

周细胞的原代培养*

周 敏 翟丽丽 齐 蕾 单丽辉 柴翠翠 韩 伟 王立峰[△]

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 探讨 Wistar 大鼠视网膜毛细血管周细胞(pericyte, PC)的原代培养和鉴定方法。方法 结合视网膜微血管的消化分离, 采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基选择性培养 PC, 通过活细胞观察原代 PC 的形态、生长特性以及与血管碎片之间的关系, 同时应用免疫细胞化学染色来鉴定 PC。结果 选择性培养获得的 PC 的纯度达到 95%以上, 并能连续传代。该细胞呈长梭形或星芒状, 漩涡或栅栏状生长, 无接触性抑制, 单核, 偶见双核, 核卵圆形, 细胞浆丰富, α -SMA、PDGFR- β 染色阳性。结论 通过对视网膜微血管的消化分离能够获得较为纯净的 PC。

关键词 视网膜; 周细胞; 细胞培养

中图分类号: Q95-3, Q813 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)01-36-03

The Primary Culture of pericytes*

ZHOU Min, ZHAI Li-li, QI Lei, SHAN Li-hui, CHAI Cui-cui, HAN Wei, WANG Li-feng[△]

(Department of Pathology, the First Hospital of Harbin Medical University, 150001, Harbin, China)

ABSTRACT Objectives: To cultivate purify and identify pericytes derived from rat retinal capillaries. **Methods:** We combined the methods of digestion and distinguish of retinal capillary, used Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 20% fetal bovine serum, rat retinal capillary pericytes were cultured in vitro with digesting culture method of retinal microvasculature, and the cultured cells were identified by immunohistochemical staining. The morphous of pericytes, growth character and relationship between vascular fragment and the cells cultured in vitro were observed by using inverted microscope. **Results:** The purity of the cells cultured in vitro was higher than 95%, and the cells could be continued serially. The shape of pericyte was long fusiform, asterism, whirlpool or palisade, no restraint with contact, mononuclear occasional dikaryon, nucleus ovoid, cytoplasm rich, α -SMA and PDGFR- β were positive. **Conclusion:** Higher purity retinal capillary PC cultured in vitro can be obtained through the selective culture method.

Key words: Retina; Pericyte; Cell culture

Chinese Library Classification: Q95-3, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-36-03

前言

1923 年 Zimmermann 首先提出周细胞(pericyte, PC)这一概念, 后又称 Rouget 细胞或壁细胞, PC 是微血管的必要组成成分之一, 它与血管内皮细胞相互作用, 在调节体内血管发育、稳定、成熟以及血管重塑中起到重要作用, 并且其在肿瘤新生血管以及肿瘤的侵袭转移过程中所扮演的角色逐渐引起人们的关注。本研究从大鼠视网膜分离毛细血管 PC, 为进一步研究 PC 的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 所需试剂及实验用品 DMEM 低糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司), 胰蛋白酶(美国 Amersco 公司), EDTA、2Na₂H₂O(上海华舜生物工程有限公司), 型胶原酶(美国 Amersco 公司), 青霉素(河南新乡华星药厂), 链霉素(大连美罗大药厂), PBS(福州迈新生物试剂有限公司), 鼠抗人 α -SMA

单克隆抗体(福州迈新生物技术有限公司, 1A4), 兔抗大鼠 PDGFR- β (武汉博士德生物工程有限公司), 兔抗鼠 CD31 单克隆抗体(北京泉晖新商贸有限公司, 1A10), 兔抗大鼠 GFAP 多克隆抗体(北京泉晖新商贸有限公司), 通用型二步法检测试剂盒(PV6000)、DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)。脱水机(Shandon 英国 Scientific 有限公司, Serial No.1253), 微量加样器(Nichiryo, 日本 Nichiryo 有限公司制造, 型号 5000DG), 电热恒温水浴箱(上海医疗器械七厂制造, 型号 HH·W21·Cu600) 眼科剪, 镊子, 平皿。

1.1.2 大鼠 Wistar 大鼠 4-6 只, 3-4 周龄, 购自哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 PC 的原代培养 参见 Lee CS^[1]等所应用的实验方法并加以改进。脱髓处死大鼠, 应用眼科剪立即摘取眼球, 浸泡于 75% 酒精当中 0.5min, 取出放入含 1000 μ /ml 青霉素、1000 μ g/ml 链霉素的无菌 PBS 中 15min, 于操作台内进行后续实验。应用眼科剪沿眼角膜缘剪开眼球, 将眼内容物去除, 尽可能的去除色

