

Primitive Culture of Rat Vascular Endothelial Cells Using Low Concentration Trypsin Digestion Method

Faxian Guo¹, Zhiping Wei¹, Wanying Su¹, Yalan Shao¹, Liping Li¹, Yajun Liu¹, Bei Yang¹, Lei Wu¹, Fenfang Hong², Shulong Yang^{1*}

¹Department of Physiology of Basic Medical College, Nanchang Jiangxi

²Parasites Laboratory in Department of Experimental Teaching Center, Nanchang Jiangxi

Email: *slyang@ncu.edu.cn, *shulongyang@qq.com

Received: Nov. 5th, 2017; accepted: Nov. 17th, 2017; published: Nov. 23rd, 2017

Abstract

Objective: To explore a simple, economic and highly purified modified method to isolate and culture the endothelial cells of rat thoracic aorta. **Methods:** Under an aseptic condition, the thoracic aorta was harvested in a male adult Wistar rat anesthetized with 2% pentobarbital sodium. After having removed the peripheral connective tissue and fat, the thoracic aorta was turned inside out to expose its intima. Then, the thoracic aorta ends were ligated with the sterile silk thread, and thoracic aorta intima was digested with 0.125% trypsin for 18 min - 20 min in centrifugal tube. Cell growth and cell morphology was directly observed under inverted phase contrast microscope; immunohistochemistry and immunofluorescence method is applied to detect and identify if the primary culture rat aortic endothelial cells (RAECs) are the vascular endothelial cells by their combining reactivity with VIII factor related antigen antibody. **Results:** After 3 - 4 days, the cultured rat aortic endothelial cells were distributed on the basement of six-well plates in a cluster. 10 - 12 days later, the adherent cells spread to cover most bottom of culture plate with about 85% of the adherent cells in a confluent monolayer, and show a typical cobblestone appearance which is the characteristic of the vascular endothelial cells. In addition, immunohistochemical staining and immunofluorescence staining with monoclonal anti-Factor-VIII antigen antibody in culturing RAECs were shown by the tan and green fluorescence positive reactive particulate matter found in most of the cell cytoplasm, suggesting that the primary culture RAECs are the vascular endothelial cells. **Conclusions:** Just using the concentrations as low as 0.125% trypsin, our modified cultural method of vascular endothelial cells is a convenient, economical and applicable one with a higher cell activity and purity, no needing the expensive collagen enzyme and endothelial cell growth factor.

Keywords

Vascular Endothelial Cells, Primary Cell Culture, Trypsin, Methodology, Rat

*通讯作者。

低浓度胰蛋白酶原代培养大鼠血管内皮细胞实验方法研究

郭发先¹, 魏志萍¹, 苏湾英¹, 邵亚兰¹, 李莉萍¹, 刘雅璐¹, 杨蓓¹, 吴磊¹, 洪芬芳², 杨树龙^{1*}

¹基础医学院生理学教研室, 江西 南昌

²医学实验教学部寄生虫实验室, 江西 南昌

Email: *slyang@ncu.edu.cn, *shulongyang@qq.com

收稿日期: 2017年11月5日; 录用日期: 2017年11月17日; 发布日期: 2017年11月23日

摘要

目的: 探索改进一种简单、经济和高纯度的大鼠血管内皮细胞分离培养方法。**方法:** 采用2%戊巴比妥钠麻醉Wistar大鼠, 在无菌条件下截取主动脉约3~4 cm, 再将主动脉血管外翻使内膜暴露, 用丝线结扎动脉两端, 以0.125%胰蛋白酶消化18~20 min, 在倒置相差显微镜下直接观察细胞生长和细胞形态特征, 分别应用免疫组化和免疫荧光方法检测第VIII因子相关抗原抗体结合情况, 对培养传代的血管内皮细胞进行鉴定。**结果:** 采用0.125%胰蛋白酶直接消化可获得高纯度的大鼠主动脉血管内皮细胞。经过3~4天培养, 细胞呈集落样散在分布于六孔培养板底, 到10~12天时, 细胞贴壁增长至覆盖大部分培养板底, 约85%的细胞汇合成单层, 呈现典型的“鹅卵石”样内皮细胞特征; 此外, 免疫组化和免疫荧光方法检测第VIII因子相关抗原抗体结合情况, 发现大多数细胞胞浆呈现棕黄色和绿色荧光的阳性反应, 显示分离培养的细胞主要是血管内皮细胞。**结论:** 本改良的细胞培养方法操作简便, 只需浓度低至0.125%胰蛋白酶即可获取较高纯度的血管内皮细胞, 不需要较昂贵的胶原酶及内皮细胞生长因子, 与现有的其他培养方法相比更为经济实用。

