

胰蛋白酶消化法体外培养和鉴定人脐静脉血管内皮细胞[☆]

白燕慧¹, 张明昌¹, 边芳²

Culture and identification of human umbilical vein endothelial cells *in vitro* using Trypsin digestion method

Bai Yan-hui¹, Zhang Ming-chang¹, Bian Fang²

Abstract

BACKGROUND: The establishment of human umbilical vein endothelial cells model *in vitro* has significant meaning for the study of neovascularization, but human umbilical vein endothelial cells are difficult to cultivate *in vitro* and there is not a criterion.

OBJECTIVE: To explore how to harvest and identify human umbilical vein endothelial cells *in vitro*.

METHODS: 0.25 g/L Trypsin and 0.02% ethylene diamine tetraacetic acid perfusion method was used to isolate human umbilical vein endothelial cells from the fresh umbilical cord, and the cells were cultured and amplified. The composition of culture medium was simplified by not adding vascular endothelial cell growth factor and heparin. Human umbilical vein endothelial cells grown to 80% confluence were identified by morphological observation and immunofluorescence method.

RESULTS AND CONCLUSION: The endothelial cells spread on the bottom of the dishes within 2 hours, then coalesced and grew to form a confluent monolayer of polygonal cells within 24 hours. The cultured cells were identified as human umbilical vein endothelial cells. Trypsin perfusion is a simple and effective method for collection of human umbilical vein endothelial cells. Cells harvested with this protocol can be used as models on research of vascular endothelial cells *in vitro*.

Bai YH, Zhang MC, Bian F. Culture and identification of human umbilical vein endothelial cells *in vitro* using Trypsin digestion method. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2695-2698. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 体外建立稳定可靠的人脐静脉血管内皮细胞模型, 目前培养方法缺乏统一的标准。

目的: 探索脐静脉内皮细胞的体外培养的方法。

方法: 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化、分离、体外原代培养及消化传代脐静脉内皮细胞, 简化完全培养液组分(不添加血管内皮细胞生长因子、肝素等辅助因子), 当原代培养细胞 80%以上汇合, 根据细胞特有的形态学特征和 VIII 因子进行内皮细胞的鉴定。

结果与结论: 种植在培养瓶中的内皮细胞 2 h 贴壁生长, 24 h 换液后内皮细胞 80%融合, 细胞状态好, 内皮细胞呈单层铺路石样外观, 经过镜下观察和 VIII 因子相关抗原鉴定证明是脐静脉内皮细胞。证实用胰蛋白酶灌注脐静脉是一种简单、实用的获得人脐静脉血管内皮细胞的方法, 可靠性大, 成功率高, 可以构建体外研究血管内皮细胞的模型。

关键词: 人脐静脉; 血管内皮细胞; 细胞培养; 形态学; 鉴定

缩略语注释: HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, 人脐静脉血管内皮细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.008

白燕慧, 张明昌, 边芳. 胰蛋白酶消化法体外培养和鉴定人脐静脉血管内皮细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2695-2698. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

角膜是眼主要的屈光介质, 正常角膜没有血管, 以保持其透明性。角膜缘则具有丰富的血管网, 在感染、外伤、免疫反应等病理情况下, 毛细血管由角膜缘处向角膜内生长。一般认为, 毛细血管进入角膜周边部 1.0~2.0 mm 以上即称为角膜新生血管。角膜新生血管可破坏角膜正常微环境, 是角膜移植排斥反应的高危因素; 而且新生血管结构较脆弱。易渗透, 常因出血渗出及继发纤维化等导致失明, 是目前常见的致盲原因。角膜移植是治疗角膜病致盲的主要方法, 但血管化植床的角膜移植排斥率高达 49%^[1]。因此角膜新生血管的治疗一直是个棘手的问题, 而对其发生机制的研究是解决问

题的关键。为了更好地研究新生血管的发病机制, 需要在体外建立稳定可靠的血管内皮细胞模型。由于内皮细胞株的体外培养存在异议^[2], 因此脐静脉内皮的原代培养是最常用于内皮细胞研究的方法之一^[3-5]。

实验通过探索脐静脉内皮细胞的培养的方法, 为进一步研究角膜新生血管的发病机制在体外建立稳定可靠的人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 模型。

1 材料和方法

设计: 细胞的体外培养。

时间及地点: 2011-03/09 在华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科实验室完成。

¹Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China; Union Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Bai Yan-hui[☆], Studying for doctorate, Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China z212006baiyanhui@126.com

Corresponding author: Zhang Ming-chang, Doctoral supervisor, Chief physician, Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation for the Youth, No. 81000365*

