

小鼠肺微血管内皮细胞磁珠分选法分离和原代培养*☆

孙振朕¹, 蔡在龙², 朱科明¹, 邓小明¹

Magnetic beads isolation and primary culture of mouse pulmonary microvascular endothelial cells *in vitro*

Sun Zhen-zhen¹, Cai Zai-long², Zhu Ke-ming¹, Deng Xiao-ming¹

¹Department of Anesthesiology, ²Clinical Experimental Center, Changhai Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Sun Zhen-zhen^{*}, Studying for doctorate, Attending physician, Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
zhenzhensun2008@hotmail.com

Correspondence to: Zhu Ke-ming, Professor, Chief physician, Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
kmzhu_md@yahoo.com.cn

Correspondence to: Deng Xiao-ming, Professor, Chief physician, Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
xmdeng@anesthesia.org.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30872459*

Received: 2010-07-27
Accepted: 2010-10-19

Abstract

BACKGROUND: Lung function depends on the activity of pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs). It is a very important cell model in related researches, while the cells which are isolated by the tissue block culture adhesion method that are currently widely used in China have a major disadvantage of being usually mixed with other cells.

OBJECTIVE: To establish an accurate and effective technique and methods of isolation and culture mouse PMVECs *in vitro*.

METHODS: PMVECs were isolated and purified by collagenase I digesting and magnetic beads separating, and adherent cultured *in vitro*. The growth curve of cultured PMVECs was measured by CCK-8, the cell morphology and ultrastructure was observed by microscopes and its phenotype was identified by flow cytometry.

RESULTS AND CONCLUSION: The cells grew as a monolayer in culture and exhibited the well-described cobblestone morphology, contained a lot of endothelial cell specific rhabditiform organelles Weibel-Palade bodies, expressed endothelial cell specific surface marker CD105 relatively stably, and rarely expressed lymphatic endothelial cell specific surface marker VEGFR-3. The PMVECs isolated successfully by immunoglobulin magnetic beads are of high purity and rapid multiplication and retain certain of their functional differences, including constitution and antigen molecule expression.

Sun ZZ, Cai ZL, Zhu KM, Deng XM. Magnetic beads isolation and primary culture of mouse pulmonary microvascular endothelial cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(50): 9366-9369.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 肺组织的功能依赖于肺微血管内皮细胞的活性, 因此肺微血管内皮细胞是相关研究的重要细胞模型, 但目前国内多采用的组织块贴壁法培养所得的肺微血管内皮细胞常有其他细胞混杂。

目的: 建立一种有效分离、培养、扩增小鼠肺微血管内皮细胞的方法。

方法: 采用酶消化、免疫磁珠二次分选法分离纯化小鼠肺微血管内皮细胞, 贴壁培养法体外扩增, CCK-8 法测定细胞的生长情况, 相差显微镜观察培养细胞的形态, 透射电子显微镜观察细胞的超微结构, 流式细胞仪对其表型进行鉴定。

结果与结论: 培养所得小鼠肺微血管内皮细胞具有典型的铺路石样形态学特征, 含有大量内皮细胞特有的杆状细胞器 Weibel-Palade 小体, 较稳定地表达内皮细胞特异性表面标记 CD105, 不表达淋巴管内皮细胞特异性表面标记血管内皮生长因子受体 3。说明免疫磁珠二次分选法可成功分离纯化小鼠肺微血管内皮细胞, 体外培养所获细胞纯度高、自我更新能力强, 并保留了包括构成、表面抗原表达等特性。

关键词: 免疫磁珠; 分离; 小鼠; 肺微血管内皮细胞; 细胞培养

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.50.014

孙振朕, 蔡在龙, 朱科明, 邓小明. 小鼠肺微血管内皮细胞磁珠分选法分离和原代培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50):9366-9369. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