关键词

血管内皮细胞, 原代细胞培养, 胰蛋白酶, 方法学, 大鼠

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

血管内皮细胞(Vascular endothelial cell, VEC)是存在于血管壁与血液之间的天然屏障, 不仅参与血管的形成, 而且在组织生长、发育过程中也有重要作用[1]。VEC 主要生理功能有: 释放不同的生物活性调节因子调节血管的收缩与舒张; 防止血小板的聚集、黏附以及血栓的形成; 防止炎性细胞对血管壁的粘附、浸润等。其结构功能的正常对于预防血栓闭塞性血管炎(thromboangiitis obliterans, TAO)等周围血管疾病的发生和发展有着重要意义[2]。VEC 易受体内物理、化学因素攻击损伤, 引起 VEC 功能尤其是内分泌功能紊乱, 是不少心血管疾病早期表现形式, 且与糖尿病、肿瘤等疾病的发生、发展有密切关系[3]。VEC 是组织细胞培养对象之一, 以 VEC 建立疾病的离体模型, 被广泛应用于心血管疾病、肿瘤血

管生成和血管修复等领域研究[4] [5] [6]。人脐静脉内皮细胞(HUVEC)是目前国内外研究最常用的内皮细胞。主要考虑 HUVEC 容易获得和培养, 实验重复性好, 但是人脐静脉内皮细胞来源于静脉而非动脉。大鼠是一个十分重要的研究模型, 繁殖较快, 取材方便, 且与人相似性较高, 但分离培养鼠原代主动脉内皮细胞是比较困难的[7]。因此探索建立一套操作简单, 实用、重复性良好的大鼠主动脉内皮细胞(rat aortic endothelia cells, RAECs)分离培养方法, 具有重要意义。目前国内外常见的获取 VEC 的方法包括机械刮取法、组织块移植法和酶消化法等, 均存在一些不足之处[4] [5] [6] [7], 通过对上述方法优缺点的分析, 并在参考了大量国内外文献的基础上, 经过反复实验, 改进了原代大鼠主动脉血管内皮细胞培养方法。并获得了纯度高, 活性良好的 VEC。为 TAO、心血管疾病、肿瘤血管生成和血管修复等领域研究的开展提供了较好的实验素材。现介绍如下。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 主要试剂与仪器

含双抗低糖型 RP1640 培养基(北京 Solarbio 科技有限公司), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司), 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司), PBS (北京中杉生物技术有限公司), FVIII 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)、荧光标记羊抗兔 Ig 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。医用型超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司), CO₂ 培养箱(上海医疗器械厂), 倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

2.1.2. 实验动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠 2 只, 体重 200~250 g, 由南昌大学医学院动物实验中心提供, 动物合格证: [南昌大学实验动物中心, 编号 SCXK(赣), 2008-0001]。

2.2. 实验方法

2.2.1. RAECs 原代培养

Wistar 大鼠采用 2%戊巴比妥钠麻醉, 无菌条件下打开腹腔, 分离并取约 3~4 cm 主动脉放入含有双抗的 PBS 中漂洗, 用眼科剪和小镊子去除主动脉外周结缔组织及脂肪, 并用吸管将动脉管腔残留的血液冲洗干净。将消毒过的除掉针头的缝衣针牵引手术缝合线穿过主动脉管腔, 缝合线的远端结扎主动脉的一端。再用血管钳牵引缝合线, 同时用镊子夹住血管的另一端轻轻反向下拉使主动脉内膜翻出, 将已翻转的主动脉两端向内折入少许, 缝合线将主动脉两端结扎, 并用在酒精灯上烧热的镊子烫烙动脉两端, 使翻转的主动脉两端完全密闭。将翻转封闭的主动脉完全浸入装有 2~3 ml 的 0.125%胰蛋白酶的离心管中, 置于 37℃水浴锅中, 消化 18 min, 加入等量含 10% FBS 的培养液中中止消化, 收集消化液, 于 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 在底部沉淀的细胞中加入含 20% FBS 的 RP1640 培养液重悬, 吹打混匀, 接种在六孔板内。放入 37℃和 5% CO₂ 培养箱培养。孵育 3~4 天时细胞贴壁, 再更换培养液。之后每隔 2~3 d 换液 1 次, 在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

