

猕猴冠状动脉原代内皮细胞分离和培养及其功能验证

蒋海峰,许振,张磊,檀学文,陈维乐,董婷玉,刘潇一,严尚学,常艳,魏伟

摘要 目的 建立非人灵长类动物冠状动脉原代内皮细胞的分离和培养方法,为研究人冠状动脉内皮细胞提供细胞模型。**方法** 无菌分离猕猴冠状动脉,胶原酶短暂消化后采用组织黏附法分离猕猴冠状动脉原代内皮细胞,利用流式细胞术检测并分选 CD31 阳性细胞,确定内皮细胞纯度;经前列腺素 E₂ (PGE₂) 刺激后,以 CCK-8 法和高内涵细胞成像法分别检测猕猴冠状动脉原代内皮细胞活力和增殖能力、以 Transwell 法和 Matrigel 胶法分别检测猕猴冠状动脉原代内皮细胞迁移能力和体外成管功能。**结果** 猕猴冠状动脉原代内皮细胞在 10~14 d 细胞覆盖培养瓶面积的 80% 左右,细胞呈不规则多边形和铺路石状。流式检测其纯度为 31.7% 左右,分选后利用流式细胞术再次检测内皮细胞纯度,达 95% 以上;PGE₂ 能显著上调猕猴冠状动脉原代内皮细胞的增殖、迁移和成管能力。**结论** 该研究成功建立猕猴冠状动脉原代内皮细胞分离培养方法,通过功能研究表明猕猴冠状动脉原代内皮细胞可以作为模拟人冠状动脉内皮细胞的体外细胞模型。

关键词 猕猴;冠状动脉;原代内皮细胞;分离培养;鉴定;细胞模型

中图分类号 R 322.1; R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0897-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.010

内皮细胞生理上分泌 NO 和内皮素(endothelin, ET)等细胞因子,控制血管舒缩及血液中大分子和血细胞的外泄^[1];内皮损伤及功能障碍时,其表达血管细胞黏附分子-1 和内源性 NO 等生物分子导致血管舒缩平衡被打破^[2-3]。前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 在多种组织中发挥重要功能,病理状态下表达升高,加重多种炎症反应参与疾病的

发生发展^[4]。冠状动脉为营养心脏的主要血管,其内皮细胞作为与血液接触的直接屏障尤为重要。

目前已有成人、小鼠和猪的冠状动脉原代内皮细胞分离方法,尚未见猕猴相关方法报道^[5-7]。与其他动物相比,猕猴表现出与人类遗传、免疫和代谢的高度相似性,是基础研究和临床应用之间一个理想的转化模型^[8]。在体外实验中,为更好模拟人体细胞的病理生理状态,探索一种简便可行的猕猴冠状动脉原代内皮细胞分离方法十分必要。该研究成功建立了猕猴冠状动脉原代内皮细胞的分离培养方法,并对其进行鉴定和功能研究。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选取 3~5 岁普通级实验猕猴,饲养于安徽医科大学临床药理研究所实验动物中心。温度 20~26 ℃;日温差 ≤4 ℃;相对湿度 40%~70%。昼夜交替满足猕猴作息时间,饲料、水和瓜果蔬菜不受限制,定时为猕猴播放音乐及视频。实验动物购自旌德县皖南猕猴驯养繁殖基地,生产许可证号:SCXK(皖)2020-001。该实验过程得到安徽医科大学临床药理研究所动物伦理委员会批准(批号:PT-2020-001)。

1.2 主要试剂 冠脉内皮细胞完全培养基购自武汉普赛诺生命科技有限公司;DMEM 基础培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自以色列 Biological Industries 公司;CD31 抗体购自美国 Biotend 公司;CCK-8 试剂盒购自广州 Biosharp 公司;PGE₂ 购自美国 Cayman 公司;基质胶(Matrigel 胶)和 Transwell 小室均购自美国 Corning 公司;II 型胶原酶购自美国 Sigma 公司;舒泰 50 购自合肥国腾动物保健有限公司。

1.3 主要仪器 Cyto FLEX 型流式细胞仪:美国 Beckman Coulter 公司;BD FACSAria 分选型流式细胞仪:美国 Becton Dickinson 公司;23062 型 CO₂ 培养箱:美国 SHEL LAB 公司;Image Xpress Micro4 型高内涵细胞成像分析仪:美国 Molecular Devices 公司;Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪:瑞士 TECAN 公司。

