

猪主动脉瓣内皮细胞的分离与鉴定

张煜 李宁 白一帆 刘晓红 龚德军 徐志云

【摘要】 目的:探讨胶原酶消化法分离猪主动脉瓣内皮细胞的可靠性及可重复性。

方法:通过胶原酶消化法从新鲜猪主动脉瓣膜表面分离并培养主动脉瓣内皮细胞,通过免疫荧光染色法和流式细胞仪对获得的瓣膜内皮细胞(VEC)的表型加以鉴定。 结果:通过胶原酶消化法可成功分离 VEC,光镜下 VEC 呈铺路石样分布,为典型的内皮细胞形态。免疫荧光染色示 VEC 的 CD31 表达为阳性,波形蛋白(Vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达为阴性,分离获得的细胞中 VEC 阳性率高,间质细胞污染率较低;流式细胞仪示分离获得的细胞 Vimentin 表达阴性(3.06%),CD31 表达阳性(99.01%),再次验证分离获得的 VEC 纯度高。 结论:胶原酶消化法可从猪主动脉瓣膜分离获得纯度较高的 VEC,该方法简单,可重复性好。

【关键词】 主动脉瓣内皮细胞;细胞培养;细胞表型鉴定

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.01.011

Isolation and identification of endothelial cells from porcine aortic valve ZHANG Yu, LI Ning, BAI Yifan, LIU Xiaohong, GONG Dejun, XU Zhiyun Department of Cardiac Surgery, Changhai Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China

【Abstract】 Objective: To investigate the reliability and reproducibility of isolating endothelial cells from porcine aortic valve by collagenase digestion. **Methods:** The aortic valve endothelial cells (VECs) were isolated and cultured from fresh porcine aortic valve surface by collagenase digestion. Immunofluorescence staining and flow cytometry were used to identify the phenotype of VECs.

Results: The cells isolated presented typical morphology of endothelial cells, arranging as paving stones under light microscopy. VEC could be successfully isolated by collagenase digestion. Immunofluorescence staining showed that CD31 was positive, while Vimentin and α -SMA were negative in VECs, indicating that positive rate of VECs in cells isolated was high and contamination rate by interstitial cells was low. It was verified by flow cytometry, which showed that Vimentin positive rate was 3.06% and CD31 positive rate was 99.01% in cells isolated. **Conclusions:** Collagenase digestion can be used to isolate aortic high-pure VECs from porcine aortic valve. This method is simple and reproducible.

【Key words】 Aortic valve endothelial cells; Cell culture; Cell phenotype identification

既往钙化性主动脉瓣疾病(CAVD)被认为是不可逆的被动的退行性病变。但越来越多的临床研究发现,CAVD是包括内皮损伤、慢性炎性反应、细胞外基质重构、细胞表型分化及细胞凋亡等多个复杂病理变化的过程,为主动过程^[1-4]。内皮损伤可能是CAVD的起始因素^[5],随后瓣膜间质细胞(VIC)

在多种因素刺激下向成骨细胞样细胞主动转化,最终导致瓣膜中钙盐沉积^[6]。有学者认为瓣膜内皮细胞(VEC)参与CAVD的主要机制为VEC通过内皮-间质转换机制(EndMT)转化成为具有增殖能力的VIC^[7-8],另有学者认为VEC主要通过旁分泌机制影响VIC的形态学特征或功能^[9-10]。目前对于VEC在CAVD发展过程中的始动作用机制尚未明确。体外分离和培养VEC是深入研究VEC在CAVD病理生理中改变的细胞学基础,本文探讨猪主动脉瓣VEC的分离和培养方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

2~3 月龄雄性家猪由上海五丰上食公司提供。高糖 DMEM 培养基、青霉素/链霉素、胎牛血清 (FBS) 均购自美国 Gibco 公司; II 型胶原酶粉剂购自美国 Sigma 公司; CD31 抗体购自于美国 abcam 公司(ab28364), 波形蛋白(Vimentin)荧光直标抗体购自于美国 Santa Cruz 公司(sc6260), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体购自于美国 Affinity 公司(AF1032), 荧光二抗 Alexa Fluor 488 购自于美国 EarthOx 公司(E032211-01); 内皮细胞培养基(ECM)购自于美国 ScienCell 公司。

II 型胶原酶溶液使用 DMEM 培养基配制, II 型胶原酶终浓度为 2 mg/mL, 青霉素/链霉素终浓度为 1%。内皮细胞培养使用 DMEM 完全培养基, 青霉素/链霉素终浓度为 1%。