2.2.2. RAECs 传代培养

原代培养的 RAECs 孵育约 10~12 d, 至贴壁细胞覆盖 3/4 以上六孔培养板面积, 约 80%的细胞融合成单层时即可传代。弃培养液, 用 0.01 mmol PBS 液洗涤培养板 2 次, 加入 1~2 mL 0.125%胰蛋白酶消化约 2~3 min, 待镜下见内皮细胞皱缩变圆时, 立即加入等量含 10%胎牛血清的 RP1640 培养液终止消化, 用吸管轻轻反复吹打使细胞完全脱壁并混匀, 转移到 10 ml 离心管中, 室温下以 1000 r/min 离心 5 min,

弃上清, 沉淀细胞中加入含 10%胎牛血清的 RP1640 培养液 3 mL, 轻轻吹打使细胞重悬均匀, 倒置相差显微镜下计数, 以 $(2\sim 3) \times 10^5$ /瓶的密度接种到 25 cm²的塑料培养瓶中, 置于 37℃ CO₂ 培养箱内孵育。根据内皮细胞贴壁时间快于成纤维细胞的特点, 传代培养 4 h 后换培养液可以除去未贴壁杂细胞, 以后每 2~3 d 换液一次, 倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

2.2.3. RAECs 的形态学观察

在培养过程中, 每天于倒置相差显微镜下观察细胞的生长和细胞形态特征, 并拍照。

2.2.4. 免疫组化法鉴定 RAECs [3]

取第三代长满 24 孔培养板的传代细胞, 设立实验组和空白对照组, 至细胞汇合成单细胞层后, 吸去培养液, 以 0.01M PBS 漂洗 2 次, 经 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 用 PBS 洗 3 次, 体积分数为 3% H₂O₂ 室温浸泡 30 min, 以灭活内源过氧化物酶, PBS 洗 2 次, 0.3% TritonX-100 室温浸泡 30 min, PBS 洗 3 次, 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min, 甩去多余液体不洗。然后加入稀释(1:100)Factor VIII 抗体, 4℃湿盒过夜, 用 PBS 洗 3 次; 滴加 2 抗, 室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 二氨基联苯胺(DAB)室温显色, 显微镜下控制反应时间, 蒸馏水洗涤, 苏木精轻度复染, 蒸馏水洗涤, PBS 返蓝, 在荧光显微镜下观察并摄片。用 PBS 代替 Factor VIII 抗体, 其余步骤不变, 作为阴性对照。

2.2.5. 免疫荧光染色技术鉴定 RAECs

取生长于 25 cm²的塑料培养瓶第 3 代细胞, 传代接种于 24 孔培养板, 随机分为实验组和空白对照组, 至细胞生长融合成单细胞层后, 吸去培养液, 0.01 mmol PBS 漂洗 2 次, 经 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min 后再用 PBS 漂洗 3 次, 体积分数为 3% H₂O₂ 室温浸泡 30 min, 以灭活内源过氧化物酶, PBS 洗 2 次, 0.3% TritonX-100 室温浸泡 30 min, PBS 洗 3 次, 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min, 甩去多余液体。然后加入 1:100 稀释的第 VIII 因子相关抗原 Factor VIII-related antigen, Factor VIII)抗体, 4℃湿盒过夜。次日用 PBS 洗 3 次, 滴加用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 IgG 抗体, 室温置于暗室中 30 min, PBS 洗 3 次, 在荧光显微镜下观察染色结果并拍片。

