

小鼠脑微血管内皮细胞的分离培养与鉴定

宋晓彬¹, 范春娥¹, 王 焱², 张艺腾¹, 崔丛丛¹,
曾卫卫¹, 郑丽蓉¹, 蔡晓洁¹, 陈华群¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

(2. 南京沐赛生物技术有限公司, 江苏 南京 210061)

[摘要] 脑微血管内皮细胞(Brain microvascular endothelial cell, BMVEC)是构成血脑屏障(Brain-blood barrier, BBB)的基本组分,多种神经疾病都与 BBB 的失功能相关,分离培养原代 BMVEC 是体外研究 BBB 功能及其调节的重要手段. 本文通过简单有效的葡聚糖密度梯度离心和酶消化方法,从小鼠脑组织分离培养出 BMVEC,并用免疫荧光染色进行了鉴定. 结果表明,内皮细胞表面特征性的标记分子 CD31 阳性细胞达到 95% 以上,同时通过 VE-Cadherin 及 ZO-1 免疫荧光染色鉴定证实,其为脑微血管内皮细胞. 本研究为体外利用 BMVEC 进行相关研究提供了良好基础.

[关键词] 脑微血管内皮细胞, 原代培养, 密度梯度离心, 酶消化

[中图分类号] Q28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2017)03-0138-06

Primary Culture and Identification of Mouse Brain Microvascular Endothelial Cell

Song Xiaobin¹, Fan Chun'e¹, Wang Ye², Zhang Yiteng¹, Cui Congcong¹,
Zeng Weiwei¹, Zheng Lirong¹, Cai Xiaojie¹, Chen Huaqun¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

(2. Nanjing Mucyte Biotechnical Com., Nanjing 210061, China)

Abstract: Brain microvascular endothelial cell (BMVEC) is an essential component of the brain blood barrier (BBB). It has been known that the dysfunction of BBB plays critical roles in the pathological process of a variety of neurological disorders. The primary cultured BMVECs were widely used in the study of the functions and the regulation mechanisms of the BBB. Here, it is reported that a simple and effective method of isolating and growing of BMVEC established upon density gradient centrifugation and enzyme digestion. The purity of the cultured cells was higher than 95% determined by CD31 immunofluorescence staining. The features of the cells were further confirmed by positive staining of VE-cadherin and ZO-1, the characteristics of BMVECs. Our method may provide a good approach for the study of BBB *in vitro*.

Key words: mouse brain microvescular endothelial cell, primary culture, density gradient centrifugation, enzyme digestion

血脑屏障(Brain blood barrier, BBB)的完整性为保护神经系统的正常运行提供了基础,脑微血管内皮细胞(Brain microvescular endothelial cell, BMVEC)是组成血脑屏障结构的基本组分^[1]. BBB 失功能对于一系列神经疾病病理过程的起始都具有重要意义,包括脑中风、多发性硬化症、Alzheimer 等^[2-6]. 目前,尚没有很好的治疗该类疾病的有效方法,而血脑屏障及内皮细胞被认为是一个很好的靶点.

在脑微血管的血管腔一侧,相邻内皮细胞之间通过紧密连结和黏着连接形成结构紧密、通透性极低的屏障,其外围包绕的周细胞、基膜和神经胶质细胞伸出的突起使这一结构更加坚固. 在生理状态下,血脑屏障阻止脑微血管与神经组织之间的物质交流,包括大分子和细胞等,以维持机体的稳态^[7]. 在脑血管相关疾病发生过程中,常常伴有炎症、缺血等症状,此时脑微血管内皮细胞和血液细胞等被激活,导致内皮通

收稿日期:2017-04-18.

基金项目:国家自然科学基金(31371356、30971540)、江苏省教育厅重大项目(13KJA180004).

