



## 黑斑侧褶蛙脑微血管内皮细胞的原代培养及鉴定

艾单寒<sup>1,2</sup>, 侯家昊<sup>1,2</sup>, 刘芳园<sup>1,2</sup>, 顾泽茂<sup>1,2,3,4</sup>, 胡瑞雪<sup>1,2,4\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070;

3. 华中农业大学双水双绿研究院, 湖北 武汉 430070;

4. 教育部长江经济带大宗水生生物产业绿色发展工程研究中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 为了建立蛙脑微血管内皮细胞原代培养方法, 实验以黑斑侧褶蛙脑组织为实验材料, 在无菌条件下分离出大脑灰质, 利用 0.1% II 型胶原酶和胶原酶-分散酶进行消化, 经过 Percoll 密度梯度离心后, 将获取的脑微血管段接种于鼠尾胶包被的培养瓶中, 于 28 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下原代培养蛙脑微血管内皮细胞, 并通过细胞形态学观察和 VIII 因子相关抗原免疫荧光对细胞进行鉴定, 最后用四唑蓝比色法 (MTT) 测定细胞的生长状态。结果显示, 微血管段在体外培养 1 d 后开始贴壁生长, 并逐渐扩大成团簇状, 培养至 7 d 时, 细胞呈“铺石路样”镶嵌式排列, 表现为区域性单层生长; VIII 因子免疫荧光检测发现胞质呈红色, 表达为阳性, 阳性细胞率达 97% 以上; MTT 实验显示, 细胞在第 3~5 天时生长速率最快。本研究首次建立了蛙脑微血管内皮细胞的原代培养与鉴定方法, 为体外研究蛙类神经性疾病的发病机理奠定基础, 也为相关药物的研发和筛选提供了细胞模型。

**关键词:** 黑斑侧褶蛙; 脑组织; 微血管内皮细胞; 原代培养

中图分类号: S 947.2

文献标志码: A

蛙类是我国重要的水产养殖两栖动物, 具有较高的食用和药用价值。据不完全统计, 2019 年全国蛙类养殖面积已超 8 667 hm<sup>2</sup>, 总产量超过 105 000 t<sup>[1]</sup>, 主要养殖品种有牛蛙 (*Rana catesbeiana*)、黑斑侧褶蛙 (*Pelophylax nigromaculata*) 等<sup>[2-3]</sup>。然而, 近年来日益频发的病害已成为制约蛙类养殖产业发展的主要因素之一, 尤其是传染性“歪头病”, 该病传染性强、死亡率高、难防控, 是唯一被列入《一、二、三类动物疫病病种名录》中的蛙类疾病<sup>[4]</sup>, 患病蛙表现为歪头、白内障等脑膜炎症状, 目前尚无稳定有效的治疗方案。

研究表明, “歪头病”的病原主要为米尔伊丽

莎白菌 (*Elizabethkingia miricola*)<sup>[5-9]</sup>, 该菌主要感染蛙的脑组织, 对脑部中枢神经系统的损伤最为明显<sup>[6-7]</sup>, 但关于该菌致蛙脑膜炎的机制尚不清楚。中枢神经系统的保护结构“血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB)”可以控制脑实质和血液循环之间的物质交换, 阻止病原微生物和毒素的入侵<sup>[10]</sup>, 如果病原菌侵入脑部组织、损伤中枢神经系统, 则大都需要跨过机体的 BBB<sup>[11-12]</sup>, 因此, BBB 模型是研究病原致脑膜炎机制的重要工具, 也被广泛应用于脑膜炎靶向药物筛选等研究<sup>[13-15]</sup>, 而目前尚未有关于两栖动物体外 BBB 模型的应用。

血脑屏障主要依赖脑微血管内皮细胞 (brain

收稿日期: 2021-07-20 修回日期: 2022-06-17

资助项目: 国家自然科学基金 (32202990); 湖北省自然科学基金 (2021CFB128); 中国博士后科学基金 (2021M701351)

第一作者: 艾单寒 (照片), 从事水产动物疾病学研究, E-mail: 1003019727@qq.com

通信作者: 胡瑞雪, 从事水产动物疾病学研究, E-mail: hrx@mail.hzau.edu.cn



microvascular endothelial cells, BMECs) 完成其屏障功能, BMECs 能形成紧密连接, 增加了跨内皮细胞电阻, 构成屏障作用, 阻止病原菌穿透 BBB<sup>[10, 16]</sup>, 因此, BMECs 的分离和培养是构建体外 BBB 模型的关键。本研究以我国主要的蛙类养殖品种黑斑侧褶蛙为实验材料, 探讨了蛙类 BMECs 的分离和培养方法, 为后续研究蛙类神经性疾病的发病机制提供基础材料, 也为体外药物的筛选提供了细胞模型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**实验对象** 体重为 (25.02±1.03) g 的黑斑侧褶蛙购自湖北君坤生态养殖基地。实验蛙暂养于 43.5 cm×57.0 cm×69.5 cm 的水族缸中, 水温为 (27.0±0.5) °C, pH 7.07~7.62, 缸中装有 2 L 曝气水。

