

视网膜微血管内皮细胞的体外分离和培养方法新进展

杨敏¹, 罗向霞², 王晗¹, 冯玉沛¹

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81460685)

作者单位:¹(730000)中国甘肃省兰州市,甘肃中医药大学;²(730050)中国甘肃省兰州市,甘肃省中医院眼科

作者简介:杨敏,在读硕士研究生,研究方向:中医中药治疗眼底病。

通讯作者:罗向霞,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中医中药治疗眼底病。jessica_lxx@163.com

收稿日期:2016-12-12 修回日期:2017-03-01

Progress on separation and cultivation of retinal microvascular endothelial cells *in vitro*

Min Yang¹, Xiang - Xia Luo², Han Wang¹, Yu - Pei Feng¹

Foundation item: Natural Science Foundation of China (No. 81460685)

¹Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Correspondence to: Xiang - Xia Luo. Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. jessica_lxx@163.com

Received:2016-12-12 Accepted:2017-03-01

Abstract

• There are a variety of ways for isolation and selective cultivation of retinal microvascular endothelial cells *in vitro*, in which the newly reported tissue culture with collagenase digestion method are widely used for simple, economical, high purity and good activity of obtained endothelial cells. As a result of the limitation of person eye donor, researchers often use rat retinal microvascular endothelial cells that are highly homologous to human beings to experiment *in vitro*. In this paper, the methods of culturing retinal microvascular endothelial cells *in vitro* will be elaborated from the aspects of animal species, added factors, cell purification and identification *in vitro*. At the same time, the advantages and disadvantages of these methods in the process of operation are briefly described, which can provide a reference for the researchers to select suitable cultivation methods.

• KEYWORDS: retinal microvascular endothelial cells; cultivation *in vitro*; progress

Citation: Yang M, Luo XX, Wang H, et al. Progress on separation and cultivation of retinal microvascular endothelial cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(4):658-660

摘要

体外分离与选择性培养视网膜微血管内皮细胞的方法有多种,其中新报道的组织块培养结合胶原酶消化法因操作简便、经济,获得的内皮细胞纯度较高、活性良好等优点而被广泛应用。受人眼球供体的限制,研究者通常会选用分离与人高度同源的鼠视网膜微血管内皮细胞(retinal microvascular endothelial cell, RMVEC)进行体外实验。本文就目前常用的视网膜微血管内皮细胞体外培养方法从不同动物种属、添加因子、细胞纯化、体外鉴定等方面进行阐述,同时简要说明众多方法在操作过程中的优缺点,为研究人员选择合适的培养方法提供参考。

关键词:视网膜微血管内皮细胞;体外培养;进展

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.4.17

引用:杨敏,罗向霞,王晗,等.视网膜微血管内皮细胞的体外分离和培养方法新进展.国际眼科杂志 2017;17(4):658-660

0 引言

血管内皮细胞是位于血管内壁的单层扁平细胞,主要参与血管通透性和凝血功能的调节^[1],与全身血管性疾病的发生发展息息相关,而视网膜微血管内皮细胞是糖尿病视网膜病变、视网膜动脉硬化、高血压的眼底改变等病中各种生理、病理性因素的靶细胞^[2-4]。近年来,有学者已经成功在体外培养出脐静脉、脑血管、主动脉、视网膜血管等不同组织来源的血管内皮细胞^[5]。为了更好地研究视网膜血管性病,采用视网膜微血管内皮细胞(retinal microvascular endothelial cell, RMVEC)作为模型细胞更具说服力^[6]。目前,已有研究人员成功培养出人、鼠、牛、恒河猴、羊等动物的视网膜微血管内皮细胞,现就国内外学者报道的视网膜微血管内皮细胞体外分离和培养的可靠方法与原代培养经验做一系统综述。

1 不同物种视网膜微血管内皮细胞的提取和培养的方法

目前报道的可供选择的实验对象有人、鼠、牛、羊、恒河猴等,其中鼠视网膜微血管内皮细胞基因组与人有较大同源性,因其来源简单且经济而被广泛采用^[6]。可采用的培养方法有经典分离法、胰蛋白酶、胶原酶消化分离法、组织块培养结合胶原酶消化法、混合酶分离法。

1.1 人视网膜微血管内皮细胞的提取与培养

1.1.1 经典分离法 使用机械分离获取人视网膜微血管内皮细胞,通过制备视网膜匀浆和细胞筛来获得血管碎片。经机械或剪碎人视网膜,进行胶原酶水浴消化后依次通过不同直径尼龙筛网,将细胞芽接种于明胶包被的培养瓶以获得内皮细胞,置于培养箱进行培养^[7-9]。

