

人脐静脉内皮细胞培养液的选择

郭梦龙, 包小丹, 刘巧利, 全克玲, 井长勤, 王文锋

(新乡医学院 生命科学技术学院, 河南 新乡 453003)

摘 要:目的:筛选出人脐静脉内皮细胞(HUVECs)原代、传代最适培养液. 方法:0.02% II型胶原酶灌注脐静脉消化15 min获得细胞,用不同的培养液培养. 24 h后观察细胞贴壁状况,细胞计数法得到贴壁细胞数量;内皮细胞标志性蛋白vWF进行细胞鉴定. 传代培养后,用MTT法比较不同培养液对HUVECs活力的影响. 结果:用含ECGS、20% FBS的ECM组进行原代培养,可获得贴壁细胞数量最多的HUVECs,且与其他组间有显著差异;用含30 ng·mL⁻¹ VEGF165、10% FBS的M199进行传代培养,HUVECs活力较ECM组无明显差异. 结论:HUVECs原代、传代培养分别选用优化后的培养液,既保证原代HUVECs的质量和数量,又使传代培养成本降低60.8%.

关键词:人脐静脉内皮细胞;原代和传代培养;细胞鉴定;培养条件优化

中图分类号:Q256

文献标志码:A

血管内皮细胞(Endothelial Cells, ECs)通过调节血压、凝血与抗凝,从而保持血管的通畅及血液的正常流动. 血管内皮细胞功能的紊乱可引起一系列血管相关性疾病,如:动脉粥样硬化、血栓等. 因而血管内皮细胞已成为研究血管新生及血管相关疾病的重要体外模型^[1]. 血管内皮细胞株如ECV-304、HUVEC-12等都属永生化细胞,这些细胞与原代内皮细胞相比其遗传物质已发生改变. 且这些细胞株在体外模拟的环境与真正的血管内皮环境存在较大差异. 原代细胞由于培养代数短,其遗传物质很少发生改变,细胞代表性好. 因此,建立一种经济实用的血管内皮细胞原代培养方法十分必要^[2].

人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs)因取材容易,分离操作简单,已成为体外研究血管功能实验的主要细胞^[3]. HUVECs分离技术自创立以来,经过了诸多的改进,其分离技术已日益完善,但想要成功培养HUVECs并不容易. HUVECs对培养条件要求高,培养液的选择是决定培养成败的关键因素.

目前HUVECs原代、传代培养主要选用ECM培养液. 包含胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、内皮细胞生长添加剂(Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS)的ECM培养液是针对正常人类血管或微血管内皮细胞体外培养而设计的一种完全培养液,适于人类血管或微血管内皮细胞生长. 但ECM培养液每500 mL售价约为1500元,且其FBS浓度仅为5%. 预实验发现5% FBS并不能满足原代HUVECs的生长需要,因此还需额外添加FBS. 高血清和ECM培养液使HUVECs的培养成本一直居高不下,这严重限制了HUVECs的培养规模,影响后续实验进展. 因而亟待对HUVECs培养液进行优化,降低培养成本.

本实验在借鉴其他学者^[4-7]原代分离和培养HUVECs的基础上,通过探索替换ECM培养液中的基础培养液和ECGS,来降低HUVECs的培养成本,并取得了理想的效果,为进一步研究血管内皮细胞的功能及阐明相关疾病的生理和病理机制提供了很好的基础.

收稿日期:2016-06-14;修回日期:2016-08-01.

基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(142102310045;152102210126);新乡医学院培育基金(20132D109).

第1作者简介:郭梦龙(1991-),男,河南汝州人,新乡医学院在读研究生,主要从事细胞免疫方面的研究.

通信作者:王文锋(1976-),女,河南长垣人,新乡医学院副教授,博士,主要从事细胞免疫方面的研究, E-mail:wwf200594@163.com.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用新生儿脐带取自新乡医学院第三附属医院,正常娩出,实验方案经医院伦理委员会批准,产妇及家属均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

ECM培养液、胎牛血清、内皮细胞生长添加剂,购于Sciencell;L-DMEM培养液、M199培养液,购于Hyclone;血管内皮细胞生长因子165,购于金斯瑞生物科技有限公司;兔抗人第Ⅷ因子vWF抗体,购于Solarbio;山羊抗兔IgG-FITC抗体,购于北京中杉金桥公司;青-链霉素、明胶、 $10\times$ 多聚赖氨酸、多聚甲醛、0.25%胰蛋白酶溶液、Ⅱ型胶原酶,购于北京鼎国昌盛生物技术公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 HUVECs的分离

