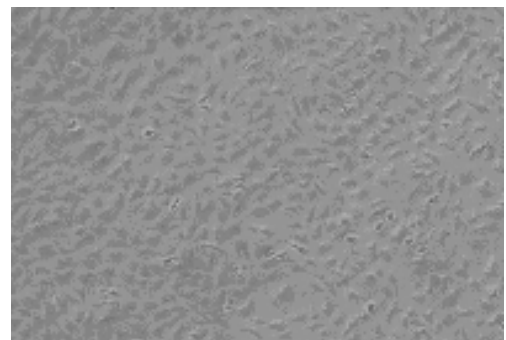
性者为细胞膜上有黄褐色细颗粒或粗颗粒附着,阴性者无黄褐色着色。阳性细胞数大于 95%,证明本实验培养的细胞具有微血管内皮细胞特异性(图 5),结合培养细胞生长性状和趋势以及分离和培养细胞的方法,可以判定本实验培养的细胞为 SD 大鼠 CMEC。



图 1 分离 SD 大鼠 CMEC 并种植后第 1 天(4~8h)观察结果

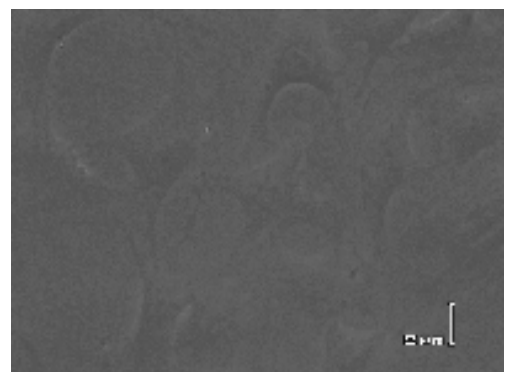


图 2 SD 大鼠 CMEC 原代培养第 2 天观察结果



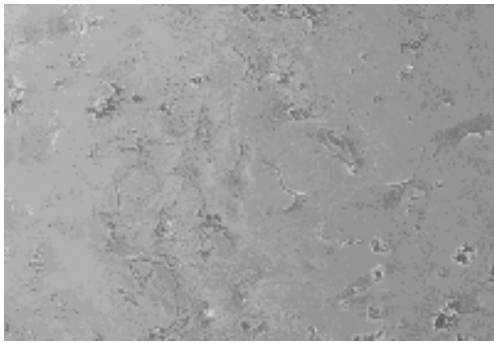
呈铺路石状。

图 3 SD 大鼠 CMEC 原代培养第 6 天观察结果



呈管状生长趋势。

图 4 SD 大鼠 CMEC 原代培养第 7 天观察结果



CD31 表达阳性细胞为棕黄色颗粒附着者。

图 5 SD 大鼠 CMEC 鉴定结果

2.3 SD 大鼠 CMEC 细胞计数结果 经台盼蓝染色后细胞计数,培养 CMEC 中健康细胞所占比例大于 90%,以 35mm×10mm 培养皿培养细胞数为 $(1.5 \sim 2.5) \times 10^6$ /培养皿;以 60mm×15mm 培养皿培养细胞数为 $(5 \sim 6) \times 10^6$ /培养皿;以 25cm² 培养瓶培养细胞数为 $(5 \sim 6) \times 10^6$ 个/培养瓶;以 75cm² 培养瓶培养细胞数为 $(1.5 \sim 2.5) \times 10^7$ /培养瓶。

