

陈柳,邱敏,丁相荣,等. 树鼩脑微血管内皮永生生化细胞系的建立及最适 D-半乳糖浓度诱导 BMECs 衰老细胞模型的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 337-345.

Chen L, Qiu M, Ding XR, et al. Establishment of an immortalized tree shrew brain microvascular endothelial cell line and study of a senescence cell model of BMECs induced by the D-galactose concentration [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 337-345.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 03. 008

树鼩脑微血管内皮永生生化细胞系的建立及最适 D-半乳糖浓度诱导 BMECs 衰老细胞模型的探讨

陈柳¹,邱敏²,丁相荣¹,霍姝洵²,王文广¹,陆彩霞^{1*},代解杰^{1*}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所,昆明 650118;2. 昆明医科大学,昆明 650500)

【摘要】 目的 建立树鼩永生生化脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs),明确 D-半乳糖对 BMECs 衰老的影响,探索其潜在机制。**方法** 用携带 SV40T 基因的慢病毒转染 BMECs,传至 50 代后进行形态观察、生长曲线测定以及免疫荧光和核型鉴定;再用不同浓度 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导 BMECs,通过细胞增殖实验确定最适诱导条件,用衰老相关 β 半乳糖苷酶染色分析细胞衰老情况,Western Blot 检测衰老相关蛋白 p53 的表达水平,超氧化物歧化酶和脂质氧化检测试剂盒检测细胞内氧化应激水平。**结果** 永生化的细胞生长状态较好,不同代次的细胞形态一致,单个细胞呈短梭形或多角形,整体呈典型的铺路石状;细胞生长曲线显示细胞数量在第 2 ~ 5 天时处于对数生长期,在第 6 天时达到高峰,之后缓慢增长进入平台期;免疫荧光显示该细胞特异蛋白 vWF 和 CD31 及永生生化基因 SV40T 为阳性;细胞核型结果显示永生生化细胞染色体数目与滇西亚种树鼩的染色体数量相符;D-gal 诱导 BMECs 抑制细胞增殖,有时间和浓度依赖性;实验组,即浓度为 10 g/L 的 D-gal 诱导 48 h 的 BMECs, β -半乳糖苷酶染色阳性明显增多、衰老相关蛋白 p53 显著增多、细胞内 SOD 酶活性降低和 MDA 含量增多。**结论** 成功构建树鼩永生生化脑微血管内皮细胞系,10 g/L 的 D-gal 是建立永生生化 BMECs 衰老模型的适合浓度,D-gal 在体外促进细胞衰老可能是通过促进氧化应激水平、抑制细胞增殖来实现的。

【关键词】 树鼩;脑微血管内皮细胞;永生生化;D-半乳糖;衰老模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 03-0337-09

Establishment of an immortalized tree shrew brain microvascular endothelial cell line and study of a senescence cell model of BMECs induced by the D-galactose concentration

CHEN Liu¹, QIU Min², DING Xiangrong¹, HUO Shurui², WANG Wenguang¹, LU Caixia^{1*}, DAI Jiejie^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China. 2. Kunming Medical University, Kunming 650500)

Corresponding author: DAI Jiejie. E-mail: dj@imbcams.com.cn; LU Caixia. E-mail: lcx@imbcams.com.cn

【基金项目】国家重点研发计划项目(2021YFF0702404),云南省基础研究计划面上项目(202101AT070291),云南省眼科疾病防治研究重点实验室(2017DG008),昆明市科技创新团队(2019-1-R-24483)。

Funded by National Key R&D Program of China(2021YFF0702404), Yunnan Fundamental Research Projects(202101AT070291), Yunnan Key Laboratory of Ophthalmic Research and Disease Control(2017DG008), Kunming Science and Technology Innovation Team(2019-1-R-24483).

【作者简介】陈柳(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型建立及机制。Email:chenliu19950623@163.com

【通信作者】代解杰(1961—),男,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型与比较医学。Email:dj@imbcams.com.cn;

陆彩霞(1979—),女,博士,硕士生导师,研究方向:干细胞及人类疾病动物模型建立。Email:lcx@imbcams.com.cn。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective Establish immortalized brain microvascular endothelial cells from tree shrews, clarify the effect of D-galactose on senescence of brain microvascular endothelial cells, and explore the potential mechanisms. **Methods** BMECs were transfected with a lentivirus carrying the *SV40T* gene, and immortalized cells were characterized by morphological observation, growth curve determination, immunofluorescence, and karyotype after expansion for > 50 passages. Next, BMECs were treated with various concentrations of D-gal, and the optimal concentration was determined by cell proliferation assays. Senescence was analyzed by staining with senescence-associated β -galactosidase. Expression of senescence-associated p53 was measured by Western Blot. Intracellular oxidative stress levels were measured by superoxide dismutase and lipid oxidation assays. **Results** Immortalized cells grew with consistent morphology throughout passages. Single cells were shaped as short spindles or polygonal with a typical paving stone shape. The cell growth curve showed cells were in the logarithmic growth phase on days 2 ~ 5. Cell growth peaked at day 6 and then the cells grew slowly to a plateau. High levels of tree shrew vWF, CD31, and *SV40T* were detected by immunofluorescence. Karyotyping showed that the number of chromosomes in immortalized cells matched the number of chromosomes in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). D-galactose reduced BMEC proliferation in time- and dose-dependent manners. In the experimental group, i.e. BMECs treated by D-gal at a concentration of 10 g/L for 48 h, positive β -galactosidase staining was significantly increased, p53 was significantly increased, intracellular SOD activity was reduced, and MDA content was increased. **Conclusions** A tree shrew immortalized brain microvascular endothelial cell line was established successfully. The optimal concentration to establish an immortalized BMEC senescence model was 10 g/L D-gal. The mechanism by which D-gal promotes cellular senescence *in vitro* may be mediated through promotion of oxidative stress and inhibition of cell proliferation.

