

网络出版时间: 2024-12-26 16:27:02 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1133.002>

改良组织块培养法提取原代大鼠脑微血管内皮细胞及鉴定

张帆¹, 李柏霖², 池茗³, 刘海琴⁴, 唐元瑜²

(福建中医药大学¹ 针灸推拿学院针推系、² 中医学院中医基础理论学科、³ 中西医结合学院临床医学系, 福州 350122; ⁴ 海军军医大学上海长征医院呼吸与危重症医学科, 上海 200003)

摘要 目的 探究脑微血管组织块培养法提取原代大鼠脑微血管内皮细胞并对其进行鉴定。方法 取4周龄SD大鼠脑皮层, 经过筛网、预消化、微血管组织块固化处理后, 置于CO₂培养箱中进行原代培养。通过细胞形态学观察、第Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学染色法鉴定所培养的目的细胞。结果 体外培养48 h后短梭形细胞从脑微血管段周围爬出; 72 h后岛屿状的细胞团簇形成; 96 h后团簇融合, 细胞呈典型的单层铺路石样镶嵌式排列生长。第Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学染色法检测显示, 细胞胞质呈棕红色, 表达为阳性, 细胞核被苏木精衬染成蓝黑色。结论 脑微血管组织块培养法能够成功提取原代大鼠脑微血管内皮细胞。

关键词 脑; 微血管内皮细胞; 原代培养; 脑微血管组织块培养法; 第Ⅷ因子相关抗原; 大鼠; 鉴定

中图分类号 R 331.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)01-0010-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.002

大脑神经-血管单元是由神经元、神经胶质细胞、脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)及细胞外基质共同构成的一个功能性整体^[1]。BMECs作为大脑神经-血管单元的重要细胞组分之一, 在构筑血脑屏障、参与物质转运、限制各种内外源性毒素入脑, 以及维持中枢神经系统内环境稳态等方面扮演着重要角色^[2], 与临床脑卒中^[3]、高血压脑病^[4]、阿尔茨海默病^[5]等疾病的发生密切相关, 是开展脑血管疾病研究的重要载体和工具细胞。

既往国内外学者多采用物理过筛法^[6-7]或化学酶消化法^[8-9]开展BMECs的原代培养, 组织块法则因脑组织含胶质成分多、容易液化、不易固化贴壁等原因而少有研究报道, 但该方法具有简单、高效、实验成本低等优点。故课题组积极改进组织块法, 以期建立一种高效低耗的大鼠BMECs原代培养方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级4周龄Sprague Dawley大鼠4

2024-10-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81072714); 福建省自然科学基金(编号: 2017J01545)

作者简介: 张帆, 男, 本科;

唐元瑜, 男, 副教授, 通信作者, E-mail: 2422198977@qq.com

只, 雌雄不拘, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 质量合格证号为SCXK(沪)2022-0004。实验严格遵守国际兽医编辑协会颁布的《关于动物伦理与福利的作者指南共识》等相关规定。

1.1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清、M199培养基均购自美国Gibco公司; Triton X-400购自北京Solarbio生物公司; II型胶原酶购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; Rabbit Anti rat Ⅷ因子抗体购自北京博奥森生物科技公司; 生物素标记的羊抗兔IgG、即用型免疫组织化学试剂盒SABC、DAB显色剂均购自武汉博士德生物公司。Airtech超净工作台购自苏州安泰空气技术有限公司; TDZ4A-WS低速离心机购自湖南湘仪公司; DFC295倒置生物显微镜购自德国Leica公司; CO₂培养箱购自美国Thermo公司; 培养皿购自丹麦Nunc公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠BMECs的原代培养 选取大鼠4只, 予腹腔注射3%戊巴比妥钠麻醉剂后, 行颈椎脱臼处死。依次剪开大脑皮层、肌肉层和颅骨, 用无菌眼科镊取出大脑皮质, 并将其置于滤纸上滚动, 以除去皮质表面的软脑膜和大血管等。将清洁后的脑皮质剪碎成大小约为1 mm × 1 mm × 1 mm的组织小块, 并使其通过孔径为40 μm的细胞筛网, 收集网上截留的微血管组织块于15 ml锥底离心管中。向管内滴加终浓度为0.1%的II型胶原酶5 ml, 37℃水浴振摇消化15~20 min。2 000 r/min离心10 min, 弃

