

本文引用: 姚智超, 杨阳, 霍丽蓉. 小鼠脑血管平滑肌细胞和内皮细胞的联合提取与鉴定[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(9): 790-797. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.09.008.

· 方法学研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2024)32-09-0790-08

小鼠脑血管平滑肌细胞和内皮细胞的联合提取与鉴定

姚智超, 杨阳, 霍丽蓉

首都医科大学附属复兴医院中心实验室, 北京市 100038

[摘要] [目的] 建立一种高效且稳定的原代小鼠脑血管平滑肌细胞和内皮细胞的分离方法, 为脑血管病发病机制和治疗方法的探究提供实验材料。[方法] 通过葡聚糖梯度离心联合酶消化法分离脑血管平滑肌细胞, 再通过免疫磁珠分选分离脑血管内皮细胞。使用倒置相差显微镜观察两种细胞的形态和生长特征, 通过免疫荧光鉴定纯度, 通过 CCK-8 法观察传代后生长和增殖特性。在细胞功能层面, 通过血管形成实验评估内皮细胞血管形成能力, 通过迁移实验评估平滑肌细胞对血小板源性生长因子(PDGF)的反应性。[结果] 采用本方法分离出的两种细胞生长旺盛, 状态良好。平滑肌细胞表现出典型的“峰谷状”生长, 免疫荧光结果显示胞质内平滑肌特异性 α -SMA 和 SM22 α 表达阳性; 内皮细胞表现出典型的“铺路石”样生长, 血小板内皮细胞黏附分子 CD31 和闭锁小带蛋白 1 表达阳性。[结论] 本研究建立了一种高效同时分离两种脑血管细胞的可靠方法, 分离细胞纯度高, 活性良好, 且传代后特征稳定, 足以满足后续实验需求。

[关键词] 脑血管内皮细胞; 脑血管平滑肌细胞; 葡聚糖梯度离心联合酶消化法; 免疫磁珠分选

[中图分类号] R74;R5

[文献标识码] A

Combined extraction and identification of mouse brain vascular smooth muscle cells and endothelial cells

YAO Zhichao, YANG Yang, HUO Lirong

Central Laboratory, Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

[ABSTRACT] **Aim** To establish an efficient and stable isolation method of primary mouse brain vascular smooth muscle cells and endothelial cells, and provide experimental materials for the investigation of pathogenesis and treatment of brain vascular diseases. **Methods** Brain vascular smooth muscle cells were isolated by dextran gradient centrifugation with enzymatic digestion, and endothelial cells were isolated by immunomagnetic beads sorting. Morphology and growth characteristics of two types of cells were observed with an inverted phase contrast microscope, their purity were identified by immunofluorescence, and their proliferation characteristics were observed by CCK-8 assay. At the level of cellular function, angiogenic capacity of endothelial cell was assessed by angiogenesis assay and smooth muscle cell responsiveness to platelet-derived growth factor (PDGF) was assessed by migration assay. **Results** The two types of cells isolated using this method grew vigorously and were in good condition. Smooth muscle cells exhibited typical “peak valley” growth, and immunofluorescence results showed cytoplasmic specific smooth muscle α -SMA and SM22 α expression was positive. Endothelial cells exhibited typical “cobblestone like” growth, with positive expression of platelet endothelial cell adhesion molecule CD31 and atresia zone protein 1. **Conclusion** This study established a reliable and efficient method for simultaneously isolating two types of cerebrovascular cells, the isolated cells have high purity, good activity, and stable characteristics after passage, which were sufficient to meet the needs of subsequent experiments.

[KEY WORDS] brain vascular smooth muscle cell; brain vascular endothelial cell; dextran gradient centrifugation with enzymatic digestion; immunomagnetic beads sorting

[收稿日期] 2023-10-20

[修回日期] 2023-12-31

[基金项目] 北京市自然科学基金面上项目(7182065)

[作者简介] 姚智超,硕士研究生,研究方向为神经系统疾病的发病机制及治疗措施,E-mail:996839502@qq.com。通信作者霍丽蓉,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为神经变性病及脑血管病,E-mail:huolir@ccmu.edu.cn。

血脑屏障在限制不利因素进入脑实质中发挥着重要的看门人作用^[1], 血脑屏障功能失调是许多疾病病理生理过程中的始动因素^[2-3]。而作为其主要组成部分的脑血管内皮细胞, 承担着血脑屏障的主体功能^[4-5], 因此脑血管内皮细胞生物学功能研究成为脑血管病发病机制探究中的热点。同样, 因平滑肌表型转化在动脉粥样硬化过程中起着关键作用^[6-7], 也使其成为近些年研究的热点^[8-9]。而上述两项研究的开展是建立在体外大量培养两种细胞的基础之上的。针对上述两种细胞的提取, 目前国内外方法均为单一细胞提取, 易造成样本浪费, 且国内外传统方法或多或少存在效率低、易污染等缺点^[10]。本研究旨在汲取国内外现有方法的优点并加以改进和创新, 建立一种高效且稳定的提取方法, 为脑血管病及其他神经系统疾病发病机制和治疗方法的探究提供实验材料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用亲代种鼠为 12 只 8~14 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠, 购于北京维通利华实验动物有限公司, 动物质量合格证号: SCXK(京)2021-0011。子代 1 周龄、6 周龄、4 月龄、6 月龄小鼠由实验室自繁育。

