

人脐静脉内皮细胞体外分离培养方法改进的探索及鉴定

An Improved Method of Culturing Human Umbilical Vein Endothelial Cells and its Characterization

林少芬 周焕娇 丁运刚 梁小玲 罗 燕 唐仕波

中山大学眼科学国家重点实验室 中山大学中山眼科中心, 广州 510060

Shaofen Lin, Huanjiao Zhao, Yungang Ding, Xiaoling Liang, Yan Luo, Shibo Tang

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

目的:建立能大量分离人脐静脉内皮细胞的体外培养的简便方法,分析人脐静脉内皮细胞抗原表达的特点。

方法:采用玻璃接管连接医用三通管灌注 0.133% 胶原酶 I 法分离脐静脉内皮细胞, 培养于 10% 胎牛血清的人内皮细胞培养液(含 β -促内皮细胞生长因子和肝素钠), 培养皿用 1.5% 明胶包被, 促进内皮细胞贴壁。培养过程中观察细胞的形态特征, 同时行免疫组织化学染色检测第八因子相关抗原、CD31 表达情况, 鉴定内皮细胞来源。

结果:成功获取人脐静脉内皮细胞, 原代人脐内皮细胞 24 h 贴壁, 第 5 日细胞融合; 第八因子相关抗原和 CD31 呈广泛的阳性表达, 第八因子相关抗原阳性染色程度高于 CD31, 证实为人脐静脉内皮细胞。

结论:应用玻璃接管连接医用三通管灌注胶原酶消化法分离脐静脉内皮细胞, 利用 10% 优质胎牛血清的人内皮细胞培养基, 添加 β -促内皮细胞生长因子和肝素钠, 并用 1.5% 明胶包被培养皿, 能简单有效培养人脐静脉内皮细胞。《眼科学报》2010; 25: 99-102.

关键词:人脐静脉内皮细胞、细胞培养方法、鉴定

Purpose: To establish a simple and convenient method for the culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and study its characterization in vitro.

Methods: Human umbilical cord was isolated and digested by collagenase type I. And then, it was cultured in 1.5% geltain coated dish with 10% fetal bovine serum (FBS), heparin sodium and β -endothelial cell growth factor (β -ECGF) in human endothelial basal growth medium. HUVECs were identified by anti-human factor related antigen and CD31 immunohistochemical staining.

Results: We can successfully culture HUVECs in this way. HUVECs attached the dish in 24 hours and the confluence was seen in 5 days. HUVECs were generally positive for anti-human factor related antigen and CD31.

Conclusion: It is a fast and effective method to culture purified HUVECs successfully in which we use collagenase type I to digest HUVECs with glass tube connected to T-tube, human endothelial basal growth medium containing 10% FBS and heparin sodium and β -ECGF in 1.5% geltain coated dish. *Eye Science* 2010; 25: 99-102.

Key words: Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Culture; Identification

体外人血管内皮细胞已成为眼部新生血管等血管性疾病研究,尤其是糖尿病血管并发症机制研究的重要途径之一。目前对培养人脐静脉内皮细胞的实验方法存在差异。本实验通过改良传统的培养方法,建立了简单有效的分离培养方法,同时检测了不同内皮细胞抗原表达情况,现报告如下。

材料与方 法

一、主要试剂

包括胶原酶 (Sigma, 美国)、胎牛血清 (杭州四季青公司), 胎牛血清 (进口), DMEM/F12 培养液 (Gibco, 美国), 人内皮细胞培养液 (Gibco, 美国), 重组人 β -促内皮细胞生长因子 (R&D systems, 美国)、即用型抗人类血管内皮细胞 [第八因子相关抗原 (兔抗人)、CD31 (鼠抗人)] 抗体 (迈新, 福州), 即用型非生物素 Elivision™ Plus 免疫组化检测试剂盒 (迈新, 福州)。

二、主要器械

内皮细胞培养包内有手术方巾, 手术剪刀、弯止血钳 (大, 小各一)、两个镊子、三通管、玻璃接管、50 ml 注射器, 胶管, 松紧带或棉绳)。超净工作台购自苏净集团安泰公司, CO₂ 培养箱由 Heraeus 公司生产, 离心机购自广州飞域实验设备公司, Leica 倒置显微镜生物显微镜 BX51 由日本 Olympus 公司生产。

三、方法

用 0.02 g 型胶原酶和 0.1 g 牛血清白蛋白溶于 20 ml 磷酸盐缓冲液, 制备 0.133% 胶原酶。将青霉素-链霉素溶液 (终浓度 10 万 u/L), 肝素钠 (终浓度 10 mg/L), 内皮细胞生长因子 (β -ECGF: 7.5 U_g/L) 溶于 90 ml 内皮细胞培养液, 10 ml 优质胎牛血清中, 制成 100 ml 完全培养液。再用 1.5 g 明胶溶于 100 ml 磷酸盐缓冲液, 制成 1.5% 明胶溶液。