**实验试剂** DMEM (高糖, 8114031) 培养基和胎牛血清 (FBS, 10099-141) 均购自 Gibco 公司; 胶原酶-分散酶 (10269638001) 购自 Roche 公司; II 型胶原酶 (2275MG100) 购自 Biosharp 公司, 兔抗人 VIII 因子单克隆抗体 (bs-2974R) 购自 Bioss 公司; 羊抗兔 IgG 抗体 (SHB134)、4, 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 显色剂 (AR1000)、链霉亲和素-生物素复合物 (SABC) 试剂盒 (SA2002) 购自 Boster 公司; 鼠尾胶原 I (C8062)、脱氧核糖核酸酶 I (DNase I 酶) (D8071)、Percoll (P3870)、苏木精 (H8070)、四唑蓝比色法 (MTT) 试剂盒 (M1020) 均购自 Solarbio 公司, 碱性成纤维生长因子 (bFGF, 400-29) 购自 Peprotech 公司。

**实验仪器** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Sanyo, 日本), 超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司), 高速冷冻离心机 (Thermo Fisher, 美国), 倒置荧光显微镜、成像系统 (尼康, 日本)。

**主要试剂配制** 1 mg/mL 鼠尾胶: 用 0.2% 乙酸配置; 0.1% II 型胶原酶: 用 DMEM 配置; 0.1% 胶原酶-分散酶: 用 DMEM 配置; DNase I 酶: 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 配置; 50% Percoll (配置 6 mL): 需 3 mL 原液, 0.34 mL 10×PBS, 0.2 mL FBS, 2.46 mL PBS; DMEM 完全培养基: 20% FBS、4.5 g/L D-葡萄糖、110 mg/L 丙酮酸钠、20 mmol/L HEPES、100 mg/L 肝素钠、3 μg/L bFGF、1×10<sup>5</sup> U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素。以上试剂均经过 0.22 μm 微孔过滤器除菌。

### 1.2 实验方法

**黑斑侧褶蛙 BMECs 的分离** (1) 黑斑侧褶蛙脑组织的提取与处理。取 6 只健康暂养的黑斑侧褶蛙, 用三卡因甲基磺酸盐 (MS-222; Sigma, 美国) 麻醉, 断头处死后用 75% 乙醇浸泡 3 min, 在无菌条件下打开黑斑侧褶蛙颅骨, 取出全脑置于盛有 D-Hanks 液的培养皿中, 用镊子去除小脑、间脑, 在显微镜下剥离大脑灰质、大血管以及软脑膜, 并将收集到的大脑灰质用无菌 D-Hanks 液漂洗 3 次, 之后将大脑灰质剪成约 1 mm<sup>3</sup> 组织块, 并转至 50 mL 离心管中备用。(2) 脑组织的 2 次连续酶消化。在上述离心管中加入 0.1% II 型胶原酶 (内含 30 U/mL DNase I), 用移液枪上下吹打至培养基变乳白色, 于 28 °C 振荡消化 30 min, 之后在 4 °C, 800×g 条件下离心 10 min, 弃上清液, 向底部沉淀中加入 0.1% 胶原酶-分散酶 (内含 20 U/mL DNase I) 悬浮混匀, 28 °C 振荡消化 30 min, 再次于 4 °C, 800×g 条件下离心 10 min, 弃上清液, 获得组织消化产物。(3) 脑微血管段的分离。向上述底部沉淀中加入 3 mL DMEM 培养液, 悬浮混匀后平铺于经离心形成连续梯度的 50% Percoll 分离液表面, 4 °C, 1 000×g 离心 15 min, 用无菌注射器吸取靠近底部红细胞层之上的黄白色部分, 漂洗 3 次 (4 °C, 400×g 离心 5 min), 弃去上清液, 获得脑组织微血管段。实验过程中操作人员严格遵守华中农业大学科学伦理规范, 并按照华中农业大学科学伦理委员会制定的规章制度执行。

**黑斑侧褶蛙 BMECs 培养及纯化** 向微血管段中加入含 20% FBS 的 DEME 完全培养基重悬, 用移液器将悬浮物吸出接种于涂有鼠尾胶的培养瓶中, 置于 28 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内静置培养, 培养 48 h 后换液以去除未贴壁的细胞。