1.2 实验材料

胎牛血清(CellMax, SA112.02); DMEM 培养基(Sigma, D5671); GlutaMAX(Gibco, 35050-061); 非必需氨基酸(Gibco, 11140-050); I 型 DNA 酶(Sigma, DN25); 内皮细胞生长因子(ScienCell, 1052); 肝素(Sigma, H-3933); 丙酮酸钠(Gibco, 11360-070); 胶原酶/中性蛋白酶(Roche, 1097113); 葡聚糖(Sigma, D3759); 红细胞裂解液(索莱宝, R1010); Accutase(Gibco, A1110501); 绵羊抗大鼠 IgG 免疫磁珠(Invitrogen, 11035); 大鼠抗小鼠 CD31 抗体(BD, 557355); 兔抗小鼠 α-SMA 抗体(Abcam, ab124964); 兔抗小鼠 SM22α 抗体(Abcam, ab14106); 兔抗小鼠 CD31 抗体(Abcam, ab222783), 大鼠抗小鼠 ZO-1 抗体(Invitrogen, 14-9776-82); Alexa Fluor 488 山羊抗兔 IgG(Abcam, ab150077); Alexa Fluor 594 兔抗大鼠 IgG(Abcam, ab150160), 鼠尾胶原(索莱宝, C8065), 磁分离架(碧云天, FMS008), Matrigel(康宁, 356234), 支原体预防去除试剂Ⅱ(碧云天 C0293), 抗生素-抗真菌剂(Gibco, 15240112), 胰岛素(碧云天, P3376), 血小板源性生长因子[(platelet-derived growth factor, PDGF), RD, 220-BB-010]; BSA

(索莱宝, A8020); 嘌呤霉素(碧云天, ST551), DAPI 染色液(碧云天, C1005); Transwell 小室(Corning, 3422)。

1.3 试剂制备

平滑肌细胞生长完全培养基: 用 DMEM 配制。含有 10% 胎牛血清、1% 抗生素-抗真菌剂、1% 非必需氨基酸、1% GlutaMAX、50 mg/L DNase I、10 mg/L 胰岛素、20 μg/L PDGF-BB、0.2% 支原体预防去除试剂Ⅱ。内皮细胞筛选培养基: 用 DMEM 配制, 含有 5% 胎牛血清、1% 抗生素-抗真菌剂、1% 非必需氨基酸、1% GlutaMAX、100 mg/L 肝素、1% 丙酮酸钠、100 mg/L 血管内皮生长因子、1 mg/L 嘌呤霉素、0.2% 支原体预防去除试剂Ⅱ。内皮细胞生长培养基: 内皮细胞筛选培养基去除嘌呤霉素即可。磁珠洗脱缓冲液: 用不含钙镁的 PBS 配制, 含有 0.1% BSA, 2 mmol/L EDTA。

1.4 培养皿和爬片包被

用无菌 0.006 mol/L 乙酸将胶原蛋白稀释到 0.024 g/L, 以 40 mg/m² 加入培养器皿中, 以 35 mm 培养皿为例, 加入 1.33 mL 稀释胶原(其他器皿按照底面积进行换算), 在超净台内过夜晾干, 使用前用 PBS 润洗 3 遍。

1.5 免疫磁珠制备

将 Dynabeads 绵羊抗大鼠 IgG 磁珠振荡混匀, 取 0.5 mL 磁珠悬液于 2 mL 离心管中, 将离心管放在磁架上, 等待 1 min, 肉眼观察到磁珠吸附到管壁上后, 去上清液, 加入 1 mL 磁珠洗脱缓冲液, 混合均匀, 放在磁架上 1 min。重复此洗涤步骤 3 次, 用 0.5 mL 缓冲液重悬, 加入大鼠抗小鼠 CD31 抗体 25 μL, 4 °C 涡旋过夜。隔天用缓冲液用上述方法洗涤 3 次, 去除未结合的抗体。用 0.5 mL 缓冲液将磁珠重悬使用或 4 °C 保存 1~2 周使用。

1.6 原代细胞悬液制备

将 4 只小鼠颈椎脱臼处死, 在 70% 乙醇中浸泡 3 min, 断头后置于超净台, 依次剪开皮肤和颅骨, 取出大脑浸泡在预冷的含有 20 mmol/L HEPES 的 DMEM 中(以下称 HEPES 缓冲液)。随后用镊子小心剥离小脑、脑干、脑膜后, 将余下组织切碎为 1 mm³ 左右的小块^[11], 用剪口的移液枪将组织小块转移到 50 mL 离心管中, 4 °C、500×g 离心 5 min, 弃上清, 加入 10 mL 用 HEPES 缓冲液配制的 0.05% 胶原酶/中性蛋白酶, 1% Accutase 溶液重悬组织, 在室温下消化 30 min, 每隔 5 min 吹打重悬一次, 帮助组织解离。加入 10 mL 含 5 mmol/L EDTA 的平滑肌细胞生长完全培养基终止消化。室温、1 000×g