[Keywords] tree shrew; brain microvascular endothelial cells; immortalization; D-galactose; senescence model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 是构成血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的主要成分,而 BBB 是哺乳动物最重要的生理屏障,作为血液和大脑之间的连接点,它能限制许多循环病原体、毒素、化合物、炎症因子和免疫细胞进入中枢神经系统,从而维持大脑稳态^[1]。在正常的 BBB 中,脑微血管内皮细胞与星形胶质细胞和周细胞共同协作,通过能量依赖、载体介导的系统控制极性溶质进入中枢神经系统,运输氨基酸、一元羧酸、核苷和维生素^[2]。当 BMECs 结构的完整性遭到破坏时,会严重影响 BBB 的结构和功能,有可能引起精神损伤和神经退行性疾病^[3]。同样的,衰老也会引起微血管内皮功能和表型失调,这在血管性认知障碍和阿尔茨海默病等疾病中起重要作用^[4-5]。已有研究显示 BMECs 在脑血管相关疾病^[6]及神经退行性疾病^[3]等多种疾病的发病过程中起到重要作用,Castillo-Carranza 等^[5]发现 tau 聚积体在人类阿尔兹海默病和进行性核上性麻痹患者的脑血管中积累,这与微血管内皮细胞有关,在路易体痴呆患者中也发现了 tau 寡聚体的脑血管沉积。

目前已成功分离出兔 BMECs^[7]、小鼠 BMECs^[8]、大鼠 BMECs^[9]、猪 BMECs^[10],并根据不同物种的 BMECs 开展了脑相关疾病的研究。树鼯

作为攀鼯目小型哺乳动物,其生理特征,如解剖结构、神经发育和心理压力,与包括人类在内的灵长类动物高度相似,已被用于神经相关疾病及精神疾病模型的研究^[11],我们前期也对树鼯 BMECs 进行了分离培养^[12],但体外培养的原代细胞增殖能力有限,随着代次增多,细胞会发生形态变化及表型丢失,从而显著降低实验的重复性。在本研究中,我们建立了树鼯脑微血管内皮永生化细胞系,克服了原代细胞难以重复、耗时长和效率低下的缺点,为后续树鼯 BMECs 的应用奠定了基础。

D-半乳糖(D-galactose, D-gal)是一种己醛糖,正常情况下,半乳糖激酶和尿苷基转移酶将 D-gal 代谢成葡萄糖。而过量的 D-gal 会产生活性氧(ROS),从而导致细胞衰老和凋亡^[13]。大量研究证实 D-gal 在果蝇^[14]、小鼠^[15]和大鼠^[16]等动物模型上能显著致衰老,而且方法简单、重复性好、短时间内能快速建模,所以作为致老剂被广泛应用。但是以上动物的生理结构和免疫学基础与人类相差较大,细胞衰老的过程往往与人类细胞并不一致,所以需要选用与人类细胞亲缘性更高的细胞作为样本来进行衰老研究。本研究观察了在不同剂量的 D-gal 刺激下,对树鼯 BMECs 增殖、衰老和氧化应激水平产生的影响,探究 D-gal 浓度差异对 BMECs 衰老过程的影响,以确定体外构建 BMECs 衰老模型的最佳 D-gal 浓度,为探讨

BMECs 衰老提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

1 只 1 日龄普通级新生雄性树鼩(中缅树鼩滇西亚种),体重 8 ~ 10 g,由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供【SCXK(滇)K2018-0002】;实验均在中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心进行【SYXK(滇)K2018-0002】;饲养室为普通环境动物隔离室,环境温度控制在 20 ~ 25℃,湿度控制在 40% ~ 70%,人工光照每天 12 h,换气次数每小时超过 15 次。本实验经中国医学科学院医学生物学研究所伦理审查委员会审批(DWSP202108002),并遵循实验动物使用的 3R 和福利伦理原则。

1.1.2 细胞

本团队前期用该动物分离建立了原代 BMECs,该 BMECs 由本团队王文广老师保存惠赠^[12]。

1.1.3 主要试剂与仪器

HBLV-SV40T-3xflag-PURO 由汉恒生物科技有限公司(上海)有限公司构建,病毒滴度为 1×10^9 TU/mL。PBS (Hyclone); 0.25% Trypsin-EDTA 胰蛋白酶(Gibco);青-链霉素(Gibco);胎牛血清(FBS)(BI);无血清冻存液(Cyagen);DMEM/F12 基础培养基(BI);兔抗 vWF 单克隆抗体(ImmunoWay);鼠抗 CD31 单克隆抗体(GeneTex);兔抗 SV40T 单克隆抗体(Abcam);羊抗兔和羊抗鼠二抗(Abcam);鼠抗 p53 单克隆抗体(Abcam);羊抗鼠二抗(Affinit);秋水仙素(Sigma);Giemsa 染液(索莱宝);香柏油(Nikon);D-半乳糖(D-gal)(Sigma);细胞衰老 β 半乳糖苷酶试剂盒(碧云天);脂质氧化(MDA)检测试剂盒(Biosharp);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成)。细胞计数仪(Bio-Rad,美国);酶标仪(BioTek,美国);生物安全柜和 CO₂ 恒温培养箱(Forma,美国);台式高速离心机(Beckman,美国);倒置荧光相差显微镜(Nikon,日本)。