1.2 主动脉瓣内皮细胞的分离和培养

于屠宰场处死家猪后立即切除其主动脉瓣, 放置在消毒的无纺布上, 佩戴无菌手套和口罩, 用高温灭菌的器械取出瓣膜, 放置于预冷的 PBS 中, 于 1 h 内送至实验室。使用无菌 PBS 反复清洗猪主动脉瓣, 共 3 次, 每次 3 min。将瓣膜置于培养皿中, 加入 6 mL 预热的 II 型胶原酶溶液并放入 37 °C 培养箱中孵育 5~10 min。轻轻移除内皮层, 用干燥的无菌棉签刮擦瓣膜表面, 使内皮细胞从组织中分离出来。所施加的力量为能感受到组织的阻力, 但未穿透基底膜。在 II 型胶原酶溶液中涂抹棉签, 使内皮细胞中从棉签中分离出来。收集细胞悬液, 以 1 500 转/min 离心 5 min, 去除上清液。用 DMEM 培养基重悬细胞, 将细胞移入培养皿中, 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 2~3 d, 而后改用 ECM 培养细胞。

1.3 免疫荧光染色法检测猪主动脉瓣内皮细胞(PAVEC)

将细胞接种到 12 孔板, 待细胞贴壁后培养细胞至融合度达 30%~50%。75%乙醇室温固定细胞 15 min, PBS 洗 3 次后, 1% Triton-100 室温破膜 10 min, 5% BSA 室温封闭 30 min。加入 1:200 一抗(抗 CD31 抗体、抗 Vimentin 抗体、抗 α -SMA 抗体)4 °C 孵育过夜, 1:400 Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG 二抗 37 °C 避光孵育 30 min, 4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)复染细胞核, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.4 流式细胞仪检测分离细胞 CD31 和 Vimentin 的表达

胰酶消化 12 孔板中的细胞, 离心去除上清, 1% Triton-100 室温破膜 10 min, 5% BSA 封闭 30 min。1:200 一抗(抗 CD31 抗体、抗 Vimentin 抗体)4 °C 孵育过夜, Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG 二抗 37 °C 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测分离细胞的 CD31 和 Vimentin 表达情况。

2 结果

2.1 VEC 形态

从新鲜猪主动脉瓣膜分离获取的 VEC 约 8 h 贴壁, 分离后第 2 天 VEC 增殖速度显著增快, 第 3 天时 VEC 汇集成单层, 互相接触抑制, 细胞形态呈铺路石样。