Received: 2011-10-08 Accepted: 2011-12-15

¹ 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科, 湖北省武汉市 430022; ² 武汉市新华路协和医院眼科, 湖北省武汉市 430022

白燕慧☆, 女, 1982年生, 河南省郑州市人, 汉族, 华中科技大学同济医学院附属协和医院在读博士, 主要从事角膜病的研究。
z212006baiyanhui@126.com

通讯作者: 张明昌, 博士生导师, 主任医师, 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科, 湖北省武汉市 430022

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)15-02695-04

收稿日期: 2011-10-08
修回日期: 2011-12-15
(20111008010/W · W)

材料: 健康产妇足月分娩的婴儿脐带由华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科提供, 产妇及其家属签署知情同意书。

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM-F12 培养基, 胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶和 Na2-EDTA 粉剂	Gibco 公司
青霉素, 链霉素	Amresco 公司
恒温恒湿培养箱	广东省医疗器械厂

实验方法:

HUVECs的原代培养: 无菌条件下取新生儿脐带, 长度至少>20 cm, 在超净工作台上剪去脐带两端血肿、钳夹部分, 找到口径较大的脐静脉后, 将尖端磨平的50 mL注射器针头插入脐静脉一端的管腔中, 用止血钳夹闭以固定针头, 用37 °C预热的生理盐水冲洗脐静脉直至流出液无色, 再用PBS冲洗2遍。止血钳夹闭脐带另一端后, 抽取2.5 g/L胰酶和0.02%的EDTA混合液注入脐静脉使静脉充盈, 置脐带于37 °C培养箱中消化10~12 min后, 收集消化液于50 mL离心管中, 加入含有体积分数20%胎牛血清的完全培养基于离心管中终止消化, 以1 000 r/min离心10 min后, 弃去上清液, 加入新鲜配制的完全培养基吹打均匀后, 种植于25 cm²一次性培养瓶中, 于37 °C培养箱内培养。理论上24 h后更换培养液, 以后两三天换1次液, 直至细胞长至80%融合^[6-15]。

HUVECs的传代培养: 相差显微镜下观察, 待细胞生长至80%以上融合时, 于超净台内弃去培养瓶内旧的培养基, 再用PBS洗1遍后, 加入2.5 g/L胰酶和0.02%的EDTA混合液1 mL, 轻轻晃动使消化液铺满培养瓶底, 同时在倒置相差显微镜下观察, 当细胞大部分变圆时, 弃去消化液, 在培养瓶中加入完全培养基终止消化, 然后将细胞从培养瓶底吹打下来, 以1:2传代。

HUVECs的鉴定: 经2.5 g/L胰酶和0.02%的EDTA混合液消化后的细胞重悬于细胞培养液中, 将细胞接种于预先加有盖玻片的培养孔内, 待细胞贴壁生长至80%汇合时取出爬片, 用PBS清洗2次, 置爬片于预冷的丙酮中, -20 °C固定10 min, PBS洗2次, 滴加兔抗人VIII因子相关抗原(vwF)多克隆抗体(1:50)^[16], 4 °C孵育过夜, PBS洗3次, FITC标记羊抗兔IgG(1:500)避光孵育2 h, 暗室中PBS洗5 min,

5 mg/L DAPI室温下避光染色2 min, 荧光显微镜下观察, 以细胞胞质出现红色荧光为染色阳性的判断标准。

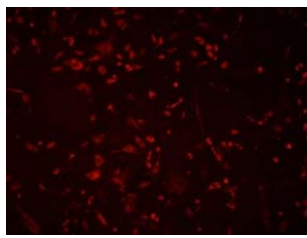
主要观察指标: HUVECs的形态学及免疫荧光染色的鉴定。

2 结果

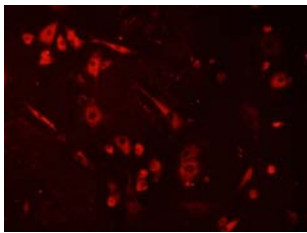
2.1 HUVECs形态学观察 细胞接种后随即在倒置相差显微镜下观察, 培养液中有很多大小不等的圆形细胞, 2 h后开始贴壁, 24 h后可生长至80%融合, 细胞边界清楚, 胞浆丰富, 呈鹅卵石样排列, 见图1a。细胞传代后30 min后开始贴壁, 细胞纯度高, 但细胞生长较原代慢, 形态略差见图1b, 细胞传5代以上细胞生长缓慢, 时逐渐变肥大, 扁平, 细胞状态差, 即使培养5~7 d, 也不能达到80%汇合, 见图1c。



