

人主动脉内皮细胞体外培养方法的建立及生物学活性鉴定

何珂帅¹, 章 辉², 张俊杰¹, 吴 亚³, 武晓泓^{3*}, 邵永丰^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科, ²公共平台实验室, ³内分泌科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:建立体外人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs)提取和培养的方法。方法:从术中取下的人主动脉组织上剥离内皮层, I型胶原酶消化分离HAECs,利用显微镜观察其生长状况,免疫组织化学方法及流式细胞法鉴定及检测细胞纯度,以氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)检测细胞吞噬功能并检测细胞在体外的血管生成能力。结果:0.1%及0.2%的I型胶原酶,最佳消化时间均为50 min, 2 h贴壁细胞数分别为 $(25.2 \pm 2.1) \times 10^3$, $(40.5 \pm 3.8) \times 10^3$ 个。细胞融合后在倒置显微镜下呈“鹅卵石”样排列生长。血小板-内皮黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)及Ⅷ因子鉴定为阳性,细胞纯度达 $(96.43 \pm 4.12)\%$ 。细胞内吞ox-LDL及血管生成能力较好。结论:钝性分离主动脉内皮层,辅以I型胶原酶消化是一种较好的HAECs获取方法,酶浓度及消化时间是其重要的影响因素。

[关键词] 人主动脉内皮细胞;免疫组织化学;细胞分离;细胞培养;流式细胞术

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)06-734-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180604

Establishment of human aortic endothelial cell culture *in vitro* and identification of biological activity

He Keshuai¹, Zhang Hui², Zhang Junjie¹, Wu Ya³, Wu Xiaohong^{3*}, Shao Yongfeng^{1*}

¹Department of Cardiovascular Surgery, ²Public Experiment Platform, ³Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To Establish the methods of extracting and cultivate human aortic endothelial cells (HAECs) *in vitro*. **Methods:** Stripping endodermis from human aorta, using collagenase I to digest endothelial cells from endodermis, and then utilizing immunohistochemistry and flow cytometry (FCM) to detect purity of HAECs. **Results:** 0.1% and 0.2% collagenase type I, the best digestion time was 50 min, the adherent cells number in 2 h were $(25.2 \pm 2.1) \times 10^3$, $(40.5 \pm 3.8) \times 10^3$. After cell fusion, cells were cobblestone-like growth in inverted microscope. Cells were identified by CD31 and Ⅷ factors as positive, the cell purity reached $(96.43 \pm 4.12)\%$. The ability of endocytosis of ox-LDL and angiogenesis were normal. **Conclusion:** The method that blunt dissection of the aortic endothelium and simply use type I collagenase digestion was better to separate HAECs. Enzyme concentration and digestion time are important factors. The method is simple and convenient, shortening the training cycle and obtaining high purity cells. It is beneficial to the endothelial cells experiment *in vitro*.

[Key words] human aortic endothelial cells; immunohistochemistry; cell separation; cell culture; flow cytometry

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06): 734-738]

心血管疾病是一种严重威胁人类,特别是50岁以上中老年人健康的常见病,具有高患病率、高致残率和高病死率的特点,即使应用目前最先进、完善的治疗手段,全世界每年死于心血管疾病的人数

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20151590)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: shaoyongfeng2010@aliyun.com; drxhww@njmu.edu.cn

仍高达1 500万,居各种死因首位。而血管内皮又是心血管的核心组成,因此,研究血管内皮细胞具有重要意义。血管内皮细胞是指衬于心、血管、淋巴管内的单层扁平上皮细胞。内皮细胞沿着整个循环系统分布,从心脏到最微小的血管。内皮细胞具有多种生理功能,分泌多种生物活性物质,参与血管功能调节^[1-3]。体外血管内皮细胞的培养是研

究内皮细胞功能及其在血管病变发生发展中所起作用的基础^[4]。目前实验室研究常使用人脐静脉内皮细胞,鲜有使用人主动脉内皮细胞,但是脐静脉内皮细胞具有干细胞潜能^[5-6],因此易分化,而人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs)相对稳定,实验结果可靠性强;另外,静脉内皮细胞的特性与动脉内皮细胞不完全一致,以脐静脉内皮细胞代替动脉内皮细胞进行实验会产生偏差。本实验在体外成功进行了人主动脉内皮细胞的原代分离与培养,为后期血管病变研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