离心 10 min, 去上清液后用 20 mL 16% 葡聚糖 (HEPES 缓冲液配制) 重悬组织, 4 ℃、10 000×g 离心 30 min。离心后可见 3 层, 上层为残余脑组织, 中层为葡聚糖, 下层红色沉淀为微血管沉淀。吸去上层和中层, 用 10 mL 平滑肌细胞生长完全培养基吹打重悬红色沉淀, 室温、1 000×g 离心 10 min, 去上清后加入 0.05% 胶原酶/中性蛋白酶、1% Accutase (平滑肌细胞生长完全培养基配制), 37 ℃ 孵育 2 h, 每 10 min 轻轻吹打一次, 帮助细胞解离。加入 10 mL EDTA 溶液(同上) 终止消化, 室温、1 000×g 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 mL 红细胞裂解液, 吹打重悬, 裂解 5 min, 室温、1 000×g 离心 5 min, 弃上清留沉淀, 用 6 mL 平滑肌细胞生长完全培养基重悬。

1.7 内皮细胞和平滑肌细胞的分离

在上述细胞悬液中加入 90 μL 制备好的磁珠, 室温下涡旋孵育 15 min, 于磁架上静置 1 min, 待磁珠吸附在管壁上, 在不干扰磁珠的前提下轻柔吸出上清, 置于一个新的 15 mL 离心管中, 室温、1 000×g 离心 5 min, 弃上清留沉淀, 用 3 mL 平滑肌细胞生长完全培养基重悬沉淀, 种于 35 mm 细胞培养皿中, 培养 3 天后换液去除未贴壁的细胞和血管碎片即可得到高纯度平滑肌细胞。此时内皮细胞仍吸附在磁珠上, 将装有磁珠的离心管从磁架中取出, 在 3 mL 内皮细胞完全培养基中吹打, 使细胞团分散为单个细胞, 再次将离心管置于磁架上 1 min, 在不接触磁珠的情况下吸除上清, 取下离心管, 用 3 mL 内皮细胞筛选培养基吹打重悬磁珠, 接种到 35 mm 培养皿中, 3 天后换液去除未贴壁的游离细胞和磁珠沉淀, 改用内皮细胞生长培养基继续培养。

1.8 细胞传代

当细胞达到 80% 以上汇合时可传代, 具体步骤: 弃掉旧培养基, PBS 洗 2 次, 加入 Accutase 消化液常温或 37 ℃ 静置 8 min, 待有大量细胞漂浮或轻拍皿底有大量细胞漂浮时吹打细胞, 将细胞悬液收集到离心管中, 室温、1 000×g 离心 4 min, 重悬后以 1:1.5 的比例接种到新培养容器中。前期原代细胞生长缓慢, 需低比例传代, 两代后可提高传代比例, 按照常规 1:2 或 1:3 的比例进行传代。

1.9 细胞类型免疫荧光鉴定

实验前一晚接种 1×10^5 个细胞到铺好爬片的 12 孔板中, 隔夜去培养基, PBS 洗 3 次, 加入 0.5 mL 4% PFA, 固定 15 min, PBS 洗 3 次, 加入 0.5 mL 0.5% Triton, 室温下摇床 20 min, PBS 洗 3 次, 加入 0.5 mL 2% BSA, 室温下摇床封闭 20 min。封闭结

束后按照抗体说明书中的比例对一抗进行稀释, 每孔加入 400 μL 抗体, 4 ℃ 过夜孵育。过夜后 TBST 洗 3 次, 加入荧光二抗, 室温摇床避光孵育 2 h, 避光条件下加二抗, 加入 400 μL DAPI 染色液染色 5 min, 去 DAPI, TBST 洗 3 次后封片, 再观察拍照。

1.10 细胞增殖实验

取第 3 代细胞接种到 96 孔板中, 每孔加入 100 μL (2×10^3 个) 细胞, 以培养基作为空白对照, 空白组和实验组各设置 5 个复孔, 重复 3 次。细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 环境中连续培养 8 天, 第 4 天换液。每日固定时间每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 于上述条件孵育 2 h, 测 450 nm 吸光度, 绘制生长曲线。

1.11 血管形成实验

实验前将基质胶置于冰上, 4 ℃ 解冻过夜, 并将 24 孔板和枪头置于 4 ℃ 预冷。每孔加入 300 μL 基质胶, 于 37 ℃ 静置 30 min。将第 3 代内皮细胞分别以 5×10^4 、 1×10^5 、 1.5×10^5 、 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板, 每孔 300 μL。于 37 ℃、5% CO₂ 环境中培养 10 h 后观察成管情况。

