

大鼠肺微血管内皮细胞原代培养方法的改进

蒋玲¹, 胡远东¹, 徐菲菲¹, 王廷华^{1,2△}

1. 四川大学华西医院 麻醉科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 转化神经科学中心(成都 610041)

【摘要】 目的 改进 SD 大鼠肺微血管内皮细胞(PMVECs)原代培养方法,以获得纯化的大鼠 PMVECs。方法 对组织块法培养 PMVECs 过程中的组织取材、植块贴壁、培养基配制、传代培养进行改进包括:在麻醉前提前注射肝素钠;利用腹腔放血,待大鼠停止呼吸后剪开胸腔;改进操作以及试剂中加入双抗以降低污染率;原代培养 48 h 即取出组织块;进行再次消化去除成纤维细胞;异硫氰酸标记的植物凝集素(FITC-BSI)鉴定培养的 PMVECs。培养后在倒置显微镜下观察细胞形态。结果 原代培养的细胞呈现为多角形或短梭形,呈单层铺路石样排列的典型结构。随着细胞传代或培养条件的改变,细胞形态发生变化,可呈长梭形,漩涡状排列。FITC-BSI 结合实验呈绿色荧光,阳性率达到 90% 以上。结论 通过改进分离及培养方法可获得生长状态良好、纯度高且能够稳定传代培养的 PMVECs。

【关键词】 肺微血管内皮细胞 原代培养 鉴定

Improving Primary Culture of Pulmonary Microvascular Endothelial Cells of Rats JIANG Ling¹, HU Yuan-dong¹, XU Fei-fei¹, WANG Ting-hua^{1,2△}. 1. Department of Anesthesiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Translational Neuroscience Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: tinghua_neuron@263.net

【Abstract】 **Objective** To improve the culturing method of pulmonary microvascular endothelial cells (PMEVCs) of SD rats. **Methods** The culturing processes in regard to obtaining peripheral lung tissue, attaching tissue block, preparing medium and subculturing were modified. These included an injection of heparin sodium before anesthesia, abdominal bleeding, opening of chest when breathing stopped, improvement of operational details, reduction of pollution by adding penicillin and streptomycin, discard of tissues after 48 h of primary culturing, remove of fibroblasts by a second digestion, and identification of cells using a fluorescence microscope for binding with lectin from BSI (FITC-BSI). An inverted microscope was used to observe the morphological characteristics of PMEVCs. **Results** Purified PMEVCs were obtained, which displayed a polygon or short fusiform, exhibiting a typical cobblestone-like morphology. The morphology of PMVECs turned into swirling or long fusiform following subculture or changes in culture conditions. The results of FITC-BSI assay showed that more than 90% cells were stained with green fluorescence. **Conclusion** Purified PMEVCs with a good growth state and subculture stability can be obtained using the modified method.

【Key words】 Pulmonary microvascular endothelial cells Primary culture Identification

肺微血管内皮细胞(PMVECs)不仅是血气屏障的重要组成部分,同时因其能够分泌血管活性物质、黏附分子以及凝血、抗凝物质而具有调节微循环、炎症反应、凝血过程等功能^[1]。多种肺疾病如急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征以及脑缺血再灌注性肺损伤的发生机制都涉及了肺微血管内皮的改变^[2-4]。因此要研究 PMVECs 在这些机制中的作用和意义,其体外培养就显得格外重要。近年来国外已经有多种 PMVECs 分离培养方法,主要包括酶

消化法^[5]、磁珠法^[6]和微载体法^[7]。组织块法由 CHEN 等^[8]首次提出,由于该法操作简单,细胞损伤小,目前已成为国内培养肺微血管内皮的主要方法。但该法存在易污染、细胞纯度低等问题。

本研究对组织块法的多个技术细节进行了改进,以期降低培养的污染率,提高 PMVECs 的纯度,为体外培养 PMVECs 提供一种简单、稳定的方法。

1 材料与方法

1.1 动物

△ 通信作者, E-mail: tinghua_neuron@263.net

SPF级健康、雄性SD大鼠(120~150 g)2只,由成都达硕实验动物有限公司提供。实验方案获得四川大学动物实验伦理委员会通过,所有手术操作都是在动物被麻醉的情况下进行,力求减轻动物的痛苦。