1.2 方法

1.2.1 树鼩脑微血管内皮永生化细胞系的建立

(1)慢病毒转染树鼩 BMECs

将生长较好的 BMECs 按 1×10^5 cells/mL 细胞密度接种 6 孔板,每孔含 2 mL 完全培养基(含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM/F12),放入 37℃、5% CO₂ 培

养箱中培养。当细胞长满单层,PBS 清洗 3 次,每孔加入含助转剂(4 μ g/mL)的培养液 1 mL,按 MOI = 30 接种 HBLV-SV40T-3xflag-PURO 慢病毒,并设置空白对照,继续培养 4 h 后补加 1 mL 含助转剂的培养液,24 h 后更换为完全培养液继续培养。24 h 之后更换为含嘌呤霉素(4 μ g/mL)的完全培养液,每 48 h 换液 1 次,直至对照孔细胞完全死亡。

(2)有限稀释法挑取单克隆

将上述经慢病毒转染后的细胞用 0.25% Trypsin-EDTA 胰蛋白酶消化并计数,将细胞密度调整为 10^3 cells/mL,10 倍梯度稀释,直至细胞浓度为 10 cells/mL 左右,每孔按 100 μ L 在 96 孔板里每个浓度梯度接种 16 个孔,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中,每隔 24 h 进行观察,标记单个细胞复制生长形成的细胞群落。细胞群落长满单层后消化至 24 孔板中培养,之后继续扩大培养,每消化 1 次记为 1 代。

(3)树鼩 BMECs 传代

当细胞长满单层时,弃培养液,PBS 清洗,胰蛋白酶消化,当镜下大部分细胞变圆变亮时,加入含血清的培养液终止消化,按 1:7 传代培养,定期显微镜观察拍照。

(4)树鼩脑微血管内皮永生化细胞系生长曲线的测定

取生长状态良好的第 53 代细胞,胰酶消化后按照 1×10^5 cells/mL 细胞密度接种于 48 孔板,每孔 250 μ L,设置 3 个复孔,连续 8 d 进行胰酶消化,细胞计数仪测定每孔细胞总数,检测细胞的增殖情况,绘制细胞增殖动力曲线图。

(5)免疫荧光鉴定

取生长状态良好的第 53 代细胞,胰酶消化后按照 1×10^5 cells/mL 细胞密度接种于 24 孔板,每孔 500 μ L,设置 2 个复孔。待细胞长至 80%时,PBS 清洗 2 次,使用 4℃ 预冷的 4%多聚甲醛于室温固定细胞 30 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。向装有细胞的孔中加满枸橼酸缓冲液,放入微波炉中,中火加热 4 min,然后补足挥发的枸橼酸缓冲液,再中火加热 3 min,取出自然冷却至室温,PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入 0.5%的 TritonX-100 室温通透 20 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,加入 5%的 BSA 封闭 30 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。分别加入 1:200 的兔抗 vWF 单克隆抗体,1:100 的鼠抗 CD31 单克隆抗体和 1:200 的兔抗 SV40T 单克隆抗体,4℃ 过夜,隔天 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入 1:500 的羊抗

兔和羊抗鼠二抗,37℃避光孵育,1 h 后用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。加入 5 μg/mL DAPI 染色液染核,室温避光孵育 5 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min,之后置于荧光显微镜下观察拍照。

(6) 细胞核型分析

取生长状态良好的第 53 代细胞,消化至新的培养瓶中,根据奎秀莹等^[17]的方法进行细胞染色体核型检查,之后在显微镜下用油镜观察拍照。

1.2.2 D-gal 诱导 BMECs 衰老

(1) 细胞增殖活力检测

取生长状态良好的第 53 代细胞消化后调整细胞密度为 1×10^5 cells/mL 接种于 48 孔板,每孔 250 μL,24 h 细胞贴壁后, PBS 清洗 2 次,基于 Wang 等^[18]、Liu 等^[19]的研究,加入含浓度分别为 0、5、10、20、40 g/L 的 D-gal 的培养基,每孔 250 μL,每组 3 个复孔,分别在培养第 12、24、48 h 的时候消化细胞计数,绘制细胞增殖活力图。

(2) β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况

取生长状态良好的第 53 代细胞消化后调整细胞密度为 1×10^4 cells/mL 接种于 24 孔板,每孔 500 μL,24 h 细胞贴壁后, PBS 清洗 2 次,实验组加入浓度为 10 g/L 的 D-gal,对照组加正常培养基,分别在 48 h 和 120 h 时根据细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色 (senescence-associated-β-galactosidase, SA-β-gal) 试剂盒进行 β-半乳糖苷酶染色。在光学显微镜下拍照,取 5 个视野,每个视野 100 个细胞,计算阳性细胞百分率。

(3) Western Blot 检测 p53 蛋白表达

取生长状态良好的第 53 代细胞消化后调整细胞密度为 1×10^5 cells/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,24 h 细胞贴壁后, PBS 清洗 2 次,实验组加入浓度为 10 g/L 的 D-gal,对照组加正常培养基,48 h 时用 RIPA 裂解法提取各组细胞总蛋白,BCA 法检测

蛋白浓度,以 25 μg 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,400 mA 湿转 25 min 至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温孵育 1 h 封闭。加入 p53 一抗(1:200 稀释)4℃过夜,第 2 天用 PBST 洗膜 3 次,加入二抗室温孵育 1 h,洗去未结合的二抗,滴加 ECL 显影液于凝胶成像分析仪采集信号,用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。GAPDH 设为内参,实验重复 3 次。