内皮细胞呈单层连续性衬在血管内面, 在炎症反应、损伤及免疫应答时循环中的中性粒细胞向组织和器官募集的过程中发挥着积极的作用。在炎症反应过程中, 内皮被炎症因子或细菌内毒素激活, 进而调节黏附因子的表达和细胞因子的生成, 而后两者可调节外周循环中中性粒细胞的黏附和迁移^[1]。研究显示, 内皮细胞并不是单一的, 因其所在的各种血管床和器官的不同而表达不同的细胞学和生化特性, 以适应局部环境的需要^[2-3]。

肺微血管内皮细胞在肺血管通透性改变、

血管通透性肺水肿、急性肺损伤和脓毒症等过程中有重要作用, 使其成为体外研究相关病症机制不可缺少的细胞模型。

实验在 Lim 等^[3]方法的基础上, 结合国内实验室实际情况, 采用免疫磁珠二次分选法分离纯化小鼠肺微血管内皮细胞, 建立一种有效分离、培养、扩增小鼠肺微血管内皮细胞的方法。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 于 2009-07-01/23 在解放军第二军医大学长海医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁级6~8周龄C3H/HeN小鼠9只, 雌雄不限, 体质量18~25 g。由上海实验动物资源中心提供, 许可证号: SCXK(沪)2008-0016。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》文献的相关要求^[4]。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
高糖 DMEM 培养基、胎牛血清	Gibco
内皮细胞生长因子	Biomedical Technologies
大鼠抗小鼠 CD31/CD144 抗体	BD
PE 标记大鼠抗小鼠 CD105 单克隆抗体及其同型对照抗体	Biolegend
生物素化的山羊抗小鼠血管内皮生长因子受体 3(vascular endothelial growth factor-3, VEGFR-3)多克隆抗体、NL557 标记的连霉亲和素及相应的同型对照抗体	R&D
绵羊抗大鼠 IgG 磁珠、MPC-S 型磁架	Dynal
胰蛋白酶	Invitrogen
倒置显微镜	Olympus
流式细胞仪	Miltenyi
酶标仪	Thermo labsystems

方法:

抗体磁珠的预处理: 取100 μ L Dynal磁珠于1 mL PBS+0.1%牛血清白蛋白中制成磁珠冲洗缓冲液, 混匀, 置于磁架上, 1 min后移去上清液, 冲洗4次; 磁珠冲洗缓冲液再悬浮磁珠至最初的容积; 每100 μ L(4×10^7)磁珠加入10 μ L (5 μ g)抗体; 置于旋转混匀机4 $^{\circ}$ C 孵育30 min; 再于磁架冲洗4次后用磁珠冲洗缓冲液再悬浮磁珠抗体至最初的容积, 于4 $^{\circ}$ C 保存, 有效期为1周。

细胞的制备: 10%水合氯醛(400 mg/kg)麻醉小鼠后, 体积分数70%乙醇消毒, 取小鼠肺脏, 置于装有30 mL冰基础培养基(DMEM含体积分数20%胎牛血清、25 mmol/L HEPES及1%青链霉素双抗)的50 mL试管中。无菌条件下将分离的组织置于直径100 mm的一次性组织培养皿中; 将肺叶小心剪下, 去除可见的支气管放入另一只装有30 mL冰基础培养基的干净试管中; 轻摇试管以去掉器官表面的红细胞; 移至另一干净培养皿中, 用剪刀剪成碎块; 平均分3份移入装有15 mL预热的胶原酶溶液(1 \times)[用Hank's平衡盐液溶解胶原酶 I 制成0.2 g/L的贮存液(100 \times)]的3支50 mL试管; 轻轻

振荡试管、37 $^{\circ}$ C 孵育45 min; 12-G金属针头接20 mL注射器抽吸研磨细胞悬液15~18次, 制成单个细胞悬液, 尽量不要引起泡沫; 用70 μ m细胞滤器将细胞悬液过滤到另一干净的50 mL试管中, 然后用10 mL基础培养基冲洗滤器; 细胞悬液4 $^{\circ}$ C、1 300 r/min离心8 min; 弃上清, 6 mL冰基础培养基再悬细胞并移至1.5 mL EP管中, 每管1 mL, 共6管。