1.2 主要试剂和仪器

低糖DMEM培养液(Hyclone);100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素(成都宝科生物科技有限公司);胎牛血清(Hyclone)、胰蛋白酶(Gibco);异硫氰酸荧光素标记植物凝集素(FITC-BSI, Sigma);6孔细胞培养板(Corning);体积分数为5%的CO₂细胞培养箱(Thermo);倒置显微镜(NIKON T1-SM);解剖显微镜(重庆光学仪器厂);超净工作台(SW-CT-2FD2);手术器械包括显微镊、扁平尖镊、剪刀、弯镊等。配制后续实验使用的胰蛋白酶液:100 mL PBS中加入0.25 g胰蛋白酶,并在100 mL配制好的胰蛋白酶液中加入0.02 g乙二胺四乙酸(EDTA)以螯合钙、镁等金属离子,消除对胰酶的抑制,增加胰酶的活性。

1.3 细胞培养

1.3.1 取材及植块 取SD大鼠,提前在腹腔注射肝素钠5 000 U,然后用36 g/L水合氯醛按体质量1 mL/100 mg腹腔注射进行麻醉。麻醉后,进行胸腹区备皮,用750 mL/L乙醇溶液全身浸泡消毒5 min(注意不要使口鼻吸入酒精)。仰卧位固定,打开腹腔,暴露腹主动脉并剪断放血处死大鼠。待大鼠停止呼吸,剪开胸腔并暴露心肺器官,剪开左心耳,用注射器经右心室缓慢推注含双抗的PBS 15~20 mL冲洗至肺叶变白。剪下肺叶,用预冷的PBS漂洗2次后,转移至超净台中盛有预冷DMEM培养基的培养皿中。在解剖显微镜下,用显微镊将肺边缘的胸膜剥除。用剪刀沿肺边缘剪下宽度约1.5 mm的肺组织,置于含有预冷血清的EP管中,将组织剪成1 mm×1 mm×1 mm的组织块。将组织块以每孔12~15块种植在6孔板上,置于含体积分数5% CO₂培养箱中倒置干贴壁30 min。

1.3.2 原代培养 取出6孔板,轻轻翻转培养板,用移液枪缓慢滴入完全培养基(90 U/mL肝素、200 mL/L胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素、低糖DMEM培养液)至刚好没过组织块,将6孔板重新置于培养箱中继续培养。取两板细胞,分别于48 h以及60 h时移除组织块,吸弃剩余培养基,沿板壁每孔加入2 mL新鲜培养基继续培养。以后根据情况每隔2~3 d更换培养基。

1.3.3 传代培养 待细胞长满板底的80%~90%(10 d左右)时,进行传代培养。取出6孔板,吸弃培养基,用37℃的PBS清洗2次后,加入胰蛋白酶液消化1 min。待细胞变圆后、间隙变宽时,加入完全培养基终止消化,用移液器轻柔吹打后,收集细胞悬液于15 mL离心管中。此时6孔板中仍有大量细胞残余,用PBS清洗2次后,加入胰蛋白酶液进行再次消化,约2 min待细胞变圆、间隙增宽时加入完全培养基终止消化,用移液枪轻柔吹打细胞壁,收集细胞悬液于15 mL离心管中。将两管细胞悬液以1 000 r/min离心8 min,弃掉上清液,每管加入12 mL完全培养基。用移液枪轻柔吹打重悬后,将两管细胞分别种植于6孔板中,置于培养箱中继续培养。然后根据细胞的生长情况更换培养基。

1.3.4 冻存与复苏 冻存:取生长状况良好的3~5代细胞进行冻存。取出细胞板,弃掉培养基。加入PBS漂洗后加入胰蛋白酶液进行消化,再用完全培养基终止消化,制成细胞悬液后,以1 000 r/min离心8 min。弃掉上清液加入1 mL含体积分数为85%的培养基及15%的甘油,吹打。最后移入冻存管中进行冻存。冻存时,先将冻存管置于4℃冻存30~40 min后转入-20℃冻存2~4 h,然后转入-80℃冻存24 h,最后转入液氮内永久冻存。复苏:将冻存管迅速置于37℃的水浴中,待其融化后,将细胞加入含有10 mL完全培养基的离心管中进行离心,弃掉上层液体,再重新加入新鲜培养基进行重悬接种。

1.4 细胞鉴定

1.4.1 倒置相差显微镜下观察细胞形态 在培养箱中培养48 h或60 h,此间应避免进行细胞观察,以防组织块漂起。48 h或60 h去除组织块后,在倒置相差显微镜下观察原代和传代细胞的形态变化,并拍照。