标本来自于南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科主动脉手术中所取下的废弃主动脉组织,本研究通过了本院伦理委员会审查(伦理号2016-SR-144)。冰冻0.9%生理盐水中保存转运,取材后1 h内对HAECs进行分离培养。

内皮细胞培养基(endothelial cell culture medium, ECM)、胎牛血清(ScienCell公司,美国),内皮细胞生长添加物(endothelial cell growth additives, EC-GS, ScienCell公司,美国), I 型胶原酶(Sigma公司,美国), 0.25%胰酶(Gibco公司,美国), PBS (HyClone, 美国), 鼠抗人Ⅷ因子抗体(Santa Cruz公司, 美国), FITC-抗人CD31抗体(Abcam公司, 美国)。倒置显微镜(Nikon公司, 日本),超净工作台(苏州 Airtech公司),体积分数5%的CO₂培养箱、离心机(Thermo公司, 美国),流式细胞仪(Beckman公司, 美国), 70 μm细胞筛(Falcon公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 HAECs分离与培养

取主动脉手术患者的主动脉1 cm×1 cm,于超净台中剔除血管周围血块等,0.9%生理盐水冲洗3遍,尽量洗去血管表面血细胞。取消毒灭菌的眼科剪、眼科镊,于培养皿中用眼科镊沿血管内面边缘轻轻剥离血管内皮,沿血管方向逐渐刮下血管内皮,置于0.9%生理盐水中再次冲洗2~3遍,彻底洗去血细胞。于0.9%生理盐水中剪碎后,移至15 mL离心管中,上机离心(900 r/min, 3 min);弃上清,0.1%或0.2% I 型胶原酶重悬内皮,移至培养皿中于5% CO₂、37℃细胞培养箱中,消化20~60 min,细胞筛过滤,取下层液体离心(1 200 r/min, 5 min),弃上清,下层沉淀即为内皮细胞,ECM培养基重悬沉淀,移至25 T培养瓶中,置于5% CO₂、37℃细胞培养箱中培

养。24 h后换液,此后每1~2 d换液1次,大约3~5 d内皮细胞融合至90%。

1.2.2 HAECs传代

当HAECs融合至90%后,弃培养基,无菌PBS清洗2~3次,0.25%胰酶室温消化2 min,镜下见大量内皮细胞皱缩变圆,完全培养基(含5%牛血清)终止消化,离心(1 200 r/min; 5 min),弃上清,ECM培养基(含5%牛血清)重悬细胞,分装至25 T培养瓶中再次置于5% CO₂、37℃细胞培养箱中培养。

1.2.3 HAECs鉴定

1.2.3.1 HAECs形态学鉴定

用倒置显微镜每12~24 h镜下观察细胞形态。

1.2.3.2 细胞活性检测

第5代HAECs, 3×10³个细胞接种于96孔板,5% CO₂、37℃细胞培养箱中培养2 h,以商品化HAECs作对照,加入细胞增殖和细胞毒性分析试剂盒-8 (cell proliferation and cytotoxicity assay Kit-8, CCK8)后测光密度(optical density, OD),并以此为基线,之后每24 h检测OD值,并绘制两组数据折线图。

1.2.3.3 CD31⁺及Ⅷ因子相关抗原检测

原代内皮细胞贴壁后弃培养基, PBS清洗, 4%多聚甲醛固定10 min, PBS洗涤, 1% BSA 孵育1 h, CD31⁺抗体(1:100稀释)和Ⅷ因子抗体(1:50稀释)4℃孵育过夜, PBS洗涤3遍,分别予以FITC标记以及594标记二抗,室温孵育1 h后, DAPI染核、封片。

1.2.3.4 流式细胞术检测

80%~90%融合的HAECs, 0.25%胰蛋白酶消化后,离心(1 200 r/min, 5 min)弃上清。PBS重悬细胞,清洗3遍后离心(1 200 r/min, 5 min)弃上清, 4%多聚甲醛室温10 min固定细胞, 1% BSA 孵育1 h。重悬细胞, CD31⁺抗体(1:200稀释)室温孵育2 h, PBS清洗后再予以FITC(1:1 000稀释)标记的二抗室温孵育30 min,流式细胞仪检测。