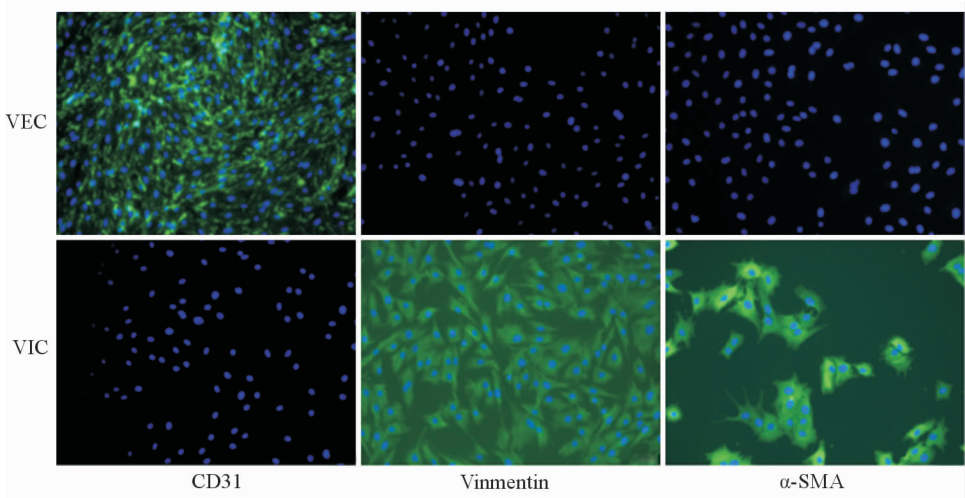
2.2 VEC 表型鉴定

通过免疫荧光染色法对细胞进行表型鉴定, 结果显示 VEC 的 CD31 染色为阳性, α -SMA 和 Vimentin 染色为阴性, VIC 的 Vimentin 和 α -SMA 染色为阳性, CD31 染色为阴性(见图 1), 分离培养的 VEC 为 PAVEC, 且 VIC 污染率低。通过流式细胞仪进一步对细胞进行鉴定, 结果显示 VEC 的 Vimentin 阳性率为 3.06%, CD31 阳性率为 99.01%, 为 CD31⁺ Vimentin⁻ 细胞, VIC 的 Vimentin 阳性率为 97.76%, CD31 阳性率为 0.99%, 为 CD31⁻ Vimentin⁺ 细胞(见图 2)。主动脉瓣由 VEC 和 VIC 构成, VEC 主要表达 CD31 和血管性血友病因子(vWF), VIC 主要表达 Vimentin 和 α -SMA, 而分离获取的细胞以 CD31⁺ Vimentin⁻ 细胞为主, 因此可以认为通过胶原酶消化法获取的 VEC 没有 VIC 污染, 再次验证胶原酶消化法分离获得的 VEC 纯度较高。

3 讨论

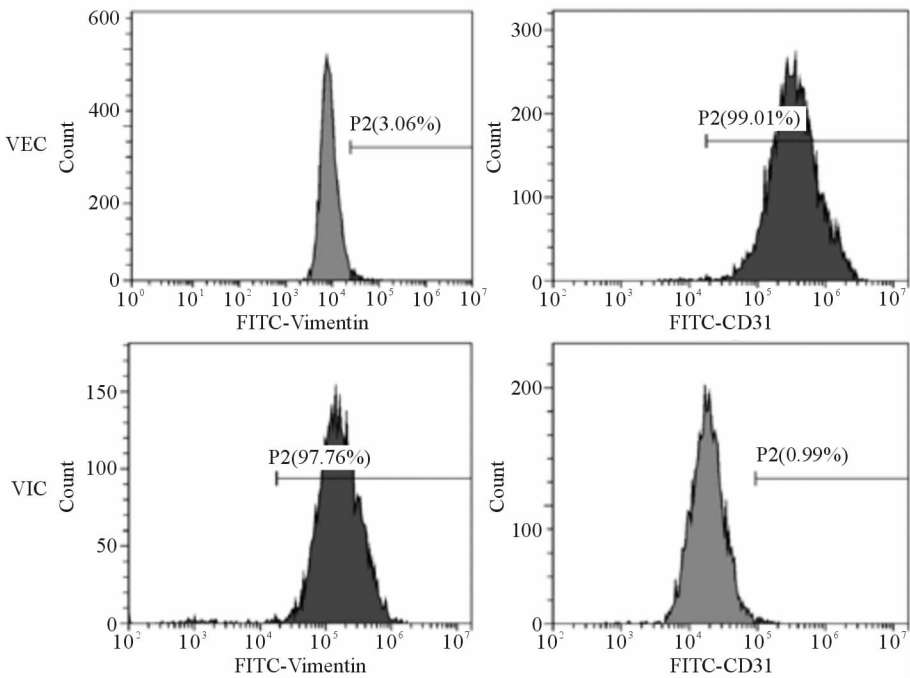
VEC 起源于胚胎发育时期的中胚层, 其覆盖于瓣膜的外表面, 与 VIC 及细胞外基质共同构成瓣膜。VEC 直接接触血流, 因此血流动力学及炎性改变均能直接作用于 VEC^[12]。从某种意义上说, VEC 可以作为一个探测器, 感受外界的变化, 然后通过调节基底膜的渗透性、炎性细胞黏附能力转导外界的信号变化, 维持瓣膜内环境的稳定^[13]。越来越多的研究证明, VEC 在 CAVD 的发生过程中可能起着始动作用。

在本研究中, 我们通过胶原酶消化法, 将瓣膜表面的 VEC 分离出, 在 DMEM 培养基中培养 2~3 d



注: VEC 呈现 CD31 染色阳性, Vimentin 和 α -SMA 染色阴性; VIC 呈现 Vimentin 和 α -SMA 染色阳性, CD31 染色阴性

图 1 免疫荧光染色法鉴定 VEC 细胞表型



注: VEC Vimentin 阳性率为 3.06%, CD31 阳性率为 99.01%; VIC Vimentin 阳性率为 97.76%, CD31 阳性率为 0.99%

图 2 流式细胞仪鉴定 VEC 细胞表型

后,再改用内皮培养基培养细胞。该方法有助于细胞的状态恢复和分裂,但整体来说细胞产量较低。值得注意的是,内皮细胞接触抑制可导致细胞转化,因此细胞传代时机的选择非常重要。分离出的细胞呈典型的内皮细胞形态,单层生长,呈铺路石样。通过免疫荧光染色法检测细胞 CD31、Vimentin 和 α -SMA 等表型,显示 VEC 为 CD31 表达阳性, Vimentin 和 α -SMA 表达阴性细胞,符合内皮细胞的表型特点。进一步通过流式细胞仪对获取的细胞进行表型鉴定, VEC 为 CD31⁺ Vimentin⁻ 细胞,同时显示该分离方法获得的 VEC 纯度较高,