通讯联系人:陈华群,教授,研究方向:细胞生物学. E-mail:chenhuaqun@njjnu.edu.cn

透性升高,血脑屏障功能遭到破坏,血液中的大分子物质和血细胞侵入神经组织,通过分泌炎症因子和细胞因子等造成神经细胞损伤^[8-9]。近期的研究发现,血脑屏障功能障碍对于相关疾病的起始具有极为重要的作用。因此,脑微血管内皮细胞生物学成为相关疾病研究的热点问题,而体外分离培养脑微血管内皮细胞成为进行相关研究的必要手段。

小鼠是与人类基因组最接近的模型生物,许多疾病模型和基因敲除模型都是利用小鼠建立的,因此其脑微血管内皮细胞的分离培养尤为重要。目前,国内外对于大鼠的脑微血管内皮细胞培养方法的报道较多,也较为成熟^[10-13]。而小鼠由于其脑组织较小,每只个体能够分离得到的细胞数量有限,因此报道的方法并不多见^[14-16]。怎样得到数量更多、纯度更高的脑微血管内皮细胞是建立该方法的关键。

本文通过简单的葡聚糖密度梯度离心和酶消化的方法,建立了有效的原代小鼠脑微血管内皮细胞培养方法,通过细胞免疫荧光染色进行了鉴定。结果表明,分离培养的脑微血管内皮细胞纯度可达到95%以上,细胞之间表达该细胞特异的紧密连结蛋白。本文为利用脑微血管内皮细胞进行血脑屏障的体外研究提供了良好基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

实验所用动物为6~8周龄C57/BL6小鼠(购自南京大学模式动物研究所,SPF级),性别不限。

1.1.2 实验试剂

DMEM培养基、0.25%胰酶-EDTA购自Gibco公司;胶原酶I购自Worthington公司;明胶、肝素钠、I型DNA酶、EGF、维他命C(Vc)、氢化可的松、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、5 mg/mL DAPI染液购自Sigma公司;bFGF购自R&D公司;胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、青链霉素、L-谷氨酰胺、羊血清购自Gibco公司;葡聚糖Dextran-70购自上海生工生物工程公司;4%多聚甲醛、Tritonx-100、Tween-20购自Biosharp公司;Rat anti-CD31 antibody购自BD公司;Rabbit anti-VE Cadherin购自Santa Cruze公司、Alexa Fluor 555 goat anti-Rat IgG、Rabbit anti-ZO-1 antibody、FITC 488 goat anti-Rabbit IgG购自Invitrogen公司。

1.1.3 试剂配制

细胞生长培养基(100 mL):用DMEM配制,含FBS 20 mL、1 mL 100×L-谷氨酰胺、5 μL 5 ng/mL EGF、0.1 mL 4 ng/mL bFGF、10 μL 1 $\mu\text{g/mL}$ Vc、0.2 mL 2 $\mu\text{g/mL}$ 氢化可的松、68 μL 1 mg/mL 肝素钠、1 mL 100×青链霉素。

15%葡聚糖溶液(Dextran-70):称取4.5 g Dextran-70,溶于30 mL无菌PBS溶液(包含1×双抗)。由于葡聚糖在PBS中溶解较慢,一般在实验刚开始最先配制。

0.1%明胶:0.1 g明胶溶解于100 mL PBS,高压灭菌,4℃保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠脑微血管内皮细胞的分离与培养

24孔细胞培养板的处理:以0.1%明胶包被,于37℃、5% CO_2 培养箱内孵育1 h~2 h。无菌PBS清洗3次,灭菌水清洗1次,晾干备用。

小鼠脑的分离:预先准备好PBS(含双抗),直径3.5 cm细胞培养皿,直径6 cm细胞培养皿,并向3.5 cm培养皿中加入2 mL DMEM,所有的手术器械均置于75%乙醇中浸泡30 min。颈脱臼处死小鼠,酒精棉球擦拭小鼠头部及全身;剪开小鼠头部皮肤,剥离颅骨,小心取出大脑,浸入含DMEM培养基的3.5 cm培养皿中,置于冰上。

脑膜的分离及去除:将完整的脑组织于无菌滤纸来回滚动至干净滤纸表面无明显的组织残留,此步骤将脑组织表面大部分脑膜及大血管去除;然后将脑组织转移至PBS(含双抗)中,在体视镜下去除小脑、脑干及残余的脑膜及白质。

