

- Neurosci, 2011, 18(11):1429-1434
- 3 Rwigema JC, Wegner RE, Mintz AH, *et al.* Stereotactic radiosurgery to the resection cavity of brain metastases: a retrospective analysis and literature review[J]. Stereotact Funct Neurosurg, 2011, 89(6):329-337
- 4 Elaimy AL, Mackay AR, Lamoreaux WT, *et al.* Clinical outcomes of stereotactic radiosurgery in the treatment of patients with metastatic brain tumors[J]. World Neurosurg, 2011, 75(5-6):673-683
- 5 王宏伟, 窦长武, 张国荣, 等. 伽玛刀治疗脑转移瘤的疗效观察[J]. 中华神经外科杂志, 2011, 27(1):65-68
- (收稿日期: 2012-06-27)
- (修回日期: 2012-11-20)

大鼠心肌微血管内皮细胞缺氧模型的建立

翟仰魁 潘明政 张 宏

摘 要 目的 对大鼠的心肌微血管内皮细胞(myocardial microvascular endothelial cells, MMVECs)离体培养方法进行改良,建立该细胞的缺氧模型。**方法** 取出7日龄左右的Wistar大鼠的心脏,用胰蛋白酶和胶原酶二次消化法获得MMVECs,密度梯度离心法纯化细胞,计算细胞纯度;用免疫细胞化学方法检测微血管内皮细胞特异性第Ⅷ因子、CD34及CD31相关抗原;将原代培养的细胞置于持续通入体积分数为1% O₂、5% CO₂和94% N₂的自制缺氧装置中,并在37℃孵箱中分别缺氧处理4、6、12、18、24h,各时间段均设置正常对照组;用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色实验检测缺氧对大鼠MMEVCs增值活力的影响,Hoechst33342染色观察缺氧诱导该细胞凋亡形态学变化。**结果** 细胞形态特征及相关抗原检测证实:与仅用二次消化法培养细胞相比,密度梯度离心纯化后所得MMVECs纯度提高($P < 0.01$);MTT比色实验:随着培养时间的延长,与正常对照组相比,各缺氧组OD值均有所降低,其中缺氧12、18和24h的OD值降低显著(P 均 < 0.01);从缺氧12h开始,各缺氧组的OD值逐渐降低,与12h相比均有显著差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);Hoechst33342染色:缺氧12h细胞开始出现核固缩、碎裂、蓝色浓染等典型的凋亡形态学变化,随着缺氧时间延长该变化更为明显。**结论** 该原代离体培养方法可以获得纯度较高的MMVECs;缺氧对MMVECs的增殖有抑制作用,本方法可以简便、有效地建立MMVECs的缺氧模型。

关键词 心肌微血管内皮细胞 缺氧

Establishment of Hypoxic Model of Myocardial Microvascular Endothelial Cells in Rats. Zhai Yangkui, Pan Mingzheng, Zhang Hong. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100032, China

Abstract Objective To improve the procedures of in vitro culture of the myocardial microvascular endothelial cells (MMVECs) of rats primarily and establish the hypoxic cell model of MMVECs. **Methods** The hearts of the Wistar (about 7 days of age) rats were taken and the method of trypsin and collagenase digestion was used to obtain cells, then the gradient centrifugation was applied to purify the cells and the purity of cells was measured. Factor Ⅷ, CD34 and CD31, the special related antigens of endothelial cells, were tested by immunocytochemistry. The cells were incubated in a closed container with continuous follow of 1% O₂, 5% CO₂ and 94% N₂ for 4, 6, 12, 18, 24h respectively and normal control groups of each time period were established. The viability of cells were evaluated by MTT activity assay and hypoxia induced cell morphologic changes of apoptosis were assessed by Hoechst 33342 staining. **Results** The morphology and immunocytochemistry results showed that the purity of MMVECs was improved by gradient centrifugation ($P < 0.01$). MTT activity assay showed that compared to control groups, the OD value of hypoxic groups decreased, among which the group of 12, 18 and 24h decreased significantly ($P < 0.01$). The OD value of hypoxic groups began to decrease gradually from 12h and differences were significant ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). After 12h of hypoxia, cells began to show typical morphologic changes of apoptosis, such as condensation and fragmentation of nucleus and it became obvious with the increasing time of hypoxia. **Conclusion** The improved in vitro culture method of MMVECs can get cells with relative high purity to perform hypoxic tests. The hypoxia inhibits the viability of MMVECs and the present method can establish a successful hypoxic model of MMVECs.