无菌条件下取健康产妇正常分娩后的新鲜脐带约10 cm(4 h内),剪去脐带两端的止血钳夹痕,并处理血肿的部分;在脐带静脉的一端插入灌胃针,用含1.0%青-链霉素的生理盐水反复冲洗脐静脉至流出液澄清;将脐静脉另一端用止血钳钳闭,通过灌胃针向脐静脉注入0.02%Ⅱ型胶原酶至静脉管腔完全充盈;将脐带连同止血钳置于含1.0%青-链霉素的生理盐水中37℃水浴15 min;期间每隔5 min用手轻按脐带帮助细胞消化,15 min后收集脐静脉消化液,并用含10%FBS的L-DMEM培养液冲洗脐静脉,将消化液和冲洗液吹打均匀。

1.3.2 HUVECs的原代培养及分组

将混匀的消化液和冲洗液等分到9个离心管中进行离心($1000\times g$,5 min),弃上清;分别加入含ECGS、10%、20%FBS的ECM,L-DMEM和M199培养液各4 mL,并轻轻吹打使细胞均匀分布;将细胞悬液分别接种于一次性培养瓶(多聚赖氨酸包被)中,37℃、5%CO₂培养箱中培养;24 h后更换培养液以去除残余红细胞和其他未贴壁细胞,随后每3 d换液1次。试验重复4次。

1.3.3 原代HUVECs的细胞形态及免疫荧光鉴定

细胞玻片PBS浸洗3次;4%多聚甲醛固定15 min,PBS浸洗3次;0.2% TritonX-100破膜10 min,PBS浸洗3次;10%山羊血清室温封片30 min;vWF一抗稀释液(1:100),4℃孵育过夜,PBS-T浸洗玻片3次;荧光二抗,37℃孵育1 h,PBS-T浸洗3次;含DAPI的抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察(图4)。

1.3.4 HUVECs的传代培养及分组

将用ECGS+20%FBS+ECM培养液培养好的原代HUVECs细胞,用常规方法进行传代操作,传代培养选用ECGS+10%FBS+ECM,ECGS+20%FBS+ECM,ECGS+10%FBS+M199,ECGS+20%FBS+M199培养液,来测定不同血清浓度的ECM,M199对HUVECs传代培养的影响(图5)。传代培养选用10%FBS+M199作为基础培养液,分别添加ECGS和10、20、30、50、100 ng·mL⁻¹VEGF165来测定不同浓度的VEGF165对HUVECs传代培养的影响(图6)。用3代HUVECs重复试验3次。

1.3.5 MTT法测细胞活力

将细胞悬液接种到96孔板,每孔200 μL,约 1×10^4 个细胞,在培养箱中孵育24 h;孵育结束后向每孔加20 μL MTT溶液,继续在培养箱中孵育4 h;之后吸出96孔板中的上清液,然后每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min;在酶标仪上测各孔在490 nm处吸收值。

1.3.6 相对细胞活力计算

相对细胞活力=(实验组-空白组)/(对照组-空白组)。

1.3.7 统计学分析

采用GraphPad Prism 5,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示实验结果。多组数据之间的比较采用单因素方差分析(Analysis of Variance,ANOVA)。P<0.05为差别有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 不同培养液培养所分细胞 24 h 后贴壁细胞的数量

实验结果显示,原代 HUVECs 培养 24 h 后,除了 10%FBS 的 ECM、M199 和 20%FBS 的 ECM、M199 培养组贴壁细胞较多外(图 1),其他组几乎没有细胞贴壁. 对贴壁细胞较多组,胰酶消化离心去上清,500 μ L 培养液重悬细胞进行细胞计数,20%FBS 的 ECM 培养组得到的贴壁细胞最多,且与其他组有极其显著差异(图 2).