去上清液,将组织沉淀与 2 ml M199 完全培养液充分混匀后接种于直径为 55 mm 的培养皿中。用眼科镊夹取无菌干棉球,利用毛细作用小心吸弃皿内培养液后将其静置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中固化 20 ~ 30 min。待血管段贴壁锚定后,补加适量培养液,以刚好覆盖皿底为宜,其后每隔 24 h 换液 1 次。

1.2.2 倒置生物显微镜观察大鼠 BMECs 的细胞形态及生长状况 观察主要包括细胞形态及血管段组织块贴壁、出芽、融合等生长状况,并拍照记录。

1.2.3 免疫细胞化学染色法检测大鼠 BMECs 第Ⅷ因子相关抗原 当培养皿中的 BMECs 增殖生长接近 80% 的融合度时,使用 PBS 液进行漂洗,每次 5 min,重复 3 次。滴加预冷的 4% 多聚甲醛溶液,常温固定细胞 15 min。再次用 PBS 液进行漂洗,每次 5 min,重复 3 次。滴加 0.3% Triton X-100,常温脱脂透膜 15 min。之后再次用 PBS 液进行漂洗,每次 5 min,重复 3 次。滴加 5% BSA 进行室温封闭 20 min。甩弃封闭液,滴加稀释度为 1 : 300 的兔抗大鼠第Ⅷ因子抗体,并将培养皿置于湿盒中,于 4 ℃ 孵育过夜。12 h 后用 PBS 液进行漂洗,每次 5 min,重

复 3 次。滴加羊抗兔 IgG 二抗,37 ℃ 孵育 30 min。再次用 PBS 液进行漂洗,每次 5 min,重复 3 次。滴加 SABC,37 ℃ 孵育 30 min。再次用 PBS 液进行漂洗,每次 5 min,重复 3 次。滴加 DAB 显色液,室温显色 2 min。经 PBS 液彻底漂洗后,滴加苏木精进行胞核衬染,持续 1 min,最后在镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 原代大鼠 BMECs 的细胞形态学观察 倒置生物显微镜下可见:接种于培养皿中的脑微血管段呈长短不一的短棍状,或沉于皿底,或悬浮于培养液中,其间含较多细小的髓鞘等杂质(图 1A);经干棉球吸附处理后,质地较轻、体积较小的髓鞘等杂质被去除,获得较纯净的脑微血管段(图 1B、C);48 h 后,贴壁的血管段周围爬出短梭形细胞,呈蜈蚣样出芽式生长(图 1D ~ F);72 h 后,以血管段为中心的岛屿状或团簇样的细胞集落形成(图 2A ~ C);96 h 后,血管段逐渐塌陷,管形消失;同时细胞集落相互融合成片,细胞铺满瓶底,呈典型的单层、铺路石样镶嵌式排列生长(图 2D ~ F)。