* 基金项目 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1155G33)、黑龙江省自然科学基金项目(D201103)

作者简介 周敏(1974-)女, 本科, 主管技师。主要研究方向 肿瘤病理学, 作者所在科室为国家临床重点专科,

E-mail: xianqianjie6@163.com

[△]通讯作者 王立峰, 电话: Tel:13604805297 E-mail: hljwlf@yahoo.cn

(收稿日期:2011-09-05 接受日期:2011-09-30)

素细胞层,同时尽量去除眼周肌肉以及视神经,应用无菌的PBS反复冲洗几次,剪成0.5mm大小的组织块,放入事先准备好的2g/L的型胶原酶当中,于37℃下消化45min,冷牛血清和Hanks液保护细胞并终止消化,200目筛网过滤,离心(1000 r/min × 10min),沉渣于无血清DMEM重悬,离心(1000 r/min × 3min),所得沉淀应用10%胎牛血清的DMEM重悬,接种于一次性培养瓶中,一般4-6只3-4周龄大鼠鼠眼可接种50ml培养瓶一瓶,37℃、95%湿度、5% CO₂培养箱中培养,48h后首次换液,以后视情况每2-3d换液一次,直至细胞长满瓶底。

1.2.2 PC的传代及纯化 原代培养的细胞长满瓶底>80%后,往培养瓶中加入0.05%胰蛋白酶+0.02% EDTA.2Na.2H₂O 0.5ml,室温下置于相差倒置显微镜下观察,细胞胞质回缩,细胞间隙变大,细胞变圆,立即加入适量含血清的DMEM培养基终止消化。用吸管轻轻吹打制成单细胞悬液,1000r/min离心3min,弃上清,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基,1:2传代。传至3-5代即已自然纯化。

1.2.3 活细胞的形态学观察 在相差倒置显微镜下观察细胞形态及生长状态。

1.2.4 免疫细胞化学染色 常规细胞爬片,4%中性甲醛固定30min,按照试剂盒说明书进行免疫细胞化学染色。以胞浆中出现黄色或棕黄色颗粒作为阳性染色。

2 结果

经眼科剪剪碎、型胶原酶消化,200目滤网过滤后所获得的培养标本,在相差倒置显微镜下观察发现,培养基中有大量的血管碎片及游离的圆形、透明清亮的单个细胞或细胞团块,培养3-5d后,可见PC从毛细血管碎片中迁移、长出,自然分开并呈不规则状,贴壁生长,经过换液,血管片段被冲洗掉,7d左右,PC呈集落、团块生长,14d左右,团块间融合,细胞无接触抑制和重叠生长。经0.25%胰蛋白酶、0.02% EDTA.2Na.2H₂O联合消化传代后,PC生长速度增快,大约7d左右便可传一代,在原代细胞培养当中,会混杂有少量的神经细胞(呈星芒状),经过几次传代及PC多量呈优势生长的特点,神经细胞会逐渐消失,而PC在传代过程中,形态未发生改变,呈长梭形、三角形,少部分呈多边形,单核、双核,极个别呈多核,无接触性抑制生长。HE染色,PC呈长梭形或三角形,胞浆丰富,嗜酸性,胞核位于胞体中央,圆形或长椭圆形,少数双核,极个别多核,细胞呈放射状或束状排列,部分细胞排列紊乱,交叉重叠生长,无接触性抑制(图1)。免疫细胞化学染色PC α-SMA、PDGFR-β阳性表达,而内皮细胞CD31与视神经细胞GFAP阴性表达,说明本实验原代培养的PC中不混杂有内皮细胞和视神经细胞(图2)。

3 讨论

随着科技的发展以及人们对疾病研究的深入,影响疾病发生发展机制但没有被人们认识的因素逐渐受到重视。PC自1923年由Zimmermann提出后,最近10年,一些文献对其在微血管疾病,尤其是糖尿病视网膜病变当中所发生的病理变化以及其所起的作用有所报道,PC在肿瘤组织当中所扮演的角色也正受到人们的关注。通过应用desmin、α-SMA标记PC发现

其存在各种肿瘤组织当中,但PC的异型性明显^[2]。在血管周围,PC的覆盖率降低与前列腺癌细胞的血道转移有关,而且随着肿瘤级别的增加,PC的覆盖率逐渐减少,同时,PC的覆盖率减少亦促进了内皮细胞的迁移,增加了肿瘤血管密度^[3]。脑组织肿瘤当中,骨髓源性的PC在脑组织肿瘤血管形成当中起到重要的作用^[4]。目前研究发现,肿瘤血管结构与正常血管不同,对于这一特点形成的机制,Yvonne Reiss等^[5]做了相关研究,指出Ang-1/Tie2信号通路在肿瘤血管稳定性方面扮演重要的角色,同时Ang-2对于PC在肿瘤血管壁的缺失是至关重要的。Xi-anXJ等^[6]通过转基因大鼠胰岛B细胞瘤模型验证了PC对于限制癌细胞的血道转移起到重要的作用。可见PC在疾病当中所起的作用逐渐引起人们的重视,而对PC的培养以及后续深入研究PC显得至关重要。