2.2 内皮细胞鉴定结果 免疫荧光鉴定显示见图2。95%以上细胞胞浆vwF染色阳性见图2a, b。



a: x200



b: x400

Figure 2 Immunostaining result for multiclonal rabbit anti-human VIII factor antibodies
图2 人脐静脉血管内皮细胞第VIII相关抗原染色阳性

3 讨论

HUVECs的培养最早始于20世纪60年代, 张宝庚等^[17]首先在国内采用胶原酶消化的方法取得HUVECs后进行培养, 随后杨小平等^[18]改用胰蛋白酶灌注脐静脉, 消化取得HUVECs后进行培养取得成功。HUVEC的原代培养的主要方法有机械刮取^[19]、组织块移植和酶消化法。前两种方法容易混杂其他血管壁细胞, 近年来逐渐被酶消化法取代。

由于HUVECs原代培养成功率低, 且传代次数有限, 文献报道使用胶原酶来消化以及在培养液中使用血管内皮生长因子促进细胞生长^[20-22], 血管内皮生长因子是促进血管内皮生长的重要生长因子^[23], 但生长因子及胶原酶价格昂贵, 在实际中不易推广, 作者使用价格低廉的胰蛋白酶来消化脐静脉, 试图找到一种简单、实用、有效的培养脐静脉内皮细胞的方法, 取得良好效果, 现将实验体会总结如下。

首先, 脐带的选择非常重要。脐带的选择要注意以下几个方面: ①捐献脐带的孕妇一定要排除心脏病、肝炎、糖尿病、血小板减少症、营养不良等内科疾病, 因为孕妇的营养状态会影响脐带的质量, 营养状态好的孕妇脐静脉内皮细胞的活力好, 获得的细胞的数量多、质量高。以往的文献中很少强调这一点, 作者也是在多次失败后才体会到这一点。②脐带一定要新鲜, 取下的脐带最好在2 h内将细胞的分离完成, 最好不要超过3 h, 文献报道离体6~12 h内皮细胞VIII因子相关抗原^[24]、前列腺素呈下降趋势, 本实验曾经比较脐带取下后2 h及5 h细胞的成活率, 发现后者细胞的成活率、细胞的数量和

质量显著下降, 不能满足进一步传代及实验要求, 因此取下的脐带要尽早处理。

其次, 酶和酶消化时间的选择也很关键。目前常用的酶主要有胰蛋白酶和I型胶原酶^[25]。采用I型胶原酶分离HUVECs, 价格比较昂贵, 而胰蛋白酶消化分离HUVECs可以降低非内皮细胞的贴壁能力^[26], 但是胰蛋白酶消化法因消化时间不易掌握而限制了其广泛应用^[27-28]。本实验研究发现, 胰蛋白酶消化时间并不是固定不变, 而是随脐带的长度不同而变化, 一般在10~12 min范围内, 只要掌握最佳消化时间, 并及时终止消化, 就可以成功获得足够多的内皮细胞, 实验过程中2.5 g/L胰蛋白酶需要新鲜配制, 用之前需37 °C预热, 通常每条脐带可以用胰酶消化2次, 2次消化后所收集细胞数量及状态差别不大, 这种方法可以使每根脐带都得到充分的利用, 这在之前的文献中未见报道。在传代培养时, 消化所用的胰蛋白酶中一定要加入EDTA, 如果仅仅用胰酶去消化, 贴壁细胞很难消化下来。

再次, 完全培养基是否新鲜同样重要。本实验中每次原代培养中所用完全培养基均为新鲜配制, 配制后保存时间一般不超过2周。完全培养基中所加入的血清是体积分数20%的新鲜胎牛血清, 因HUVECs是一种低增殖能力细胞, Bryan等^[29-30]认为, 新鲜胎牛血清中含有的各种细胞因子等可促进内皮细胞的生长, 如果保存时间过长, 会显著影响细胞因子等成分。王志华等^[31]认为胎牛血清的浓度为10%~15%才能维持内皮的生长, 本实验原代培养时胎牛血清的体积分数一般保持在20%, 在这个体积分数细胞才能稳定生长。

据文献报道, 内皮细胞培养5~7 d可长至80%融合, 但本实验在培养原代细胞过程中有5次在细胞24 h换液后, 细胞已达到80%融合, 且细胞边界清楚, 生长状态良好, 传3代后细胞的生长状态仍然较好, 这在之前的文献中未见报道。内皮细胞具有相互接触促生长作用, 因此细胞接种密度不能过低, 当细胞接种密度低于 1×10^5 时内皮细胞增殖能力明显减弱, 传代后细胞不易成活。本实验的成功可能与接种密度, 脐带质量以及消化时间的良好把握有关。