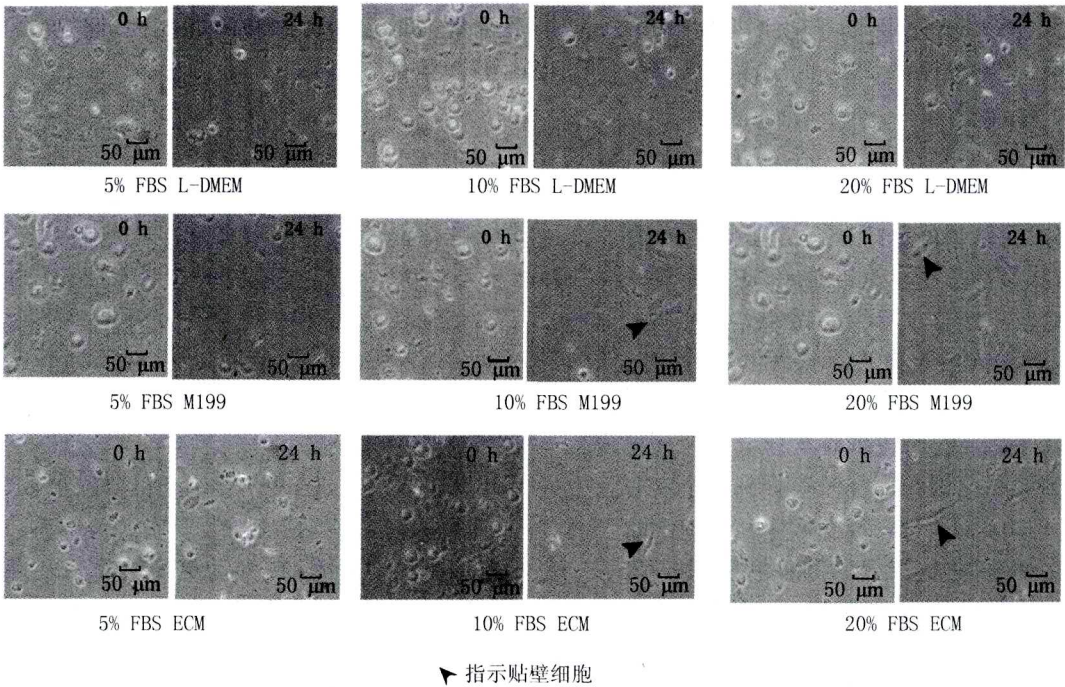
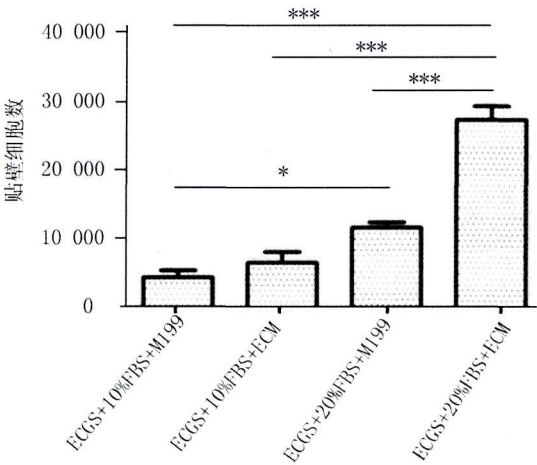


图1 不同培养液培养原代HUVECs 24 h后贴壁细胞数贴壁状况

2.2 原代细胞贴壁形态及 vWF 免疫荧光鉴定

贴壁细胞呈长梭形,且呈单层铺路石状排列(图 3). 采用内皮细胞标志性蛋白 vWF 进行细胞鉴定,免疫荧光检测结果显示:细胞内有大量的绿色荧光颗粒(图 4),及其第Ⅷ因子相关抗原呈阳性反应. 表明分离的细胞是 HUVEC.



