

# 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养与鉴定

吴秀芹, 梅晓云\*, 吴颢昕, 李洋, 李辉

(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的: 探索纯度较高、相对经济简便的大鼠脑微血管内皮细胞分离和原代培养的方法。方法: 取 1~10 d SD 大鼠脑皮质经胰蛋白酶消化后, 通过不同孔径的筛网过滤, 再用胶原酶 2 次消化获得的微血管内皮细胞进行培养, 采用相差显微镜形态学观察及因子相关抗原免疫组化鉴定。结果: 1~2 d 细胞呈区域性单层贴壁生长, 7~9 d 呈典型的铺路卵石样征象, 因子相关抗原免疫组化检测内皮细胞表达阳性, 可见细胞的胞浆及核周呈棕黄色, 胞核呈阴性, 阳性细胞占绝大部分。结论: 采用 2 次消化、2 次过滤技术可以成功分离培养出较理想的大鼠脑微血管内皮细胞。

[关键词] 微血管内皮细胞; 细胞培养; SD 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0187-03

## Methods of Culturing and Identifying Brain Microvascular Endothelial Cells in Rats

WU Xiu-qin, MEI Xiao-yun\*, WU Hao-xin, LI Yang, LI Hui

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[ Abstract ] Objective:** To explore the methods of culturing highly purified rat brain microvascular endothelial cells (BMEC). **Method:** BMEC of SD rats were prepared by filtering through a mesh, and digested by collagenase. Then the cells were examined under microscope and the expression of factor polyclone antibody was determined. **Result:** The cells became polygon arranging as single layer in 1-2 days. In 7-10 days, the cells arranged as ovum-like in compact monolayer. Immunocytochemistry of factor polyclone antibody showed positive in cytomembrane and cytoplasm, but negative in cell nucleus. Most of the cells were found to express factor-related antigen. **Conclusion:** Ideal rat brain microvascular endothelial cells can be cultured by the improved cultural method of double filtering and digestion.

**[ Key words ]** microvascular endothelial cells; cell cultivation; SD 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<sup>[1]</sup>。大鼠脑微血管内皮细胞较高纯度的培养, 可用于脑微血管内皮的生理、病理及药理学研究, 是研究血脑屏障生理及中枢神经感染机制的重

要工具, 也为研究脑血管疾病及其新药筛选提供实验模型, 因此, 如何获得大量的、比较单纯的大鼠脑微血管内皮细胞, 有重要意义。本课题参考国内外各种分离方法<sup>[2]</sup>, 摸索出了能成功分离、培养原代脑微血管内皮细胞的经济简便的方法。

### 1 材料

**1.1 动物** 1 周龄 SD 大鼠 10 只, 雌雄均可, 南京中医药大学实验动物房提供, 合格证号 SCXK(苏)2010-0068。

**1.2 试剂** DMEM/F12 干粉培养基 (批号 1344177), 胎牛血清 (FBS) (批号 619559)、胰蛋白酶 (批号 201004)、L-谷氨酰胺 (批号 711422)、型

[收稿日期] 2010-07-12

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目 (BK2007243); 江苏省“六大人才高峰”资助项目

[第一作者] 吴秀芹, 博士, 专业方向: 中医基础理论, Tel: 13770725416, E-mail: wuxiuqin2011@yahoo.com.cn

[通讯作者] \* 梅晓云, 教授, 博士生导师, E-mail: xiaoyun663399@163.com

胶原酶、肝素钠均购自 Gibco 公司;青、链霉素双抗溶液(100 ×) 购自碧云天生物技术有限公司(批号 C0222); 抗试剂盒为 SABC 试剂盒,购自武汉博士德公司; 因子相关抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(批号 bs-0434R)。

**1.3 仪器设备** 6 孔细胞培养板、12 孔细胞培养板(Corning, USA); SW-CJ-2FD 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司; CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Sanyo, 日本); 倒置相差显微镜(Olympus, 日本); LDZ5-2 型低速离心机,北京医用离心机厂。