1.12 划痕实验

将细胞在不含 PDGF 的培养基中培养 3 天, 随后以 3×10^5 个细胞/孔的密度接种到 12 孔板中, 过夜后用 100 μL 移液器枪头垂直划线, 用 PBS 冲洗去除脱落的细胞。将细胞在添加 1% 胎牛血清的培养基中培养, 实验组加入 40 μg/L PDGF, 对照组不做任何处理。分别在划痕后 0 h、12 h 进行拍照, 计算划痕愈合率。划痕愈合率 = $(D_0 - D_n) / D_0 \times 100\%$, 其中 D_0 代表初始伤口距离, D_n 代表 12 h 伤口距离。

1.13 Transwell 实验

将细胞以上述同样方法处理后以 1×10^4 个细胞/孔的密度悬浮在低血清 (1% 胎牛血清) 培养基中, 并接种到 Transwell 上室中, 然后将含有 10% 胎牛血清的完全培养基放入下室, 实验组加入 40 μg/L PDGF, 对照组不做任何处理。24 h 后, 用棉签去除附着在滤膜上表面的细胞, 用 0.1% 结晶紫对下表面的迁移细胞染色 15 min, 在光学显微镜下计数迁移细胞个数。

1.14 细胞计数及统计学分析

使用 Image J 软件统计细胞总数, 标志性抗原表达阴性细胞通过人工计数, 阳性细胞数 = 细胞总数 - 阴性细胞数。随机选取 6 个视野进行计数, 实验重复 3 遍。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Graphpad prism 9.5 进行统计分析。

2 结 果

2.1 小鼠脑血管内皮细胞和平滑肌细胞形态观察

2.1.1 内皮细胞 分离次日,可见空泡样血管段与磁珠贴壁(图 1A),3 天后大量内皮细胞从血管段游离出来,呈“出芽式”生长(图 1B),7 天后内皮细胞开始快速生长,细胞群开始呈现扩大汇合趋势,表现出明显“铺路石”样生长特征(图 1C),14 天即可铺满培养皿(图 1D)。

2.1.2 平滑肌细胞 分离次日,可见大量血管段和血管碎片贴壁(图 2A),平滑肌细胞从第 3 天开始

即进入大量增殖阶段(图 2B),第 5 天细胞密度增大并出现汇合趋势,并表现出明显的“峰谷状”生长特征(图 2C),第 7 天细胞致密,即可铺满培养皿(图 2D)。

2.2 细胞类型免疫荧光鉴定

2.2.1 内皮细胞鉴定 内皮细胞区别于其他细胞的重要特征是细胞间存在着广泛的紧密连接,紧密连接蛋白闭锁小带蛋白 1(zonula occluden-1,ZO-1) 和血小板内皮细胞黏附分子 CD31 染色阳性提示细胞间形成了良好的紧密连接,也提示细胞群为高纯度的脑血管内皮细胞。通过 CD31 阳性率进行细胞纯度鉴定,细胞纯度可达 98% 以上(图 3)。

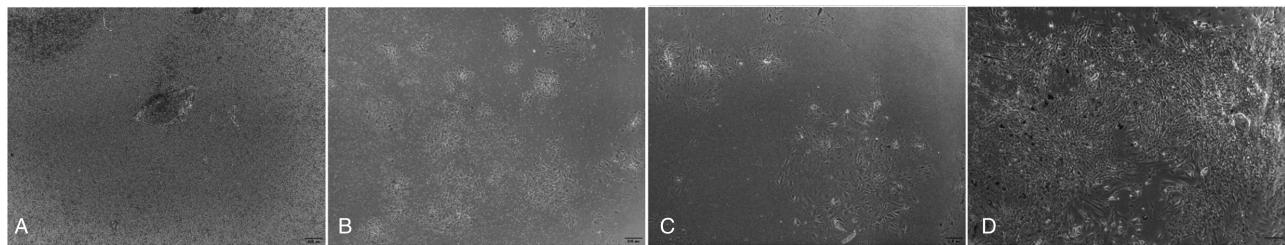


图 1. 原代培养的小鼠脑血管内皮细胞形态学特征

A、B、C、D 分别为培养 1 天、3 天、7 天、14 天。标尺 = 200 μm。

Figure 1. Morphological characteristics of the primary cultured mouse brain vascular endothelial cells

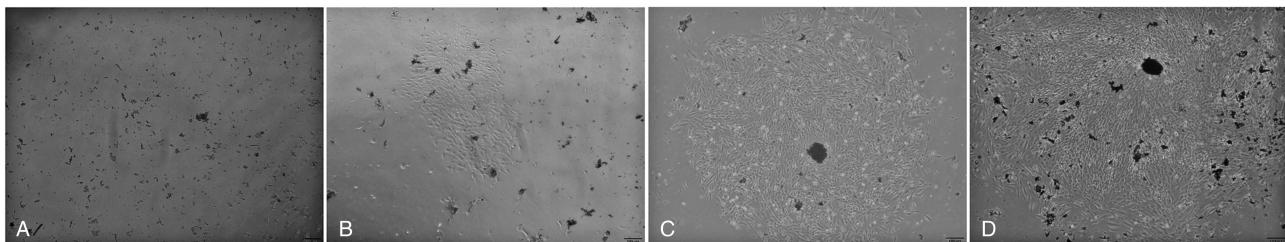


图 2. 原代培养的小鼠脑血管平滑肌细胞形态学特征

A、B、C、D 分别为培养 1 天、3 天、5 天、7 天。标尺 = 200 μm。

Figure 2. Morphological characteristics of the primary cultured mouse brain vascular smooth muscle cells