1.2.3.5 内吞红色荧光标记的氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)检测

细胞贴壁后,加入红色荧光染料DiI标记的人源性ox-LDL,置于5% CO₂、37℃细胞培养箱中培养3 h,荧光显微镜观察HAEC吞噬ox-LDL功能。

1.2.3.6 血管生成能力检测

Ibidi 15 μ-Slide Angiogenesis 玻璃板, 10 μL孔基质胶铺板, 37℃细胞培养箱中待基质胶成固态后,每孔加5×10³个HAEC, 5% CO₂、37℃细胞培养箱中培养6 h后拍照。

1.3 统计学方法

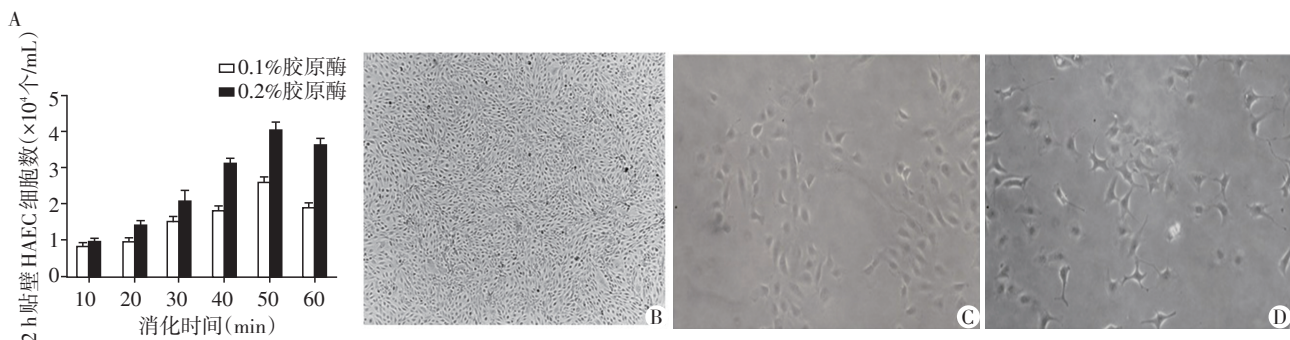
采用Stata 11.0统计软件对数据进行分析,定量数据均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组数据之间采用独立样本 t 检验进行比较。所有直方图都采用GraphPad Prism 4.0软件绘制。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HAECs 形态

原代 HACEs 培养 2 h 后,内皮细胞开始贴壁生

长,此时对贴壁细胞予以计数并绘制直方图(图1A),根据统计可知,予以 I 型胶原酶消化 50 min 可得贴壁细胞数量最多,在任意时间点 0.2% 的胶原酶较 0.1% 胶原酶消化所得贴壁细胞数量多。第 5 天可见贴壁细胞呈梭形,单层,细胞核呈圆形或椭圆形,融合成片后细胞呈“鹅卵石”状排列生长(图1B)。当传代至第 5 代时,细胞形态无明显改变,细胞活性高(图1C);至第 9 代时可见,细胞开始变形,细胞拉长,变成长梭形,细胞伸出触脚,细胞趋于异



A: 分别使用浓度为 0.1% 和 0.2% 的 I 型胶原酶消化,不同消化时间获取不等数量的贴壁细胞;B: 原代细胞培养 5 天融合后在倒置显微镜($\times 200$)下呈“鹅卵石样”排列生长;C: HAECs 培养至第 5 代时在倒置显微镜下观察($\times 400$);D: HAECs 培养至第 9 代时在倒置显微镜下观察($\times 400$)。

图1 原代HAECs数量及形态

Figure 1 The number and morphology of primary HAECs

形分化(图1D)。

2.2 细胞活性检测

细胞生长曲线是测定细胞绝对生长数的常用方法,也是判定细胞活力的重要指标,是培养细胞生物学特性的基本参数之一。根据每天测得的吸光度值绘制生长曲线,第 5 代 HAECs 7 d 的吸光度值与商品化 HAECs 之间差异无统计学意义($P > 0.05$),即表明两组细胞间生长曲线基本一致,两组细胞生长之间差异无明显统计学意义(图2)。

