IKKε 基因敲除小鼠血管内皮细胞的原代培养及鉴定

戚永超[1],陈　文[1],朱一帆[1],万　辛[2],曹长春[2],陈　鑫[1*]

([1]南京医科大学附属南京第一医院心胸外科,[2]肾内科,江苏　南京　210006)

[摘　要]　**目的**:建立简单有效地获取 IκB 激酶复合物 ε(inhibitor-κB kinase ε,IKKε)基因敲除小鼠血管内皮细胞的培养方法。**方法**:在超净台中取小鼠主动脉,撕去其外膜和脂肪组织,纵行剖开血管,切成 1 mm × 1 mm 的血管块,内面朝下贴于培养皿底部,加入含内皮细胞生长辅助因子(ECGS)的 DMEM 培养液,贴壁培养;用倒置显微镜观察细胞形态并用Ⅷ因子相关抗原免疫荧光的方法进行鉴定。**结果**:72 h 后在倒置显微镜下可见内皮细胞从血管块边缘游出,12~14 d 血管内皮细胞融合成片,Ⅷ因子相关抗原免疫荧光检测呈阳性。**结论**:本方法可获取纯度高、结构和功能良好的 IKKε 基因敲除小鼠血管内皮细胞。

[关键词]　IKKε; 小鼠; 血管内皮细胞; 原代培养

[中图分类号]　Q813.1　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2012)03-329-04

Culture of vascular endothelial cells from IKKε KO mouse artery

QI Yong-chao[1],CHEN Wen[1],ZHU Yi-fan[1],WAN Xin[2],CAO Chang-chun[2],CHEN Xin[1*]

([1]Department of Cardiothoracic Surgery,[2]Department of Nephrology,Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006,China)

[**Abstract**]　**Objective**:To develop an easy and reduplicate method for the isolation and primary culture of vascular endothelial cells of IκB kinase ε(IKKε) knock-out(KO) mouse. **Method**: The aorta was obtained from IKKε KO mouse in the super-clean bench,with its adventitia and adipose tissue cleared carefully. Then the vessel was split longitudinally and cut into 1 mm × 1 mm explants. The explants were placed on culture dish with the lining endothelium side down and DMEM containing endothelial cell growth supplement (ECGS) was added into the culture dish. The morphological characteristics of the cells were observed with the inverted microscope and the cells were evidenced by immunofluorescence with marker Ⅷ factor. **Results**: Endothelial cells migrating out of the aortic intima can be seen at the edge after 72 hours,forming confluent monolayer 12~14 days later. Immunofluorescence showed the characteristic positive reaction of Ⅷ factor in the cytoplasm of the cells. **Conclusion**: High purity,solid structure and sound function IKKε KO mouse endothelial cells can be obtained from this method.

[**Key words**]　IKKε;mouse;vascular endothelial cells;primary culture

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 329-332]

血管内皮细胞是覆盖于血管内的一层上皮细胞,是血液与血管平滑肌之间的机械屏障,具有多种生理功能,参与机体的凝血、免疫、物质转运和生物活性物质的释放等生命活动,其损伤是很多疾病尤其是心血管疾病的病理基础[1]。因此,对血管内皮细胞的研究是心血管疾病研究的一个重点[2],而其关键所在就是建立简单有效的血管内皮细胞体外培养方法。由于小鼠血管细小,难以操作,所以目前血管内皮细胞培养的实验取材多局限于人脐静脉[3]、大鼠主动脉[4]等,但是随着基因改造小鼠的广泛应用, 小鼠血管内皮细胞的培养在相关研究中越来越重要[5]。经过反复实践和改良,本研究成功培养出了纯度高、结构和功能良好的 IκB 激酶复合物 ε(inhibitor-κB kinase ε,IKKε)基因敲除小鼠血管内皮细胞,为该细胞的相关研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

[基金项目]　国家自然科学基金面上项目(81070180);国家人力资源和社会保障部留学人员科技活动项目(人社厅函[2010]412 号)

*通讯作者,E-mail:stevecx@njmu.edu.cn

雄性 IKKε 基因敲除（IKKε KO 即 B6.Cg-Ikbketm1Tman/J)小鼠,清洁级,体重 18~20 g,购自美国 Jackson Laboratory 公司。

不完全 DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)(南京凯基公司)，胎牛血清、0.25%胰蛋白酶-0.2% EDTA 消化液(美国 Gibco 公司),内皮细胞生长辅助因子(ECGS,美国 Millipore 公司),兔Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体(北京博奥森公司),荧光(FITC)标记羊抗兔 IgG 抗体（北京中杉公司),Hoechst33342(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 方法