2.2.6. RAECs 细胞活力检测

4.0 g 台盼蓝中加入少许双蒸水研磨, 待台盼蓝充分溶解后定容至 100 ml, 经滤纸过滤后放 4℃保存。临用时加 PBS 稀释至 4 g/L。于 RAECs 传代过程中每次取 50 μl 细胞悬液与 50 μl 的 4 g/L 台盼蓝混匀, 取 1 滴滴入血球计数板于倒置显微镜下计数 200 个左右细胞。显微镜下可见活细胞拒染, 死细胞被染成淡蓝色。计算活细胞率(%) = 活细胞数/总细胞数 × 100%, 此过程重复 3 次, 取平均值。

3. 结果

倒置相差显微镜下观察显示培养 3 天的细胞呈透亮的圆形, 单个或成团, 呈棱状或多角形(图 1(A)); 培养 11 天, 细胞生长覆盖六孔板面积的 85%以上, 呈现 VEC 典型的“鹅卵石”样特征(图 1(B))。

3.1. RAECs 免疫组化鉴定

应用抗 VIII 因子相关抗原抗体进行免疫组织化学检查, 结果显示 DAB 染色阳性, 200 和 400 倍显微镜下观察到细胞浆内有棕黄色颗粒(图 2)。

3.2. RAECs 免疫荧光鉴定

用抗 VIII 因子相关抗原抗体进行免疫荧光染色, 400 倍荧光显微镜下观察细胞质呈现绿色荧光阳性反应(图 3)。

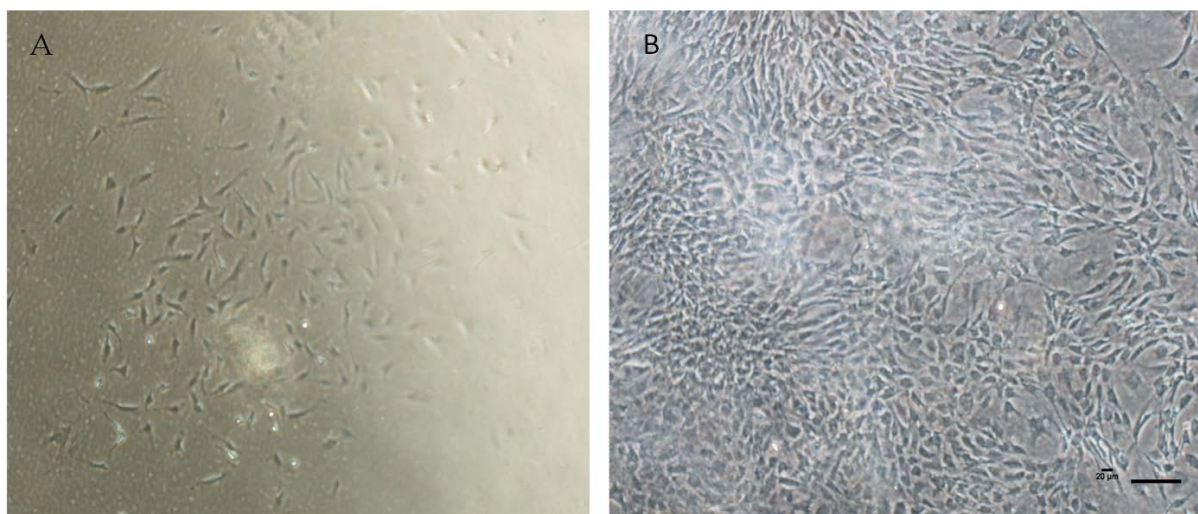


Figure 1. (A) Rat aortic endothelia cells (RAECs) after 3 days culture, which appear to be like triangle or polygon ($\times 100$); (B) RAECs after 11 days culture, showing a slabstone-like changes ($\times 100$). Bar = 25 μm (A, B)

图 1. 倒置相差显微镜下的培养 3 天(A)和 11 天(B)的大鼠主动脉血管内皮细胞形态学特征($\times 100$)