(4) 细胞氧化应激水平检测

取生长状态良好的第 53 代细胞消化后调整细胞密度为 1×10^5 cells/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,24 h 细胞贴壁后, PBS 清洗 2 次,实验组加入浓度为 10 g/L 的 D-gal,对照组加正常培养基,48 h 时胰酶消化细胞, PBS 清洗 3 次后重悬细胞,反复冻融 3 次裂解细胞提取上清,调整蛋白浓度。按照超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒与脂质氧化(MDA)检测试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学分析

所有计量资料采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,使用 GraphPad Prism 8 软件进行作图、统计分析,采用单因素方差分析或 *t* 检验比较组间差异,*P* < 0.05 表示有统计学意义。

2 结果

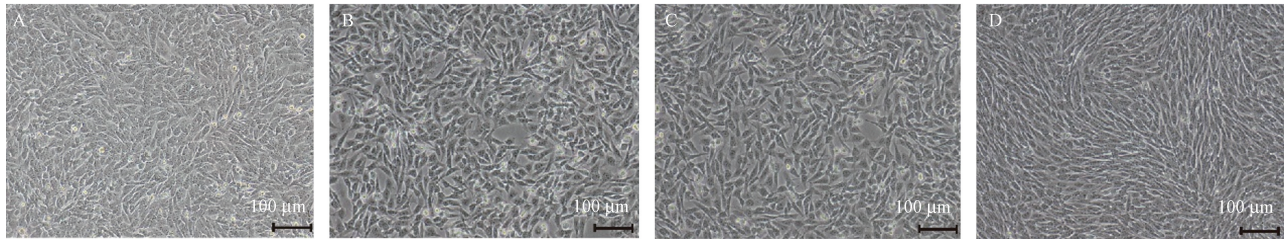
2.1 树鼩脑微血管内皮永生化细胞系的建立

2.1.1 不同代次的树鼩 BMECs 形态学观察

复苏的树鼩 BMECs 增殖较快,按 1:7 传代后 2 d 即长满培养瓶。观察第 20、30、41 和 54 代,单个细胞形态均呈短梭形或多角形,总体呈旋涡状和铺路石样生长排列,为典型的内皮细胞形态(见图 1)。

2.1.2 生长曲线测定

生长曲线测定结果显示第 54 代细胞在第 2 ~ 5 天时增殖快速,处于对数生长期,第 6 天时达到高峰,之后进入平台期(图 2)。



注:A:第 20 代;B:第 30 代;C:第 41 代;D:第 54 代。

图 1 不同代次的树鼩 BMECs

Note. A. 20th generation. B. 30th generation. C. 41th generation. D. 54th generation.

Figure 1 BMECs of Chinese tree shrew in different generations

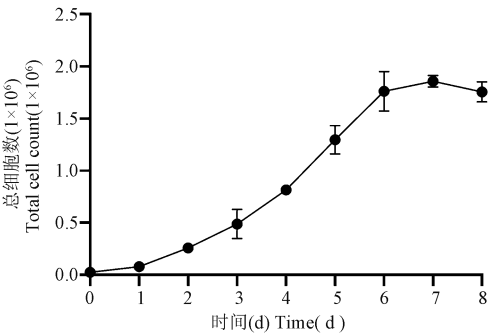


图2 第54代树鼩BMECs生长曲线
Figure 2 Growth curve of Chinese tree shrew BMECs in the 54th generation

2.1.3 免疫荧光鉴定

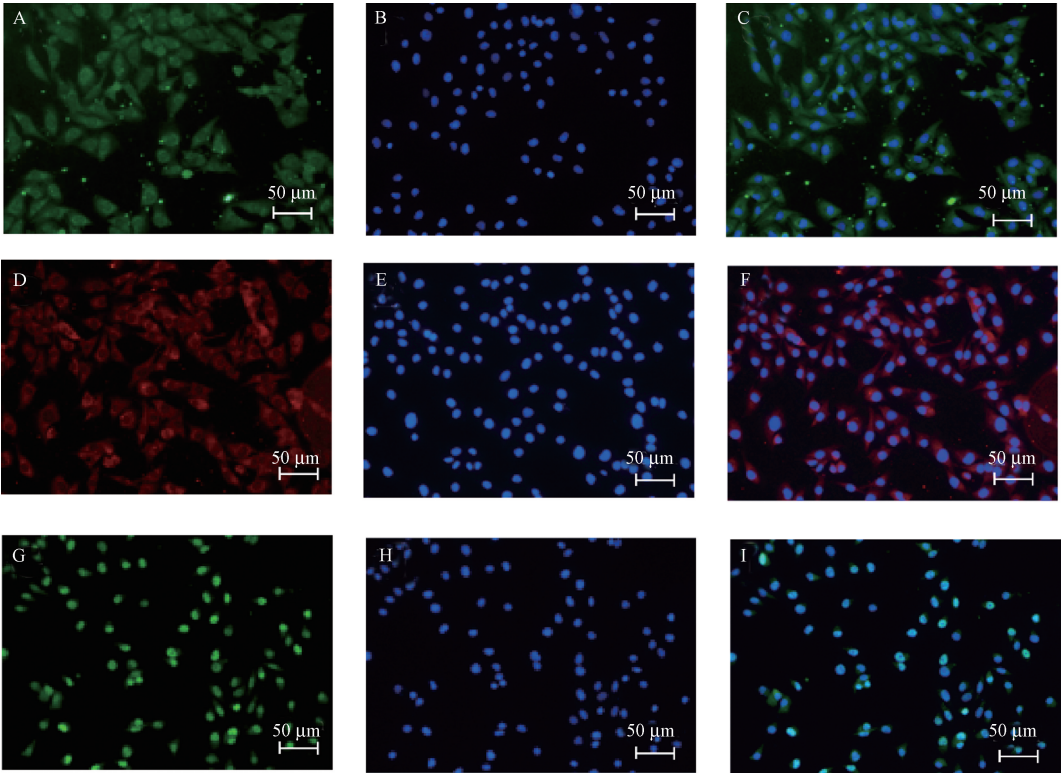
血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)和CD31是内皮细胞特异蛋白,荧光结果显示胞质处vWF和CD31信号强阳性(图3),胞核处有明显的SV40T信号,证明实验所得细胞为树鼩