1.2.1 IKKε KO 小鼠血管内皮细胞的原代培养

将 IKKε KO 小鼠颈椎脱臼处死,置于 75%乙醇中浸泡 3 min 消毒，在超净台中取出胸主动脉并放入装有 PBS 的培养皿中,用眼科镊小心剥除胸主动脉外膜和脂肪组织,并洗净血管腔中残血,将血管移入另一装有 DMEM 培养液（含 20%胎牛血清、80 U/ml 青霉素、0.08 mg/ml 链霉素)的培养皿中,用显微剪纵行剪开血管,将剪开的血管移入另一个已用 DMEM 培养液(含 ECGS 75 μg/ml)湿润过底面的培养皿(直径 60 mm)中,用手术刀把血管切成 1 mm × 1 mm 的血管块,用显微镊使血管块内面贴于培养皿底,血管块之间的距离为 5~10 mm,放入 37℃、5% CO_2 培养箱中静置 20 min,使血管块与培养皿底部贴牢,加入 DMEM 培养液(含 ECGS 75 μg/ml) 1.2 ml,使培养液浸润每一片血管块且使其不会因培养液量过多而漂浮。继续放入培养箱中培养,完全静置 72 h 后观察细胞游出情况,去除血管块并换液。以后每 3 d 换液 1 次,直至细胞达到约 80%融合时,进行传代培养。

1.2.2 传代培养

待细胞生长至约 80%融合时，吸弃旧培养液，用 PBS 轻洗 2 次,加入预热到 37℃的 0.25%胰蛋白酶-0.2%EDTA 消化液 2 ml,消化约 30 s,在倒置相差显微镜下可观察到细胞收缩变圆，加入 4 ml DMEM 培养液终止消化，轻轻吹打使细胞悬浮,将细胞悬浮液移入离心管中，以 800 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 3 ml DMEM 培养液(含 10%胎牛血清、ECGS 75 μg/ml),轻轻吹打制成细胞悬液,按 1:3 接种于培养皿中,放入 37℃ 5%CO_2 培养箱中继续培养,24 h 后换液,去除未贴壁的细胞,以后每 3 d 换液 1 次,直至约 80%融合时可进行下一次传代。

1.2.3 血管内皮细胞的鉴定

在血管块贴壁后的 72 h 内避免进行细胞观察，以防血管块漂浮。72 h 后每隔 1~2 d 在倒置相差显微镜下观察细胞的形态。

将细胞接种于放有盖玻片的培养皿中,24 h 后待细胞贴壁时终止培养,PBS 洗 2 次,晾干,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 4 次,0.2%Triton X-100 破膜 10 min,PBS 洗 2 次,1%小牛血清封闭 30 min,吸弃封闭液并加入按 1:50 稀释的兔Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体(设置空白对照组,用 PBS 代替一抗),4℃过夜,PBS 洗 4 次,加入按 1:100 稀释的 FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体，在避光条件下室温孵育 1 h，PBS 洗 4 次，用 10 μg/ml Hoechst33342 染核 10 s，PBS 洗 3 次,80%的甘油封片并在正置荧光显微镜下观察。

2 结 果

2.1 IKKε KO 小鼠血管内皮细胞的形态学观察

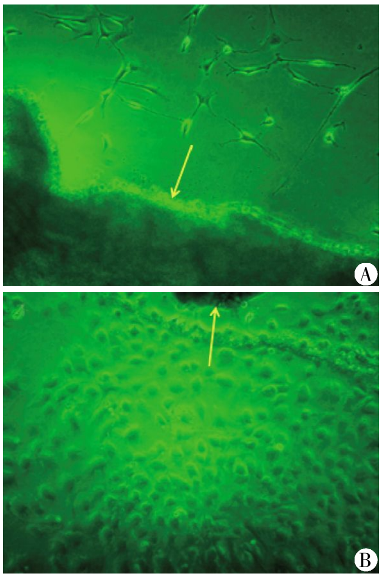
在血管块贴壁 72 h 后,在倒置相差显微镜下可以观察到少量细胞从血管块边缘游出,呈梭形、三角形或多边形,边界清晰,胞质饱满(图 1A);12~14 d 细胞融合成片,形态呈铺路石样改变(图 1B)。传代培养的细胞约 7 d 可以融合成片。第 2~4 代细胞形态与原代细胞相似,相对较饱满(图 2A);从第 5 代细胞起,细胞形态相对较差,较干瘪(图 2B)。

2.2 Ⅷ因子相关抗原免疫荧光鉴定

对原代和传代培养的细胞进行Ⅷ因子相关抗原免疫荧光鉴定,在正置荧光显微镜下,可见培养的细胞表达出明亮的绿色荧光信号，证实为主动脉内皮细胞[6],而空白对照组未见特殊荧光信号(图 3)。随机计数 10^3 个细胞,内皮细胞阳性细胞率> 99%。