**黑斑侧褶蛙 BMECs 的形态学鉴定** 将培养有 BMECs 的培养瓶于倒置显微镜下观察细胞形态、贴壁情况及每天的生长状况, 并拍照记录。

**VIII 因子免疫组织化学染色检测** 待培养皿中黑斑侧褶蛙 BMECs 汇合度接近 70% 时, 弃去培养基, 无菌 PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛常温固定 20 min, 于漂洗后的爬片中滴加 0.25% Triton X-100 处理 15 min, 山羊血清封闭 30 min; 甩弃封闭液, 滴加 1:300 (体积比) 稀释的一抗 (兔抗人 VIII 因子单克隆抗体) 覆盖细胞, 将其置于湿盒

中 4 °C 过夜; 吸弃一抗, 无菌 PBS 漂洗 3 次, 滴加 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG, 28 °C 孵育 30 min, 无菌 PBS 漂洗 3 次, 滴加 SABC, 28 °C 孵育 30 min, 再次用无菌 PBS 漂洗 3 次后, 滴加 DAPI 于显微镜下显色 1~2 min, 苏木精复染 30 s, 倒置荧光显微镜下观察并记录。随机选取 5 个视野 (200×), 计算阳性细胞个数, 换算成百分比, 重复 5 次, 取其均值作为阳性 BMECs 的纯度 (%):

BMECs 纯度 = 阳性细胞数 / 视野总细胞数 × 100%

**黑斑侧褶蛙 BMECs 生长曲线的测定** 选取单层生长的 BMECs 制成细胞悬液, 以每孔  $2 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板中, 设置 8 个组, 每组 4 个重复, 空白组不接种细胞, 于 28 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内静置培养。分别在培养 1、2、3、4、5、6、7、8、9 d 后吸弃实验组培养液, 每孔加入 10 μL MTT 后孵育 4 h, 小心弃去上清液, 孔板内加入 100 μL DMSO, 振荡培养 10 min 使结晶紫

充分溶解, 在波长为 492 nm 的酶标仪上测定各孔吸光值。以时间为横坐标, 每日所测平均吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

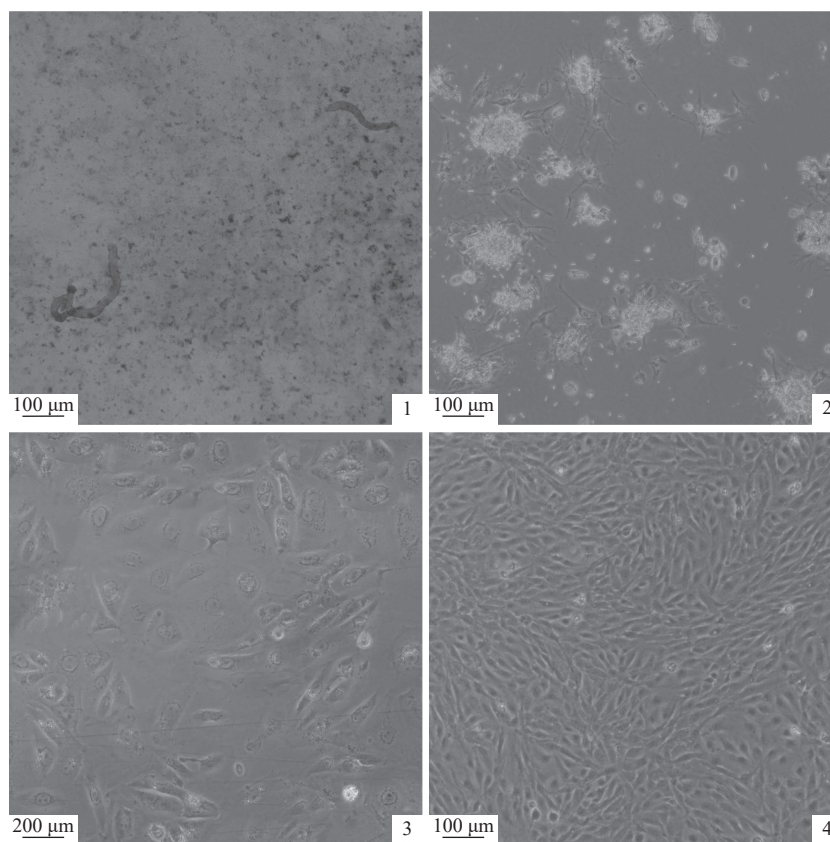
## 2 结果

### 2.1 黑斑侧褶蛙 BMECs 的细胞形态

于倒置显微镜下观察黑斑侧褶蛙 BMECs 在不同时间的细胞形态和生长状况。结果显示, 接种后可见微血管段呈单支状和多支状, 长短不一 (图版 I -1); 1 d 时微血管段变形坍塌, “团簇样”细胞团初步形成, 并扩大成细胞集落 (图版 I -2); 3 d 时细胞集落逐渐扩大为短梭状或多角形细胞; 生长 5 d 后集落逐渐融合 (图版 I -3); 生长 7 d 时, 形成致密的单层细胞, 呈扁平、“铺路石样”镶嵌式排列 (图版 I -4)。