2022-03-23 接收

基金项目:安徽高校重点科研平台协同创新项目(编号:GXXT-2020-065)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,安徽医科大学风湿关节炎研究中心,合肥 230032

作者简介:蒋海峰,男,硕士研究生;

常艳,女,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yychang@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

1.4 猕猴冠状动脉原代内皮细胞分离方法 猕猴以 6 mg/kg 剂量肌肉注射舒泰 50 麻醉,股动脉放血处死。无菌取出猕猴心脏,并用眼科剪、眼科镊分离冠状动脉前降支和右冠状动脉。将血管移入无菌 1.5 ml EP 管中剪碎,并用含双抗的生理盐水清洗,4 ℃、4 000 r/min 离心 5 min 弃上清液。加入 1 ml 0.1% II 型胶原酶,于恒温振荡箱 37 ℃、200 r/min 消化 30 min 左右,终止消化并离心。用冠状动脉完全培养基重悬组织块,并将其轻轻贴入培养瓶中,加入 3 ml 冠状动脉完全培养基。将培养瓶竖立在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中,4~6 h 后轻轻放倒细胞培养瓶进行培养,过程中保持组织块一直呈贴壁状态。

1.5 猕猴冠状动脉原代内皮细胞形态学观察 倒置显微镜(DMi1 型)观察并拍照记录猕猴冠状动脉原代内皮细胞形态及生长状况。

1.6 猕猴冠状动脉原代内皮细胞传代培养 原代细胞培养 10~14 d,细胞覆盖培养瓶面积 80% 左右去除组织块,进行传代。加入胰蛋白酶消化细胞;当细胞皱缩变圆后终止消化。4 ℃、1 500 r/min 离心 5 min 后,用含 20% FBS 的高糖 DMEM 培养基(20% 培养基)重悬,并 1:2 进行传代培养。

1.7 猕猴冠状动脉原代内皮细胞纯度检测 将消化所得细胞 4 ℃、2 500 r/min 离心 5 min,200 μl PBS 重悬,取 100 μl 细胞悬液孵 CD31 抗体 30 min。离心并加入适量 PBS 重悬细胞,过滤后流式细胞仪检测内皮细胞比例。

1.8 分选和培养猕猴冠状动脉原代内皮细胞 制备细胞悬液,于 1.5 ml EP 管中孵育 CD31 抗体 40 min,4 ℃、1 500 r/min 离心 5 min。PBS 重悬细胞,经 200 目纱网过滤放入流式管中,分选型流式细胞仪进行分选。分选后细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.9 猕猴冠状动脉原代内皮细胞功能实验

1.9.1 细胞活力和增殖实验

1.9.1.1 CCK-8 法检测猕猴冠状动脉内皮细胞活力 制备细胞悬液并使用计数板计数,以 5×10^3 个/孔铺入 96 孔板,培养 6 h 后加 0.3 μmol/L PGE₂。37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 h,PBS 洗涤细胞。每孔加 100 μl 20% 培养基,10 μl CCK-8 试剂继续培养 2~4 h 后,以酶标仪检测其吸光度($\lambda = 450$ nm)。

1.9.1.2 高内涵细胞成像法检测猕猴冠状动脉内皮细胞增殖 细胞制成悬液后,以 5×10^3 个/孔细胞接种 96 孔板,0.3 μmol/L PGE₂ 刺激 48 h。PBS

清洗细胞,多聚甲醛固定 30 min,加 DAPI 染核 7 min,用高内涵成像系统拍照。设定软件参数,检测细胞直径最小到最大范围和细胞荧光最弱到最强范围,减去背景荧光强度,统计分析各组细胞数量。

1.9.2 细胞迁移实验 猕猴冠状动脉内皮细胞制成悬液后,接种于 24 孔板,0.3 μmol/L PGE₂ 刺激 48 h。消化细胞铺入 24 孔板中 Transwell 小室,下室加 20% 培养基。培养 12 h 后将小室放入含 0.1% 结晶紫的生理盐水,染色 15 min;显微镜下观察拍照,每组随机选取 9 个视野,计数每组视野紫色深染细胞总数。

1.9.3 细胞成管实验 内皮细胞接种于 24 孔板,0.3 μmol/L PGE₂ 刺激 48 h 后制备细胞悬液;取 30 μl Matrigel 胶加入 4 ℃ 放置 30 min 预冷 96 孔板中,培养箱放置 2 h 至完全凝胶;以 5×10^3 个/孔细胞接种 96 孔板,培养 6 h;倒置生物显微镜(DMi1 型)下观察拍照,每组随机选取 5 个视野,计数每组视野内皮细胞聚集成环的总数。