初次免疫磁珠分离: 每毫升细胞悬液加入15 μ L抗CD31涂层的磁珠, 置于旋转混匀机4 $^{\circ}$ C 孵育20 min; 后将EP管置于磁架2 min。吸附细胞的磁珠和无细胞吸附的磁珠将被分至EP管的两极; 无需移动EP管, 将上清液移出, 从磁架上取下EP管, 各加入1 mL冰基础培养基重悬磁珠团粒; 将EP管再置于磁架上2 min, 小心地吸出上清; 重复冲洗至少4次, 直至上清液变得清澈; 各加入1 mL完全培养基(基础培养基加100 mg/L肝素、100 mg/L内皮细胞生长因子、1%非必需氨基酸及1%丙酮酸钠)重悬浮磁珠团粒, 并将其移至具有0.1%明胶涂层的T75培养瓶, 再加入4 mL完全培养基; 放入标准体积分数5%CO₂培养箱孵育过夜, 移除未贴壁细胞, 已贴壁细胞用HBSS液冲洗2次后加入10 mL完全培养基; 隔日用10 mL完全培养基换液^[3]。

再次免疫磁珠分离: 一般在接种后7 d左右, 初级培养细胞70%~80%融合时即可行二次分选, 以提高内皮细胞的纯度。弃去培养基, 用HBSS液冲洗内皮单细胞层, 加入4 mL 0.25%胰蛋白酶, 轻轻摇匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 相差显微镜下观察确定内皮细胞已经收缩、分离, 形成间隙。观察整个过程, 避免胰酶消化时间过长; 4 mL基础培养基终止胰酶作用, 并将细胞悬液移入15 mL离心管; 2 000 r/min离心5 min; 弃上清, 用2 mL冰基础培养基重悬细胞沉淀后移入EP管中, 每管1 mL, 共2管, 每管加入30 μ L抗CD144涂层磁珠后置于旋转混匀机4 $^{\circ}$ C 孵育20 min; 置于磁架重复冲洗4次; 用完全培养基重悬细胞, 接种于1个明胶涂层的T75培养瓶中。

细胞传代: 内皮细胞培养需隔日10 mL完全培养基换液; 培养细胞达80%~90%融合后用胰酶消化, 以不超过1:3的比例传代; 所得细胞的纯度因每次制备而异。第2~5代细胞用于实验。

透射电镜观察内皮细胞特有的细胞器 Weibel-Palade小体: 取即将传代的细胞(细胞要尽量成熟些, 细胞器才能丰富齐全)约 5×10^7 个, 以40 g/L多聚甲醛固定, 4 $^{\circ}$ C 保存, 送交电镜

解放军第二军医大学长海医院, ¹麻醉科, ²中心实验室, 上海市200433

孙振朕^{*}, 女, 1979年生, 山东省青岛市人, 汉族, 解放军第二军医大学在读博士, 主治医师, 主要从事脓毒症急性肺损伤方面的研究。Zhenzhensun2008@hotmail.com

通讯作者: 朱科明, 教授, 主任医师, 解放军第二军医大学长海医院麻醉科, 上海市200433 kmzhu_md@yahoo.com.cn;

通讯作者: 邓小明, 教授, 主任医师, 解放军第二军医大学长海医院麻醉科, 上海市200433 xmdeng@anesthesia.org.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)50-09366-04

收稿日期: 2010-07-27
修回日期: 2010-10-19
(20100727001/WLM · Z)

室制片、检查。

流式细胞仪检测细胞CD105和VEGFR-3的表达: 取1~5代的培养细胞, 0.25%的胰蛋白酶消化, 2 000 r/min离心7 min, 弃上清, PBS洗1次后重悬, 制成大于 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液; 分至每个待测的流式管, 每管0.1 mL, 分别加入荧光标记的抗体及其相应的同型对照抗体, 室温避光孵育15 min, 2 000 r/min离心7 min后300 μL PBS重悬后上机^[3,5]。