脑微血管的分离纯化:将以上处理好的脑组织转移到生物安全柜中,PBS清洗3次,然后尽量控干水分,移入2 mL EP管中,用显微剪剪碎至匀浆状(至1 mL的移液枪枪头可顺利吸取)。EP管内加1 mL葡聚糖溶液继续快速剪100下,然后将剪碎的组织移到15 mL离心管,补加15%葡聚糖溶液至10 mL,颠倒

混匀3次. 室温2 000 r/min 离心15 min, 可看到离心管内液体分三层, 其中最下面一层发白或淡红色沉淀为微血管段富集部分, 中间澄清液体为葡聚糖溶液, 最上面一层为残余的脑组织. 微血管沉淀中加入2 mL DMEM, 轻轻吹打混匀暂存于4 ℃. 将上层组织块和中间的葡聚糖溶液转移到一个新的15 mL 离心管中, 补加15% 葡聚糖溶液至10 mL, 室温2 000 r/min 离心15 min, 再次收集脑微血管, 之后再重复一次. 最后将3次所收集的微血管段合并至同一15 mL 离心管内, 补加DMEM至10 mL, 室温1 000 r/min 离心3 min, 富集的脑微血管段位于离心管底.

微血管段的消化及培养: 向离心管中加入2 mL DMEM 消化液(含1% 胶原酶 I, 0.8% 胰酶, 1% DNase I), 37 ℃ 水浴1.5 h, 每隔15 min 轻轻摇动数次. 为了观察消化状态, 防止消化不够或消化过度, 至75 min 时, 吸取5 μ L 消化液观察消化情况, 待出现大部分血管段被消化成由5~10个细胞组成的团块时停止. 消化完成后加入含FBS的细胞生长培养基3 mL, 轻轻吹打混匀, 终止消化. 室温1 000 r/min 离心5 min, 弃上清液, 加入生长培养基, 轻轻吹打混匀, 移入明胶包被的24孔细胞培养板中(1只小鼠脑分离出的微血管接种1个孔), 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养. 24 h后吸弃旧培养基, 用37 ℃ 预热的无菌PBS清洗3次去除未贴壁细胞及组织碎屑, 更换新鲜培养基继续培养, 以后每2 d~3 d 更换1次新鲜培养基.

1.2.2 细胞传代

原代细胞长至80%左右可以进行细胞传代. 细胞传代步骤如下: 弃去旧培养基, PBS洗1次, 每孔加入200 μ L 0.25%的胰酶-EDTA, 约10 s后吸去大部分消化液, 37 ℃ 继续消化约1 min, 待细胞突起回缩时加入含有血清的细胞培养基终止消化, 将细胞轻轻吹打下来, 转移至新的明胶包被的24孔培养板内继续培养. 用于做免疫荧光的细胞应提前将细胞爬片铺于24孔板内, 传代细胞接种于细胞爬片之上.

1.2.3 细胞免疫荧光染色

固定: 首先将培养板内培养基弃去, PBS清洗3次, 每孔内贴壁加1 mL 4% PFA 室温固定10 min, PBS洗3次, 每次3 min.

破膜: 每孔加入1 mL 0.5% Tritonx-100, 室温孵育10 min, PBS洗3次, 每次3 min.

封闭: 5% 羊血清湿盒内室温封闭1 h.

一抗孵育: 按抗体说明书稀释一抗, 每个细胞爬片加50 μ L, 放入湿盒内4 ℃ 冰箱孵育过夜; 第二天恢复室温30 min; 含0.1% Tween-20的PBS洗3次, 每次10 min.

二抗孵育: 加入荧光二抗(DAPI同时掺入) 室温湿盒内避光孵育1 h; 避光条件下, 含0.1% Tween-20的PBS洗4次, 每次10 min.

封片: 加防淬灭封片剂封片.

拍照: 激光共聚焦显微镜(Nikon A1-TIRF) 拍照.

1.2.4 细胞计数及分析

使用image J 软件进行细胞总数计数, 辅助人工排除不清楚及多个细胞核成团的情况. CD31 阴性细胞通过Photoshop 5.0 软件进行人工计数, CD31 阳性细胞数=细胞总数-CD31 阴性细胞数. 随机选取3个视野进行计数, 实验重复3次. 数据用(Mean \pm SD) 表示, Excel 进行统计分析.