BMECs,并且成功转入了永生化慢病毒基因。
2.1.4 核型分析
对第54代树鼩BMECs进行核型分析,细胞染色体数为62条(图4),与滇西亚种中缅树鼩的染色体数目一致^[20],证明此细胞来源是树鼩。

2.2 不同D-gal浓度诱导BMECs衰老

2.2.1 D-gal对细胞增殖的影响

用不同浓度的D-gal刺激BMECs后,不同时间点的检测结果显示细胞增殖活力随着D-gal浓度的增高与处理时间的增加而降低。0 g/L的D-gal诱导的细胞为对照组,其他为实验组。与未用D-gal处理的对照组相比,10 g/L处理48 h、40 g/L处理12 h差异有显著性($P < 0.01$),20 g/L处理48 h、40 g/L处理24 h、48 h差异有极显著性($P < 0.001$)。D-gal抑制细胞增殖有时间依赖性和浓度依赖性(图5)。后续选择浓度为10 g/L的D-gal诱导48 h的细胞为实验组,0 g/L的D-gal作用48 h为对照组。



注:A:BMECs vWF(绿色);B:BMECs核DAPI(蓝色);C:BMECs vWF与细胞核重叠;D:BMECs CD31(红色);E:BMECs核DAPI(蓝色);F:BMECs CD31与细胞核重叠;G:BMECs SV40T(绿色);H:BMECs核DAPI(蓝色);I:BMECs SV40T与细胞核重叠。

图3 第54代树鼩脑微血管内皮细胞vWF、CD31和SV40T免疫荧光鉴定

Note. A. vWF expression of BMECs (green). B. DAPI of BMECs (blue). C. vWF overlaps with the nucleus in BMECs. D. CD31 expression of BMECs (red). E. DAPI of BMECs (blue). F. CD31 overlaps with the nucleus in BMECs. G. SV40T expression of BMECs (green). H. DAPI of BMECs (blue). I. SV40T overlaps with the nucleus in BMECs.

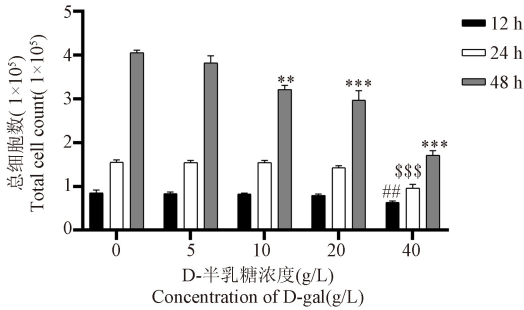
Figure 3 vWF、CD31、SV40T identification of Chinese tree shrew BMECs in the 54th generation by immunofluorescence

2.2.2 β-半乳糖苷酶染色结果

10 g/L 浓度的 D-gal 作用细胞 48 h,如图 6 所示,实验组与对照组相比,SA-β-gal 阳性细胞数无明显变化;延长 D-gal 作用时间,将 10 g/L 浓度的 D-gal 作用细胞 120 h,如图 7 所示,SA-β-gal 阳性细胞数明显增加($P < 0.001$)。



图 4 第 54 代树鼯 BMECs 核型分析
Figure 4 Karyotype identification of Chinese tree shrew BMECs in the 54th generation



注:D-gal 处理 12 h 时与对照组比较,## $P < 0.01$;D-gal 处理 24 h 时与对照组比较, \$\$\$ $P < 0.001$;D-gal 处理 48 h 时与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 5 D-gal 抑制细胞增殖

Note. Compared with control group at 12 h of D-gal treatment, ## $P < 0.01$. Compared with control group at 24 h of D-gal treatment, \$\$\$ $P < 0.001$. Compared with control group at 48 h of D-gal treatment, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 5 D-gal inhibits cell proliferation