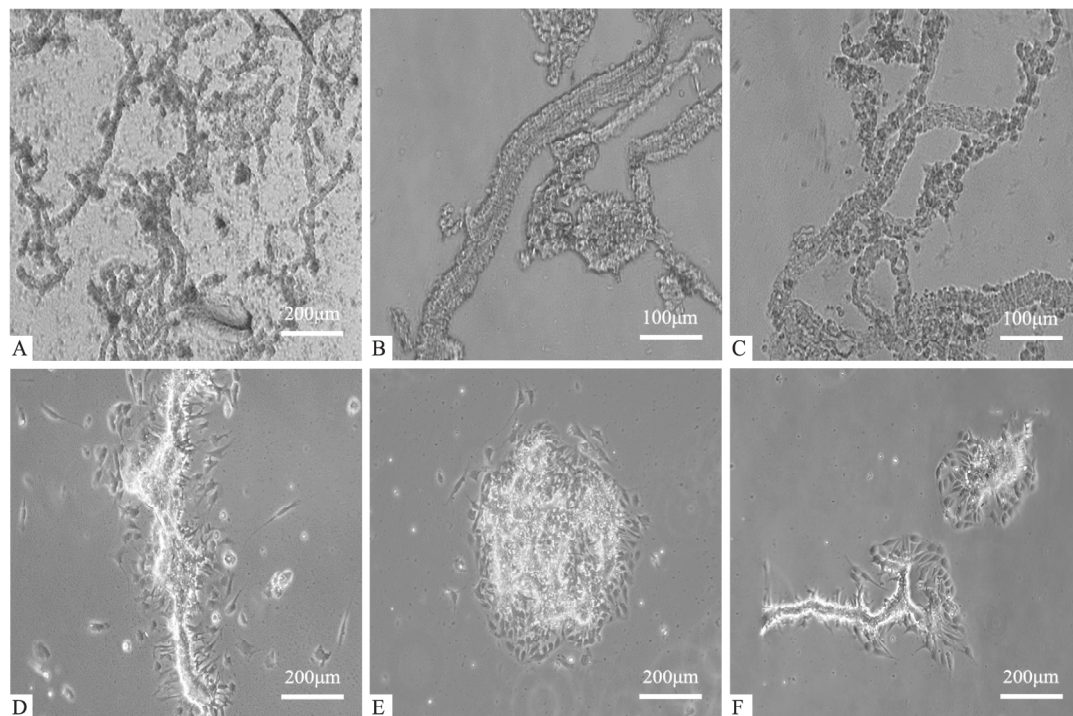


图 1 纯净大鼠脑微血管段的获得及 BMECs 的出芽观察

Fig. 1 Acquisition of cerebral microvascular segments in rats and observation of BMECs germination

A: short stick-shaped brain microvascular segment containing impurities such as myelin sheath obtained through sieve; B, C: Pure brain microvascular segment obtained by cotton ball siphon treatment; D ~ F: 48 hours later, short spindle-shaped cells emerged around the vascular segment and grew like centipede buds.

2.2 大鼠 BMECs 第Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学染色的检测 免疫细胞化学染色法检测细胞第Ⅷ因子相关抗原表达,100 倍和 400 倍倒置显微镜下均可见细胞胞质淡染成棕红色,表达为阳性,阳性细胞率达 99% 以上(图 3A、B);苏木精衬染细胞核,显示为蓝黑色(图 3C)。

3 讨论

与既往体外培养 BMECs 所采用的组织块法不

同,分离出纯净的脑微血管段进行单独的组织块培养是本研究的一大特色。如李华等^[14]采用大脑皮质进行组织块培养,即将脑皮质直接剪碎成 1 mm^3 小块,并与 1 滴胎牛血清混匀后,接种于培养皿中,37℃ 固化 2 h,然后补加液体进行培养。该方法由于固化时间冗长,增加了实验操作时间成本,而且大脑皮质的细胞组分复杂,培养出的目的细胞纯度不高,没能很好地解决原代细胞的纯化问题。而祝慧凤等^[11]则采用大脑琼脂糖凝胶切片法进行组织块