1.1.2 胰蛋白酶、胶原酶消化分离法 采用质量分数 20g/L 胰蛋白酶和质量分数 1.33g/L 胶原酶 I,用二步消化法获取人视网膜微血管内皮细胞,并在培养液中添加内皮细胞生长因子(β -ECGF)、胎牛血清和肝素钠,接种于纤维黏连蛋白包被的培养皿,置于培养箱进行培养。此选择性培养法获得的内皮细胞纯度,高于经典分离法所获得的细胞纯度^[10-12]。

1.2 鼠视网膜微血管内皮细胞的提取与培养

1.2.1 经典分离法结合酶二步消化法 陈焱等将经典分离法及胰蛋白酶、胶原酶二步消化法综合运用,采用机械除杂法进行细胞分离而在传代时利用选择性消化和贴壁法分离以获得较纯的鼠视网膜微血管内皮细胞,方便简单,具有良好的重复性^[10,13]。

1.2.2 组织块培养结合胶原酶消化法 崔铮等^[14]对传统的机械分离法进行改良,提出组织块培养结合胶原酶消化法,即用眼科剪剥取大鼠视网膜并将其剪碎成 1mm×1mm 的组织块,经 PBS 冲洗、离心后取沉淀组织,用 1g/L II 型胶原酶消化 20min,制备细胞悬液,接种于纤维粘连蛋白(FN)包被的培养瓶进行培养。因机械分离法对细胞的损伤较大,胰蛋白酶消化对视网膜细胞会产生较大的毒性,此经改良的组织块培养结合胶原酶消化法获得细胞贴壁良好,活性较强,再经高选择性的血管内皮细胞培养基和 FN 促贴壁培养,获得的内皮细胞成活率明显高于单纯的组织培养法,在实际操作中多被研究者采用。

1.3 牛视网膜微血管内皮细胞的提取与培养 混合酶消化法:牛视网膜微血管内皮细胞的体外培养方法与鼠、人等物种的培养方法类似^[15-20]。王征等^[21]通过在细胞消化的过程中添加胶原酶、DNA 酶及蛋白酶 E 进行混合消化,得到了一种高效、高选择性的培养牛视网膜微血管内皮细胞的方法。这种方法避免了以往的胶原酶消化产生的大量 DNA 黏液而使组织成团,影响细胞贴壁及生长,而 DNA 酶能及时将释放的 DNA 分解,蛋白酶可以消化分解血管周围的内皮细胞以得到纯度较高的内皮细胞,简化了实验过程。

1.4 羊视网膜微血管内皮细胞的提取与培养 关于羊视网膜微血管内皮细胞的提取与培养,国内学者暂未进行相关报道,国外学者 Haribalaganesh 等^[22]成功提取并培养了羊视网膜微血管内皮细胞,通过体外剪碎羊视网膜微血管,添加生长因子促进内皮细胞增殖,抑制周细胞生长,获得的内皮细胞生长状况良好,纯度高,建立了一种操作简便、效果良好的羊视网膜微血管内皮细胞的培养方法。

以上四个物种是学者们进行内皮细胞体外培养实验的常用物种,此外亦有学者采用恒河猴、兔、猪等进行此实验研究^[23-26]。

2 添加不同生长因子对体外培养视网膜微血管内皮细胞生长的影响

研究者往往通过在培养基中加入不同的生长因子和各种添加物来促进内皮细胞的贴壁和生长,文献中提到常用的有血管内皮生长因子(VEGF)、胎牛血清(FBS)、肝素钠、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素-转铁蛋白-硒添加物(ITS)、肝素等,这些因子中内皮细胞生长添加剂(EGCS)和纤维粘连蛋白(FN)包被的培养瓶获得了较多的认可^[27-28]。

据文献报道,VEGF 等生长因子、转铁蛋白、肝素、维生素 C、纤维粘连蛋白等能提供足够营养,适量的肝素可

有效抑制成纤维细胞和 VIII 因子免疫反应细胞增生,转铁蛋白、维生素 C 等能显著促进内皮细胞的生长,有利于得到纯度较高且活性良好的内皮细胞^[14]。

3 细胞纯化的不同方法

以往进行细胞纯化多采用过滤-离心法、磁珠标记法、物理刮除法、等密度沉降分离法、生长特性选择法、更换培养液法及单克隆增殖法等^[29-30]。其中等密度沉降分离法需要较多的组织和细胞^[31];磁珠标记法操作复杂、成本较高;机械除杂法需要根据细胞的形态特征刮除杂细胞,主观性强不易操作,易对细胞产生不可逆的损伤,并造成二次污染等缺点^[32];免疫磁珠法分离细胞方法复杂、价格高昂,需专用仪器设备,并且磁珠与细胞结合后难以分离,对细胞的生长有一定影响^[17],以上诸方法均存在缺陷而难以广泛应用。目前研究者多采用添加高选择性的生长因子进行细胞纯化,此方法简化了实验步骤,可多次重复,并获得贴壁良好的内皮细胞。