3 讨 论

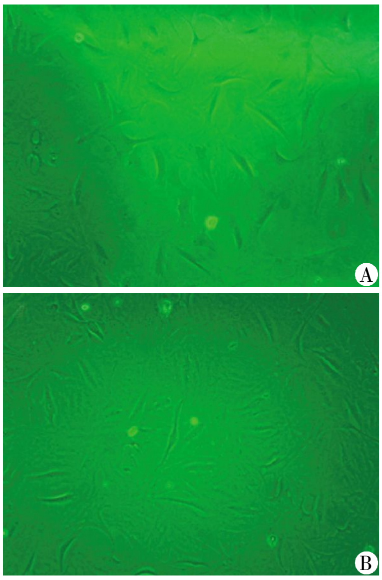
血管内皮细胞的研究是心血管疾病研究的一个重点[7],而基因敲除小鼠的成功应用使得对疾病的研究达到了一个新的平台[8]。因此,如何简单有效地获取纯度高、结构和功能良好的基因敲除小鼠的血管内皮细胞是如今心血管疾病研究的一个突破点。血管内皮细胞原代培养的常用方法有酶消化法[9]、机械刮取法和组织块贴壁法等。酶消化法和机械刮取法主要适用于大血管内皮细胞的培养,而小鼠主动脉细小,难以操作,很难避免消化液和刮取对内皮的损伤,且易造成其他细胞的污染,故小鼠主动脉血管内皮细胞的原代培养多采用组织块贴壁法[10]。在反复的实践和不断的改进中,本研究成功地培养出 IKKε 基因敲除小鼠主动脉血管内皮细胞，且有



A:72 h 后从血管块边缘游出的少量血管内皮细胞;B:12~14 d 后细胞融合成片,形态成“铺路石样”改变。箭头所指为血管块边缘。

图 1　小鼠血管内皮原代细胞(× 100)

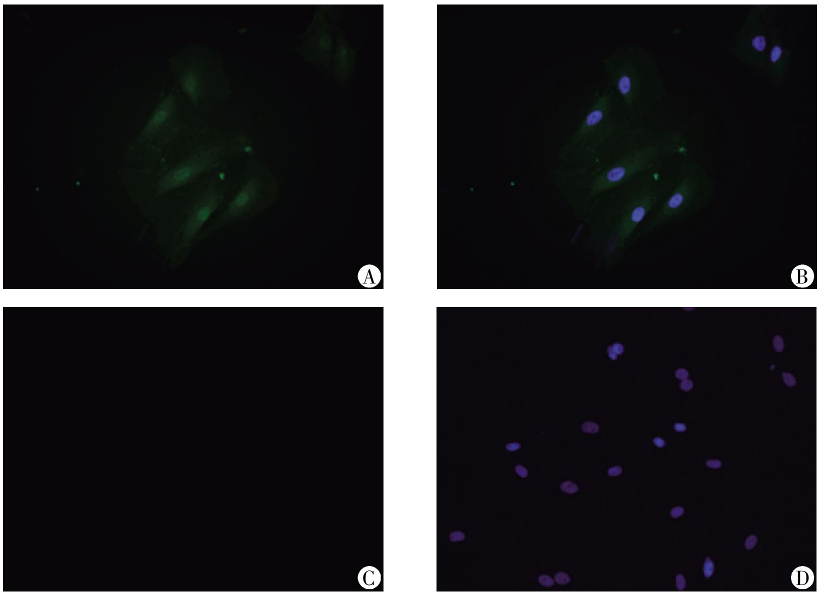
Figure 1　Primary vascular endothelial cell(× 100)



A:第 2 代血管内皮细胞,形态与原代相似,较饱满;B:第 5 代血管内皮细胞,形态相对较差,较干瘪。

图 2　小鼠血管内皮传代细胞(× 100)

Figure 2　Passaged vascular endothelial cells(× 100)



A:Ⅷ因子免疫荧光,可见内皮细胞浆中呈现出绿色的特异性荧光;B:Ⅷ因子免疫荧光与细胞核叠加之后可见视野中绝大多数细胞为内皮细胞;C:空白对照组的免疫荧光,可见内皮细胞浆中没有呈现出特异的绿色荧光;D:空白对照组与细胞核叠加之后可见细胞浆中绿色荧光均为阴性。

图 3　免疫荧光鉴定血管内皮细胞(× 400)

Figure 3　Immunofluorescence staining of vascular endothelial cells(× 400)