另外, 本实验使用的是corning公司的一次性无菌25 cm²培养瓶, 在实验中离心转速一般为1 000 r/min, 时间10 min, 时间过长会打碎细胞, 反之, 细胞则不能很好地分离沉淀。培养液的保存须注意其密闭性, 完全培养液的保存时间不可超过2周, 须长期保存的培养液应置于-20 °C的冰箱中。另外消化操作及培养传代时应严格防范污染, 本实验在配制完全培养基时一般都要加青霉素、链霉素, 细胞发生污染的情况很少。至于培养过程中是否加生长因子, 本实验过程中并未加生长因子, 细胞依然生长良好, 而且加生长因子的话可能会影响后继实验的结果, 因此不赞成加生长因子。

血管内皮细胞的纯度对于进一步的实验结果有决定性的影响, 在进一步的实验研究之前应对所获得的培养细胞进行鉴定。除了形态学上特征的单层铺路石状排列外, 最为可靠的鉴定内皮细胞的方法是VIII因子相关抗原的免疫组化鉴定, 本实验结果表明胰蛋白酶消化法可以获得高纯度的人血管内皮细胞, 经体外传代培养仍可保持稳定的血管内皮细胞表型, 是一种理想的细胞培养方法, 有助于新生血管的体外实验研究。