2 结果

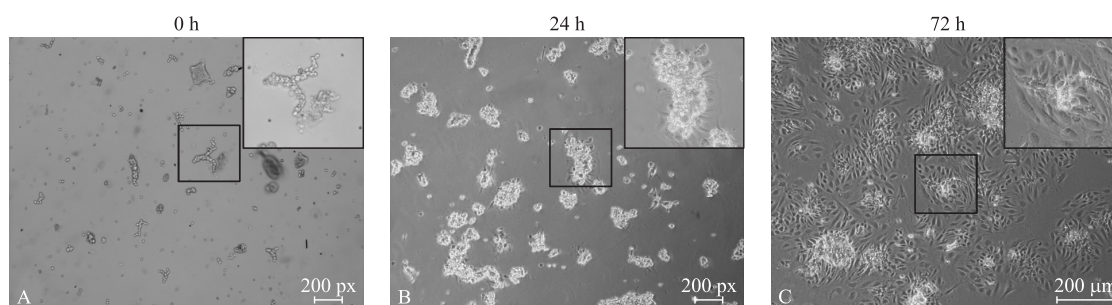
2.1 小鼠脑微血管内皮细胞的形态观察

经过密度梯度离心分离纯化及酶消化, 光镜下微血管段呈现数个细胞联在一起的串珠状结构(图1A), 培养24 h后, 洗去未贴壁细胞及组织碎片, 微血管内皮细胞开始沿着微血管段边沿向四周迁出(图1B). 48 h~72 h后细胞呈快速增殖状态, 整体呈涡旋状, 单个内皮细胞逐步呈现铺路石形态(图1C).

2.2 小鼠脑微血管内皮细胞的免疫荧光鉴定

2.2.1 CD31 的表达鉴定

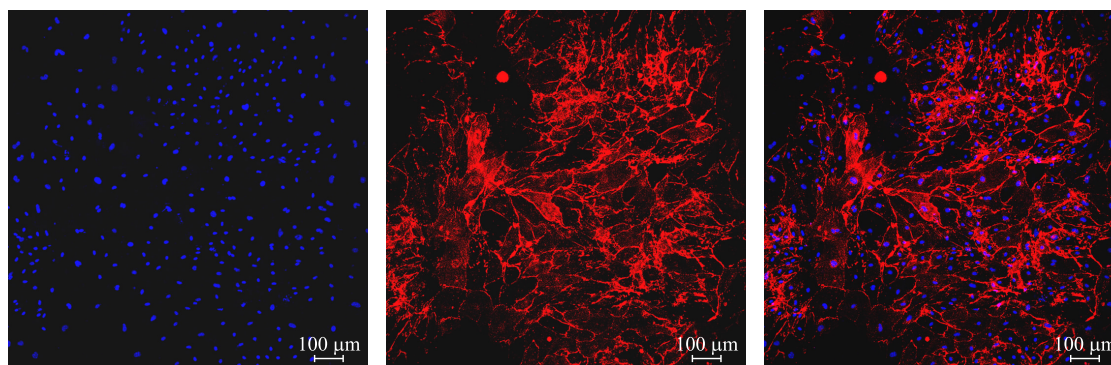
CD31 是内皮细胞特异表达的膜蛋白, 当细胞达到一定密度后, 相邻细胞靠在一起时, 可明显显示阳性信号. 将培养7 d的细胞以CD31 抗体进行免疫荧光染色(图2), 随机选取3个视野进行细胞计数, 重复3次. 结果显示, CD31 阳性细胞所占比例为(95.73 \pm 3.55)%, 表明分离得到了高纯度的内皮细胞.