超净工作台内无菌条件下, 剪除新鲜脐带破损、淤血部位, 用 D-Hanks 液洗至静脉内无血迹。将脐带一端用止血钳夹紧, 另一端找到脐静脉 (脐带有 2 条较细的脐动脉, 其中稍粗的是脐静脉), 连接玻璃接管, 玻璃接管用松紧带 (或棉绳) 固定, 连上胶管, 再连接医用三通管, 接 50 ml 注射器 (图 1)。三通管有 3 个接口, 可调节开关, 用注射器灌注胶原酶溶液入脐静脉内使管腔充盈, 然后

关闭三通管。置超净工作台内室温 18 min, 消化期间可转动血管壁, 让消化酶、血管充分作用。松开止血钳, 将含有细胞的酶消化溶液收集到烧杯, 用 20% 胎牛血清 DMEM/F12 冲洗脐静脉, 并中止消化, 转移至无菌烧杯, 置入离心管, 1500 r/min 离心 7 min, 弃上清液, 加入含内皮细胞生长因子的内皮细胞培养液, 吹打均匀, 移入含 1.5% 明胶包被的一次性大培养皿中 (直径 100 mm)。置入 37℃ 培养箱内, 在 5% CO₂、接近饱和湿度的环境中培养; 每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况, 每周换液 2 次。



图 1 玻璃接管连接医用三通管灌注胶原酶法分离脐静脉内皮细胞

当原代细胞达 90% 融合时, 弃培养液, 用 D-Hanks 液洗 3 次, 培养瓶中加入适量 0.0625% 胰酶和 0.02% 依地酸二钠铺盖细胞表面, 显微镜下观察, 待细胞回缩变圆时, 弃消化液, 加入含血清 20% DMEM/F12 培养液终止消化, 吹打。细胞悬液吸至离心管, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入含内皮细胞的完全培养液吹匀, 细胞悬液按 1:3 接种新培养瓶, 加培养液, 置入 37℃ 培养箱内, 在 5% CO₂、接近饱和湿度的环境中培养。

应用倒置显微镜观察细胞的形态。利用盖玻片培养法制片, 甲醇固定, 苏木素-伊红染色, 中性树脂封片, 置光学显微镜下观察。同时行 Elivision™ plus 免疫组织化学 DAB 染色, 阳性显色为棕黄色。

结 果

培养的细胞, 24 h 可贴壁, 呈扁圆形状 (图 2)。5 d 时内皮细胞铺满培养皿, 镜下呈铺路石样外观 (图 3), 以 1:3 传代生长, 传代后细胞呈短梭形 (图 4)。苏木素-伊红染色示细胞呈多角形, 核椭圆形, 呈鲜蓝色, 轮廓清楚, 胞浆丰富呈淡红色 (图 5)。免疫组织化学染色示人脐静脉内皮细胞呈棕黄色阳性反应, 细胞核鲜蓝色 (图 6, 图 7, 图