Key words Myocardial microvascular endothelial cells; Hypoxia

作者单位:100032 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院(翟仰魁、潘明政);中国医学科学院/北京协和医学院基础医学研究所细胞中心(张宏)

通讯作者:潘明政,电子信箱:vip.com@139.com

细胞缺氧是多种缺血缺氧性疾病发病机制的关键环节,例如心肌梗死、糖尿病视网膜病变等,所以建立细胞缺氧模型是从细胞和分子水平研究该类疾病的重要方法。缺氧对内皮细胞的损伤包括:缺氧可影响线粒体的有氧呼吸功能,使呼吸链电子传递速率降低以及氧化磷酸化脱偶联,导致细胞供能障碍^[1]。缺氧时将产生大量的自由基,引起细胞生物膜损伤、蛋白质交联失活及 DNA 的损伤,导致细胞功能严重受损,同时缺氧还可引发细胞凋亡。微血管内皮细胞,作为单层扁平上皮细胞,其位于血液循环与组织液之间的,它是微血管通透作用的主要物理屏障,确保微血管内外物质交换的平衡,同时也是一种多功能的分泌细胞,可以合成和释放多种血管活性物质,对微环境稳态和调节血管新生有重要作用^[2]。因此,建立心肌微血管内皮细胞(myocardial microvascular endothelial cells, MMVECs)的缺氧模型,对于研究存在缺血缺氧导致的心肌微血管病变的疾病有重要意义。本研究根据前期实验改良了 MMVECs 的原代培养方法,摸索该细胞的缺氧模型,并通过缺氧对其增殖活力和凋亡的影响证实该模型,对心肌微血管病变的研究有重要意义^[3]。

材料与方法

1. 实验材料:超净台、倒置相差显微镜(Olympus)、CO₂ 孵箱(Thermo)、TD5A2WS 低速离心机(Thermo)、全自动多功能酶标仪(Thermo)、自制缺氧装置;DMEM 高糖、Hepes、谷氨酰胺、0.25% 胰蛋白酶、II 型胶原酶、胎牛血清(Hyclone 公司)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、Hoechst33342 (Sigma 公司);CD31(PECAM-1)(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA2211)、CD34(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA0532)、八因子相关抗原(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA0046)、SABC(兔 IgG)-FITC kit(武汉博士德生物工程有限公司,批号:SA1064);PBS、D-Hanks、MTT、二甲基亚砷、人淋巴细胞分离液 4% 多聚甲醛、Triton-X100、牛血清白蛋白(BSA)(北京中杉金桥)。

2. 实验方法:(1)原代培养、纯化及传代:取 8 只健康级新生 Wistar 大鼠,体重 8~10g,雌雄不限,约 7 日龄(中国医学科学院实验动物研究所提供)。将大鼠断头处死后置于 75% 乙醇中浸泡 5min,移至无菌间,在超净工作台中快速打开胸腔、取出心脏,放入装有预冷的 D-Hanks 液的培养皿中;用眼科剪将大血管、心脏瓣膜及周围结缔组织等剪去,用镊子刮除心脏内、外膜,然后将余下的心肌组织放入新的含 D-Hanks 液的培养皿中,剪成约 1mm³ 大小的组织块,置于 50ml 离心管中,加入 10ml 左右 0.25% 胰蛋白酶,置 37℃ 温箱消化,每 1min 晃动 1 次,消化 5min 后 1000r/min 离心 5min;去上清后加入 10ml 0.2% II 型胶原酶继续消化,每隔 5min 晃动 1 次,