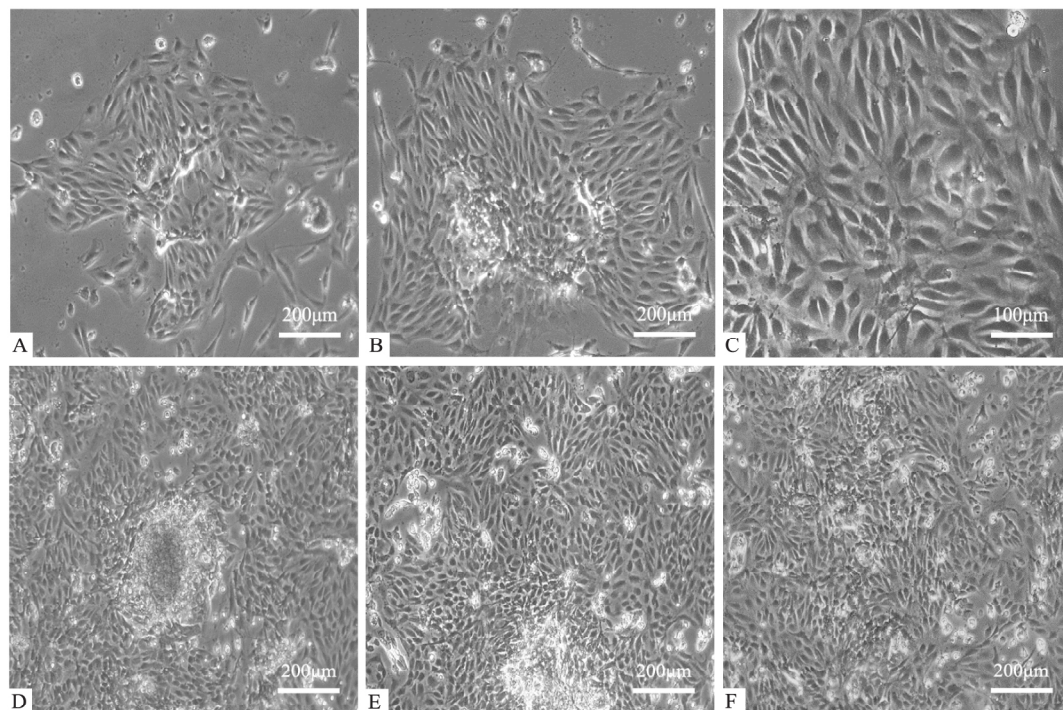


图 2 岛屿状的大鼠 BMECs 集落形成及其相互融合

Fig. 2 Formation and mutual fusion of island like BMECs colonies

A - C: After 72 hours, cell colonies with island-like or cluster-like distribution centered around vessel segments were formed; D - F: After 96 hours, the cell colonies expanded and gradually merged into sheets, the cells covered the bottom of the bottle, exhibiting a typical single-layer, pebble-like, mosaic arrangement.

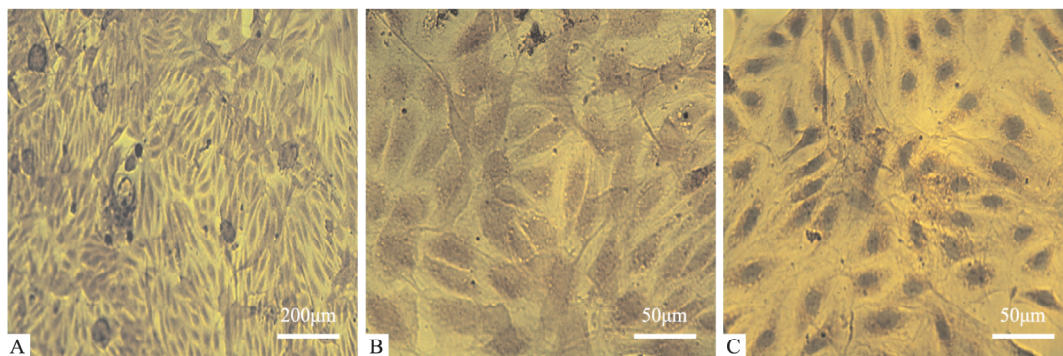


图 3 大鼠 BMECs 第Ⅷ因子相关抗原的表达及检测

Fig. 3 Primary rat BMECs Ⅷ factor-related antigen expression and detection

A, B: Immunocytochemical staining for Ⅷ factor-related antigen at different magnifications showed that the cytoplasm of cells was stained brown-red, indicating positive expression; C: The nucleus was stained blue-black with hematoxylin.

培养。该方法由于琼脂糖凝胶大脑切片的制备操作繁琐,容易导致微生物污染,且大脑含胶质成分较多,若操作时间过长,组织容易液化,变成烂泥样的浓稠浆液状而不能完成固化过程,最终导致体外培养失败。

而本课题组所采用的组织块法,首先通过细胞筛网获得纯度较高的脑微血管段,经化学消化酶进行预处理后,再将其接种于皿中进行培养。由于血管段重量较轻,体积较小,肉眼不可见,即使皿中残留少量的培养液,往往也会随着皿里的液体晃动而四处漂移、不能贴壁,故课题组采用眼科镊夹取无菌干棉球,小心吸除皿里残余的培养液及髓鞘组织。待皿内已无明显肉眼可见的液体流动时,再将培养皿放入培养箱中,固化 20 ~ 30 min。以上技术方法的改进,不仅缩短了实验所需时间,节约了实验成本,而且去除了髓鞘等杂质,提高了微血管段的纯度,保证了微血管段贴壁的稳定。后续实验结果也证明,采用纯净的脑微血管组织块培养法提取的原代大鼠 BMECs 活性较高,48 h 后细胞即可“出芽”,即以血管段为中心,细胞从其周围迁移爬出,同时所培养的目的细胞亦呈典型的内皮细胞样单层、铺路石样镶嵌式排列生长。