以下几点体会:①鼠龄的选择:选用体质量 18~20 g 的青壮年小鼠的主动脉,因其细胞的增殖能力相对比较旺盛,血管内皮细胞的游出能力强。②培养皿的处理:在接种血管块之前,先用含有 ECGS 的 DMEM 培养液湿润培养皿的底面,减轻在加入培养液之前血管块干贴壁的损伤。③ECGS 的使用:研究中发现 ECGS 的合理应用对血管内皮细胞的生长促进作用非常明显,常规用量 30~75 μg/ml。④内皮的保护:操作熟练,减少对血管的撕扯,从处死小鼠到血管块贴壁在 20 min 内完成,以免影响内皮细胞活性。⑤接种的密度:组织块尽可能小,约 1 mm × 1 mm 为宜,边缘整齐,组织块之间的距离 5~10 mm。⑥首次加液量:组织块贴壁法成功的关键是血管块不能漂浮,所以首次加液量以刚刚浸润血管块为宜,

且加液时在培养皿中没有血管块的地方轻轻加入。⑦72 h 内完全静置：最初的 72 h 避免移动培养皿，以免造成组织块漂浮，影响细胞生长。⑧血管块去除时间：去除过早会造成细胞游出量少和刚游出的细胞损伤；去除太迟易引起成纤维细胞和平滑肌细胞的污染；一般在第 5 天把血管块移除，此时细胞游出量明显增多，且几乎没有其他细胞污染。⑨传代的注意事项：胰蛋白酶预热到 37℃，消化时间约 30 s，时间过长会造成细胞的严重损害，造成传代细胞死亡数的增多；离心以 800 r/min，5 min 为宜，这样可以在传代过程中对内皮细胞的损伤减到最小；传代细胞的形态不如原代饱满，传 5 代以后，细胞形态明显变差，生长缓慢，坏死脱落的细胞明显增多，难以继续传代。因此，对内皮细胞的研究运用以第 3~4 代最佳。

随着基因敲除技术的日趋成熟，基因敲除动物的原代细胞培养技术越来越受到研究人员的重视[11]，而我国在关于基因敲除小鼠血管内皮细胞培养方面的文献仍是空白，即使是野生型小鼠血管内皮细胞培养技术也很不成熟。本文采用组织块贴壁法，并加以改进，在细节方面不断优化，成功培养出了 IKKε 基因敲除小鼠主动脉血管内皮细胞，建立了简单、有效、经济的基因敲除小鼠主动脉血管内皮细胞的原代培养技术，为深入研究基因敲除小鼠主动脉血管内皮细胞在疾病过程中的病理生理作用奠定了方法学基础。

[参考文献]

[1] Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, et al. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I [J]. Circulation, 2003, 108(16): 1917-1923

[2] Voghel G, Thorin-Trescases N, Mamarbachi AM, et al. Endogenous oxidative stress prevents telomerase-dependent immortalization of human endothelial cells [J]. Mech Ageing Dev, 2010, 131(5): 354-363

[3] Xiao G, Wang Z, Zeng H, et al. Ibrolipim attenuates high glucose-induced endothelial dysfunction in cultured human umbilical vein endothelial cells via PI3K/Akt pathway [J]. Pharmazie, 2011, 66(10): 798-803

[4] Pan LL, Dai M. Paeonol from Paeonia suffruticosa prevents TNF-alpha-induced monocytic cell adhesion to rat aortic endothelial cells by suppression of VCAM-1 expression [J]. Phytomedicine, 2009, 16(11): 1027-1032

[5] Benn CL, Butler R, Mariner L, et al. Genetic knock-down of HDAC7 does not ameliorate disease pathogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease [J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5747

[6] Ulger H, Karabulut AK, Pratten MK. Labelling of rat endothelial cells with antibodies to vWF, RECA-1, PECAM-1, ICAM-1, OX-43 and ZO-1 [J]. Anat Histol Embryol, 2002, 31(1): 31-35

[7] Lidington EA, Rao RM, Marelli-Berg FM, et al. Conditional immortalization of growth factor-responsive cardiac endothelial cells from H-2K (b)-tsA58 mice [J]. Am J Physiol Cell Physio, 2002, 282(1): C67-74

[8] Chiang SH, Bazuine M, Lumeng CN, et al. The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice [J]. Cell, 2009, 138(5): 961-975

[9] Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, et al. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells [J]. J Atheroscler Thromb, 2005, 12(3): 138-142

[10] Chen SF, Fei X, Li SH. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries [J]. Microvasc Res, 1995, 50(1): 119-128

[11] Lee S, Huen S, Nishio H, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(2): 317-326

[收稿日期] 2011-12-16