4 参考文献

- [1] Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001;12(4):242-49.
- [2] Suda K, Rothen-Rutishauser B, Gunther M, et al. Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2001;37(8):505-514.
- [3] Nachman R L, Jaffe E A. Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest*. 2004;114(8):1037-1040.
- [4] Jaffe EA, Nachmann RL, Becker CG. Culture of human endothelial cells d veins-identification by morphologic and immnologic crite-ris. erived from umbilical. *J Clin Invest*. 1973;52:27-45.
- [5] Song HJ, Zhao ZF, Qiao JG, Liu MS, et al. *Changzhi Yixueyuan Xuebao*. 2011;25(2):87-90.
宋红娟, 赵中夫, 乔京贵, 等. 丙酮酸乙酯对人脐静脉内皮细胞HMGB1表达的影[J]. *长治医学院学报*, 2011, 25(2):87-90.
- [6] Kang H, Deng X. Potential application of pooled human umbilical plasma in the culture of human umbilical vein endothelial cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2011; 28(1): 115-120.
- [7] Luo HY, Hu CL. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(1):1995-1999.
罗海彦, 胡长林. 人脐静脉血管内皮细胞缺氧氧损伤时黏结合蛋白多糖1及细外信号调节酶表达与肝素酶I的调节[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(1):1995-1999.
- [8] Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, et al. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*. 2007; 2(3):481-485.
- [9] Cheung AL. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Curr Protoc Microbiol*. 2007; Appendix 4: Appendix 4B.
- [10] Kadam S S, Tiwari S, Bhonde R R. Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2009;45(1-2): 23-27.
- [11] Chen WF, Liu HR, Zhu M, et al. *Shiyong Yixue Zazhi*. 2009;25(15): 2415-2418.
陈伟富, 刘洪瑞, 朱敏, 等. 人脐静脉血管内皮细胞分离与原代培养体会[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(15):2415-2418.
- [12] Zhang JF, Zheng JB, Shanxi Yixue Zazhi. 2011;40(3):264-266.
张嘉锋, 郑见宝. 人脐静脉内皮细胞的原代培养及鉴定[J]. *陕西医学杂志*, 2011, 40(3):264-266.
- [13] Zhang BC, Wang AC, Li LF, et al. *Shiyong Yixue Zazhi*. 2009;25(7): 1048-1049.
张步春, 王安才, 李利芳, 吴明. 血管内皮细胞体外培养方法的实验研究[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(7):1048-1049.
- [14] Zhang C, Li T, Hou YL, et al. *Tianjin Yiyao*. 2010;38(7):605-607.
张臣, 李彤, 侯跃龙, 等. 人脐静脉血管内皮细胞的高效分离与培养[J]. *天津医药*, 2010, 38(7):605-607.
- [15] Lin S, Zhou H, Ding Y, et al. An improved method of culturing human umbilical vein endothelial cells and its characterization. *Yan Ke Xue Bao*. 2010 ;25(2):99-102.
- [16] Wu SQ, Zheng JF, Zeng SG, et al. Culture and identify the human umbilical vein endothelial cells and investigate the expression of tyrosine kinase-2 with immunoglobulin-like and epidermal growth factor homology domains in the cells. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009 27(6):653-656.
- [17] Zhang BG, Chen TZ, Zhang JF, et al. *Zhonghua Xinxueguan Zhazhi*. 1985, 13(1):52-54.
张宝庚, 陈铁镇, 张晶范, 等. 人脐带静脉及大鼠主动脉内皮细胞的培养[J]. *中华心血管病杂志*, 1985, 13(1):52-54.
- [18] Yang XP, Chen GF, Zhang JS. *Zhonghua Xinxueguan Zazhi*. 1988; 16(50):298-300.
杨小平, 陈国芬, 张莼. 人脐静脉内皮细胞培养及形态观察[J]. *中华心血管病杂志*, 1988, 16(50):298-300.
- [19] Quattrone S, Chiappini L, Scapagnini G, et al. Relaxin potentiates the expression of inducible nitric oxide synthase by endothelial cells from human umbilical vein in in vitro culture. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(5):325-329.
- [20] Vag T, Schramm T, Kaiser WA, Hilger I. Proliferating and quiescent human umbilical vein endothelial cells (HUVECs): a potential in vitro model to evaluate contrast agents for molecular imaging of angiogenesis. *Contrast Media Mol Imaging*. 2009;4(4):192-198.
- [21] Cai W, Liang L, Ji P, Zhang W, et al. Experimental study on culture method of human umbilical vein endothelial cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2011;25(2):139-143.
- [22] Qian Y, Zhang L. *Yanke Yanjiu*. 2003;4(21):26-28.
钱勇, 张励. 内皮细胞生长因子和肝素对人脐静脉内皮细胞增殖的影响[J]. *眼科研究*, 2003;4(21):26-28.
- [23] Chandagirikoppal V, Kavitha I, Chapla Agarwal, Rajesh Agarwal, Gagan Deep. Asiatic Acid Inhibits Pro-Angiogenic Effects of VEGF and Human Gliomas in Endothelial Cell Culture Models. *Plos One*. 2011;6(8) :1-12.
- [24] Wang JM, Liu MQ, Lai XN. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 1995; 7(1): 8.
王建明, 刘萌秋, 赖西南. 正常脐静脉离体后不同时间内皮某些物质含量的变化[J]. *第三军医大学学报*, 1995, 17(1):8.
- [25] Sun C, Hu Y, Chu Z, et al. The Effect of Brain-derived Neurotrophic Factor on Angiogenesis. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 2009;29(2): 139-143.
- [26] Brown MA, Wallace CS, Anamelechi CC, et al. The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces. *Biomaterials*. 2007;28(27):3928-3935.
- [27] Lopes AA, Peranovich TM, Maeda NY, et al. Differential effects of enzymatic treatments on the storage and secretion of von willebrand factor by human endothelial cells. *Thrombosis Research*. 2001;101(4):291-297.
- [28] Nakayama T, Hirano K, Hirano M, et al. Inactivation of protease-activated receptor-1 by proteolytic removal of the ligand region in vascular endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*. 2004;68(1):23-32.
- [29] Bryan N, Andrews KD, Loughran MJ, et al. Elucidating the contribution of the elemental composition of fetal calf serum to antigenic expression of primary human umbilical-vein endothelial cells in vitro. *Biosci Rep*. 2011;31(3):199-210.
- [30] Seol HJ, Oh MJ, Kim HJ. Endothelin-1 expression by vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells and aortic smooth muscle cells. *Hypertens Pregnancy*. 2011;30(3): 295-301.
- [31] Wang ZH, He ZX, Wang HW, et al. *Guizhou Yixueyuan Xuebao*. 2006; 31(6):499-501.
王志华, 何志旭, 汪浩文, 等. 人脐静脉内皮细胞的培养和鉴定[J]. *贵州医学院学报*, 2006, 31(6)499-501.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81000365)。

作者贡献: 实验设计为第一作者, 实验的实施者为第一作者, 实验的评估为通讯作者, 盲法评估

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 婴儿脐带由华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科提供, 产妇及其家属签署知情同意书。

本文创新性:

文章要点: 探索脐静脉内皮细胞的体外培养的方法。

关键信息: 用胰蛋白酶灌注脐静脉是一种简单、实用的获得人脐静脉血管内皮细胞的方法, 可靠性大, 成功率高, 可以构建体外研究血管内皮细胞的模型。

研究的创新之处: 实验在国内首次报道以胰蛋白酶消化法获得的脐静脉内皮细胞在细胞接种 24 h 后细胞达到 80% 融合, 该方法获得的细胞活力好, 细胞数量多, 操作简单, 易重复。