A-C: 培养时间分别为 0 h、24 h、72 h. 右上角为放大的图中部分. 标尺 = 200 μm

图 1 小鼠原代培养脑微血管内皮细胞的光镜照片

Fig. 1 Morphology of the primary cultured mouse brain microvascular endothelial cells



蓝色为 DAPI 染色显示细胞核, 红色为内皮细胞特异性的 CD31 抗体免疫荧光染色. 比例尺 = 100 μm

图 2 培养 7d 的原代小鼠脑微血管内皮细胞 CD31 免疫荧光染色

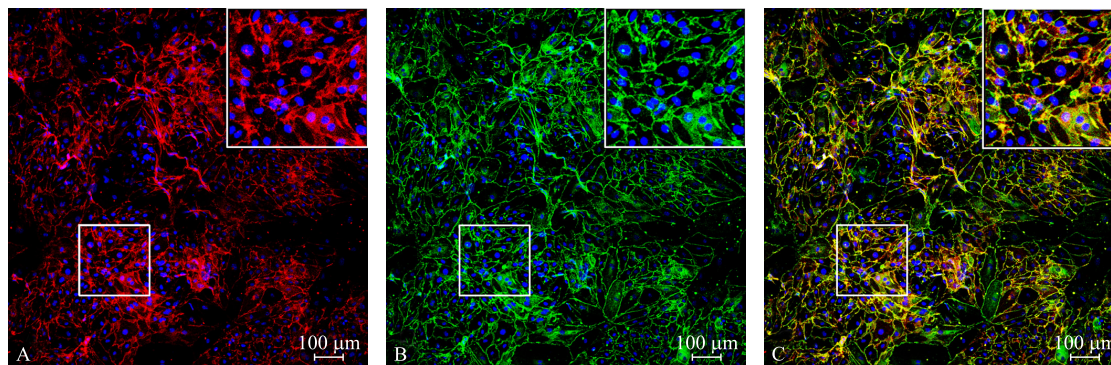
Fig. 2 Immunofluorescence staining of the primary mouse brain microvascular endothelial cells cultured for 7 d

2.2.2 ZO-1 的表达鉴定

机体多数组织器官相邻内皮细胞之间通过黏着带连接在一起, 而脑微血管内皮细胞之间除了黏着带, 还以紧密连接相连, 以形成结构更为复杂紧密的血脑屏障. ZO-1 是一种重要的紧密连接蛋白, 主要位于内皮细胞的血管腔顶端, 在血液和脑组织之间起到封闭作用. 细胞传代后 2 d, 细胞密度达到 90% 左右, 细胞逐渐融合, 紧密连接开始形成. 当细胞融合后, 用 CD31 与 ZO-1 进行共染 (图 3). 细胞显示 CD31 和 ZO-1 双阳性, 表明所分离的脑微血管内皮细胞之间形成了良好的紧密连接.

2.2.3 VE-cadherin 的表达鉴定

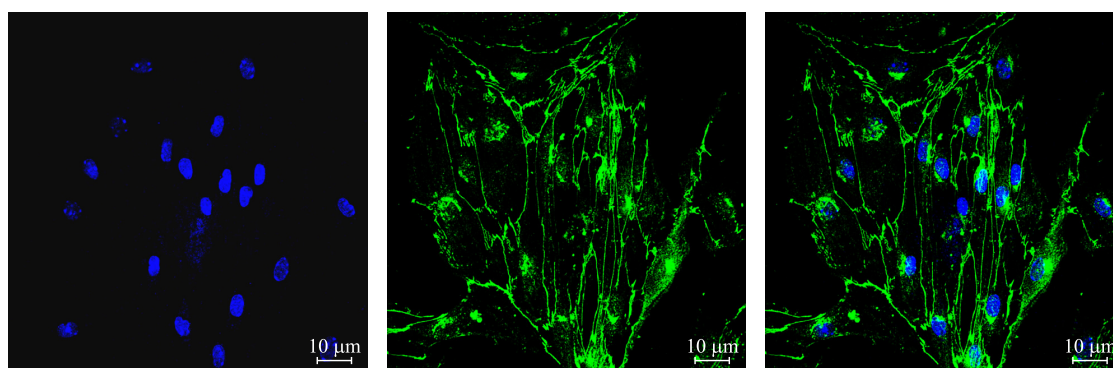
如前所述, 在脑微血管内皮细胞之间的连接除了紧密连接外, 还会形成黏着连接. 血管内皮钙黏素 VE-cadherin 是血管内皮细胞间一种主要的黏着连接蛋白. 以 VE-cadherin 对培养 7 d 的细胞进行了免疫荧光染色. 结果表明, 分离培养细胞大多数阳性表达 VE-cadherin (图 4), 说明它们之间黏着连接形成较好, 也进一步证明所分离的细胞为血管内皮细胞.