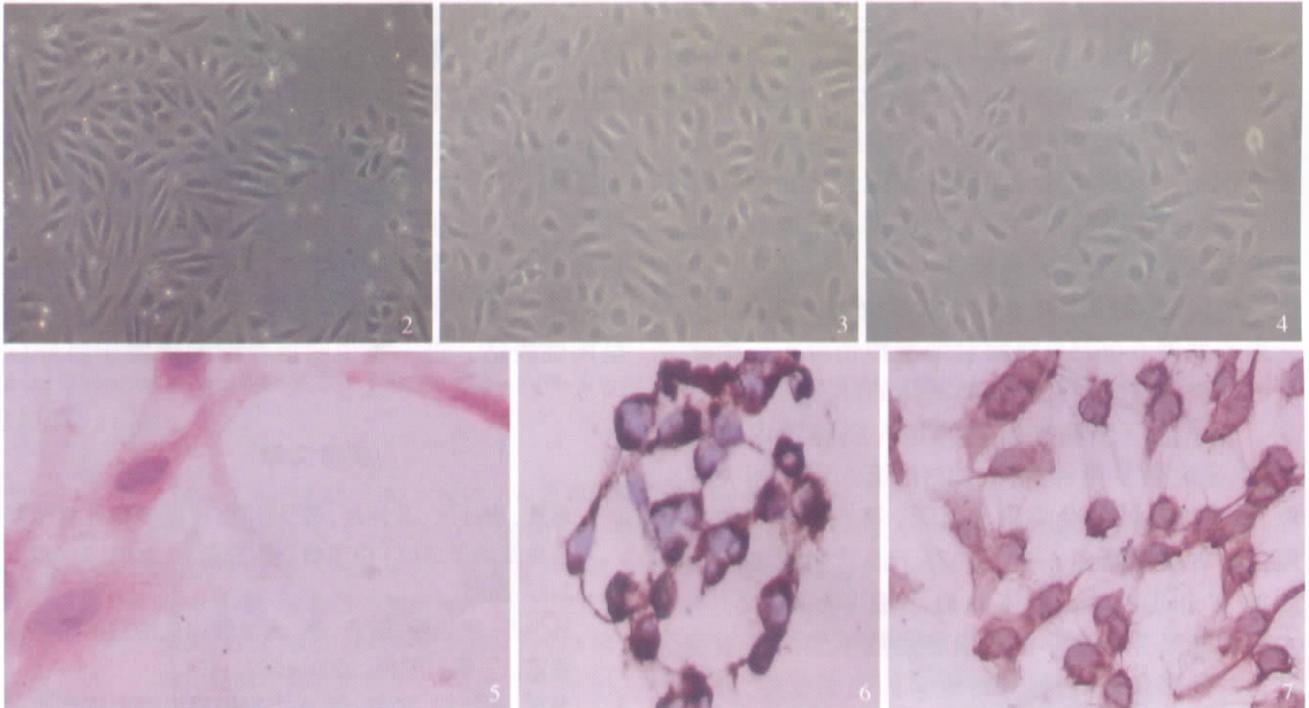


图2 原代细胞($\times 100$) 图3 融合的人脐内皮细胞($\times 100$) 图4 第1代细胞($\times 100$) 图5 人脐静脉内皮细胞(苏木素-伊红染色 $\times 400$) 图6 第八因子相关抗原阳性($\times 200$) 图7 CD31染色阳性($\times 200$)

8)。其中第八因子相关抗原和 CD31 广泛表达,且前者阳性染色程度高于后者。对照组为阴性。

讨 论

在新生血管形成的过程中血管内皮细胞起主导作用,建立血管内皮细胞的模型对进一步研究血管内皮细胞与新生血管发展机理及各种疾病和糖尿病血管并发症机制的关系有重要的意义,为相关实验提供有用的实验材料^[1-2]。脐静脉内皮细胞成为血管内皮细胞体外实验的主要材料,成功获取血管内皮细胞是体外建立内皮细胞模型的保证;虽然脐静脉内皮的培养早已获得成功,但是其原代体外培养影响因素较多,极易导致培养的失败。本研究对传统方法作了以下改进:①采用玻璃接管连接医用三通管法灌注胶原酶分离脐静脉内皮细胞,便于随时调节向脐静脉内灌注消化酶和终止液。先用烧杯来接收酶溶液和终止液,因开口大可防止污染;这样操作起来方便,省时,减少污染的机会,增加培养的成功率。②人脐内皮血管细胞是良好的血管内皮细胞的来源材料,至于体外原代培养,我们使用的人内皮细胞培养基,是一种针对于培养人血管内皮细胞的培养基,里面添加适合内皮细胞生长的物质,从我们经验的比较,培

养内皮细胞效果比 DMEM 好。在人内皮细胞培养基里加上内皮细胞生长因子,形成只有利于内皮细胞生长的选择性培养,在细胞生长过程中,其他细胞逐渐淘汰,使内皮细胞得以纯化^[3]。加入肝素可以促进内皮细胞生长因子的作用。另外还要注意的事项有:①脐带需新鲜,并尽快将细胞分离完成,有利于细胞的贴壁和生长,这样成活率高,获取的细胞多。②血管内皮细胞培养的关键是贴壁,明胶具有良好的亲和力,大大提高细胞的贴壁率,又比其他的促贴壁物质价格低,如纤维连接蛋白和多聚赖氨酸。③脐带不宜太短,太短消化获取细胞量少。文献报道脐带不少于 20 cm。但我们也取过 10 cm 的脐带,消化后置于小的培养皿里,细胞生长旺盛,说明我们的培养方法是好的。④操作前常规将培养液,胶原酶等在 CO₂ 培养箱内预热,有利于细胞的生长。⑤原代培养添加培养液量不宜太多,有利于细胞贴壁。⑥要掌握好消化时间能获得大量高纯度的内皮细胞,较好满足实验的需要,而胶原酶浓度消化时间过短或过长,获取细胞较少。