1.10 统计学处理 以 SPSS 20.0 软件、GraphPad Prism 7.0 软件分别进行统计分析 with 图形绘制相关工作。所得实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较通过 *t* 检验进行数据统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 猕猴冠状动脉原代内皮细胞形态学观察 培养第 3 天组织块周围爬出细胞,到 10~14 d 组织块周围细胞出现生长接触抑制现象,细胞密度占培养瓶 80% 左右(图 1A)。去除组织块重新铺瓶生长,可见猕猴冠状动脉原代细胞贴壁生长,形态展开,细胞核清晰居中(图 1B)。分选后第 2 天内皮细胞贴壁,多呈扁平多角形,核圆形或椭圆形,形似铺路石状(图 1C)。

2.2 内皮细胞纯度鉴定 分选前流式细胞术检测内皮细胞纯度为 31.7% 左右(图 2A、B)。分选后以流式细胞术对内皮细胞进行鉴定,结果显示内皮细胞纯度大于 95%(图 2C、D),满足后续实验要求,提示猕猴冠状动脉原代内皮细胞分离成功。

2.3 猕猴冠状动脉原代内皮细胞功能实验

2.3.1 PGE₂ 对猕猴冠状动脉原代内皮细胞活力以及增殖的影响 CCK-8 法检测猕猴冠状动脉原代内皮细胞活力,结果表明 PGE₂ 刺激组(PGE₂ 组)较未刺激组(Normal 组)内皮细胞活力显著提高($t = -3.948, P = 0.017$)(图 3A)。高内涵成像法检测

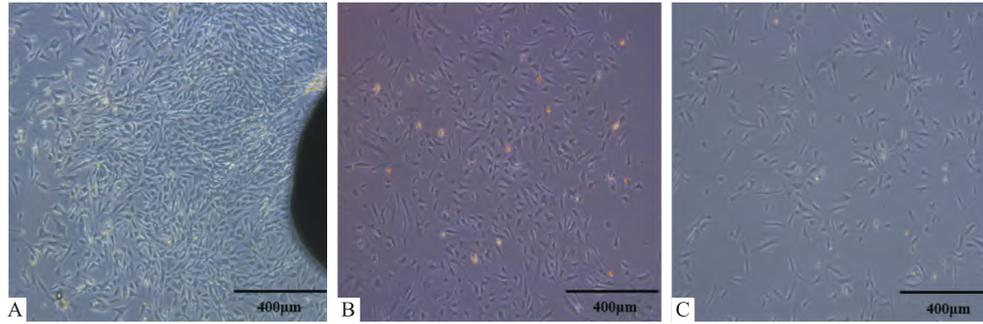


图1 原代内皮细胞生长状况 ×400

A:黏附组织旁原代内皮细胞;B:去除组织后原代内皮细胞;C:分选后原代内皮细胞

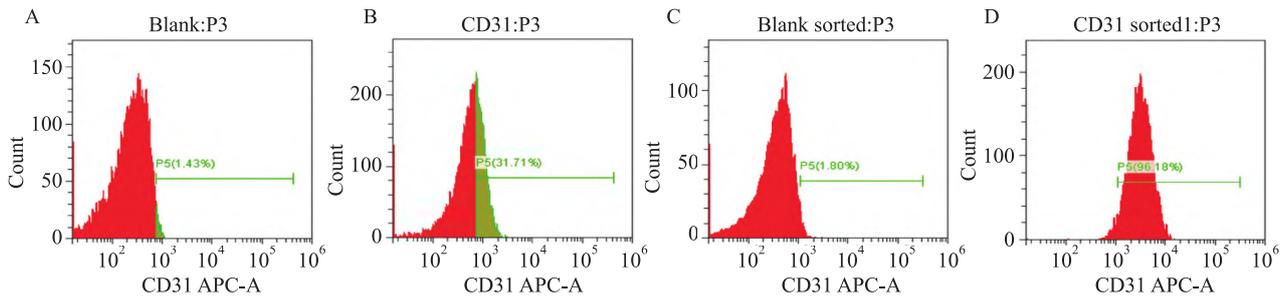


图2 流式细胞术鉴定内皮细胞纯度

A:分选前阴性对照组;B:分选前 CD31 阳性对照组;C:分选后阴性对照组;D:分选后 CD31 阳性对照组

猕猴冠状动脉原代内皮细胞的增殖能力,结果表明,与未刺激组相比,PGE₂ 刺激组猕猴冠状动脉原代内皮细胞增殖能力显著增强($t = -2.887, P = 0.045$) (图3B~D)。