1.4.2 FITC-BSI结合实验 将培养至第5代的细胞接种于96孔板中培养3 d后进行鉴定。取出细胞,用PBS缓冲液漂洗2次后,用16 g/L多聚甲醛室温固定20 min后,再用PBS漂洗2次,然后加入5 mL/L TritonX-100室温孵育20 min。再向每孔加入25 μg/mL FITC-BSI 100 μL,室温避光孵育30 min。用PBS漂洗3次后加入DAPI(1:1 000)进行室温复染5 min。最后用荧光显微镜进行观察,并拍照。

2 结果

2.1 PMVECs原代生长情况

见图1。肺组织块贴壁数小时后就见有血细胞从肺组织块边缘向四周游出。24 h 已经开始有 PMVECs 游出,至 48 h,已经有较多的 PMVECs 游出,少有成纤维细胞(图 1A),培养至 60 h 时已经有部分成纤维细胞游出(图 1B)。移除组织块,更换培养基,培养 10 d 左右见细胞呈现多角形或短梭形,呈典型的铺路石样镶嵌生长(图 1C)。但 48 h 移除

组织块组有更多细胞呈现出微血管内皮的典型改变。此时进行传代,血细胞被除去。传至 3~5 代后细胞形态逐渐发生变化,变为长梭形,或有粗大分支,呈漩涡样生长或聚集生长。可以见到第 5 代(P5)时,48 h 移除组织块组的细胞更接近于原代时的铺路石样形态(图 1D),而 60 h 移除组织块组的细胞更多的接近于成纤维的编织状生长。

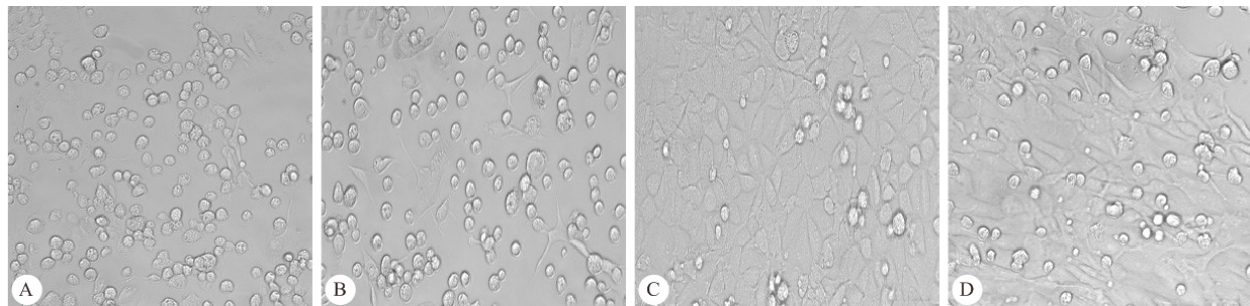


图1 原代及传代培养的细胞形态学。×200

Fig 1 Cell morphology of primary and passage culture. ×200

A,B,C: Primary cells cultured for 48 h, 60 h and 10 d, respectively; D: Passage 5 cells cultured for 48 h