2.3 CD31 和 VIII 因子抗原鉴定

荧光显微镜下细胞呈圆形、梭形或多边形,细

胞核呈圆形或类圆形,可见 CD31 阳性着色位于细胞膜上,Ⅷ因子广泛分布于细胞内,分别呈绿色与红色,核质界限清晰,可清楚反映被蓝色荧光标记的细胞核形态(图3)。CD31 是人内皮细胞特异性的一种细胞膜上的蛋白质,而Ⅷ因子广泛分布于内皮细胞内,两者在荧光显微镜下呈阳性,即可鉴定提取的是内皮细胞。

2.4 流式细胞术鉴定

CD31 抗原是内皮细胞特异性表达的一种蛋白,HAEC 与 CD31 抗体共孵育后,根据所有细胞中 CD31 表达的比例可知所分离的内皮细胞纯度。流式细胞术结果显示,(96.43 ± 4.12)% 的细胞表面抗原 CD31 表达阳性,表明所分离培养的 HAECs 纯度高达(96.43 ± 4.12)%($n=5$,图4)。

2.5 红色荧光标记的氧化低密度脂蛋白内吞试验

内皮细胞是一些有共同特点的吞噬细胞的总称,他们吞噬异物、细菌、坏死和衰老的组织,而血管内皮细胞也会特异性吞噬氧化低密度脂蛋白,予以 DiI 标记 oxLDL 与 HAEC 共孵育后,根据红色荧光的显示程度,可以判断 HAECs 所占比例以及细胞吞噬功能状况。本实验中,DiI-oxLDL 与 HAEC 共孵育 3 h 后荧光显微镜下可见胞浆内散在分布大量红色

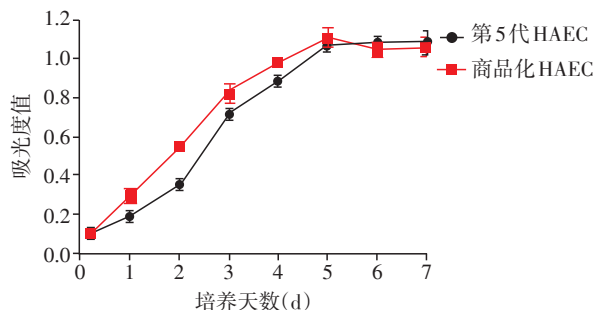
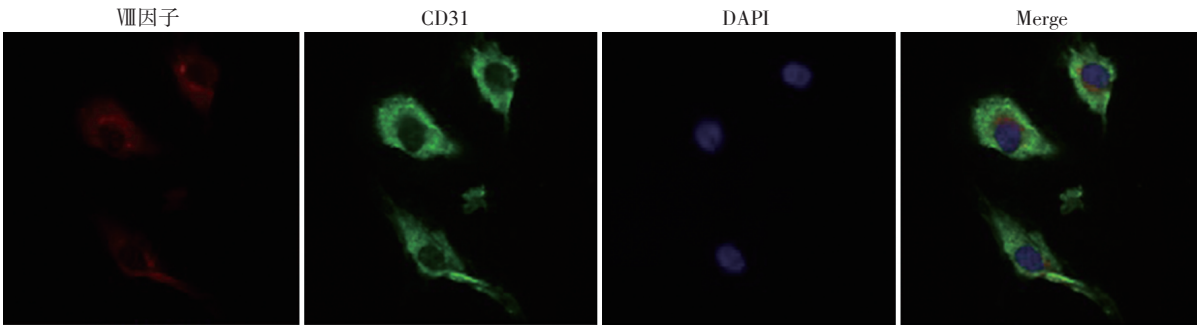


图2 原代HAECs和商品化HAECs细胞生长能力

Figure 2 Ccell growth ability of the primary HAECs and the commercial HAECs



荧光显微镜下显示,胞膜特征性表达绿色荧光标记的CD31以及细胞内广泛分布红色荧光标记的Ⅷ因子。

图3 细胞特征性表达CD31和Ⅷ因子(×400)

Figure 3 The cells characteristically express CD31 and VIII factors(×400)