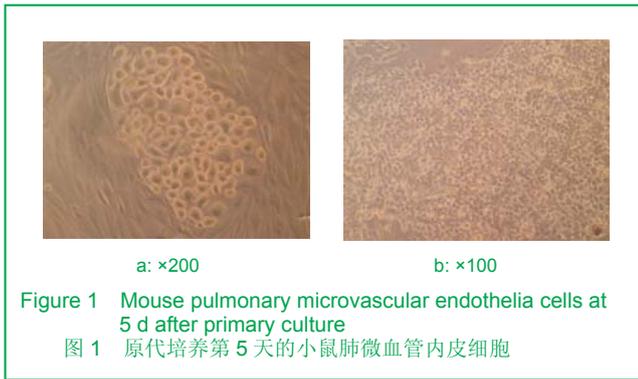
细胞生长情况: 采用CCK-8法, 取第2代内皮细胞以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于96孔板上, 以培养基作为空白对照, 空白和内皮细胞分7组, 每组3孔, 终体积100 μL 。培养7 d, 每天测1组, 每孔加入CCK-8 10 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 继续培养3 h。在酶标仪上以空白对照调零, 读取450 nm处的吸光度(参比波长650 nm), 数据取3孔的平均值, 绘制生长曲线。

主要观察指标: 细胞形态、表型及生长情况, 细胞超微结构。

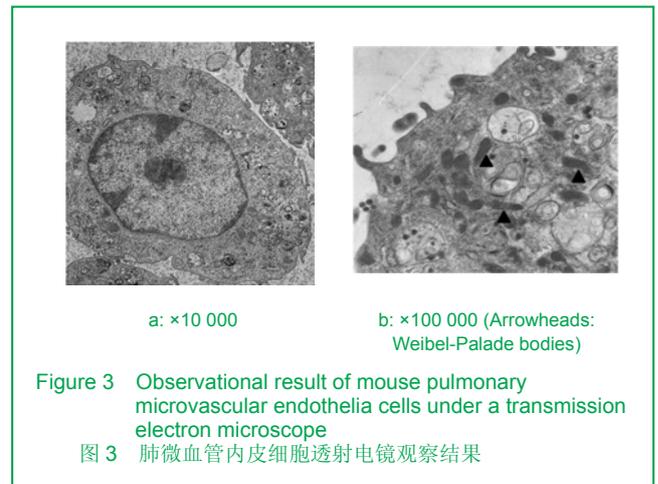
设计、实施、评估者: 设计为通讯作者和第一作者, 实施为第一作者, 全体作者负责评估, 均经过系统培训。

2 结果

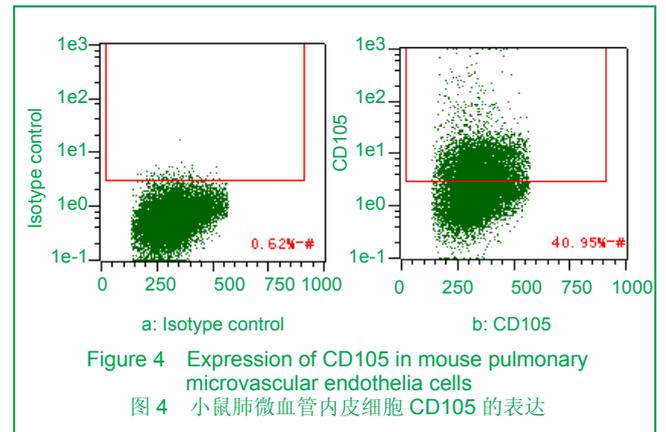
2.1 培养细胞的形态 培养物接种3~5 d, 倒置显微镜下可见含有内皮细胞的分散集落, 见图1a。融合的单细胞层具有血管内皮细胞典型的铺路石样形态, 见图1b。但过度融合生长会因细胞过于紧密而呈现进行性细长纺锤形, 见图2。