2.2 鉴定情况

将 48 h 移除组织块组的 P5 细胞进行 FITC-BSI 结合实验。可以见到 PMVECs 呈明亮的黄绿

色荧光,DAPI 复染核呈现蓝色。与首次消化相比,再次消化的细胞被 FITC-BSI 标记的阳性率更高(图 2)。

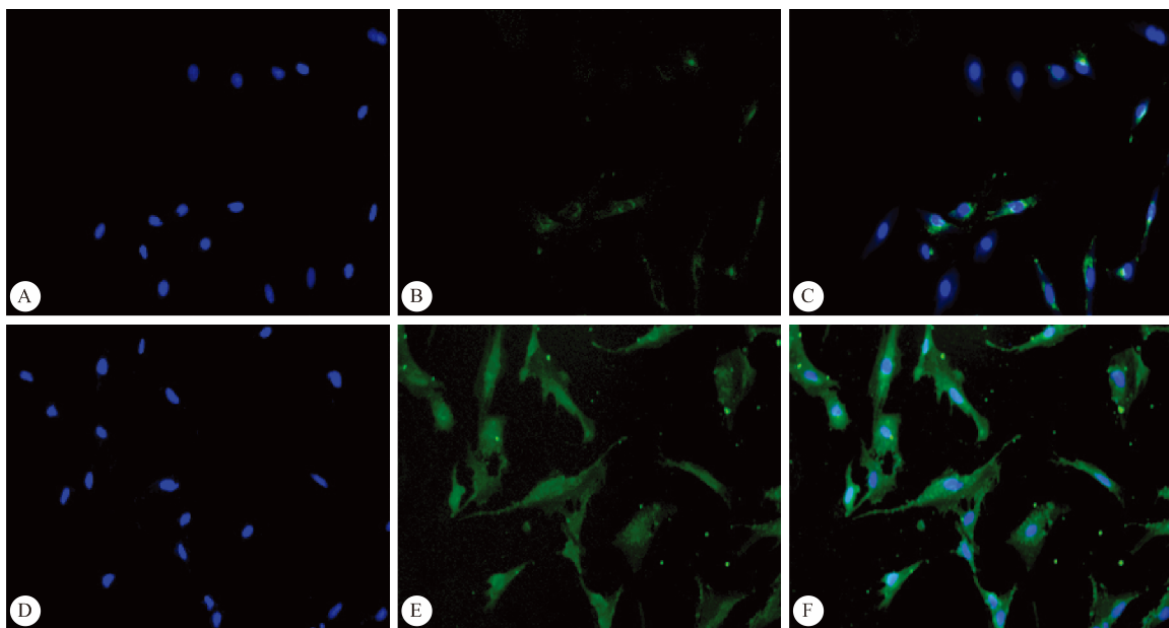


图2 P5 细胞培养 48 h 肺微血管内皮细胞的鉴定。×400

Fig 2 The identification of PMVECs at passage 5 on 48 h. ×400

A, D: DAPI; B, E: FITC-BSI; C, F: Merged; A, B, C: The first time to digest cells; D, E, F: The second time to digest cells

3 讨论

目前 PMVECs 的培养主要有酶消化法和组织块法。酶消化法操作过程复杂,试剂昂贵,细胞因活性较低难以用于后续实验,在国内很少应用。组织

块法由于操作简单,过程中无酶对细胞的损伤故活性较高,但该方法由于特异性较低,容易受到成纤维细胞的混杂污染^[9]。本实验通过下面几个方面对组织块法进行改进,降低了细胞培养污染率,获得了纯度更高的 PMVECs。

第一,在麻醉前提前注射肝素钠。过多的血细胞污染会阻止内皮细胞游出,血细胞及其碎片和裂解产物可能会阻碍内皮细胞的贴壁过程并影响内皮细胞生长,导致内皮细胞生长缓慢甚至停滞、死亡。提前腹腔注射有利于肝素钠在血液循环中扩散,发挥抗凝作用,从而在肺组织灌洗时将更多的血细胞洗出,从而减少血细胞污染的危害程度^[10]。

第二,利用腹腔放血,待大鼠停止呼吸后剪开胸腔。大多数文献指出在麻醉后对大鼠进行直接开胸灌注^[1],或是拉颈处死后再开胸灌注^[10],亦或是从颈总动脉放血处死后再开胸灌注^[11]。本实验采用腹主动脉剪开放血,放血更彻底,血细胞残留更少,同时处死后再开胸可以减少气胸对肺微血管内皮的损伤^[12]。

第三,改进操作以及试剂中加入双抗以降低污染率。细菌污染是原代细胞培养的常见问题,本实验对多个操作细节进行改进以及在试剂中加入抗生素用以降低细菌污染:①大鼠胸腹部进行备皮以及进行全身消毒;②用含抗生素的 PBS 进行肺循环的灌注;③在预冷的 DMEM 中进行胸膜的剥离,尽早给离体的肺组织提供糖分从而提高细胞存活;④在预冷的血清中剪碎肺组织,以增加组织贴壁的黏附性,更有利于细胞的迁出。

第四,原代培养 48 h 即可取出组织块。文献报道^[10],内皮细胞在 24 h 开始迁移出,在 60~72 h 除了内皮细胞和血细胞外,成纤维等尚未离开组织块,因此目前大多数采用 60 h 移除组织块的方法。本实验发现,24 h 微血管内皮细胞有少数迁出,在 48 h 有部分微血管内皮细胞迁出但此时已有少部分成纤维细胞开始游出。培养至 60 h 取出组织块,此时已有大量成纤维细胞游出,原代培养细胞会有较多的成纤维细胞污染。经对照发现,在 48 h 取出组织块可以大幅度减低成纤维细胞污染的概率,同时由于内皮细胞迁出较少,所以原代培养时间应相对延长。