消化 40min,二次消化后用 200 目金属筛网过滤;取两个 15ml 离心管,每管加入 5ml 人淋巴细胞分离液,将细胞滤液用弯头吸管按 5ml 每管贴壁加入两个离心管中;经 2000r/min 离心 20min 后,去上清,收集中层细胞于 50ml 离心管中;加入 25ml D-Hanks 液,1500r/min 离心 5min,去上清后重复该步骤 1 次,最后加入 20ml 完全培养基(含 DMEM 高糖、20% 胎牛血清、2mmol/L 谷氨酰胺、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素、1mmol/L 丙酮酸钠、20μg/ml 肝素、12.5mmol/L Hepes、30μg/ml VEGF、40μg/ml 胰岛素),吹打均匀后用细胞计数板计数,按每瓶 10⁵ 个/毫升接种于预先用 2% 的白明胶包被的 T25 培养瓶中,每瓶 7ml 培养基,24~36h 后换液,细胞生长接近融合时传代培养,以后每 48h 换液 1 次。(2)免疫细胞化学鉴定:取第 1 代细胞,消化后,按 10⁵ 个/毫升密度接种于已置有载玻片的 12 孔板,待细胞长满盖玻片的 80%,去培养基,用 4℃ 预冷的 PBS 清洗 2 次×3min;按 500 微升/孔加入 4% 多聚甲醛,15min 后吸去多聚甲醛用 PBS 清洗 3 次×3min,按 500 微升/孔加入 0.5% Triton-X100,7min 后吸去 0.5% Triton-X100,加入 3% BSA 封闭,500 微升/孔,在摇床上轻摇 45min;吸去封闭液,将盖玻片置于载玻片上(注意正面朝上),滴加 250μl 用 3% 的 BSA 稀释的一抗,其中 CD31 按 1:100 稀释,CD34 和 VIII 因子相关抗原按 1:200 稀释,湿盒中 4℃ 过夜;PBS 清洗 3 次×2min,滴加 PBS 稀释的生物素偶联的山羊抗兔 IgG (1:100),20 微升/片,孵育 30min;用 PBS 清洗 3 次×5min,滴加 PBS 稀释的生物素偶联的 FITC,20 微升/片,避光孵育 30min 后 PBS 清洗 3 次×2min;在载玻片上滴加 DAPI,20 微升/片,将盖玻片倒扣到载玻片上,5min 后荧光显微镜下观察并拍照。(3)比较单独用二次消化法和二次消化法+密度梯度离心法纯化所得细胞纯度:MMVECs 纯度计算方法:细胞原代培养 48h 后,分别用 CD31 相关抗原对二次消化法直接培养和二次消化法+密度梯度离心法纯化后所得细胞进行免疫细胞化学鉴定,两组细胞均随机选取 10 个高倍镜(×20)下不同视野,以普通光下所见细胞数为细胞总数,以荧光激发后发黄绿色荧光(CD31 阳性)的细胞为阳性细胞,MMVECs 的纯度即阳性细胞百分数=阳性细胞数/细胞总数×100%。(4)实验分组:将第 2 代细胞消化后重悬,按 10⁵/ml 的密度接种于 96 孔板中(100 微升/孔),按缺氧时间 4、6、12、18、24h 随机分为 5 组,每组设 8 个孔,各组均设置正常对照组。(5)细胞缺氧模型的制备:将充满 5% CO₂、1% O₂ 和 94% N₂ 的气瓶接到密闭有机玻璃盒,设出气口,持续通入混合气体(图 1)(气压为 2cm 水柱);每隔 5min 采集出气口的气体进行血气分析,15min 后达到气瓶气体比例;细胞贴壁后将各缺氧组细胞置于玻璃盒中,将玻璃盒置于 37℃ 孵箱,分别缺氧处理 4、6、12、18 和 24h;各正常对照组在含 5% CO₂ 的普通孵箱中培养。(6)四甲基偶氮唑盐(MTT)比色实验测定细胞增殖活力:分别于缺氧 4、6、12、18 和 24h 后取出实验组及其对照组进行 MTT 实验;吸去细胞上清,按 100 微升/孔加入 MTT 溶液(5mg/ml),37℃ 孵育 4h,弃上清,按 100 微升/孔加入二甲基亚砷,37℃ 孵