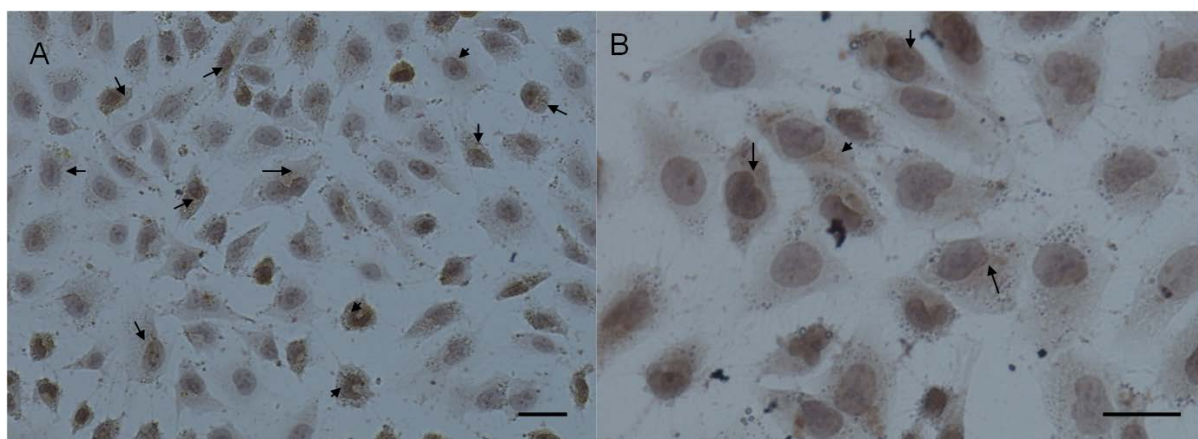


Figure 2. Immunohistochemical staining with monoclonal anti-Factor-VIII antigen antibody in culturing RAECs (A: $\times 200$, B: $\times 400$). Bar = 50 μm (A,B)

图 2. RAECs 中内皮细胞标志分子 VIII 因子相关抗原表达阳性(A: $\times 200$, B: $\times 400$)

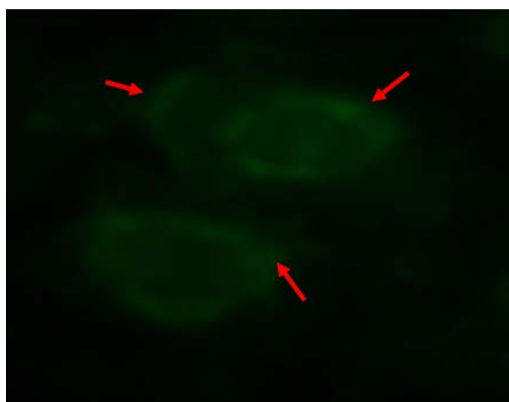


Figure 3. Immunofluorescence staining with monoclonal anti-Factor-VIII antigen antibody in culturing RAECs ($\times 400$)

图 3. RAECs 中 VIII 因子相关抗原免疫荧光染色阳性($\times 400$)

3.3. RAECs 活力检测

在传代培养过程中, 内皮细胞经台盼蓝试验, 检测活细胞率 > 95%。

4. 讨论

VEC 最初仅被看作血管内壁的屏障, 后来研究显示 VEC 具有重要的内分泌功能, 可调节血管壁的通透性、维持血流状态及出血凝血功能平衡、调节血管张力[1]。应用培养的 VEC 建立相关疾病的离体模型, 在心血管疾病、肿瘤血管生成和血管修复等领域研究中较为普遍[3]。大鼠因其繁殖较快、取材方便且价格低廉, 故此分离培养大鼠主动脉内皮细胞(RAECs)常被用于以上的相关研究。有关 RAECs 的培养方法改进的研究层出不穷。

血管内皮细胞位于血管内膜表面, 其下面是结缔组织层, 主要由III型胶原构成, 其体外培养多采用消化法、植块法, 消化法结合反复机械刮取法及热处理植环法, 但存在着原代培养难度大、效率低, 以及在细胞分离培养过程中操作较繁琐并容易增加微生物和非血管内皮细胞污染等缺点[4] [5] [6] [7]。大鼠胸主动脉管腔细小, 肋间动脉分支多, 使大鼠胸主动脉血管内皮细胞的原代培养比较困难。机械刮去法和植块法获取大鼠血管内皮细胞的方法易混杂其他血管壁细胞, 近几年来已逐渐被酶消化法取代。一般的胶原酶消化法培养内皮细胞产量低, 操作较复杂且消化时间不好掌握, 而多步骤酶消化法常因成纤维细胞或平滑肌细胞污染导致培养失败[8]。本实验采用将主动脉内膜外翻, 利用缝合线结扎、镊子烫烙血管两端的双重封闭, 以胰蛋白酶直接消化的方法, 获取一定数量的内皮细胞, 传代培养时利用 RAECs 对胰酶较成纤维细胞及平滑肌细胞敏感的特点, 采用低浓度、短时间差速消化传代法, 提高了 RAECs 的纯度。通过多次实验对比还发现, 以 0.125%及 0.25%浓度的胰蛋白酶分别消化 18~20 min 及 10~12 min 获取的 RAECs 数量及纯度无明显差别。