第五,进行再次消化去除成纤维细胞。由于成纤维细胞具有贴壁不牢固的特性^[13],而 PMVECs 相对贴壁牢固,故可利用再次消化去除成纤维细胞。本实验通过 FITC-BSI 的鉴定发现再次消化的细胞纯度高于第一次消化的细胞纯度。

第六,FITC-BSI 能够与 PMVECs 特异性结合,可以用于鉴定。原代培养的 PMVECs 呈现典型的铺路石样改变,随着传代细胞形态逐渐发生变化,变为长梭形,或有粗大分支,呈漩涡样生长或聚集生长。因此不能只靠形态学来确定 PMVECs。目前多应用Ⅷ因子相关抗原以及 CD31 进行鉴定^[11, 14]。

但有报道指出 PMVECs 对Ⅷ因子相关抗原表达为阴性,同时 CD31 在肺的大血管也有表达,因此用Ⅷ因子相关抗原或 CD31 进行鉴定并不可靠。FITC-BSI 能特异性结合 PMVECs,而不与大血管内皮反应^[8],因此本实验采用其作为 PMVECs 的特异性鉴定方法。

总之,本研究采用了组织贴块法培养 PMVECs,并对其加以改进,提高了 PMVECs 的原代培养技术的可行性,成功的培养出 SD 大鼠 PMVECs。同时运用此法所得细胞生长状态良好,纯度高,且能够持续传代培养。此方法具有简单、经济、纯度高的特点,为深入研究 PMVECs 在疾病过程中的病理生理作用奠定了方法学基础。

参 考 文 献

- [1] 刘勇军,王萍萍,马 婕,等.改良大鼠肺微血管内皮细胞原代培养技术及细胞鉴定.中华损伤与修复杂志,2014,9(1):27-31.
- [2] WU F, SZCZEPANIAK WS, SHIVA S, *et al.* Nox2-dependent glutathionylation of endothelial NOS leads to uncoupled superoxide production and endothelial barrier dysfunction in acute lung injury. *Am J Physiol-Lung C*,2014,307(12):987-997.
- [3] ZHANG K, WANG P, HUANG S, *et al.* Different mechanism of LPS-induced calcium increase in human lung epithelial cell and microvascular endothelial cell: a cell culture study in a model for ARDS. *Mol Biol Rep*,2014,41(7):4253-4259.
- [4] 吴云虎,王殿华. ADMA/DDAH 通路在脑缺血再灌注致肺微血管内皮细胞损伤中的作用.中风与神经疾病杂志,2013,30(10):898-901.
- [5] MAGEE JC, STONE AE, OLDHAM KT, *et al.* Isolation, culture, and characterization of rat lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol*,1994,267(4 Pt 1):433-441.
- [6] HEWETT PW, MURRAY JC. Human lung microvessel endothelial cells: isolation, culture, and characterization. *Microvasc Res*,1993,46(1):89-102.
- [7] RYAN US, WHITE LA, LOPEZ M, *et al.* Use of microcarriers to isolate and culture pulmonary microvascular endothelium. *Tissue Cell*,1982,14(3):597-606.
- [8] CHEN SF, FEI X, LI S. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. *Microvasc Res*,1995,50(1):119-128.
- [9] 李颖川,江 周.大鼠肺微血管内皮细胞原代培养方法的改进及细胞鉴定.上海交通大学学报(医学版),2010,30(11):1440-1443.
- [10] 姜 文.大鼠肺微血管内皮细胞原代培养方法研究.中外医学研究,2011,9(10):3-4.
- [11] 徐顺贵,吴国明,徐 智,等.组织块法培养大鼠肺微血管内皮细胞的综合鉴定.第三军医大学学报,2007,29(1):39-42.
- [12] 孟 革,赵 建,吕新怀,等.大鼠肺微血管内皮细胞原代培养方法的改进.军事医学科学院院刊,2009,33(6):567-569.
- [13] 连 敏,叶燕青,汪 甜,等.新生大鼠肺成纤维细胞的原代培养改良法及细胞鉴定.氨基酸和生物资源,2014,36(1):27-31.
- [14] WANG Y, CHEN H, LI H, *et al.* Effect of angiopoietin-like protein 4 on rat pulmonary microvascular endothelial cells exposed to LPS. *Int J Mol Med*,2013,32(3):568-576.

(2015-11-19 收稿,2016-04-01 修回)

编辑 吕 熙