受间质细胞污染率低。

VEC 在 CAVD 发生过程中的始动作用机制可能为:(1)血流动力学改变对 VEC 的影响。有研究表明,在紊乱的血流剪切力作用下,与促钙化、炎症反应相关的基因,包括骨形成蛋白-4(BMP-4)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)等的表达升高^[14]。(2)VEC 通过 EndMT 成为具有增殖能力的 VIC。Paruchufi 等^[15]研究发现,成年人瓣膜中存在同时表达 CD31、 α -SMA 的细胞,即发生 EndMT 的细胞。Dal-Bianco 等^[16]通过构建机械损

伤羊瓣膜模型,发现处理组中内皮细胞发生 EndMT 的细胞数量明显高于对照组。(3)VEC 旁分泌机制发生变化,影响 VIC 的形态学和功能。VEC 主要通过旁分泌一氧化氮(NO)和 C 型利尿钠肽(CNP)对 VIC 进行调控^[17-18]。然而,目前关于 VEC 在 CAVD 进程中的具体作用机制尚未达成共识。

综上所述,本研究探讨了通过胶原酶从猪主动脉瓣分离获取 VEC 的方法,该方法实施方便,分离得到的 VEC 纯度良好,有助于体外研究 VEC 在 CAVD 中的作用及机制。

参 考 文 献

- [1] Hulin A, Hego A, Lancellotti P, et al. Advances in pathophysiology of calcific aortic valve disease propose novel molecular therapeutic targets [J]. *Front Cardiovas Med*, 2018, 5(21):21.
- [2] 贺钰斌,朱丹.钙化性主动脉瓣疾病发病机制的研究进展[J].*中国胸心血管外科临床杂志*, 2018, 25(2):1-6.
- [3] Towler DA. Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease[J]. *Circ Res*, 2013, 113(2):198-208.
- [4] 高佳斌,徐志云.主动脉瓣钙化发病机制的研究进展[J].*国际心血管病杂志*, 2016, 43(4):210-212.
- [5] Gould ST, Srigunapalan S, Simmons CA, et al. Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease[J]. *Circ Res*, 2013, 113(2):186-197.
- [6] Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Ovcharenko EA, et al. Development of calcific aortic valve disease: do we know enough for new clinical trials?[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 132:189-209.
- [7] Rattazzi M, Pauletto P. Valvular endothelial cells: guardians or destroyers of aortic valve integrity?[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 242(2):396-398.
- [8] Dahal S, Huang P, Murray BT, et al. Endothelial to mesenchymal transformation is induced by altered extracellular matrix in aortic valve endothelial cells[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(10):2729-2741.
- [9] Bosse K, Hans CP, Zhao N, et al. Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease[J]. *J Mol*

Cell Cardiol, 2013, 60:27-35.

- [10] Huk DJ, Austin BF, Horne TE, et al. Valve endothelial cell-derived Tgfb1 signaling promotes nuclear localization of Sox9 in interstitial cells associated with attenuated calcification[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(2):328-338.
- [11] Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP, et al. Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart[J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 29(1):57-64.
- [12] Tao G, Kotick JD, Lincoln J. Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2012, 100:203-232.
- [13] Gould ST, Srigunapalan S, Simmons CA, et al. Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease[J]. *Circ Res*, 2013, 113(2):186-197.
- [14] Sucusky P, Balachandran K, Elhammali A, et al. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2):254-260.
- [15] Paruchuri S, Yang JH, Aikawa E, et al. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2[J]. *Circ Res*, 2006, 99(8):861-869.
- [16] Dal-Bianco JP, Aikawa E, Bischoff J, et al. Active adaptation of the tethered mitral valve insights into a compensatory mechanism for functional mitral regurgitation[J]. *Circulation*, 2009, 120(4):334.
- [17] Kennedy JA, Hua X, Mishra K, et al. Inhibition of calcifying nodule formation in cultured porcine aortic valve cells by nitric oxide donors[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 602(1):28-35.
- [18] Yip CY, Blaser MC, Mirzaei Z, et al. Inhibition of pathological differentiation of valvular interstitial cells by C-type natriuretic peptide[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(8):1881-1889.

(收稿:2019-03-28 修回:2019-10-28)

(本文编辑:胡晓静)