育 15min;选择 490nm 波长,在酶联免疫检测仪上检测各孔的吸收光度值(OD 值)大小,记录结果。(7)Hoechst 染色观察缺氧诱导 MMVECs 细胞凋亡:取对数生长期的 MMVECs 细胞,以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于置有盖玻片的 35mm 的培养皿中,至细胞爬满盖玻片的 80% 将培养皿置于缺氧装置中;分别处理 4、6、12、18 和 24h,同时设置各时间段的正常对照组;用 4% 多聚甲醛固定细胞 10min 后用 PBS 洗涤 3 次 $\times$ 2min,用 Hoechst33342 染色 5min 后 PBS 洗涤 3 次 $\times$ 2min,置于载玻片上荧光显微镜下观察并照相。

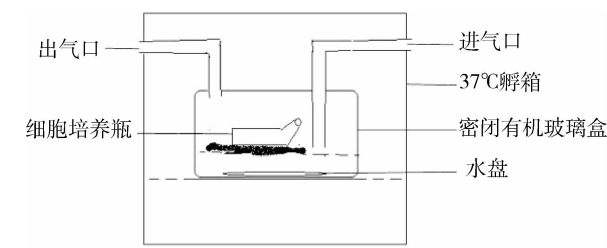


图 1 自制缺氧装置模式图

3. 统计学方法:实验数据用 SPSS 17.0 进行统计分析,所有数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞培养及鉴定结果:72h 后,原代培养的 MMVECs 在倒置相差显微镜表现为,生长至单层汇合状态,同时细胞呈明显的铺路石样,是内皮细胞典型的特点(图 2A)。用细胞免疫荧光化学方法检测 CD31(图 2B)、CD34(图 2C)和 VIII 因子(图 2D)相关

抗原,荧光显微镜下胞质和胞膜有黄绿色荧光着色即为阳性反应,细胞核呈蓝色为 DAPI 染色;结果表明所培养的细胞为微血管内皮细胞,并且阳性细胞数 $> 90\%$ 。

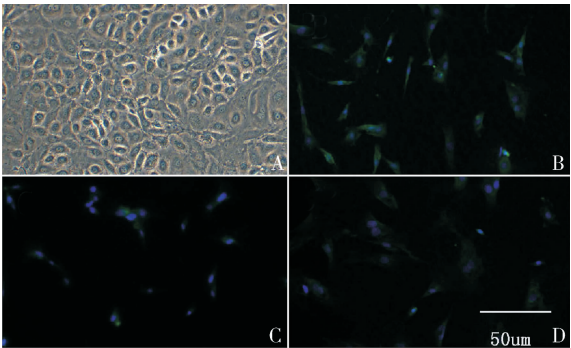


图 2 细胞形态及其免疫荧光鉴定结果

A. 正常 MMVECs(光镜);B. 细胞 CD31 鉴定结果(荧光);C. 细胞 CD34 鉴定结果(荧光);D. 细胞 VIII 因子鉴定结果(荧光)

2. MMVECs 的纯度:二次消化法培养的细胞纯度为 $86.21\% \pm 4.45\%$,二次消化 + 密度梯度离心法纯化后为 $91.38\% \pm 3.13\%$,细胞纯度显著增加($P < 0.01$)。

3. 各组 MMVECs 的增殖活力:与正常组 OD 值相比,各缺氧组 OD 值均有所减低,其中 12、18、24h 时 OD 值降低显著(P 均 < 0.01);各缺氧组中,随缺氧时间延长,缺氧 4h 到 12h OD 值有所上升,但从 18h 开始降低,与缺氧 12h 组相比差异有显著意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(表 1)。