内皮细胞呈单层“铺路石”状排列是其生长特性, 也是其形态学的重要特征, 而第 VIII 因子是内皮细胞的标志性特征[5] [7]。在本实验中, 我们通过形态学观察发现其生长出的细胞呈单层“铺路石”状生长(见图 1), 采用免疫组织化学与免疫荧光两种检验方法证明有第 VIII 因子相关抗原存在, 确认为血管内皮细胞, 增加了鉴定的可靠性(见图 2)。

这些结果显示以胰蛋白酶直接消化法获取 RAECs, 以差速消化传代进一步提高内皮细胞纯度的方法操作简单, 经济实用, 可以进一步推广应用。同时应用此低浓度胰蛋白酶直接消化法获取高产量 RAECs 时, 应注意以下操作要点: ①针头穿过血管腔时应注意勿损伤主动脉内膜, 结扎血管两端时要严密, 结扎线外的主动脉残端尽可能除去, 烫烙主动脉残端要彻底, 确保仅主动脉内膜面与胰蛋白酶接触; ②选择合适的胰蛋白酶浓度和控制好消化时间是实验的关键, 使之既能充分消化主动脉内皮组织, 又可减少 RAECs 损伤和非血管内皮组织细胞混入; ③原代培养的 RAECs 对营养要求较高, 须用含 20%胎牛血清的培养液培养, 传代细胞可用含 10%~15%胎牛血清的培养液培养; ④原代培养应用六孔板种板, 利于细胞间相互影响, 通过产生促生长活性物质, 互相促进生长。

本方法能够获得高产率的 RAECs, 重现性较好, 操作相对简单, 并且所得到的细胞纯度和活力都相对较高, 为体外 VEC 离体模型的建立以及对心血管疾病、肿瘤血管生成和血管修复等发生机制的研究提供了技术支持和理论指导。

基金项目

国家自然科学基金项目(No. 81660751, 81660151, 81260504); 江西省重点研发计划项目(No. 20161BBG70067), 江西省自然科学基金项目(No. 20171BAB205085)。

参考文献 (References)

- [1] Hong, F.-F., Guo, F.-X., Zhou, Y., *et al.* (2015) Shenfu Injection Protects Human ECV304 Cells from Hydrogen Peroxide via Its Anti-Apoptosis Way. *Journal of Ethnopharmacology*, **163**, 203-209. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.032>
- [2] Hong, F., He, C., Liu, X., *et al.* (2011) Protective Effect of Shenfu Injection on Thromboangiitis Obliterans Model Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **138**, 458-462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.033>
- [3] Su, J.B. (2015) Vascular Endothelial Dysfunction and Pharmacological Treatment. *World Journal of Cardiology*, **7**, 719-741. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i11.719>
- [4] 热依兰·艾沙, 张向阳, 迪丽努尔·买买提依明, 等. 成年大鼠心脏微血管内皮细胞的原代培养及鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(4): 505-507.
- [5] 查雨锋, 张顺, 苏航, 等. 一种高纯度和高活力的大鼠脑微血管内皮细胞的提取及原代培养方法[J]. 中国药理学通报, 2014(11): 1616-1619.
- [6] 朱涛, 李锋, 严飞, 等. 香烟提取物对大鼠血管内皮细胞的损害[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(5): 1359-1361.
- [7] 杨帆. 大鼠胸主动脉内皮细胞的体外培养技术[J]. 医药前沿, 2014(23): 38.
- [8] Oh, J., Lee, J., Woo, J.M., *et al.* (2006) Systematic Identification and Integrative Analysis of Novel Genes Expressed Specifically or Predominantly in Mouse Epididymis. *BMC Genomics*, **7**, 314. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-314>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-441X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: pi@hanspub.org