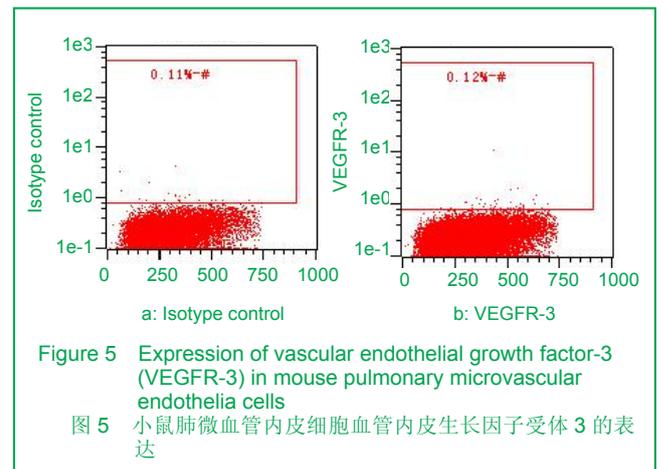
2.2 培养细胞的超微结构 电镜下细胞状态良好, 细胞器丰富, 见图3a, 并可见大量内皮细胞特有的杆状细胞器Weibel-Palade小体, 见图3b。



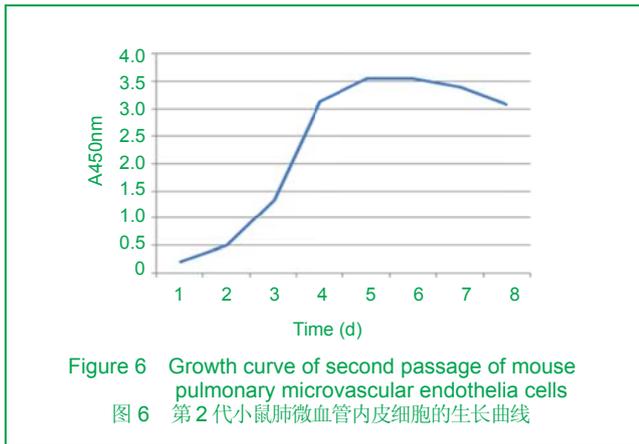
2.3 培养细胞的免疫表型测定 流式细胞仪检测结果显示, 细胞纯度均在95%以上, 大小均一, 状态良好, 第1~5代细胞均表达内皮细胞表面标志CD105, 阳性率在40%左右, 见图4。



肺部血管内皮细胞分选最可能混有的淋巴管内皮细胞的特有表面标记VEGFR-3的表达呈阴性, 说明培养所得的内皮细胞无淋巴管内皮细胞混杂, 见图5。



2.4 培养细胞的生长情况 见图6。



3 讨论

国内外开展肺微血管内皮细胞的原代培养已近20年,方法主要分为组织块贴壁法和酶消化法,鉴定方法多用形态学结合免疫组化染色AgVIII相关抗原、流式细胞仪检测CD31/CD102表达等^[6-9]。上述两种细胞培养方法虽然步骤简单、经济易行,但是存在成纤维细胞等杂细胞干扰的缺点,即便使用差速贴壁和分次消化的方法也不能确切的去除杂细胞^[9],从而降低了其实用性;且免疫组织化学法步骤复杂、灵敏性不高;而内皮细胞表面标记CD31、CD102的高表达仅限于1~3代^[3]。