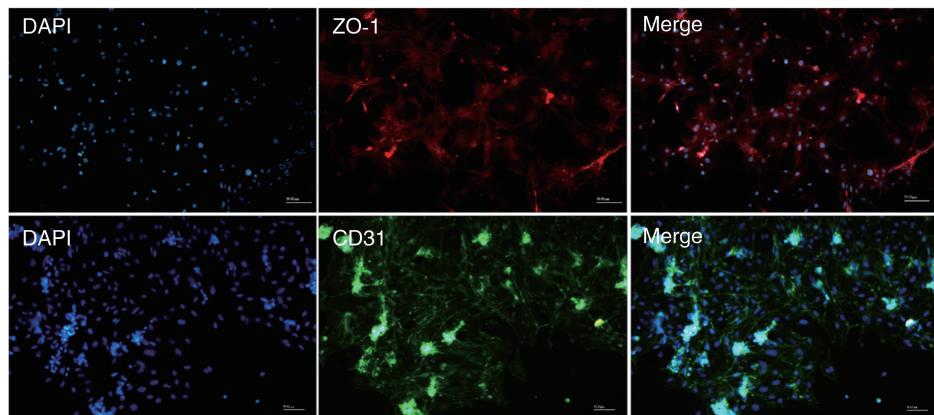


图 3. 小鼠脑血管内皮细胞 CD31、ZO-1 免疫荧光染色

上图为 ZO-1 免疫荧光染色,下图为 CD31 免疫荧光染色;蓝色代表 DAPI 着色的细胞核,绿色代表内皮细胞特异性 CD31 抗原,红色代表紧密连接蛋白 ZO-1。标尺 = 50 μm。

Figure 3. Immunofluorescence staining of CD31 and ZO-1 of the primary mouse brain vascular endothelial cell

2.2.2 平滑肌细胞鉴定 免疫荧光结果显示,平滑肌细胞特异性标志分子 α -SMA 呈现高阳性表达,肌动蛋白呈清晰条索状,形态清晰,通过 α -SMA 阳

性率进行计算,平滑肌细胞纯度可达 98% 以上(图 4)。

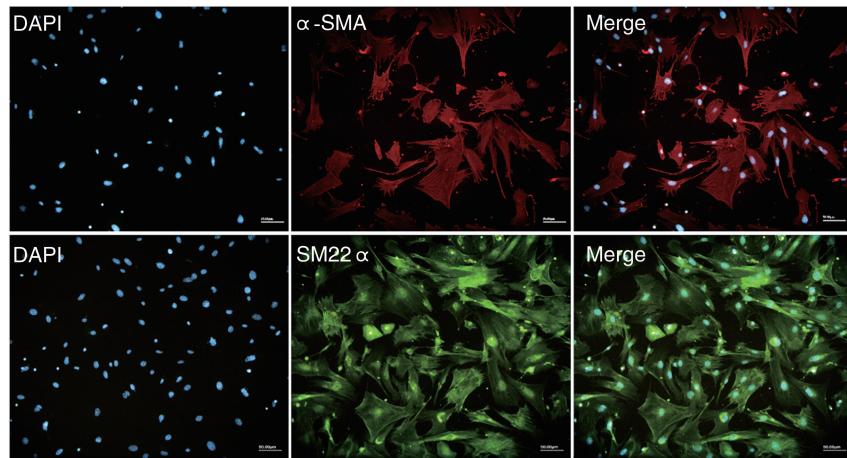


图 4. 小鼠脑血管平滑肌细胞 α -SMA 和 SM22 α 免疫荧光染色

蓝色为 DAPI, 红色为平滑肌细胞特异性 α -SMA 抗体免疫荧光染色, 绿色为平滑肌细胞特异性 SM22 α 抗体免疫荧光染色, 标尺 = 50 μm 。

Figure 4. Immunofluorescence staining of α -SMA and SM22 α of the primary mouse brain vascular smooth muscle cells

2.3 细胞增殖特性

2.3.1 内皮细胞增殖特性 取第 3 代细胞培养 8 天, 通过酶标仪对其 OD 进行读数, 绘制生长曲线。结果显示, 细胞增殖规律为 1~2 天为潜伏期, 增殖缓慢; 3~5 天增殖明显加速, 进入“对数生长期”; 第 5 天后增殖速度放缓, 进入“平台期”。内皮细胞 5 代以内可保持较高增殖活性, 5 代后增殖活性明显降低(图 5)。