## 2 方法

**2.1 主要试剂配制** DMEM/F12 干粉用超纯水充分溶解,加入 1% 双抗, L-谷氨酰胺 4 mmol·L<sup>-1</sup>, 肝素钠 50 mg·L<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 1 g·L<sup>-1</sup>, pH 调至 7.4, 过滤除菌后分装保存,用时加入 20% FBS 成为内皮细胞完全培养液。0.05% 胰蛋白酶和 0.1% 的胶原酶 均以 D-Hanks 液配制,过滤除菌,分别于 4 ℃ 及 -20 ℃ 保存备用。

**2.2 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养** 7 d 乳鼠 10 只,先以 75% 乙醇消毒全身 3 遍,浸入 75% 冰乙醇 5 min。用镊子撕开头皮及颅骨,去除脑干、小脑、海马及大脑髓质,获取尽量多的大脑皮质,置于冰 D-Hanks 液中清洗 2 次后,置于无菌滤纸上轻轻滚动,以去除大血管、软脑膜,然后将组织剪碎(1 mm<sup>3</sup>),以上操作在冰板上进行。将剪碎的组织用 0.05% (pH 7.8) 胰蛋白酶消化(在培养箱中或水浴锅中), 37 ℃, 5 min 摇晃 1 次,约 20 min 后加含血清培养基终止消化,吹打,混匀,过筛网(先用 100 目,再用 200 目),用 D-Hanks 荡洗,在 D-Hanks 液中收集 200 目筛网上的细胞,离心(1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),弃上清,在沉淀组织中加入适量 0.1% Ⅰ型胶原酶,吹打混匀,37 ℃ 消化 25 min, 5 min 摇晃 1 次,加含血清培养基终止消化,吹打,混匀,再次离心(1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),弃上清,加 20% 血清培养基离心(1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),弃上清,在沉淀组织中加入 20% 内皮细胞完全培养基,吹打混匀后接种于已铺明胶的培养板,37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱静置培养 24 h 后第 1 次换液,以后每隔 1 天换液 1 次,约第 7 ~ 10 天细胞基本融合铺满后,进行消化传代。

**2.3 大鼠脑微血管内皮细胞的传代** 细胞基本铺满培养孔后,吸弃原培养基,用 37 ℃ 预热的 PBS 液清洗 2 遍,再加入 1:1 的 0.125% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA 的消化液置细胞培养箱中 37 ℃ 消化 2 ~ 3

min, 显微镜观察,待大部分细胞收缩变圆时,立即吸弃消化液,滴加含血清的完全培养基终止消化,用吸管吹打混匀,冲洗壁上细胞,显微镜观察,悬浮细胞均匀,将细胞吸出培养瓶,至离心管中离心(1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),弃上清,加适量完全培养基吹打混匀,按 1:2 比例接种于准备好的培养瓶中。

## 2.4 大鼠脑微血管内皮细胞的鉴定

**2.4.1 形态学** 将培养有原代和传代细胞的培养板置倒置显微镜下观察细胞贴壁、生长情况及其形态,并进行拍照。

**2.4.2 因子相关抗原免疫组织化学检测**<sup>[3]</sup> 用于内皮细胞鉴定的 24 孔细胞板在种植 7 d 后用 PBS 清洗 2 次,继而滴加 4% 多聚甲醛,固定 30 min,然后纯水洗 2 遍;滴加 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和甲醇的混合液(1:50),室温浸泡 30 min,以灭活内源性的过氧化物酶。纯水洗 1 ~ 2 遍;滴加 0.2% 的 Triton, 破膜 15 min, PBS 洗 3 次;然后按试剂盒操作步骤操作即可。