表 1 不同缺氧时间对 MMVECs 增殖活力的影响

组别	n	OD 值				
		4h	6h	12h	18h	24h
缺氧组	8	0.102 ± 0.010	0.121 ± 0.012	$0.123 \pm 0.008^*$	$0.108 \pm 0.003^{* \Delta}$	$0.106 \pm 0.004^{* \Delta}$
对照组	8	0.115 ± 0.015	0.123 ± 0.025	0.167 ± 0.021	0.170 ± 0.013	0.178 ± 0.009

与对照组比较, $^* P < 0.05$; 与 12h 缺氧组比较, $^{\Delta} P < 0.05$

4. 缺氧对 MMVECs 细胞凋亡的影响:正常组细胞细胞核较大,呈均匀弥散荧光,染色较浅(图 3A)。缺氧处理细胞 6h 时细胞仍接近正常组(图 3B);12h 后细胞核出现典型凋亡改变,即胞核浓染,呈颗粒状,并且核固缩,大小不一,染色不均匀(图 3C);随缺氧时间延长,缺氧 24h 时凋亡变化更为显著(图 3D)。

讨 论

本实验在原代培养 MMVECs 的过程中,继续采用胰酶和胶原酶二次消化法,但创新点在于将二次消化法得到的细胞滤液通过人淋巴细胞分离液进行密

度梯度离心;分别原代培养上、中、下 3 层分离液中的细胞,发现上层细胞主要是质量较轻的上皮细胞,下层主要是成纤维细胞、心肌细胞、组织块和血细胞,而中层细胞主要是 MMVECs 细胞,故取中层细胞继续培养,比直接用二次消化后滤液所培养的细胞纯度高,说明密度梯度离心法可以达到纯化细胞的目的。并用微血管内皮细胞的标志抗体(VIII 因子、CD34 和 CD31 相关抗原)来鉴定细胞,结果显示,在荧光显微镜下观察到 90% 以上细胞呈黄绿色阳性反应,证明 MMVECs 的纯度很高,可用于实验。