蓝色为 DAPI 显示细胞核, 红色显示内皮细胞特异性标志物 CD31, 绿色显示紧密连接蛋白 ZO-1. 比例尺 = 100 μm

图 3 小鼠脑微血管内皮细胞免疫荧光鉴定

Fig. 3 Immunofluorescence staining of primary mouse brain microvascular endothelial cells cultured for 7 d



蓝色为 DAPI 显示细胞核,绿色显示黏着连接蛋白 VE-cadherin. 比例尺 = 10 μm . DAPI(Blue)

图 4 小鼠脑微血管内皮细胞免疫荧光鉴定

Fig. 4 Immunofluorescence staining of primary mouse brain microvascular endothelial cell

3 讨论

目前国内外关于脑微血管内皮细胞分离纯化方法主要包括:筛网过滤法、密度梯度离心法、酶消化法等,多数是二种或三种方法以及二次和二次以上酶消化、密度梯度离心的组合^[10,13,15-17]. 经过反复优化,建立了快速简单的两步法,即一次密度梯度离心法和一次酶消化法. 本研究未使用多数文献使用的尼龙网过滤法^[16],这样可以很大程度避免细胞污染. 为了节省时间同时更好地保持细胞活性,选择性省去许鹏飞等^[13]和 Shinsuke Nakagawa^[12]等使用的两次酶消化的第一次消化,以直接机械剪碎代替,避免了操作的冗杂性;另一方面 percoll 密度梯度离心步骤较为繁琐,如操作不慎很大程度上影响微血管的分离效果,内皮细胞的生长状态及活性也容易受到很大的影响,这里省去了 percoll 梯度离心^[15]这一步骤. 发现,不做 percoll 密度梯度离心,对于内皮细胞的纯度没有明显影响(本文的细胞纯度在 95%以上),且细胞活性保持较好. 另外,在 15%葡聚糖离心后消化中使用 3 种酶的混合液(I 型胶原酶,胰蛋白酶, I 型 DNA 酶)消化 1.5 h 左右,效果较好,节省了时间,相比其他使用含有 2% FBS 及 30 U/mL DNase I, 0.1%胶原酶/分散酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 6 h,大大缩短了时间,从而不仅使操作更简便,且可以更好地保持细胞活性.

为了提高获取细胞数量,在实验过程中改进了葡聚糖离心纯化微血管段步骤. 进行了连续 3 次的离心,将所取得的微血管合并,大大降低了离心造成的微血管损失,获取了数目更多的微血管. 同时,在分离微血管过程中没有进行筛网过滤^[18-19],既减小了污染的可能,也避免了细胞的损失. 本课题组多次使用本文所述的小鼠原代 BMVEC 培养方法进行细胞的分离培养及相关研究,在不同个体和不同批次的小鼠分离培养过程中,均得到了足够的细胞数量,纯度也达到 95%以上,表明本方法可以常规用于实验室.

综上所述,本文建立了一种操作简单、耗时较少、得率较高、重复性好的分离纯化小鼠脑微血管内皮细胞的方法,可用于体外进行血脑屏障功能及相关研究.

[参考文献]

- [1] BALLABH P, BRAUN A, NEDERGAARD M. The blood-brain barrier; an overview: structure, regulation, and clinical implications[J]. *Neurobiology of disease*, 2004, 16(1): 1-13.
- [2] NEUWELT E A, BAUER B, FAHLKE C, et al. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology[J]. *Nature reviews neuroscience*, 2011, 12(3): 169-182.
- [3] ZOLEZZI J M, INESTROSA N C. Peroxisome proliferator-activated receptors and Alzheimer's disease: hitting the blood-brain barrier[J]. *Molecular neurobiology*, 2013, 48(3): 438-451.
- [4] SHI Y, ZHANG L, PU H, et al. Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury[J]. *Nature communications*, 2016, 7(10): 523.
- [5] MINAMINO T, MIYAUCHI H, YOSHIDA T, et al. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis role of telomere in endothelial dysfunction[J]. *Circulation*, 2003, 105(13): 1541-1544.
- [6] ZLOKOVIC B V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders[J]. *Neuron*, 2008, 57(2): 142