## 3 结果

**3.1 倒置相差显微镜观察细胞形态观察** 原代种板时镜下观察:分离、获得的微血管段管壁较光滑清晰,形态各异,长短不等呈单枝或多分枝状。也有被分解成小片段和单个细胞的(图 1)。大约 6 ~ 7 d 细胞达到融合,排列密集时呈鹅卵石样(图 2)。传代后细胞形态差别不如原代明显,主要呈长梭形为主,仍可见“漩涡状”分布。其形态和生长特点与大多数文献报道相似<sup>[4-5]</sup>。

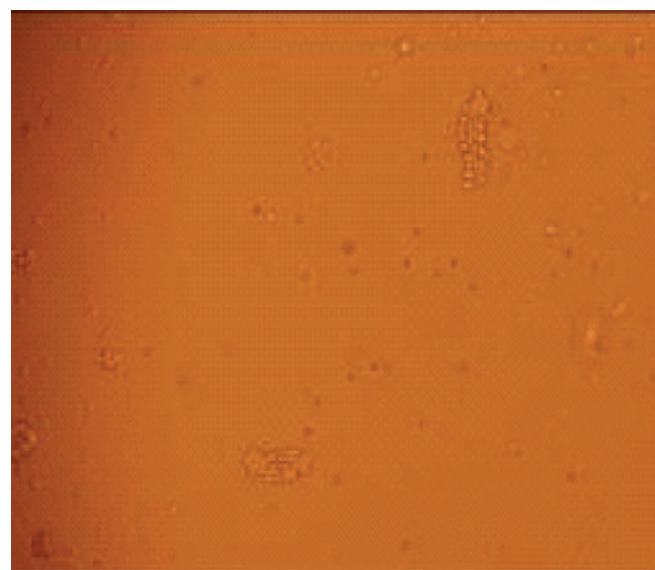


图 1 原代分离的脑微血管内皮细胞(×200)

**3.2 因子相关抗原免疫组织化学检测** 经 DAB 染色后,可见细胞的胞浆及核周呈棕黄色,胞核呈空泡状结构(图 3 ~ 4),说明本研究培养的细胞为脑微血管内皮细胞。

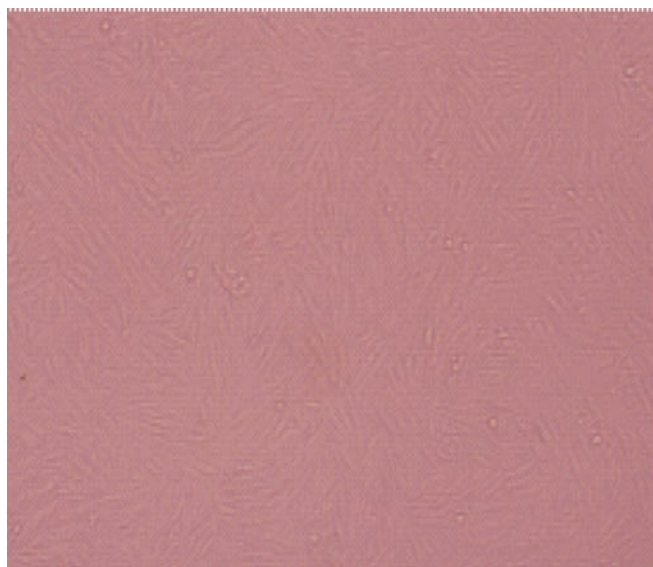


图2 1周左右的脑微血管内皮细胞(×100)