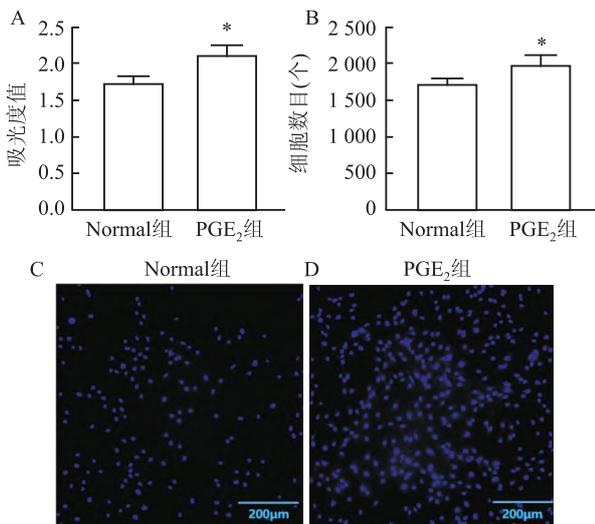


图3 PGE₂ 对内皮细胞活力及增殖能力的影响($n = 3, \times 200$)

A:猕猴冠状动脉原代内皮细胞活力统计图;B:猕猴冠状动脉原代内皮细胞增殖能力统计图;C:Normal组;D:PGE₂组;与Normal组比较;* $P < 0.05$

2.3.2 PGE₂ 对猕猴冠状动脉原代内皮细胞迁移的

影响 Transwell 法检测猕猴冠状动脉原代内皮细胞迁移能力,结果表明,与未刺激组相比,PGE₂ 刺激组猕猴冠状动脉原代内皮细胞迁移数量明显增多,表明 PGE₂ 刺激后猕猴冠状动脉原代内皮细胞迁移能力增强($t = -4.251, P = 0.013$) (图4)。

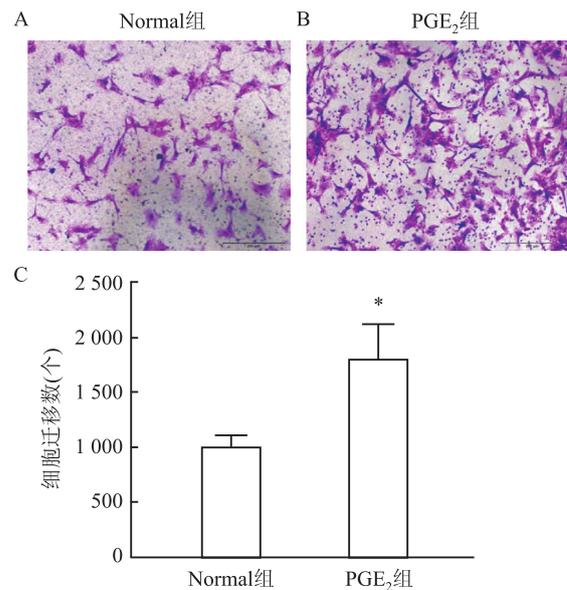


图4 PGE₂ 对内皮细胞迁移能力的影响($n = 3, \times 200$)

A:Normal组;B:PGE₂组;C:猕猴冠状动脉原代内皮细胞迁移能力统计图;与Normal组比较;* $P < 0.05$

2.3.3 PGE₂ 对猕猴冠状动脉原代内皮细胞血管生成的影响 Matrigel 胶法 6 h 检测内皮细胞成管能力良好。由结果可知,与未刺激组相比,PGE₂ 刺激组猕猴冠状动脉原代内皮细胞成管能力显著增强($t = -5.341, P = 0.006$)(图 5)。