Weibel-Palade小体,简称W-P小体,系内皮细胞所特有的杆状细胞器,由Weibel和Palade于1964年首次发现于大鼠肺内小动脉及多处器官的血管内皮,被认为是鉴定内皮细胞的依据之一。但其数量存在种属差异,且同一种属离心越近的血管其内皮所含W-P小体越多。抗CD105单克隆抗体是20世纪90年代初由英国曼彻斯特大学实验病理研究室以胎儿脐静脉内皮提取物免疫BALB/c系小鼠所得到的一类纯化抗体,为IgG类球蛋白,不与大血管内皮细胞反应且表达较为稳定^[10]。1996年Kukk等^[11]利用受体亲和色谱法从前列腺癌细胞的胞外基质中提纯出血管内皮生长因子C DNA,血管内皮生长因子C是近年来发现的血管内皮生长因子家族新成员,可特异性地与淋巴管内皮细胞上的VEGFR-3结合,是目前所知惟一具有淋巴管生成作用的因子。

实验选择酶消化法结合免疫磁珠二次分选、流式细胞仪检测表面标记CD105和VEGFR-3表达,并结合国内实验室的习惯和条件,反复摸索,改良Lim等的方法以分离、纯化、体外培养和鉴定小鼠肺微血管内皮细胞。结果显示成功分离并体外扩增出小鼠肺微血管内皮细胞,克服了杂细胞的干扰,并经多种方法证明准确有效。

实验成功的关键在于高效率分选和快速有效地扩增。这就有赖于抗体磁珠预处理时充分清洗(不少于4次),尽量去除NaN₃以减少其对细胞的不良影响;处理

肺组织时去除任何可见的支气管并尽可能地将组织切碎使酶作用充分;胶原酶消化时间不宜超过50 min,以免损伤细胞影响贴壁;抗体与磁珠作用及细胞与抗体磁珠作用时保持4℃以确保抗体活性、降低细胞代谢,从而保证分选效率和细胞活性。

总之,实验建立了一种简单、可重复、测试良好的分离小鼠肺微血管内皮细胞的方法。

4 参考文献

- [1] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76(2):301-314.
- [2] Stevens T, Rosenberg R, Aird W, et al. NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281(5):C1422-1433.
- [3] Lim YC, Garcia-Cardena G, Allport JR, et al. Heterogeneity of endothelial cells from different organ sites in T-cell subset recruitment. *Am J Pathol*. 2003;162(5):1591-1601.
- [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [5] Duff SE, Li C, Garland JM, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003;17(9):984-992.
- [6] 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):L433-441.
- [7] King J, Hamil T, Creighton J, et al. Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res*. 2004;67(2):139-151.
- [8] Zheng JY, Xie BS, Chen P, et al. Wenzhou Yixueyuan Xuebao. 2005;39(4):328-329. 郑加永, 谢炳寿, 陈萍, 等. 小鼠肺微血管内皮细胞培养及鉴定[J]. 温州医学院学报, 2005, 39(4): 328-329.
- [9] Li M, Yang MH, Liu Y. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(31):6141-6144. 李敏, 杨明会, 刘毅. 大鼠肺微血管内皮细胞培养方法的对比和改进[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(31): 6141-6144.
- [10] Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer*. 1993;54(3):363-370.
- [11] Kukk E, Lybousaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*. 1996;122(12):3829-3837.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家自然科学基金项目(30872459), 课题名称: 脓毒症急性肺损伤时血小板 TLR4 在肺微血管内皮细胞损伤中的作用机制研究。

致谢: 感谢解放军第二军医大学长海医院心胸外科实验室的龚德军老师给予的细心指导和大力帮助。

课题的意义: 用酶消化和免疫磁珠分选相结合的方法提高细胞纯度;从细胞形态、超微结构及特异性膜表面抗原表达3方面鉴定并通过测定 VEGFR-3 表达进行排除,提高准确性。为转基因动物广泛应用于科学研究及脓毒症急性肺损伤机制的离体研究提供了技术支持和细胞工具。

课题评估的“金标准”: 鉴定内皮细胞的标准很多,但是没有所谓的“金标准”,只有国内外较常用的标准,也不是惟一的。实验根据自身特点选择了特异性较高且较为方便快捷的几种方法进行了鉴定和排除。

设计或课题的偏倚与不足: 磁珠分选法成本较高,步骤较复杂,对实验环境、设备的要求较高。