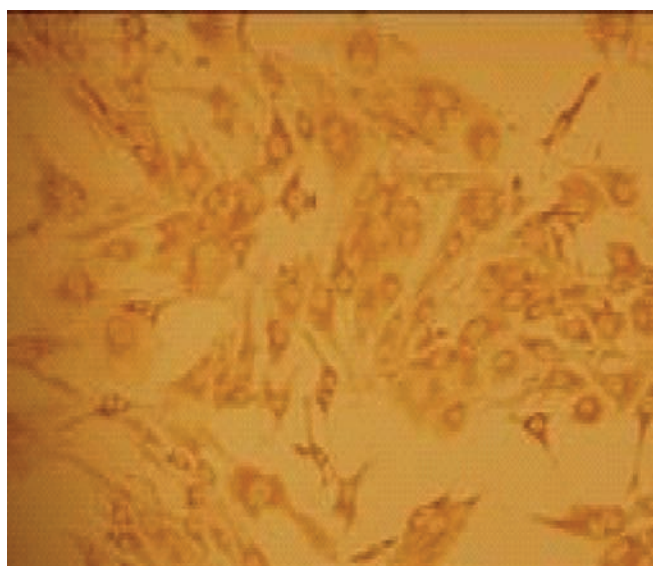


图3 因子相关抗原鉴定阳性反应(×200)



图4 因子相关抗原鉴定阴性对照(×200)

#### 4 讨论

大鼠脑微血管内皮细胞的分离方法多年来已经有很多探讨,一般常用的分离方法主要包括匀浆、过滤、离心和酶消化。此外,还有实验室运用组织块法培养大鼠脑微血管内皮细胞<sup>[6]</sup>。基本上都存在分离时间长、工作量大、仪器要求高、试剂成本大、细胞成活困难以及成纤维细胞大量混杂生长等问题。如何培养纯度高,活力好的脑微血管内皮细胞,一直是国内外研究的难点。本文摸索出可以有效分离微血管、

并对仪器要求相对较低的分离培养方法,同时也是相对经济简便的方法。在试验过程中需要注意的问题总结如下:在脑组织剪碎后,可先用0.05%胰蛋白酶消化,使微血管与神经组织更易分离。然后,再采用0.1%胶原酶型37消化分离内皮细胞10~20 min,以去除周边细胞和基底膜,这样既减少胶原酶的用量,降低成本,又不影响微血管内皮细胞的数量;本试验未用血管内皮生长因子,所以要采用优质胎牛血清,原代用20%;本试验采用滤纸吸附技术,去除了软脑膜、大血管及大脑白质,可减少成纤维细胞和平滑肌细胞的生长,对于提高内皮细胞的纯度具有重要意义;本研究使用100目和200目筛网2次过滤,一方面除去较大的血管,防止大血管中血管平滑肌细胞的“污染”,另一方面过滤掉神经胶质细胞、神经元,从而得到较为纯净的微血管段;明胶涂布的塑料培养瓶可以较好地促进大鼠脑微血管内皮细胞的贴壁,而且,原代应高密度种植,有利于细胞间相互影响,通过产生促生长活性物质,从而促进脑微血管内皮细胞的生长。

#### [参考文献]

- [1] Chi O Z, Wei N M, Sinha A K, et al. Effects of inhibition of nitric oxide synthase on blood-brain barrier transport in focal cerebral ischemia[J]. *Pharmacology*, 1994, 48(6): 367.
- [2] 张磊, 胡格. 大鼠脑皮质微血管内皮细胞的分离培养及鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2008, 40(10): 70.
- [3] 陈彬, 罗勇. 大鼠脑微血管内皮细胞的体外培养[J]. *卒中与神经疾病*, 2005, 12(2): 80.
- [4] Kis B, Chen L, Ueta Y, et al. Autocrine peptides mediators of cerebral endothelial cells and their role in the regulation of blood-brain barrier[J]. *Peptides*, 2006, 27(1): 211.
- [5] Abbott N J, Hughes C C, Revest P A, et al. Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an *in vitro* blood-brain barrier[J]. *J Cell Sci*, 1992, 103(Pt1): 23.
- [6] Jong A Y, Wu C H, Jiang S, et al. HIV-1 gp41 ectodomain enhances *Cryptococcus neoformans* binding to HBMEC[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(4): 899.

[责任编辑 何伟]