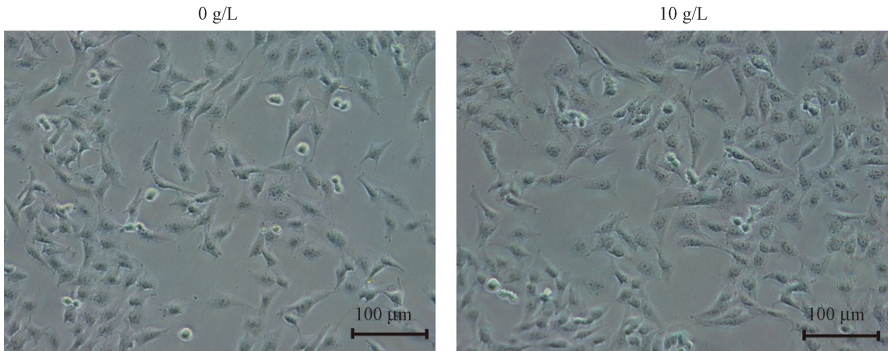
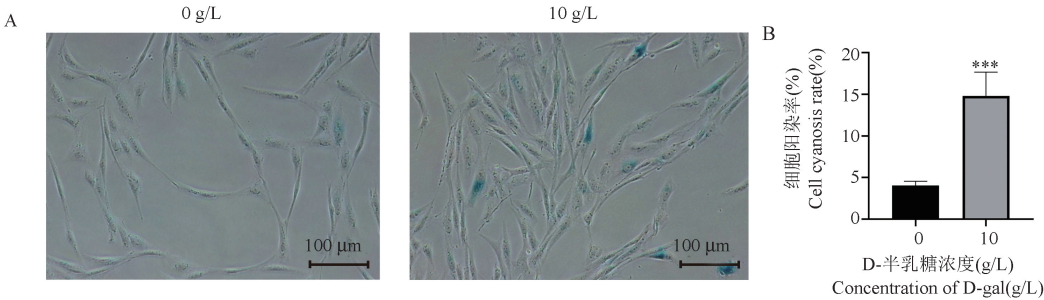


图 6 D-gal 诱导 48 h 时衰老 SA-β-gal 染色结果
Figure 6 Result of senility SA-β-gal at 48 h of D-gal induction

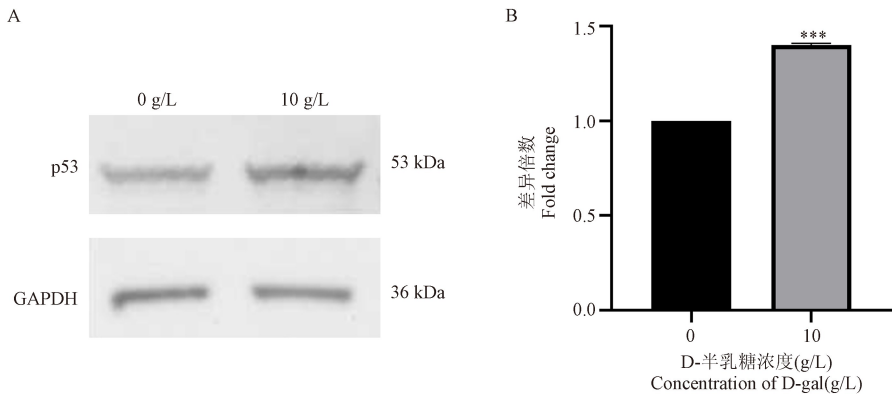


注:A:β-半乳糖苷酶染色,实验组阳性细胞数增多;B:β-半乳糖苷酶染色阳性细胞数目统计结果。

图 7 D-gal 诱导 120 h 时衰老 SA-β-gal 染色结果

Note. A. β-Galactosidase staining, the number of positive cells increases in the experimental group. B. Statistical result of positive cells number of β-Galactosidase staining.

Figure 7 Result of senility SA-β-gal at 120 h of D-gal induction



注:A:p53 蛋白电泳图;B:蛋白表达统计分析结果。

图 8 Western Blot 分析 p53 蛋白表达

Note. A. Western Blot of p53. B. Result of statistic alanalysis of protein.

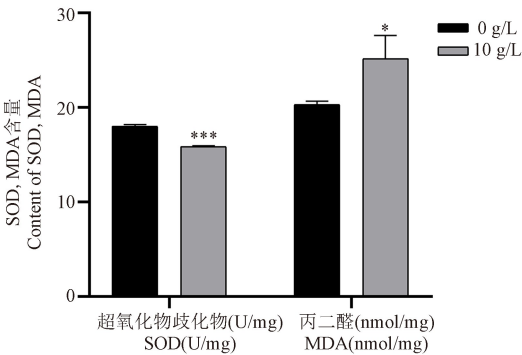
Figure 8 Western Blot results for p53

2. 2. 3 p53 蛋白表达结果

10 g/L 浓度的 D-gal 作用细胞 48 h,如图 8 所示,细胞衰老相关蛋白 p53 表达量显著增高($P < 0.001$)。

2. 2. 4 细胞氧化应激水平检测结果

10 g/L 浓度的 D-gal 作用细胞 48 h,如图 9 所示,实验组细胞 SOD 活力显著降低($P < 0.001$),MDA 含量显著增高($P < 0.05$)。



注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 9 衰老 BMECs 的 SOD 和 MDA 水平变化

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 9 Change of SOD and MDA in aging BMECs

3 讨论

目前 BMECs 多为大小鼠来源细胞,我们课题组前期分离了树鼩 BMECs,发现寨卡病毒感染时血脑屏障的通透性发生改变^[12]。相比大小鼠来说,树鼩作为小型哺乳动物,进化上接近非人灵长类,开展树鼩 BMECs 衰老的研究可能会为衰老模型的研究提供更多研究价值。我们建立的树鼩永生化的脑微

血管内皮细胞系,相比于原代细胞,具备更多优势:细胞状态差别较小,实验重复性高,能够有效排除实验结果的偶然性,保证实验数据的可靠性,对于衰老细胞模型的研究更具参考意义。有强有力的证据表明,衰老引起的微血管内皮功能和表型失调对血管性认知障碍和阿尔兹海默病的发病机制至关重要^[4-5]。最近的研究表明,内皮细胞衰老有助于脑微血管衰老表型的发生,包括微血管稀少、促炎改变、血管舒缩功能障碍和血脑屏障破坏^[21]。所以,体外建立可靠的 BMECs 衰老模型,对我们探索与认知相关的脑部疾病的发病机制机理有重要的基础研究意义。