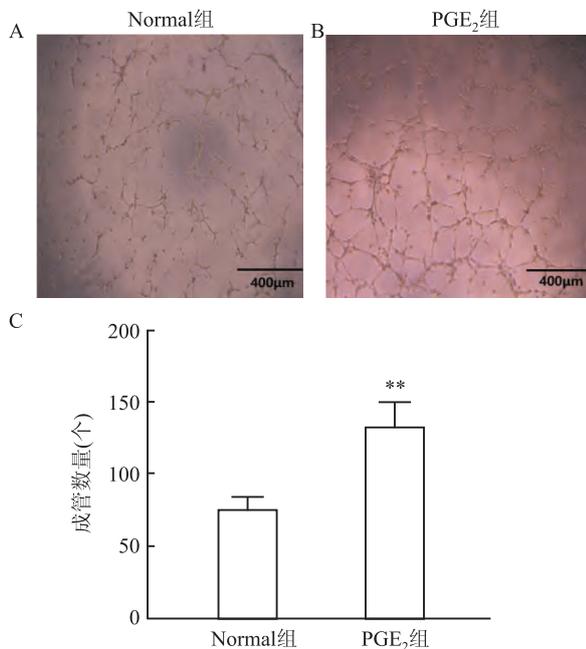


图 5 PGE₂ 对内皮细胞血管生成的影响($n = 3, \times 400$)

A: Normal 组; B: PGE₂ 组; C: 猕猴冠状动脉原代内皮细胞成管数量统计图; 与 Normal 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

非人灵长类作为人类最亲密的进化亲属,是人类生理和疾病研究的宝贵模型^[8]。人类致病基因的高度特异性使得无法利用一些低等动物模型来绘制这些致病基因的图谱^[9],这会导致一些药物向临床转化的失败,使用与人类基因组高度同源的非人灵长类动物猕猴可以提高临床药物研发成功率^[8],提示非人灵长类动物模型和细胞模型的重要性。

冠状动脉是心脏的营养血管,当其发生病变时严重威胁人类生命。川崎病(kawasaki disease, KD)是一种主要影响冠状动脉的全身性血管炎综合征,人冠状动脉内皮细胞经刺激后增殖和成管能力增强,可能参与 KD 的发病过程^[10];冠状动脉内皮细胞不能充分利用 NO 适当调节血管舒缩也会诱发冠状动脉疾病^[11]。因此,关注冠状动脉内皮细胞有助于了解相关疾病的发生和发展。

目前对不同血管原代内皮细胞提取方法多为酶消化法^[12]、组织刮取法^[5]、组织黏附法^[6]。相较于

大血管而言,冠状动脉行走于左右冠状沟内,管径狭小,在许多方法上受到限制。酶消化法难以掌握消化强度;组织刮取法难以掌握刮取力度;组织块黏附法相对简单,但血管打开后难以区分正反面,同时直接黏附细胞爬出缓慢。该研究采用酶消化和组织黏附相结合的方法,同时考虑到细胞生长过程中纯度不够问题,该实验采用了流式细胞术进行分选,以获取高纯度内皮细胞。

CD31 即血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1),是内皮细胞上最丰富的共信号受体蛋白,形成与血液细胞接触的第一线^[13]。在细胞分选前后,使用 CD31 抗体标记,细胞纯度由 31.71% 左右上升到 95% 以上,满足实验要求,表明猕猴冠状动脉原代内皮细胞分离成功。

PGE₂ 属于前列腺素家族,通过结合细胞膜上 4 个不同的 E 型前列腺素受体 (E-type prostanoid receptor 1 ~ 4, EP1 ~ 4) 发挥作用,在血管内皮细胞上与 EP4 受体结合诱导其增殖、迁移和成管能力^[14]。该实验以 PGE₂ 为刺激剂,检测猕猴冠状动脉内皮细胞功能,经刺激后其增殖、迁移和成管能力显著增强,提示猕猴冠状动脉原代内皮细胞分离成功。

不同器官和血管内皮细胞存在异质性,表现在其形态、生理和表型差异等^[1]。对冠状动脉、静脉和冠状动脉微血管分离出来的内皮细胞对比研究表明,前列腺素合成能力存在区域差异^[15]。若要进一步揭示动脉粥样硬化、冠心病等好发于冠状动脉的疾病发病机制,冠状动脉内皮细胞是很好的体外细胞模型。该实验以猕猴为实验动物成功探索出非人灵长类冠状动脉原代内皮细胞分离方法,并对内皮细胞的功能进行了鉴定,为研究冠状动脉相关疾病提供了一个体外细胞模型。