我们还尝试用薛俊丽等^[4]报道的原代细胞不更换培养基,待细胞生长稳定后(2~3 d)再更换新鲜的培养基或直接等细胞融合后将细胞传

代。但我们发现在原代培养的24 h后换液细胞生长得更好,因为这样可保持内皮细胞生长因子的浓度,能促进内皮细胞生长。培养成功的细胞进行苏木素-伊红染色和免疫组织化学染色检查时需要做细胞载玻片爬片,可滴一细胞悬液在载玻片上,0.5 h-1小时后再加液,可使细胞不因加液而游离至培养皿里,保持在玻片上。

传代时,用0.25%、0.125%、0.0625%的胰酶消化细胞发现0.0625%胰酶对细胞损伤较小,消化后的细胞状态较前两种胰酶消化的好。

为了进一步证实培养的是人脐静脉内皮细胞,本研究做了两种抗体(CD31、第八因子相关抗原)单克隆抗体的免疫组化检测。第八因子相关抗原是一种多聚蛋白,主要储存于血管内皮细胞胞质的Weibel-Palade小体和血小板 α -granules中,主要功能是介导血小板与血管内皮下膜的黏附及其自身的聚集,与血栓和纤维素的形成有关,可能与血管的新生和肿瘤的转移有关。Rorenberg等^[5]认为第八因子相关抗原是血管内皮细胞的特征性标志之一,虽然后来发现,其在体内血管的表达存在不一致性,但是以往的研究发现它在培养的脐静脉内皮可稳定表达,因此在脐静脉内皮细胞培养的研究中绝大多数研究者用该抗体来的鉴定和确定培养的成功。本研究同样发现第八因子相关抗原稳定表达于培养的脐静脉内皮细胞,且呈高

度表达,结合对细胞形态学表明本实验方法成功的培养了脐静脉内皮细胞。CD31即血小板内皮细胞黏附分子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1,PECAM-1),为分子质量130 u的跨膜糖蛋白,可表达于内皮细胞、血小板、单核细胞、中性粒细胞、T细胞,是血管形成中内皮细胞连接的重要成分,在炎症过程中它参与内皮细胞与炎症细胞粘连的反应。本研究中培养的内皮细胞CD31呈阳性表达,进一步说明培养细胞来源于脐静脉内皮。

参考文献

1. 李斌,唐仕波,马萍萍,等.利用血管模型体外模拟新生血管的形成[J].中国病理生理杂志,2005,21(12):2483-2485.
2. 林少芬,唐仕波,胡洁,等.人血管内皮细胞的培养及鉴定[J].眼科学报,2000,16(2):131.
3. 李斌,唐仕波,张革,等.人类视网膜血管内皮细胞的培养与鉴定[J].眼科研究,2005,23(1):20-22.
4. 薛俊丽,冯波.人脐静脉内皮细胞体外培养方法[J].同济大学学报,2007,28(5):110.
5. Rosenberg JB, Greengard JS, Montgomery RR. Genetic induction of a releasable pool of factor in human endothelial cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(12):2689-2695.

(收稿日期:2010-08-12;编辑:林燕薇)

(上接第88页)

8. Tsai TC, Chang HW, Kao CN, et al. Trabeculectomy with Mitomycin C versus trabeculectomy alone for juvenile primary open angle glaucoma[J]. Ophthalmologica, 2003, 217(1): 24-30.
9. Gyasi M, Amoaku W, Debrah O, et al. Outcome of trabeculectomies without adjunctive antimetabolites [J]. Ghana Med J, 2006, 40(2):39-44.
10. Noble J, Derzko-Dzulynsky L, Rabinovitch T, et al. Outcome of trabeculectomy with intraoperative mitomycin C for uveitic glaucoma[J]. Can J Ophthalmol, 2007, 42(1):89-94.
11. Eliezer RN, Kasahara N, Caixeta-Umbelino C, et al. Use of amniotic membrane in trabeculectomy for the treatment of glaucoma: a pilot study[J]. Arq Bras Oftalmol, 2006, 69(3):309-312.
12. Bansal A, Ramanathan US. Ocular decompression retinopathy after trabeculectomy with mitomycin-C for angle recession glaucoma[J]. Indian J Ophthalmol, 2009, 57(2):153-154.
13. 刘安,金威尔,张俊华,等.前房穿刺加小梁切除在青光眼滤过术中的应用[J].福建医药杂志,2001,23(4):156.
14. 黄圣松,余敏斌,刘奕志,等.晶状体后囊和玻璃体前界膜切开治疗恶性青光眼的临床研究[J].中国实用眼科杂志,2005,23(9):915-918.

(收稿日期:2010-11-11;编辑:林燕薇)