图注: *代表 $P<0.05$; ***代表 $P<0.001$.
图2 不同培养液培养原代HUVECs 24 h后贴壁细胞数

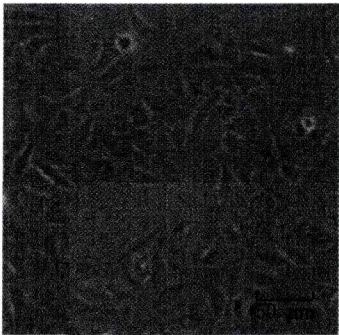


图3 原代细胞贴壁形态

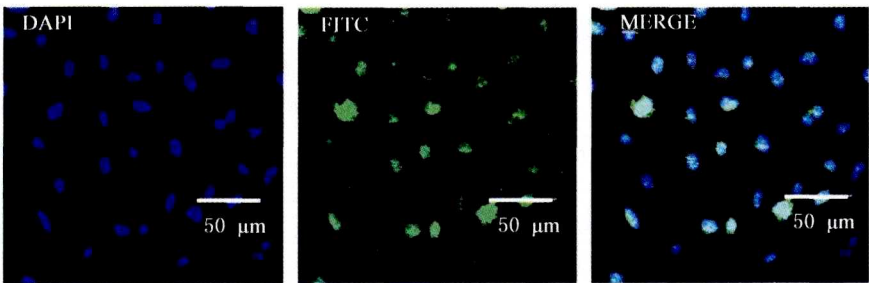


图4 内皮细胞标志性蛋白vWF免疫荧光鉴定图

2.3 传代培养中不同培养液对 HUVECs 活力的影响

对于第二代细胞,分别用含 10%和 20%FBS 的 M199、ECM 完全培养液进行培养.实验结果显示用含 10%FBS 的 M 199 完全培养在传代液培养 HUVECs 时其效果与用含 10%、20%FBS 的 ECM 完全培养液培养时并无明显差异($P>0.05$).

2.4 传代培养中不同浓度的 VEGF165 对 HUVECs 活力的影响

在传代培养中我们用不同浓度的 VEGF165 来代替 ECGS 来作为 HUVECs 培养的生长因子.实验结果显示,30 ng · mL⁻¹ VEGF165 组与 ECGS 组无明显差异($P>0.05$).

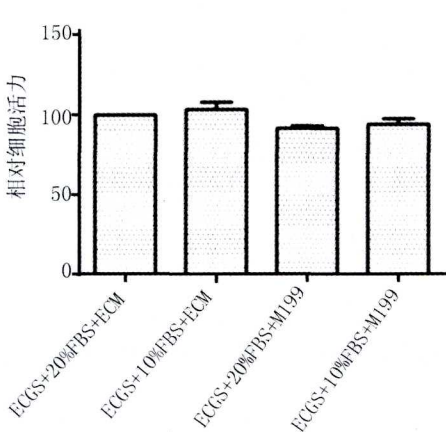


图5 传代培养中不同培养液对HUVECs活力的影响

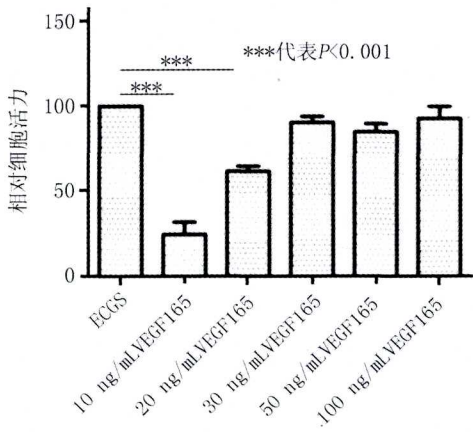


图6 传代培养中不同浓度VEGF165对HUVECs活力的影响

3 讨 论

用酶消化法得到的原代 HUVECs 受损大,且细胞生存环境发生改变,而传代培养的 HUVECs 没有受到损伤且已经适应体外培养环境,因而原代 HUVECs 和传代培养的 HUVECs 对营养的需求并不相同.我们把原代、传代 HUVECs 的培养区分开,用不同的培养液来进行 HUVECs 的原代、传代培养,筛选出最适合原代 HUVECs 的培养液,以及最经济的传代 HUVECs 培养液.

胎牛血清在细胞培养中占据一个很重要的角色,其含有各种血浆蛋白、多肽、脂肪、碳水化合物、生长因子、激素和无机盐等成分,这些物质或促进细胞生长或抑制生长活性,使细胞维持正常的生理平衡.血清浓度过高或过低都会抑制正常细胞的分裂及生长.经试验证明,培养原代 HUVECs 时,血清浓度为 20%最为合适.培养传代 HUVECs 时,血清浓度为 10%最为合适.

培养基是为细胞提供生长和增殖的生存环境.通过实验验证,原代 HUVECs 用 ECM 培养基可使细胞贴壁数显著增加,大大缩短原代 HUVECs 培养时间.而在传代培养 HUVECs 过程中用 M199 培养基即可满足 HUVECs 的正常增殖需要,降低培养成本.