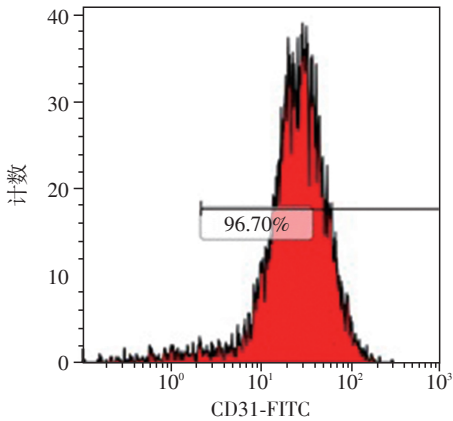


图4 流式细胞术检测内皮细胞浓度

Figure 4 Flow cytometry detected the endothelial cell concentration

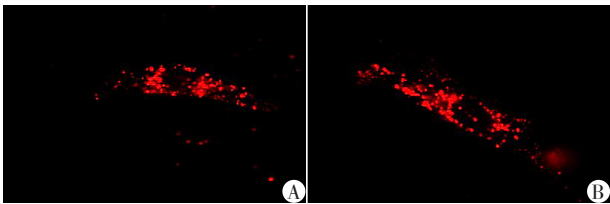
颗粒状物,此为被内皮细胞吞噬的被红色荧光标记的氧化低密度脂蛋白,显示HAEC吞噬ox-LDL功能正常(图5)。

2.6 血管生成能力检测

血管内皮细胞在体外有一定血管形成能力,将原代HAEC铺于Ibidi 15 μ-Slide Angiogenesis玻璃板中培养6 h后,在倒置显微镜下可见细胞呈环状排列,形成类似血管管腔样结构,并向外延伸生长。与商品化HEACs细胞系的成环数量、成环面积及形成血管周长比较无明显差异,表明原代细胞具有很强的血管生成能力(图6)。

3 讨论

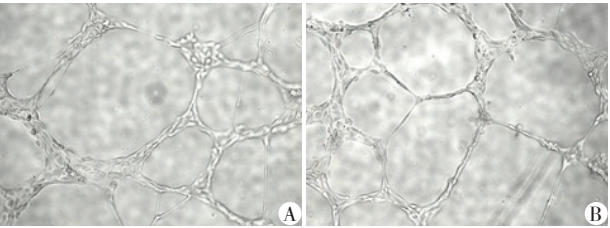
自从1973年Jaffe等^[7]报道了内皮细胞体外培养的方法后,国内外大批学者对内皮细胞的体外培养方法进行了改进和创新,包括人脐静脉内皮细胞、鼠主动脉内皮细胞等^[8-9],但是鲜有涉及人主动脉内皮细胞的体外培养方法。一方面取材相对困难,另一方面,多种因素导致内皮细胞稳定性欠佳,



本实验提取的细胞内吞氧化低密度脂蛋白能力强。荧光显微镜下显示,细胞内密布红色荧光标记的ox-LDL。A:HAEC细胞内吞氧化低密度脂蛋白;B:5代HAEC内吞氧化低密度脂蛋白。

图5 两组细胞间内吞氧化低密度脂蛋白能力无明显差异(×400)

Figure 5 There was no significant difference in the ability of endocytosis to oxidize low-density lipoprotein between two groups of cells(×400)



本实验提取的细胞血管生成能力强。A:HAEC细胞系血管生成;B:5代HAEC血管生成。细胞规则排列,形成类似管腔样内皮细胞环,成环数量,成环大小及成环形态均无明显差异。

图6 两组细胞间血管生成能力无明显差异(×100)
Figure 6 There was no significant difference in angiogenic capacity between the two groups of cells (×100)

传代次数有限。另外,国外公司虽有HAECs出售,但其出售细胞为西方人群所获得,其特性与东方人群的HAECs不完全一致;其次,其出售的细胞仅限非疾病状态下的HAECs,很多疾病状态下的HAECs无法获取。本研究通过对以前内皮细胞培养方法的改进和创新,以钝性分离内皮层辅以I型胶原酶消化的方法获得了较高纯度的HAECs,为后期疾病状态下HAECs的研究奠定了基础。