本研究所建立的树鼩永生化的脑微血管内皮细胞生长状态较好,不同代次的细胞形态一致,呈典型的铺路石状,符合内皮细胞特性,且与分离所得的小鼠^[8]和大鼠^[9]的 BMECs 形态一致。目前在永生化的细胞系的建立方法中,化学和射线诱导^[22]可能导致细胞出现其他无法预测的突变,基因自发突变的随机性太强可能导致细胞失去本来特性。而 SV40T 抗原可与多种蛋白结合,包括 p53、pRB、DNA 聚合酶 α -引物酶和热休克蛋白 70,以延长细胞周期和促进细胞永生化的相关基因的表达^[23],这种慢病毒载体介导的 SV40T 的基因转染是一种常见的获得永生化的细胞系的方法。我们的实验结果显示 SV40T 免疫荧光呈阳性,表明其已被成功导入细胞内,内皮细胞特异蛋白 vWF 和 CD31 免疫荧光鉴定结果证实此细胞为 BMECs,且此永生化的细胞染色体数量为 62 条,这与滇西亚种树鼩的染色体数量相符^[20],证实该细胞来源为树鼩。

在已有的衰老模型中,D-gal 诱导的衰老模型因其简单、副作用小、耗时短等优点被广泛使用。本实验用不同浓度的 D-gal 刺激 BMECs,检测不同时间时细胞的增殖情况,发现随着时间和 D-gal 浓度的增加,相比对照组,实验组细胞的增殖抑制作用越来越明显,因此我们认为 D-gal 对 BMECs 的抑制作用有时间和浓度依赖性。有大量研究证明活性氧在衰老过程中起着至关重要的作用^[24],高水平活性氧可诱导氧化应激,破坏 DNA、磷脂和蛋白质结构,最终导致细胞和组织损伤,这是活性氧诱导衰老的关键机制^[25]。同时,哺乳动物细胞有一种抗氧化系统,能够清除高浓度的活性氧,总超氧化物歧化酶(T-SOD)是这种抗氧化系统的关键成员。而 MDA 是一种生物体脂质氧化的天然产物,被广泛用作脂质氧化的指标。p53 是“基因组的守护者”,是细胞对各种压力反应的核心参与者。p53 的激活可导致增殖暂时停止,从而使细胞能够修复损伤并保持克隆存活。衰老是一种永久性增殖停滞,是 p53 激活的一种可能结果,p53 的表达及稳定性对维持细胞的正常生命周期至关重要^[26]。我们选择 10 g/L 浓度的 D-gal 培养细胞 48 h 进行后续实验,Western Blot 检测到实验组与衰老相关的蛋白 p53 的表达上调,抗氧化酶 SOD 活性降低,氧化指标 MDA 含量增高,这些结果都与细胞增殖结果一致。因此我们认为,D-gal 在体外促进细胞衰老可能是通过促进氧化应激水平、抑制细胞增殖来实现的。然而,实验组的衰老特异性半乳糖苷酶染色在 48 h 时与对照组相比未见明显差异,我们推测此结果出现的原因可能是细胞内基因表达先于表型表达,且永生生化细胞的增殖能力强,更加不易衰老,所以衰老细胞阳性染色表型延迟出现,因此我们延迟 D-gal 的诱导时间,发现实验组在 120 h 时的细胞染色阳性率显著增高。

目前尚缺乏可靠的方法来评估动物模型中的 BMECs 衰老程度,对其衰老机制的研究产生了阻碍。与衰老相关的 β -半乳糖苷酶的评估不足以持续检测衰老的 BMECs,而检测其他衰老标志物的抗体是非特异性的,且在同一细胞内检测多个衰老生物标志物通常非常具有挑战性。因此,迫切需要用于鉴定、量化和表征衰老 BMECs 的新方法。本研究中,我们成功地建立了树鼩脑微血管内皮永生生化细胞系,并用 D-gal 在体外构建了 BMECs 的衰老模型,确立了最适诱导浓度为 10 g/L,并使用该浓度作