最后,采用化学酶对固化前的纯净脑微血管组织块进行预消化处理也是本研究的另一特色。组织块培养法一般是在解剖获得组织块后将其直接进行贴壁培养^[2],但由于内皮细胞位于血管壁内侧,故往往需要化学消化酶松解管壁及外周结缔组织,内皮细胞才容易由内向外爬出组织块。目前常用的化学消化酶主要有 II 型胶原酶和胶原酶/分散酶^[13-14],其基本作用原理是分解细胞基底膜的胶原蛋白、松解细胞间的紧密连接、去除周细胞,以获得数量足够、纯度较高的目的细胞^[15]。但胶原酶/分散酶为国外进口试剂,价格昂贵,会大大增加实验成本。该课题组经探索,发现仅仅使用终浓度为 0.1% 的 II 型胶原酶,预消化 15 ~ 20 min,期间配合物理振荡,亦能取得满意效果,这样既减少了实验成本,又可松解血管段外周组织而使内皮细胞更容易从组织块中游离、爬出。最后的实验结果也证实内皮细胞迁移出组织块的时间明显缩短,接种血管段 48 h 后,细胞即可呈现出蜈蚣样的出芽式生长。

总之,课题组以微血管组织块为研究中心,通过筛选纯净的脑微血管组织块、胶原酶预消化处理微血管段,以及缩短微血管段的固化时间等手段改良组织块法,最终培养出了活性好、纯度高、数量足的

BMECs,成功建立了一种低耗高效的大鼠 BMECs 原代培养方法,为脑血管疾病的体外研究提供了重要载体和实用工具细胞,值得借鉴和推广。

参考文献

- [1] Lee S R, Lo E H. Interactions between p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3 in cerebral endothelial cell death after hypoxia-reoxygenation [J]. *Stroke*, 2003, 34(11): 2704 - 9. doi: 10.1161/01.STR.0000096540.40826.BA.
- [2] Abbott N J, Patabendige A A K, Dolman D E M, et al. Structure and function of the blood - brain barrier [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(1): 13 - 25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- [3] 李韵歆, 刘振权, 李月, 等. 缺血性脑卒中神经血管单元的研究进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 21(2): 217 - 20. doi: 10.3969/j.issn.1009-0126.2019.02.029.
- [4] Li Y X, Liu Z Q, Li Y, et al. Research progress of neurovascular unit in ischemic stroke [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2019, 21(2): 217 - 20. doi: 10.3969/j.issn.1009-0126.2019.02.029.
- [5] 洪靖舒, 韩登阳, 郭向阳. 神经血管单元在脑小血管病中的研究进展 [J]. *中华脑血管病杂志*, 2022, 16(1): 48 - 52.
- [6] Hong J S, Han D Y, Guo X Y. Research progress of neurovascular units in small cerebral vessel diseases [J]. *Chin J Cerebrovasc Dis*, 2022, 16(1): 48 - 52.
- [7] Apátiga-Pérez R, Soto-Rojas L O, Campa-Córdoba B B, et al. Neurovascular dysfunction and vascular amyloid accumulation as early events in Alzheimer's disease [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(1): 39 - 50. doi: 10.1007/s11011-021-00814-4.
- [8] 张杨斌, 陆茵, 李沧海, 等. 小鼠脑微血管内皮细胞的培养及其生物学行为初探 [J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(2): 139 - 42. doi: 10.3969/j.issn.1000-5005.2012.02.012.
- [9] Zhang C B, Lu Y, Li C H, et al. Primary culture of mouse cerebral microvascular endothelial cell and its biological behaviour study [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2012, 28(2): 139 - 42. doi: 10.3969/j.issn.1000-5005.2012.02.012.
- [10] 刘洁晓, 蒲传强, 郝延磊. 两次过滤体外分离培养原代血脑屏障内皮细胞 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(21): 4123 - 6. doi: 10.3321/j.issn:1673-8225.2008.21.036.
- [11] Liu J X, Pu C Q, Hao Y L. *In vitro* isolation and culture of primary blood-brain barrier endothelial cells by double filtering technique [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2008, 12(21): 4123 - 6. doi: 10.3321/j.issn:1673-8225.2008.21.036.
- [12] 王鑫, 冯波, 刘晓晔, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的体外培养与鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(8): 1260 - 4. doi: 10.11843/j.issn.0366-6964.2014.08.008.
- [13] Wang X, Feng B, Liu X Y, et al. Isolation and cultivation of rat brain microvascular endothelial cells *in vitro* [J]. *Acta Vet Zootechnica Sin*, 2014, 45(8): 1260 - 4. doi: 10.11843/j.issn.0366-6964.2014.08.008.