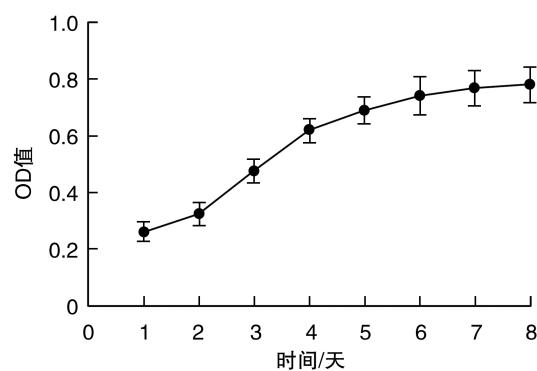


图 5. 小鼠脑血管内皮细胞生长曲线($n=3$)

Figure 5. Growth curve of the primary mouse brain vascular endothelial cells($n=3$)

2.3.2 平滑肌细胞增殖特性 第 3 代平滑肌细胞增殖趋势和内皮细胞基本一致, 同样呈横向“S”状, 但与内皮细胞不同的是, 平滑肌细胞呈现“潜伏式”生长特性且呈密度依赖性生长, 前 3 代内细胞

增殖缓慢, 且增殖速度与传代后接种密度呈正相关, 当传至第 4 代时, 细胞突破生长瓶颈, 增殖速度明显上升, 按 1:2 的比例传代后可快速铺满培养皿, 传至第 7 代仍具有较高增殖活性, 7 代后出现增殖活性衰退(图 6)。

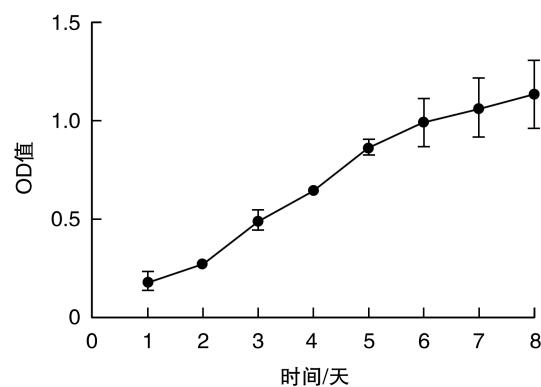


图 6. 小鼠脑血管平滑肌细胞生长曲线($n=3$)

Figure 6. Growth curve of primary mouse brain vascular smooth muscle cells($n=3$)

2.4 内皮细胞成管能力评估

经过探索优化, 原代内皮细胞成管实验最好在第 3 或 4 代, 代次过高或过低不利于最大限度地形成小管。接种密度与成管效果明显相关^[12], 该细胞在 24 孔板中使用 1.5×10^5 个细胞/孔, 可产生最好的成管反应。使用太少的细胞会导致很少或没有

管的形成,而使用太多的细胞则会形成单层或团块。因此认为使用小鼠原代内皮细胞进行成管实

验的最佳条件为使用第 3 代细胞以 1.5×10^5 个细胞/孔的密度进行接种(图 7)。

图 7. 细胞数量对内皮细胞管形成的影响

A、B、C、D 接种密度分别为 5×10^4 、 1×10^5 、 1.5×10^5 、 2×10^5 的成管效果,其中接种 5×10^4 个细胞的孔中没有成管,而在接种 2×10^5 个细胞的孔中细胞过于密集且形成团块。标尺 = 200 μm。

Figure 7. The effect of cell number on endothelial cell tube formation

2.5 平滑肌细胞迁移能力评估

PDGF 是血管平滑肌细胞表型转换的最强刺激因子。划痕实验结果显示,PDGF 刺激后,平滑肌细胞 12 h 迁移率提高了 1.7 倍;Transwell 结果显示

24 h 迁移数目提高了 1.4 倍。两项功能实验结果均证实该方法提取的平滑肌细胞对 PDGF 刺激具有良好的反应性(图 8)。

Group	Wound Closure (%)
对照组	~38
实验组	~62

Group	Cell Migration Count
对照组	~85
实验组	~105

图 8. 平滑肌细胞对 PDGF 的反应性($n=3$)

A 为平滑肌细胞划痕实验结果,左图为未添加 PDGF 划痕结果,右图为添加 PDGF 后划痕结果,标尺 = 200 μm;
B 为平滑肌细胞 Transwell 实验结果,左图为未添加 PDGF 结果,右图为添加 PDGF 后结果,标尺 = 100 μm;
C、D 分别为 A、B 图的定量分析结果。

Figure 8. Smooth muscle cell responsiveness to PDGF ($n=3$)

3 讨 论

血管平滑肌细胞和内皮细胞的体外培养是研究脑血管病和其他血管生成相关疾病的重要基础和手段^[13]。上述两种细胞虽都有成品细胞系,但多数细胞系经过了长时间的培养,虽然它们还能很好地适应培养环境,但这些细胞系通常在遗传学和表