用细胞 48 h。树鼩永生生化 BMECs 衰老模型的建立,不仅为进一步研究 BMECs 的衰老机理及认知相关疾病的发病机制提供了实验数据,还可能会对量化衰老模型,探究新的衰老指标提供一种新的思路,促进细胞衰老机制的研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Yang RC, Huang K, Zhang HP, et al. SARS-CoV-2 productively infects human brain microvascular endothelial cells [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 149.
- [2] Testa E, Palazzo C, Mastrantonio R, et al. Dynamic interactions between tumor cells and brain microvascular endothelial cells in glioblastoma [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(13): 3128.
- [3] Agrawal M, Ajazuddin, Tripathi DK, et al. Recent advancements in liposomes targeting strategies to cross blood-brain barrier (BBB) for the treatment of Alzheimer's disease [J]. J Control Release, 2017, 260: 61-77.
- [4] Csiszar A, Yabluchanskiy A, Ungvari A, et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria improves neurovascular coupling responses in aged mice [J]. Geroscience, 2019, 41(5): 609-617.
- [5] Castillo-Carranza DL, Nilson AN, van Skike CE, et al. Cerebral microvascular accumulation of tau oligomers in Alzheimer's disease and related tauopathies [J]. Aging Dis, 2017, 8(3): 257-266.
- [6] 张静,潘晓华,刘国荣,等. 沉默 *NLRP3* 基因对促炎剂诱导大鼠脑微血管内皮细胞表达炎症因子的影响研究 [J]. 华西医学, 2022, 37(6): 855-862.
Zhang J, Pan XH, Liu GR, et al. Effect of *NLRP3* gene silencing on expression of proinflammatory agents-induced inflammatory factors in rat brain microvascular endothelial cells [J]. West Chin Med J, 2022, 37(6): 855-862.
- [7] 马华根,刘昭德,刘海琴,等. 家兔脑微血管内皮细胞的原代培养及鉴定 [J]. 海南医学院学报, 2022, 28(19): 1446-1450.
Ma HG, Liu ZD, Liu HQ, et al. Primary culture and identification about brain microvascular endothelial cells of rabbits [J]. J Hainan Med Univ, 2022, 28(19): 1446-1450.
- [8] 宋晓彬,范春娥,王烨,等. 小鼠脑微血管内皮细胞的分离培养与鉴定 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2017, 40(3): 138-143.
Song XB, Fan CE, Wang Y, et al. Primary culture and identification of mouse brain microvascular endothelial cell [J]. J Nanjing Norm Univ (Nat Sci Ed), 2017, 40(3): 138-143.
- [9] 王鑫,冯波,刘晓晔,等. 大鼠脑微血管内皮细胞的体外培养与鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(8): 1260-1264.
Wang X, Feng B, Liu XY, et al. Isolation and cultivation of rat brain microvascular endothelial cells *in vitro* [J]. Chin J Anim Vet Sci, 2014, 45(8): 1260-1264.
- [10] 赵春雨,孔志伟,张天芮,等. 猪脑微血管内皮细胞的原代分离培养与鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(12): 23-26.

- Zhao CY, Kong ZW, Zhang TR, et al. Primary isolation, culture and identification of pig cerebral microvascular endothelial cells [J]. Chin J Vet Med, 2015, 51(12): 23–26.
- [11] Xiao J, Liu R, Chen CS. Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model [J]. Zool Res, 2017, 38(3): 127–137.
- [12] 黎晓慧. 树鼩原代 BMECs 和 AS 的分离培养及 ZIKV 感染特性的初步研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2020.
- Li XH. Isolation and culture of primary BMECs and AS from tree shrew and preliminary study on the characteristics of ZIKV infection [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2020.
- [13] Saenno R, Dornlakorn O, Anosri T, et al. Caffeic acid alleviates memory and hippocampal neurogenesis deficits in aging rats induced by D-galactose [J]. Nutrients, 2022, 14(10): 2169.
- [14] Cui X, Wang L, Zuo P, et al. D-galactose-caused life shortening in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* is associated with oxidative stress [J]. Biogerontology, 2004, 5(5): 317–325.
- [15] 马艳宏, 刘安军, 张国蓉, 等. 硒酸对 D-gal 衰老小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. 细胞与免疫分子学杂志, 2007, 23(12): 1126–1129.
- Ma YH, Liu AJ, Zhang GR, et al. Effect of seleno-arginine on cellular immunological function in D-gal aging mice [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2007, 23(12): 1126–1129.
- [16] 王晖, 张淑华, 郭爱民, 等. 河北甜杏仁对 D-半乳糖诱导衰老模型大鼠的影响 [J]. 卫生研究, 2004, 33(2): 222–224.
- Wang H, Zhang SH, Guo AM, et al. Effects of almond on D-gal-induced aging rats [J]. J Hyg Res, 2004, 33(2): 222–224.
- [17] 奎秀莹, 王文广, 金亮子, 等. 树鼩永生化皮肤成纤维细胞株的建立及鉴定 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(3): 478–484.
- Kui XY, Wang WG, Jin LZ, et al. Establishment and identification of immortalized skin fibroblast cell line of Chinese tree shrew [J]. J Yunnan Agric Univ Nat Sci, 2022, 37(3): 478–484.
- [18] Wang J, Liu L, Ding Z, et al. Exogenous NAD⁺ postpones the D-gal-induced senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via Sirt1 signaling [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(2): 254.
- [19] Liu R, Meng J, Lou D. Adiponectin inhibits D-gal-induced cardiomyocyte senescence via AdipoR1/APPL1 [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(4): 719.
- [20] 刘瑞清, 施立明, 陈玉泽. 树鼩(*Tupaia belangeri* Wagner) 三个亚种的染色体比较研究 [J]. 动物学研究, 1989, 10(3): 195–200, 273.
- Liu RQ, Shi LM, Chen YZ. Comparative studies on chromosomes of 3 subspecies of *Tupaia belangeri* [J]. Zool Res, 1989, 10(3): 195–200, 273.
- [21] Kiss T, Nyúl-Tóth Á, Balasubramanian P, et al. Single-cell RNA sequencing identifies senescent cerebrovascular endothelial cells in the aged mouse brain [J]. Geroscience, 2020, 42(2): 429–444.
- [22] Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? [J]. EMBO Rep, 2014, 15(11): 1139–1153.
- [23] Chen Y, Hu S, Wang M, et al. Characterization and establishment of an immortalized rabbit melanocyte cell line using the SV40 large T antigen [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4874.
- [24] Shichiri M, Harada N, Ishida N, et al. Oxidative stress is involved in fatigue induced by overnight deskwork as assessed by increase in plasma tocopherylhydroquinone and hydroxycholesterol [J]. Biol Psychol, 2013, 94(3): 527–533.
- [25] Sohal RS, Orr WC. The redox stress hypothesis of aging [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(3): 539–555.
- [26] Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK, et al. p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(15): 5336–5351.

[收稿日期] 2022-10-08