- [9] 徐平湘, 齐 特, 陆 莉, 等. 原代大鼠脑微血管内皮细胞培养方法的改进 [J]. 首都医科大学学报, 2016, 37(5): 693 – 8. doi: 10.3969/j. issn. 1006 – 7795. 2016. 05. 026.
- [10] Xu P X, Qi T, Lu L, et al. Improvement of culture method of primary rat brain microvascular endothelial cells [J]. J Cap Med Univ, 2016, 37(5): 693 – 8. doi: 10.3969/j. issn. 1006 – 7795. 2016. 05. 026.
- [11] 李 华, 马明义, 马红艳. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养 [J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(12): 26 – 9. doi: 10.3969/j. issn. 1003 – 4706. 2012. 12. 008.
- [12] Li H, Ma M Y, Ma H Y. Primary culture of rat brain microvascular endothelial cells [J]. J Kunming Med Univ, 2012, 33(12): 26 – 9. doi: 10.3969/j. issn. 1003 – 4706. 2012. 12. 008.
- [13] 祝慧凤, 万 东, 王建伟, 等. 运用植块法培养脑微血管内皮细胞 [J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(3): 449 – 53. doi: 10.3969/j. issn. 1674 – 7666. 2007. 03. 030.
- [14] Zhu H F, Wan D, Wang J W, et al. Explant-culture method to culture rat brain microvascular endothelial cells [J]. Chin J Cell Biol, 2007, 29(3): 449 – 53. doi: 10.3969/j. issn. 1674 – 7666. 2007. 03. 030.
- [15] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 106 – 12.
- [16] Xue Q S. Principles and techniques of *in vitro* culture [M]. Beijing: Science Press, 2001: 106 – 12.
- [17] 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, 30(11): 1616 – 9. doi: 10.3969/j. issn. 1001 – 1978. 2014. 11. 027.
- [18] Zha Y F, Zhang S, Su H, et al. A highly purified and active extract and primitive culture method for rat microvascular endothelial cells (BMECs) [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(11): 1616 – 9. doi: 10.3969/j. issn. 1001 – 1978. 2014. 11. 027.
- [19] 熊永洁, 尹 波, 甘 莉, 等. 一种简易稳定的乳小鼠脑微血管内皮细胞原代培养方法 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2012, 41(6): 731 – 4. doi: 10.3870/j. issn. 1672 – 0741. 2012. 06. 020.
- [20] Xiong Y J, Yin B, Gan L, et al. A simple and steady method for primary culture of newborn mouse cerebral microvascular endothelial cells [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2012, 41(6): 731 – 4. doi: 10.3870/j. issn. 1672 – 0741. 2012. 06. 020.
- [21] Kumar T P, Vasudevan A. Isolation and culture of endothelial cells from the embryonic forebrain [J]. J Vis Exp, 2014(83): e51021. doi: 10.3791/51021.

Extraction and identification of primary rat brain microvascular endothelial cells by improved tissue block culture method

Zhang Fan¹, Li Bolin², Chi Ming³, Liu Haiqin⁴, Tang Yuanyu²

(¹Dept of Acupuncture and Moxibustion, College of Acupuncture and Moxibustion, ²Basic Theory of TCM Discipline, College of TCM, ³Department of Clinical Medicine, College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122; ⁴Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, Shanghai Changzheng Hospital Affiliated Naval Military Medical University, Shanghai 200003)

Abstract Objective To investigate the brain microvascular tissue block culture method for extracting primary rat brain microvascular endothelial cells and identify its effect. **Methods** Brain tissue from 4-week-old Sprague Dawley rats was screened, pre-digested and solidified to obtain brain microvascular segments. These segments were subsequently placed in a CO₂ incubator for primary culture. The target cells were identified by cell morphology and immunocytochemical staining for factor VIII-related antigen. **Results** After a 48-hour culture period *in vitro*, the short spindle cells crawled out from around the brain microvascular segments. After 72 hours, island-like cell clusters formed. After 96 hours the clusters fused and the cells formed a typical monolayer, cobble stone-like, and mosaic arrangement. Factor VIII-related antigen immunocytochemical staining showed that the cytoplasm of the cells appeared brown-red, indicating positive expression; DAB stained the nucleus, showing blue-dark. **Conclusion** The brain microvascular tissue block culture method can isolate and culture primary rat brain microvascular endothelial cells.

Key words brain; microvascular endothelial cells; primary culture; brain microvascular tissue block culture; factor VIII-related antigen; rat; identification

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81072714); Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2017J01545)

Corresponding author Tang Yuanyu, E-mail: 2422198977@qq.com