对于PC的标志物,仍不明确,但目前主要运用几个标志物的结合来鉴定PC:平滑肌肌球蛋白、原肌球蛋白、cGMP依赖性蛋白激酶、α-SMA和desmin,另外还包括神经元胶质细胞抗原2(neuroglial cell 2 chondroitin sulfate proteoglycan, NG2)、血小板源性生长因子受体2(platelet-derived growth factor-β, PDGFR-β)、氨肽酶A、氨肽酶N、G蛋白信号调节因子5(regulator of G protein signaling 5, RGS-5)、间隙连接蛋白43(the gap junction protein43, Cx43)、转基因启动子XlacZ4,以及新近发现的CD248^[7]。研究人员在对大鼠骨骼肌来源的PC进行培养,运用Western blots、流式细胞术及免疫组织化学的方法,发现80%-90%PC亚群至少表达以上标志物的一种或几种,并且在PC与PC接触的界面,会有Cx43的表达^[8]。本实验运用抗α-SMA及抗PDGFR-β抗体相结合来鉴定PC,并采用对内皮细胞标记物CD31、神经细胞标记GFAP的检测来观察是否混杂内皮细胞及视神经细胞。

相关PC的文献,主要见诸于糖尿病视网膜膜病变的报道^[9-10],在糖尿病视网膜膜病变当中,PC缺失或是功能失调。而在肿瘤组织当中,很多学者研究发现^[11],肿瘤新生血管扭曲、扩张、动静脉短路以及分叉,血管周围PC的覆盖率降低以及基底膜变薄,血管的通透性增加。不同的疾病形成了同一病理特点--PC的缺失,在血管周围的覆盖率下调。由于PC在全身各部位血管覆盖率中,视网膜血管壁PC的覆盖率最大(视网膜>肺>

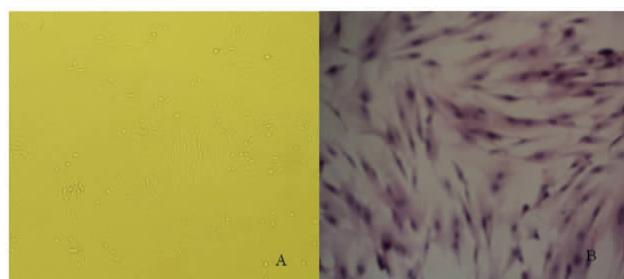


图1 大鼠视网膜PC的原代培养 A 活细胞观察,PC呈长梭形、三角形,少部分呈多边形,栅栏或旋涡状生长,无接触抑制、重叠生长(100×); B HE染色(250×)

Fig. 1 The primary culture of rat retinal PC: A: differences observed under inverted microscope, PC fusiform, triangle, polygon, palisade or vortex growing, no contact inhibition, overlapping growth(100×); B: The cells in HE staining(250×)

骨骼肌 > 心肌 > 肾上腺),且视网膜的血管丰富,因此本实验采用视网膜作为 PC 的培养组织来源,应用传统的酶消化法,同时借鉴国内外相关的 PC 培养操作规范,成功的培养了 PC,纯度达 95%以上。在 PC 培养的过程当中,一定要注意无菌操作,所用的培养基为低糖的 DMEM 而且不加内皮细胞生长所需要的明胶、纤维连接素、肝素等促进细胞贴附、生长的物质。而且

据文献报道,生长的过程中周细胞能分泌 TGF- β 抑制内皮细胞的生长^[12],所以利于 PC 的除杂提纯,同时在操作中尽可能的将视网膜色素上皮层、眼外杂肌、视神经剔除,再经过传代,可以获得较为纯净的 PC,并用形态学观察及免疫细胞化学技术加以鉴定。