对 HUVECs 的培养来说生长因子是必不可少的^[8]. ECM 培养基中所带的 ECGS 提取自胎牛脑垂体的包含多种促内皮细胞生长的因子的混合物,其中主要起作用的是 FGF 家族,还有一些起辅助作用的激素和其他生长因子.而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为上调血管生成的重要因素,能特异地直接作用于血管内皮细胞,诱导血管内皮细胞增殖、迁徙及血管腔形成,进而导致新生血管的生成^[9], VEGF165 是 VEGF 家族的主要成员.本实验通过给予体外培养的 HUVECs 不同浓度 VEGF165,发现 VEGF165 能够促进 HUVECs 增殖,且在一定浓度范围内,其作用效果呈剂量依赖性.实验表明,添加质量浓度为 30 ng/mL 的 VEGF165 即可替代 ECGS.

就传代培养 HUVECs 的成本而言,选用含 30 ng · mL⁻¹ VEGF165 + 10% FBS 的 M199 培养液,每 500 mL 成本为 800 元(商品化的 M199 培养液售价约为 50 元,加上 FBS, Sciencell, 500 mL, 3600 元; VEGF165, 金斯瑞生物科, 50 μg, 1300 元),较 20% FBS 的 ECM 培养液(每 500 mL, 2040 元)降低了 60.8%.这使得一般实验室即可扩大 HUVECs 的培养规模.

综上所述,区别对待 HUVECs 原代、传代培养,既能保证原代 HUVECs 的质量和数量,又能使传代培养成本显著降低.

参 考 文 献

- [1] SIOW R C. Culture of human endothelial cells from umbilical veins[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 806: 265-274.
- [2] 古力热巴, 聂永梅, 马依彤, 等. 原代脐静脉内皮细胞与脐静脉内皮细胞株的培养方法及生物特性的比较[J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11(10): 729-733.
- [3] 董 微, 许群星, 韩玉环, 等. 脐带血清在脐静脉内皮细胞培养中的应用[J]. *重庆医学*, 2011, 40(22): 2249-2251.
- [4] 马振华, 张连杰, 马艳琴. 人脐静脉内皮细胞分离培养方法的建立及优化[J]. *山西农业大学学报*, 2015, 35(3): 285-289.
- [5] 冉娅娟, 魏 来, 李 颀, 等. 原代人脐静脉内皮细胞体外培养方法的改进与鉴定[J]. *医药前沿*, 2014(28): 17-18.
- [6] 黎胜苗, 罗春芬, 卢兰琴, 等. 原代人脐静脉内皮细胞分离培养模型的建立[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(5): 94-96.
- [7] 延 芳, 孙 侃. 人脐静脉血管内皮细胞培养、冻存、复苏与鉴定[J]. *农垦医学*, 2011, 33(6): 486-489.
- [8] LYONS JM III, SCHWIMER J E, ANTHONY C T, et al. The role of VEGF pathways in human physiologic and pathologic angiogenesis[J]. *Journal of surgical Research*, 2010, 159(1): 517-527.
- [9] HARJES U, BRIDGES E, MCINTYRE A, et al. Fatty acid binding protein 4, a point of convergence for angiogenic and metabolic signalling pathways in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 23168-23176.

Selection of Human Umbilical Vein Endothelial Cell Culture Medium

GUO Menglong, BAO Xiaodan, LIU Qiaoli, QUAN Keling, JING Changqin, WANG Wenfeng

(College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objective: Screen the optimum medium in primary culture and subculture of HUVECs. Methods: Cells were obtained by 0.02% type II collagenase perfusion of umbilical vein to digest 15 min and cultured in different medium. Observe cell adherence status after 24 h and the number of cells was calculated by cell counting method; Identify endothelial cell by marker protein vWF. After subculture, the effect of different culture solution on the activity of HUVECs was compared via the MTT method. Results: The largest number of HUVECs were harvested using ECM medium with ECGS, 20% FBS in primary culture, which exhibited significant differences with the other groups; HUVECs were subcultured by M199 medium containing 30 ng · mL⁻¹ VEGF165 and 10% FBS, but the difference of HUVECs viability was not obvious compared with the ECM group. Conclusion: Use optimized medium for primary culture and subculture of HUVECs to ensure the quality and quantity of the original HUVECs and reduce the cost of passage culture by 60.8%.

Keywords: HUVECs; primary culture; subculture; cytology; optimization of culture medium