- 178-201.
- [7] OHTSUKI S,TERASAKI T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain;importance for cns drug discovery and development[J]. Pharmaceutical research,2007,24(9):1745-1758.
- [8] OBERMEIER B,DANEMAN R,RANSOHOFF R M. Development,maintenance and disruption of the blood-brain barrier[J]. Nat Med,2013,19(12):1584-1596.
- [9] PERSIDSKY Y,RAMIREZ S H,HAORAH J,et al. Blood-brain barrier:structural components and function under physiologic and pathologic conditions[J]. Journal of neuroimmune pharmacology,2006,1(3):223.
- [10] BETZ A L,GOLDSTEIN G W. Primary culture of capillary endothelium from rat brain[J]. *In vitro* cellular and developmental biology-plant,1981,17(4):353-362.
- [11] ABBOTT N J,HUGHES C C,REVEST P A,et al. Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture:towards an in vitro blood-brain barrier[J]. Journal of cell science,1992,103(1):23-37.
- [12] NAKAGAWA S,DELI M A,NAKAO S,et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells[J]. Cell Mol Neurobiol,2007,27(6):687-694.
- [13] 许熊飞,李润平,李泉,等. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养[J]. 中国细胞生物学学报,2005,27(1):84-88.
- [14] NAVONE S E,MARFIA G,INVERNICI G,et al. Isolation and expansion of human and mouse brain microvascular endothelial cells[J]. Nature protocols,2013,8(9):1680.
- [15] WU Z,HOFMAN F M,ZLOKOVIC B V. A simple method for isolation and characterization of mouse brain microvascular endothelial cells[J]. Journal of neuroscience methods,2003,130(1):53-63.
- [16] 林娜,王安平. 小鼠脑血管内皮细胞的分离和培养[J]. 南昌大学学报(医学版),2003,43(6):52-53.
- [17] 朱玉珍,武文,田野苹,等. 小鼠脑微血管内皮细胞的原代培养与纯化[J]. 解剖学杂志,2007,30(5):530-533.
- [18] 张畅斌,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(自然科学版),2012,28(2):139-142.
- [19] 徐剑文,王玮,康仲涵,等. 小鼠脑微血管内皮细胞的体外培养[J]. 福建医科大学学报(自然版),2000,34(3):215-217.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 137 页)

- [6] AMIOT F,FITTING C,TRACEY K J,et al. Lipopolysaccharide-induced cytokine cascade and lethality in LT alpha/TNF alpha[J]. Molecular medicine,1997,3(12):864-875.
- [7] LEE A K,SUNG S H,KIM Y C,et al. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase,TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation,C/EBP and AP-1 activation[J]. British journal of pharmacology,2003,139(1):11.
- [8] WEISCHENFELDT J,PORSE B. Bone Marrow-Derived Macrophages(BMM):isolation and applications[J]. Cold spring harbor protocols,2008(12):5 080.
- [9] RITTIRSCH D,FLIERL M A,WARD P A. Harmful molecular mechanisms in sepsis[J]. Nature reviews immunology,2008,8(10):776-787.
- [10] CHEN F,CASTRANOVA V,SHI X,et al. New insights into the role of nuclear factor- κ B,a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases[J]. Clinical chemistry,1999,45(1):7-17.
- [11] LEE J M,JOHNSON J A. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism[J]. Journal of biochemistry and molecular biology,2004,37(2):139.
- [12] ARISAWA T,TAHARA T,SHIBATA T,et al. The relationship between Helicobacter pylori infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis[J]. International journal of molecular medicine,2007,19(19):143-148.
- [13] MA Q. Multiorgan autoimmune inflammation,enhanced lymphoproliferation,and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2[J]. American journal of pathology,2006,168(6):1 960.
- [14] ZHANG L,WANG H. Targeting the NF-E2-related factor 2 pathway;a novel strategy for traumatic brain injury[J]. Molecular neurobiology,2017:1-3. doi:10.1007/S12035-017-0456-Z.

[责任编辑:黄 敏]