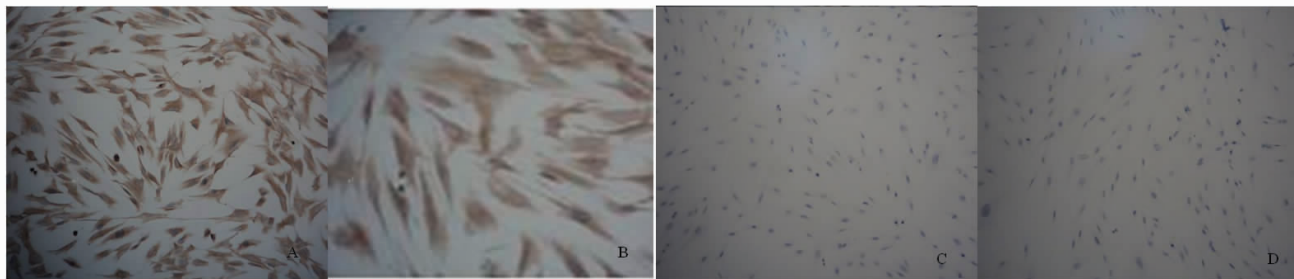


图 2 大鼠视网膜周细胞的原代培养 免疫细胞化学染色 A: PC α -SMA 阳性表达 胞浆呈棕褐色(250 \times)。B: PC 阳性表达 PDGFR- β 胞浆呈棕褐色(400 \times)。C 培养的细胞中 CD31 阴性表达(100 \times)。D GFAP 阴性表达(100 \times)

Fig.2 Rat retinal pericytes in primary culture: immunocytochemistry, A: α -SMA expression of PC, brown cytoplasm (250 \times); B: PC-positive expression of PDGFR- β , brown cytoplasm (400 \times); C and D: Anti-CD31 neutralizing antibody and Anti-GFAP neutralizing antibody were used to detect the endothelial cells and optic nerve cells, but expressions were negative (100 \times)

参考文献(References)

- [1] Lee CS, Patton WF, Welch ET, et al. Selective propagation of retinal pericytes in mixed microvascular cell cultures using L2leucine2 methyl ester[J]. Biotechniques, 1998, 25: 482-494
- [2] Shu NC, Mori KW, Peter B, et al. Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors [J]. Am J Pathol, 2002, 160: 985-1000
- [3] Wele'n K, Jennbacken K, Tes'ann T, et al. Pericyte coverage decreases invasion of tumour cells into blood vessels in prostate cancer xenografts[J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2009, 12: 41-46
- [4] Bababeygy SR, Cheshier SH, Hou LC, et al. Hematopoietic Stem Cell-Derived Pericytic Cells in Brain Tumor Angio-Architecture[J]. Stem cells and development, 2008, 17: 11-18
- [5] Yvonne R, Anette K, Andrea OT, et al. Switching of vascular phenotypes within a murine breast cancer model induced by angiopoietin-2 [J]. J Pathol, 2009, 217: 571-580
- [6] Xian XJ, Håkansson J, Ståhlberg A, et al. Pericytes limit tumor cell metastasis[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 642-651
- [7] Bagley RG, Honma N, Weber W, et al. Endosialin/TEM 1/CD248 is a pericyte marker of embryonic and tumor neovascularization [J]. Microvasc Res, 2008, 76(3): 180-188
- [8] Mogensen C, Bergner B, Wallner S, et al. Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle[J]. Acta Physiol, 2010, 201(4): 413-426
- [9] 陈百华, 龙剑锋, 姜德咏, 等. 超氧化物歧化酶在视网膜毛细血管周细胞凋亡中的活性及意义[J]. 眼科研究, 2007, 25 (5) : 3212-3224
Chen Bai-hua, Long Jian-feng, Jiang De-yong, et al. Effect of superoxide dismutase on apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured retinal microvascular pericytes [J]. Chin Ophthalmol Res, 2007, 25 (5) : 3212-3224 (In Chinese)
- [10] 刘洪雷, 刘军, 张自峰, 等. TNF2 α 对培养视网膜微血管内皮细胞与周细胞 PDGF2B /PDGFR2 β 表达的作用 [J]. 国际眼科杂志, 2008, 8 (12) : 2387-2390
Liu Hong-Lei, Liu Jun, Zhang Zi-Feng, et al. Effects of TNF2 α on the expression of PDGF2B and PDGFR2 β of retinal microvessel endothelial cells and pericytes [J]. Int J Ophthalmol, 2008, 8 (12): 2387-2390 (In Chinese)
- [11] Yoshikuni, Yonenaga, Akira M, et al. Absence of Smooth Muscle Actin-Positive Pericyte Coverage of Tumor Vessels Correlates with Hematogenous Metastasis and Prognosis of Colorectal Cancer Patients[J]. Oncology, 2005, 69: 159-166
- [12] Orlidge AD, Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells[J]. J Cel Biol, 1988, 105: 1455