2.4 SD 大鼠 CMEC 生长曲线 SD 大鼠 CMEC 指数增长期为细胞培养第 3、4 天,见图 6。

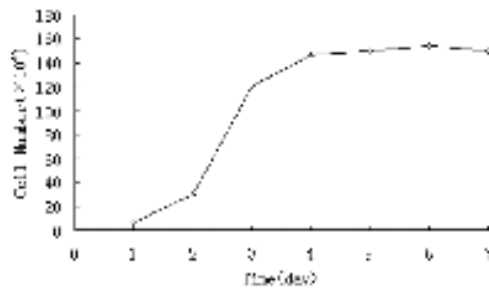


图 6 SD 大鼠 CMEC 生长曲线

3 讨 论

本实验成功分离培养了 SD 大鼠 CMEC,并进行了相关鉴定,为研究 CMEC 在流体力学中的变化及在缺血性心肌损害的免疫学损伤中的作用研究提供了良好实验载体。目前分离培养大鼠 CMEC 的方法主要有两种:(1)冯兵等^[4]和宁艳霞等^[5]以组织块培养方法培养,认为此方法简单,对设备无特殊要求,而且较少损伤细胞,用同样质量的心脏收获内皮细胞数量也较多,但未提到如何排除组织块中的贴壁细胞成纤维细胞和心肌细胞的污染,因为成纤维细胞一般比较容易贴壁;Toshio 等^[6]和 Nehls 等^[7]实验也提示心肌成纤维细胞生长速度快于 CMEC。(2)Nishida 等^[2]采用蛋白酶消化及机械剪切、过滤的方法首先分离培养出了 SD 大鼠 CMEC,并利用胰蛋白酶和胶原酶消化组织,降低心肌细胞的贴壁能力,同时根据心脏微血管内皮细胞贴壁快,而心肌细胞贴壁较慢的特点,在种植后 4h 充分洗涤种植细胞,去除可能污染的心肌细胞,使其污染降低到最低限度,再通过 70%乙醇灭活心内膜和心外膜的间质细胞,同时去除心室肌的外 1/4 部分,大大减少了间质细胞的污染,提高了 CMEC 的纯度和获得率。Nishida 等^[2]和张莉等^[8]在种植细胞时以 Laminin 预先处理培养皿,促进细胞贴壁。作者对培养皿的预处理进行了多种尝试:(1)应用新的 Corning 培养皿,以 Laminin(Laminin, BD 公司产品,价格为每毫克 249 元)作预处理,在种植 4~8h 内洗涤培养皿,贴壁细胞不易脱落,固定良好;(2)应用新的 Corning 培养皿,不作预处

理,发现原代细胞贴壁时间偏长,贴壁后,固定效果欠佳,在种植 4~8h 内洗涤培养皿,细胞易脱落,收获细胞少;(3)应用新的 Corning 培养皿,以 1%明胶预处理^[9-11],原代细胞不易贴壁;(4)应用新的 Corning 培养皿,以约 1%~2%鼠尾胶原作预处理,促进分离的微血管内皮细胞的黏附、生长和增值,原代细胞贴壁后,固定效果良好,种植 4~8h 内洗涤培养皿内贴壁细胞,细胞不易脱落,经对比发现,可获得与以 Laminin 预处理培养皿一样的培养效果。同时鼠尾胶原的材料来源广泛,价格低廉,制备方法简单,应用也很方便,作者认为是可以在 CMEC 的分离培养中广为推荐的促细胞生长的良好基质。

本实验应用血小板内皮细胞黏附分子(PECAM 或 CD31)来鉴定分离培养的 CMEC,CD31 为 130×10^3 内膜糖蛋白,属于细胞黏附分子的免疫球蛋白超家族。该分子在细胞中呈组成型表达,基本上为内皮细胞和血小板所独有。CD31 在血小板上的表达不会干扰内皮细胞的分离,因为血小板在体外不稳定,不吸附。所以 CD31 是一个很好的 CMEC 的特异性标记物。

参考文献:

- [1] Back M. Leukotriene Signaling in atherosclerosis and ischemia[J]. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2009, 23 (1):41.
- [2] Nishida M, Carley WW, Gerritsen ME, et al. Isolation and characterisation of human and rat cardiac microvascular endothelial cells[J]. Am J Physiol, 1993, 264(2):H639.
- [3] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 2001:74.
- [4] 冯兵,何作云,王德文,等. 心肌微血管内皮细胞培养及生物学特性的初步观察[J]. 微循环学杂志, 2000, 10(3): 19.
- [5] 宁艳霞,王新红,金惠铭,等. 大鼠心肌微血管内皮细胞的培养及基因芯片分析的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(12):2295.
- [6] Toshio T, Tetsushi T, Hiroyuki K, et al. The growth of a vascular network inside a collagen-citric acid derivative hydrogel in rats[J]. Biomaterials, 2009, 30(21):3580.
- [7] Nehls V, Herrmann R, Hnken M, et al. Contact-dependent inhibition of angiogenesis by cardiac fibroblasts in three-dimensional fibrin gels in vitro: Implications for microvascular network remodeling and coronary collateral formation[J]. Cell Tissue Res, 1998, 293(3):479.
- [8] 张莉,蔡绍哲,刘冰,等. 人脐静脉内皮细胞体外流动培养系统的制作研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(2):113.
- [9] 孟华,朱妙章,黄晨,等. 大鼠心肌微血管内皮细胞的培养及其生物学特性[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(9): 1153.
- [10] 鲁向辉,迟路湘,刘恺鸣. 大鼠脑微血管内皮细胞体外缺血再灌注模型的建立及他汀的保护作用[J]. 重庆医学, 2008, 37(3):293.
- [11] 王金晶,徐迎新. 肝实质细胞和肝窦血管内皮细胞体外共培养的实验研究[J]. 山东医药, 2005, 45(26):19.