型上与其起源组织起源细胞不同,甚至形态已经发生了改变。而原代细胞则不存在这些问题,拥有正常细胞的形态,并且能够体现出该细胞在生物体内所应该具备的标志和功能^[14],能更好地还原生物体内的生理状态,这些都是细胞系所不具备的优势。因此,脑血管平滑肌细胞和内皮细胞原代提取和培养在实验中更显得尤为重要。在实验动物选择方

面,小鼠的基因组和人类的基因组具备高程度的同源性^[15],且在体型和经济性方面,小鼠体型小,容易操作且价格低廉,正因如此,小鼠也成为人类疾病研究中应用最广泛的重要工具。但小鼠与大鼠相比脑组织较少,细胞产量偏低,操作难度较大,这是以往多数研究者放弃小鼠使用大鼠的原因^[16]。但小鼠的优势如前所述,因此探索一种稳定且高效的提取方法十分重要。

目前国内外关于原代细胞的提取方法主要包括贴壁培养法^[17]、磁珠分离法^[18]、差速离心法^[19]、酶联消化法^[20]、过筛法^[21]等,但上述方法均或多或少存在提取效率低、操作时间久、易污染、纯度低等缺点,且上述方法均只能分离一种细胞,造成珍贵实验样品的浪费。本实验对提取过程进行了反复优化,建立了快速且高效的联合提取方法。首先在酶联消化阶段对传统消化体系进行优化,创新性地在酶联消化体系中引入 Accutase,大大降低消化所需时间,提高了消化效率。在干扰细胞清除方面首创性地使用红细胞裂解液替代大多数文献中尼龙滤网过滤,大大降低了污染风险。为了提高内皮细胞的纯度,本实验采用磁珠加嘌呤霉素联合筛选。同时为了提高存活率,对以往报道的嘌呤霉素浓度进行了优化,以往文献中多采用 4~5 mg/L 的剂量^[22-23],该剂量主要针对大鼠细胞实验。本实验中观察到高浓度的嘌呤霉素对小鼠内皮细胞有不可逆性损伤,严重影响小鼠细胞的存活和增殖,而 1 mg/L 的剂量对小鼠细胞的活力影响就微乎其微,且能保持极高的筛选率。在实验小鼠年龄的选择上,本实验也同时进行了探索。以往文献大多使用新生幼鼠进行取材^[24],但本实验发现 6 周龄、4 月龄小鼠细胞提取成功率较高,而 1 周龄新生小鼠细胞提取培养成功率较低。分析原因可能为新生小鼠脑组织太小难以获得大量细胞,如前所述平滑肌细胞增殖呈密度依赖性^[11],因此无法满足细胞增殖密度。使用 6 月龄成年小鼠成功率也较低,且污染率高,分析原因为成年小鼠的颅骨钙化程度明显,硬度大,在开颅时易造成细菌真菌污染,且其大脑发育已成熟,细胞分化明显,体外增殖活性低,不易达到汇合状态。因此建议使用 6 周龄~4 月龄小鼠进行操作。针对原代细胞提取易污染问题原因主要有:
①操作时程较长易在操作过程中引入污染;
②小鼠皮肤存在酵母菌、白色念珠菌、支原体等污染,且上述 3 种污染源常难以被乙醇杀灭。针对污染问题,本实验不仅缩短了操作时长,同时在常规青霉素-链霉素基础上加入两性霉素 B 和支原体预

防清除试剂,极大降低了污染率。本实验尚存不足之处:由于 Accutase 的温和消化特性,经常用于干细胞的解离以及胰酶难以消化细胞如巨噬细胞的传代^[25]。目前尚无将 Accutase 用于脑组织解离与消化的先例,因此对于消化浓度的选择尚没有相关文献的支持,仍处于摸索阶段。由于血管组织存在大量弹性纤维,相较于其他组织更难以消化,需要更长的消化时间。因此,对于 Accutase 的浓度选择,本实验采用从低浓度开始测试,避免过度消化对细胞的损伤。但是此消化浓度尚需进一步验证与优化,本课题组将在后续实验中继续对 Accutase 的使用浓度进行探索和改进,寻求最佳的消化浓度和最佳的消化体系。

本课题组使用上述联合提取方法多次成功提取和分离了小鼠两种脑血管细胞,在不同批次的分离过程中均得到了足够的细胞数量,且活性良好,成功用于后续实验,纯度均在 98% 以上,且污染率控制在 10% 以下。综上,本实验在以往方法的基础上进行优化、创新,成功建立了一种高效省时、纯度高、可重复性高的脑血管细胞提取分离方法。

[参考文献]