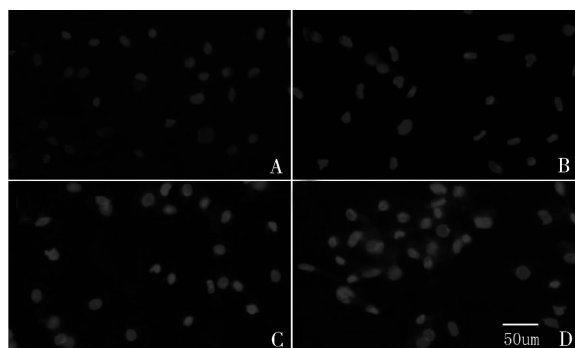


图 3 不同缺氧时间段 Hoechst33342 染色后细胞凋亡情况

A. 正常 12h 组细胞 (荧光); B. 缺氧 6h 组 (荧光); C. 缺氧 12h 组 (荧光); D. 缺氧 24h 组 (荧光)

关于细胞缺氧模型的建立,目前主要采用物理缺氧模型和化学缺氧模型两种。化学缺氧模型是在培养基中加入了化学物质,如在培养基内加入连二亚硫酸钠、氯化钴、氰化物等,使得细胞用氧障碍或耗尽培养基内的氧,其缺点是该模型改变了培养基的化学成分,同时化学物质本身可能会对细胞造成损伤^[4]。物理方法建立低氧模型最理想的装置是三气培养箱,其内的传感装置可以控制 O_2 、 N_2 和 CO_2 的摄入量,一般使用比例为 5% CO_2 、1% O_2 和 94% N_2 ,该模型容易控制,可以设定不同的缺氧浓度^[5];同时进气装置有过滤膜,不易造成污染,目前国际上公认的建立细胞缺氧模型的设备,但该培养箱价格昂贵,国内还没能普及。而混合气体培养法通过自制密闭容器或密闭低氧舱,设置入气口和出气口,持续通入混合气体建立缺氧模型,其价格低、操作简单,可重复性强。笔者借鉴文献报道的混合气体培养法建立的细胞缺氧模型方案,自制密闭有机玻璃盒,以封口膜和石蜡为密封材料^[6];每隔 5min 在出气口抽取气体进行血气分析,保证出气口气体比例与入气口相同;同时加上水盘并把缺氧装置放入 37℃ 的孵箱中,保证密闭装置内的湿度和温度恒定,建立了细胞缺氧装置。通过 MTT 实验和 Hoechst 染色验证缺氧造成了 MMVECs 缺氧损伤,并且 MTT 实验与 Hoechst 染色结果基本一致:即 MMVECs 在缺氧 12h 后开始出现增殖活力明显减低,同时 Hoechst 显示缺氧 12h 细胞开始出现凋亡,并且随着缺氧时间的延长细胞增殖活力继续降低,细胞凋亡数量增加。

MMVECs 缺氧模型的建立为研究糖尿病心肌病等心血管并发症的微血管病变奠定了实验基础。糖尿病心血管病变存在心肌缺血缺氧,首先,心肌微血管密度降低,侧支循环形成障碍是糖尿病性心血管病变主要的病理改变,进而引起心肌血流灌注障碍,导致心肌缺血缺氧^[7]。其次,糖尿病患者尸检心肌标本组织病理学观察结果显示糖尿病心肌间细、小动脉壁明显增厚,有纤维化及玻璃样变性,管腔明显狭窄,提示糖尿病心肌病存在心肌缺血、缺氧^[8]。糖尿病患者因内皮源性的 NO 活性降低和氧化应激增加引起的内皮功能障碍,导致血管收缩、舒张调节功能异常,进而引起组织缺血缺氧^[9]。这表明高糖并不是损伤内皮细胞单一的病理损伤因素,糖尿病心肌微血管病变的发生也与缺氧有关系,这为下一步体外研究高糖叠加缺氧条件下心肌微血管内皮细胞结构和功能的变化以及中药的改善作用打下了实验基础,也为研究糖尿病心肌微血管病的机制提供了理论依据。

参考文献

- 1 Mazure NM, Brahimi - Horn MC, Pouyssegur J. Hypoxic mitochondria: accomplices in resistance[J]. Bull Cancer, 2011, 98(5): 40 - 46
- 2 Virdis A, Taddei S. How to evaluate microvascular organ damage in hypertension: assessment of endothelial function[J]. High Blood Press Cardiovasc Prev, 2011, 18(4): 163 - 167
- 3 李娜,潘明政,张宏. 大鼠心肌微血管内皮细胞的体外原代培养[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(6): 640 - 643
- 4 龚敏,李树清. 体外培养细胞缺氧模型及特点[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 04(1): 157 - 158
- 5 刘琛,王斐,王凤君. 缺氧血管内皮细胞 Rho 激酶信号通路活化与通透性的关系[J]. 中华烧伤杂志, 2012, 28(2): 134 - 137
- 6 卢成志,赵向东,叶绍英,等. 短期缺氧 - 复氧对大鼠血管平滑肌细胞 myocardin 基因表达的影响[J]. 中国综合临床, 2010, 26(5): 455 - 458
- 7 Kota SK, Meher LK, Jammula S, et al. Aberrant angiogenesis: The gateway to diabetic complications[J]. Indian J Endocrinol Metab, 2012, 16(6): 918 - 930
- 8 刘冬戈,乔旭柏,杜俊,等. 糖尿病心肌病的组织病理学观察[J]. 中华病理学杂志, 2007, 36(12): 801 - 804
- 9 Capellini VK, Celotto AC, Baldo CF, et al. Diabetes and vascular disease: basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2010, 8(4): 526 - 544

(收稿日期: 2013 - 01 - 07)

(修回日期: 2013 - 01 - 17)