此外,在传代过程中,亦可采用差速黏附处理法进行细胞纯化:利用 1.25g/L 胰蛋白酶和 0.2g/L EDTA 溶液进行细胞消化,在消化过程中内皮细胞较周细胞敏感,脱壁变圆所需时间较短,该特点可用于内皮细胞进一步纯化,传代后均可获得高纯度的微血管内皮细胞^[18]。该培养技术便于掌握、费用较低,实验结果理想。

4 关于体外鉴定

通常采用倒置相差显微镜观察细胞形态及生长状况,待接种的细胞爬满载玻片后,用多聚甲醛固定,加封闭液孵育,采用 VIII 因子相关抗体、血小板内皮细胞黏附分子(CD31、CD34)免疫进行细胞鉴定。

CD34 是一种在淋巴造血干细胞/祖细胞、胚胎期部分间质细胞和血管内皮细胞中进行表达的单链跨膜糖蛋白,这种糖蛋白主要表达于小血管或新生血管的内皮细胞中。据文献报道,外伤或肿瘤后的新生血管中 CD34 呈高表达,反映出血管内皮处于增生活跃状态^[10]。以往的研究发现, VIII 因子作为血管内皮细胞的特征标志物之一,在培养的视网膜微血管内皮细胞中可稳定表达,因此常用于视网膜微血管内皮细胞的识别和鉴定^[33]。

经 VIII 因子与 CD31、CD34 免疫荧光染色后,内皮细胞会呈现特异性黄绿色荧光反应,其中 VIII 因子染色以细胞核周围的反应最明显,CD31、CD34 因子染色以胞浆着色为主^[11]。

5 小结

对于不同实验动物、实验人员及选用的不同操作方法,实验结果不尽相同,我们认为这种结果与实验动物的个体差异及实验设备、实验人员的操作息息相关。从本文提到的关于视网膜微血管内皮细胞体外分离和培养的 4 个方面综合考量,我们发现:(1)虽然内皮细胞有一个共同的形态,但不同种属的视网膜内皮细胞培养方法也略有不同,采用人视网膜微血管内皮细胞研究人类微血管疾病不存在种间差异,但其材料来源有限,且在分离过程中可获得的视网膜较眼球体积大的物种量少,因此为了获得较多的内皮细胞,应适量增加同浓度的胶原酶以进行消化,另外,研究者需明确不同动物种属各自的特征及局限性,应根据实验要求、研究意义等实际情况,选择合适的实验动物。(2)为了获得较多微血管内皮细胞,往往需要对视网膜进行彻底消化,而控制胶原酶的浓度和消化时间对实验结果影响较大,因此采用温和消化法

并添加高选择性生长因子是实验成功的关键。(3)以往对视网膜内皮细胞分离培养的报道多采用经典分离法及胰蛋白酶、胶原酶二步消化法,但所采用的经典分离法会对培养的细胞造成不可逆的损伤;胰蛋白酶消化视网膜组织对细胞会产生较大的毒性^[14],而胶原酶的消化作用温和且其消化能力不受钙、镁等离子影响,故学者们多采用胶原酶消化结合组织块培养以获得活性较强的内皮细胞,而最新报道的混合酶消化法相较于其他几种培养方法操作简便,实验结果理想,但此方法未见其他研究者报道,故还需大量实验数据给予支持。相信在未来有关视网膜微血管内皮细胞分离与培养的研究中,组织块培养结合胶原酶消化法、混合酶消化法以及其他新的分离培养方法会被更多地应用于实验中,以获取最佳可用于研究的视网膜微血管内皮细胞。