- [1] SWEENEY M D, ZHAO Z, MONTAGNE A, et al. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back [J]. Physiol Rev, 2019, 99(1): 21-78.
- [2] ARAGÓN-GONZÁLEZ A, SHAW P J, FERRAIUOLO L. Blood-brain barrier disruption and its involvement in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15271.
- [3] KNOX E G, ABURTO M R, CLARKE G, et al. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration [J]. Mol Psychiatry, 2022, 27(6): 2659-2673.
- [4] 瞿凯, 邱菊辉, 王贵学. 血管内皮细胞屏障功能的血流动力学调控及其与动脉粥样硬化的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(1): 1-6.
QU K, QIU J H, WANG G X. Hemodynamic regulation of vascular endothelial barrier function and its relationship with atherosclerosis [J]. Chin J Arterioscler, 2020, 28(1): 1-6.
- [5] KADRY H, NOORANI B, CUCULLO L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity [J]. Fluids Barriers CNS, 2020, 17(1): 69.
- [6] WU J H, ZHANG L S, NEPLIOUEV I, et al. Drebrin attenuates atherosclerosis by limiting smooth muscle cell transdifferentiation [J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(3): 772-784.
- [7] WOO S H, KYUNG D, LEE S H, et al. TXNIP suppresses

- the osteochondrogenic switch of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2023, 132(1): 52-71.
- [8] 潘敏娟, 郑熙隆, 廖端芳. 心肌素在周期性张应变调控血管平滑肌细胞表型转化中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(9): 749-756.
- PAN M H, ZHENG X L, LIAO D F. Role of myocardin in the regulation of phenotypic transformation of vascular smooth muscle cell by cyclic stretch [J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(9): 749-756.
- [9] DURHAM A L, SPEER M Y, SCATENA M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 590-600.
- [10] 刘昭德, 马华根, 唐元瑜. 小鼠脑微血管内皮细胞的原代培养与鉴定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(4): 325-329.
- LIU Z D, MA H G, TANG Y Y. Primary culture and identification of mouse brain microvascular endothelial cells [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2020, 36(4): 325-329.
- [11] GAUTHIER S A, SAHOO S, JUNG S S, et al. Murine cerebrovascular cells as a cell culture model for cerebral amyloid angiopathy: isolation of smooth muscle and endothelial cells from mouse brain [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 849: 261-274.
- [12] DECICCO-SKINNER K L, HENRY G H, CATAISSON C, et al. Endothelial cell tube formation assay for the *in vitro* study of angiogenesis [J]. *J Vis Exp*, 2014, 91: e51312.
- [13] ZHANG S C, BEI Y R, HUANG Y L, et al. Induction of ferroptosis promotes vascular smooth muscle cell phenotypic switching and aggravates neointimal hyperplasia in mice [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 121.
- [14] WEI J R, XIAO D C, TANG L, et al. Neural cell isolation from adult macaques for high-throughput analyses and neurosphere cultures [J]. *Nat Protoc*, 2023, 18(6): 1930-1957.
- [15] ALLEN T M, BREHM M A, BRIDGES S, et al. Humanized immune system mouse models: progress, challenges and opportunities [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(7): 770-774.
- [16] 郝思雨, 田江天, 刘洋, 等. 小鼠主动脉平滑肌细胞的分离培养及鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(27): 5237-5240.
- HAO S Y, TIAN J T, LIU Y, et al. Isolated culture and identification of mouse aortic vascular smooth muscle cell [J]. *Prog Mod Biomed*, 2016, 16(27): 5237-5240.
- [17] 何蔺, 刘涛, 王浩宇, 等. 改良组织块贴壁法培养小鼠主动脉血管平滑肌细胞及生物学鉴定? [J]. 重庆医学, 2015, 44(25): 3470-3472.
- HE L, LIU T, WANG H Y, et al. Improved tissue piece inoculation and identification of mouse vascular smooth muscle cell [J]. *Chongqing Med*, 2015, 44(25): 3470-3472.
- [18] 周玲萍, 冯成, 汤雪斌, 等. 免疫磁珠分选法原代培养小鼠肺微血管内皮细胞 [J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(8): 590-593.
- ZHOU L P, FENG C, TANG X B, et al. Comparison of different methods for mouse pulmonary microvascular endothelial cells culture [J]. *J Wenzhou Med Univ*, 2016, 46(8): 590-593.
- [19] RUCK T, BITTNER S, EPPING L, et al. Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells [J]. *J Vis Exp*, 2014, 93: e52204.
- [20] 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]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1): 84-88.
- XU X F, LI R P, LI Q, et al. Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells [J]. *Chin J Cell Biol*, 2005, 27(1): 84-88.
- [21] 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, 2012, 28(2): 139-142.
- 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): 139-142.
- [22] PERRIÈRE N, DEMEUSE P, GARCIA E, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties [J]. *J Neurochem*, 2005, 93(2): 279-289.
- [23] HOWLAND S W, GUN S Y, CLASER C, et al. Measuring antigen presentation in mouse brain endothelial cells *ex vivo* and *in vitro* [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(12): 2016-2026.
- [24] 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, 2000, 34(3): 215-217.
- XU J W, WANG W, KANG Z H, et al. Cultivation of mouse brain microvascular endothelial cells *in vitro* [J]. *J Fujian Med Univ*, 2000, 34(3): 215-217.
- [25] SONG Q L, ZHANG Y Z, ZHOU M M, et al. The culture dish surface influences the phenotype and dissociation strategy in distinct mouse macrophage populations [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 920232.

(此文编辑 文玉珊)