参考文献

- [1] Krüger-Genge A, Blocki A, Franke R, et al. Vascular endothelial cell biology: an update[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(18):4411.
- [2] Liao J K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation[J]. J Clin Invest, 2013,123(2):540-1.
- [3] Gimbrone M A, García-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. Circ Res, 2016,118(4):620-36.
- [4] Tsuge K, Inazumi T, Shimamoto A, et al. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E₂-exacerbated inflammation and immune diseases[J]. Int Immunol, 2019,31(9):597-606.
- [5] 田凤石, 张宏, 宋学明, 等. 成人冠状动脉内皮细胞体外培

- 养方法的实验研究[J]. 中华心血管病杂志, 2006,34(3):267-8.
- [6] 李丹, 刘建勋, 付建华, 等. 猪的冠状动脉内皮细胞体外培养方法[J]. 中药药理与临床, 2012,28(3):114-6.
- [7] Luo S, Truong A H, Makino A. Isolation of mouse coronary endothelial cells[J]. *J Vis Exp*, 2016,23(113):e53985.
- [8] Pasini E M, Kirkegaard M, Mortensen P, et al. Deep-coverage rhesus red blood cell proteome: a first comparison with the human and mouse red blood cell[J]. *Blood Transfus*, 2010,8(3):126-39.
- [9] Van Zyl T, Yan W, McAdams A, et al. Cell atlas of aqueous humor outflow pathways in eyes of humans and four model species provides insight into glaucoma pathogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020,117(19):10339-49.
- [10] Wang Y, Hu J, Liu J, et al. The role of Ca^{2+} /NFAT in dysfunction and inflammation of human coronary endothelial cells induced by sera from patients with kawasaki disease[J]. *Scientific Reports*, 2020,10(1):33-6.
- [11] Khera A V, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation [J]. *Nat Rev Genet*, 2017,18(6):331-44.
- [12] 刘倩, 韩陈陈, 罗婷婷, 等. 大鼠股动脉血管原代内皮细胞的分离与培养[J]. 安徽医科大学学报, 2021,56(4):566-70.
- [13] Caligiuri G. Mechanotransduction, immunoregulation, and metabolic functions of CD31 in cardiovascular pathophysiology [J]. *Cardiovasc Res*, 2019,115(9):1425-34.
- [14] Han C C, Liu Q, Zhang Y, et al. CP-25 inhibits PGE₂-induced angiogenesis by down-regulating EP4/AC/cAMP/PKA-mediated GRK2 translocation[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020,134(3):331-47.
- [15] Gerritsen M E, Printz M P. Sites of prostaglandin synthesis in the bovine heart and isolated bovine coronary microvessels[J]. *Circ Res*, 1981,49(5):1152-63.

Isolation, culture and functional verification of primary coronary endothelial cells from macaca mulattas

Jiang Haifeng, Xu Zhen, Zhang Lei, Tan Xuewen, Chen Weile, Dong Tingyu, Liu Xiaoyi,
Yan Shangxue, Chang Yan, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032*)

Abstract *Objective* To establish a method for isolation and culture of primary endothelial cells from non-human primate coronary arteries, and to provide a cell model for the study of human coronary endothelial cells. *Methods* The coronary arteries of macaca mulattas were separated aseptically. The primary endothelial cells were separated *via* tissue adhesion after collagenase digestion. CD31 positive cells were detected and sorted by flow cytometry to determine the purity of endothelial cells. After stimulation with prostaglandin E₂ (PGE₂), the cellular viability and proliferation ability of primary coronary endothelial cells from macaca mulattas were evaluated by high-content cell imaging and CCK-8 assay, and the migration ability and tube function of primary coronary endothelial cells from macaca mulattas were measured by Transwell method and Matrigel glue method, respectively. *Results* The confluence percentage of primary coronary artery cells of macaca mulattas was about 80% after 10-14 days *in vitro* culture, and the cellular morphology was irregular polygons and paver shape. The purity of endothelial cells was about 31.7% by flow cytometry. After sorting, the purity of endothelial cells was confirmed by flow cytometry, which was more than 95%. PGE₂ could significantly up-regulate the proliferation, migration and tube formation abilities of primary coronary endothelial cells of macaca mulattas. *Conclusion* This study successfully established the isolation and culture method of primary coronary endothelial cells from macaca mulattas, and proved that it could be used as an *in vitro* cell model to simulate human coronary endothelial cells through functional studies.

Key words macaca mulattas; coronary artery; primary endothelial cells; isolation and culture; identification; cell model