目前,血管细胞的原代分离主要以贴壁法居多^[10],然而贴壁法获取细胞周期需要5~7 d,培养周期长,而本实验以钝性分离内皮层辅以I型胶原酶消化的方法获取相同的原代细胞仅需3~5 d,大大缩短了培养周期;另一方面,贴壁法分离原代细胞后,细胞纯度较低,影响后期实验结果,本实验钝性分离血管内皮层后获取的细胞纯度达(96.43 ± 4.12)%,细胞纯度高,后期实验结果可信度高。

本实验注意事项:①标本获取后即刻置入无菌冰冻0.9%生理盐水保存转运,短时间内完成对HAECs的处理,有利于保护内皮细胞的活性,提高人主动脉内皮细胞的获取率;②在钝性分离血管内皮时,尽量剥取内皮层,减少其余组织粘附,减少其他细胞混杂;血管内皮反复多次0.9%生理盐水冲洗,减少血细胞混杂;③胶原酶能特异性降解细胞外胶原蛋白,使胶原蛋白和纤维黏连蛋白的网状结构解离,而不损坏细胞表面结构的完整性,而胰酶则在特定位置上降解蛋白,使细胞间结合处蛋白降解,对细胞膜具有一定损伤。单纯采用0.1%胶原酶消化效率低,采用0.2% I型胶原酶消化,相对较温和,避免了0.25%胰酶对细胞膜的损伤;④消化时间控制在50 min左右,时间低于30 min,细胞数量少,通常贴壁细胞不足2×10⁴个;时间长于60 min,细胞活性差,贴壁细胞数量较消化50 min减少;I型胶原酶消化50 min时可获得贴壁细胞数量最多,此时细胞活性亦相对较高,且与酶浓度无关;⑤本实验在HAECs传代至第8代时镜下见内皮细胞形态开始改变,采用细胞传代至8代前研究,可保证细胞活性及实验结果的可靠性。

本实验获取了高纯度的原代HAECs,镜下见细胞呈梭形,细胞核呈圆形或椭圆形,细胞融合成片后呈“鹅卵石”样排列,免疫组织化学染色显示细胞膜高表达CD31和特异性表达Ⅷ因子;流式细胞术检测细胞表面抗原CD31表达阳性高达(96.43 ± 4.12)%(n=5),且与国外商品化细胞系相比较,在血管生成等能力方面无明显差异。本实验技术为后

期人主动脉内皮细胞的体外培养实验提供了条件。

[参考文献]

- [1] Fang F, Wasserman SM, Torres-Vazquez J, et al. The role of Hath6, a newly identified shear-stress-responsive transcription factor, in endothelial cell differentiation and function[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 7):1428-1440
- [2] Cattaneo MG, Vanetti C, Decimo I, et al. Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):9612
- [3] Salvador E, Shityakov S, Forster C. Glucocorticoids and endothelial cell barrier function [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(3):597-605
- [4] Xu JY, Chang NB, Li T, et al. Endothelial cells inhibit the angiotensin II induced phenotypic modulation of rat vascular adventitial fibroblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(7):1921-1927
- [5] Antonova LV, Matveeva VG, Chernova MN, et al. Proliferative and secretory activity of human umbilical vein endothelial cells cultured under varying degrees of hypoxia [J]. *Tsitologiya*, 2014, 56(1):67-76
- [6] Bodiga VL, Inapurapu SP, Vemuri PK, et al. Intracellular zinc status influences cisplatin-induced endothelial permeability through modulation of PKCα, NF-κB and ICAM-1 expression[J]. *Eu J Pharmacol*, 2016, 791:355-368
- [7] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52(11):2745-2756
- [8] 崔丽丽,余芳芳,左 丽.改良人原代脐静脉内皮细胞的分离及鉴定[J]. *贵阳医学院学报*, 2015, 40(1):20-23
- [9] 刘 彦,陈绍良,徐祖玲,等.大鼠主动脉内皮细胞的分离培养和鉴定[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(5):834-836
- [10] 黄偲璇,贺 涛,邢怡桥.改良贴壁法结合内皮细胞培养基培养小鼠肺微血管内皮细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(15):2691-2694

[收稿日期] 2017-12-13