参考文献

- 1 李建桥,江静波,罗燕,等.体外培养人视网膜微血管内皮细胞屏障功能的研究.中国病理生理杂志 2009;25(4):749-754
- 2 Daniel RL, Nagede R, Marc L. Growth modulation of retinal microvascular cells by early and advanced glycation products. *Diabetes Res Clin Prac* 1997;34(3):135-142
- 3 崔丹,王哲,杨向红.大鼠视网膜微血管内皮细胞的分离培养及血管形成体系的建立.辽宁医学院学报 2009;30(5):413-414
- 4 金惠铭.加强微血管病发病机制的研究.中国微循环 2006;10(2):77-78
- 5 闫凤霞,景文莉,金学隆,等.视网膜与脑微血管内皮细胞原代培养方法的进展.中国微循环 2007;11(2):141-144
- 6 Murthi P, So M, Gude NM, et al. Homeobox genes are differentially expressed in macrovascular human umbilical vein endothelial cells and microvascular placental endothelial cells. *Placenta* 2007;28(2):219-223
- 7 刘洪雷,惠延年,刘军,等.改良人视网膜微血管内皮细胞原代培养及鉴定.眼科新进展 2005;25(3):197-200
- 8 Yan Q, Vernon RB, Hendrickson AE, et al. Primary culture and characterization of microvascular endothelial cells from Macaca monkey retina. *Invest Ophthalmol Vis Sic* 1996;37(11):2185-2194
- 9 Capetandes A, Gerritsen ME. Simplified methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(9):1738-1744
- 10 毛羽翔,林少芬,曾美珍,等.改良的人视网膜血管内皮细胞的培养与鉴定方法.中华实验眼科杂志 2013;31(1):8-12
- 11 胡健艳,吴强,宋蓓雯,等.大鼠视网膜微血管内皮细胞的原代培养及鉴定改进.眼科 2012;21(4):261-263
- 12 Zhang XZ, Luo XQ, Jiang JB, et al. Isolation and characterization of fetus human retinal microvascular endothelial cells. *Ophthalmic Res* 2010;44(2):125-130
- 13 陈焱,董晓光,陈楠,等.大鼠视网膜微血管内皮细胞的分离和

培养.眼科新进展 2005;25(5):396-399

- 14 崔铮,闫淑,刘荣,等.鼠视网膜血管内皮细胞体外培养的改良及鉴定.中华实验眼科杂志 2011;29(2):118-120
- 15 叶辉,徐格致,王文吉,等.牛视网膜微血管内皮细胞的体外分离培养.中国眼耳鼻喉科杂志 2005;5(1):20-22
- 16 丁煜,柯根杰,顾永昊.牛视网膜微血管内皮细胞的选择性培养方法.安徽医科大学学报 2012;47(2):222-224
- 17 陈晨.牛视网膜微血管内皮细胞的培养及鉴定.世界临床药物 2009;30(7):411-413
- 18 张朝云,雷闽湘.牛视网膜微血管内皮细胞体外分离与培养的实验研究.现代生物医学进展 2007;7(5):686-688
- 19 Bowman PD, Betz AL, Goldstein GW. Primary culture of microvascular endothelial cells from bovine retina. *In Vitro* 1982;18(7):626-632
- 20 Capetandes A, Gerritsen ME. Simplified methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(9):1738-1744
- 21 王征,齐炜炜,陈少波,等.一种高选择性、高效的牛视网膜微血管内皮细胞培养方法.热带医学杂志 2012;12(1):1-3
- 22 Haribalaganesh R, Banumathi E, Sheikpranbabu S, et al. Isolation and characterization of goat retinal microvascular endothelial cells. *In Vitro Cellular Dev Biol Anim* 2010;46(6):529-537
- 23 周赛君,于德民,于珮.高糖高胰岛素诱导猴视网膜内皮细胞血管新生的研究.2009中国医师协会内分泌代谢科医师分会年会论文汇编 2009;35-37
- 24 韩金栋,颜华.雷帕霉素抑制猴视网膜微血管内皮细胞增生的实验研究.中华实验眼科杂志 2014;32(3):216-219
- 25 侯培.苹果酸舒尼替尼对体外培养的恒河猴脉络膜视网膜血管内皮细胞增殖和迁移的影响.广西医科大学 2010
- 26 孙旭芳,曾水清,王宇哲,等.血管抑素体外对兔视网膜微血管内皮细胞增生的抑制.华中科技大学学报:医学版 2004;33(5):573-575
- 27 徐国兴,李琼,谢茂松,等.视网膜血管内皮细胞的培养与纯化.海峡科学 2010;41(5):29-30
- 28 李斌,唐仕波,林少芬,等.视网膜微血管内皮细胞培养及血管二维模型的建立.中华眼底病杂志 2006;22(2):110-112
- 29 吴练秋,张文健,叶丽亚,等.微血管内皮细胞的分离,纯化和功能特性.医学研究通讯 2004;33(5):29-32
- 30 黄焱,张声.血管内皮细胞的分离纯化进展.福建医科大学学报 2005;39(S1):19-22
- 31 罗静,姜德咏,唐罗生.选择性培养牛视网膜血管内皮细胞和周细胞.眼科新进展 2004;24(1):22-25
- 32 Matsubara T, Murata T, Wu GS, et al. Isolation and culture of rat retinal microvessel endothelial cells using magnetic beads coated with antibodies to PECAM-1. *Curr Eye Res* 2000;20(1):1-7
- 33 Rosenberg JB, Greengard JS, Montgomery RR. Genetic induction of a releasable pool of factor VIII in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(12):2689-2695