### 2.2 VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定

VIII 因子相关抗原 (VIII-R Ag) 存在于动物的血



图版 I 体外培养不同时间的黑斑侧褶蛙 BMECs 形态观察

1. 培养 0 d, 2. 培养 1 d, 3. 培养 5 d, 4. 培养 7 d。

#### Plate I Observation of BMECs derived from *P. nigromaculata* cultured at different time

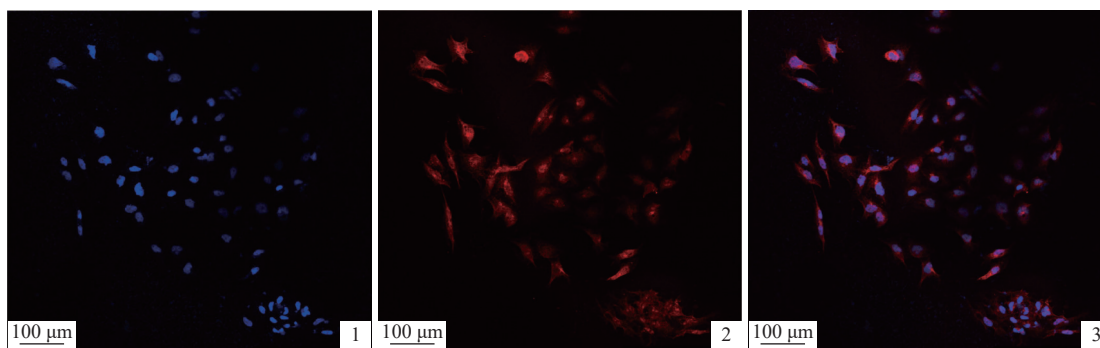
1. cultured for 0 day, 2. cultured for 1 day, 3. cultured for 5 days, 4. cultured for 7 days.

管内皮细胞、血小板及巨核细胞中, 常应用在血管内皮细胞的定量、定性和定位上, 也是 BMECs 常用的标记分子<sup>[17]</sup>。用 VIII 因子相关抗原免疫荧光法对本实验中分离培养的蛙 BMECs 进行鉴定, 在正置荧光显微镜下观察并采集图像。紫外激发使 DAPI 衬染的细胞核呈蓝色荧光 (图版 II -1), VIII 因子相关抗原表达阳性呈红色荧光。结果显示, 绝大部分细胞质呈红色 (图版 II -2), 表明培养的黑斑侧褶蛙 BMECs 的 VIII 因子相关抗原蛋白呈阳性表达。以随机 5 个视野中阳性 BMECs 的数目占

总细胞的比例为 BMECs 阳性细胞率, 在显微镜下计数, 经计算, 本研究分离的 BMECs 阳性细胞率达 97% 以上。

### 2.3 黑斑侧褶蛙 BMECs 生长曲线

用 MTT 法测定蛙 BMECs 细胞增殖率的变化结果显示, 492 nm 处吸光度总体上呈现先升高后降低并趋于稳定的趋势, 1~5 d 内吸光度持续增加, 在第 5 天时达到峰值, 7 d 后吸光度趋于稳定 (图 1)。结果说明细胞生长率也经历增殖、降低、到达稳定的生长模式。



图版 II 培养 6 d 的黑斑侧褶蛙 BMECs 的免疫荧光染色

1. DAPI 衬染的细胞核, 2. VIII 因子相关抗原染色细胞质, 3. 两种染料共染

### Plate II Immunofluorescence staining of *P. nigromaculata* BMECs on the 6<sup>th</sup> day

1. Nucleus stained by DAPI, 2. cytoplasm stained by VIII factor-related antigen, 3. Merge

## 3 讨论

BMECs 细胞的分离培养是构建体外 BBB 模型的前提, 也是研究脑生理、病理、毒理等领域的重要工具<sup>[18-20]</sup>。由于 BMECs 在培养过程中易受周细胞、星型胶质细胞和成纤维细胞等杂细胞污染<sup>[21]</sup>, 最终导致体外培养难度大。因此, 成功分

离、提取脑皮质微血管段是获得高纯度内皮细胞的关键。基于上述问题, 我们结合国内外对大鼠 (*Rattus norvegicus*)<sup>[22]</sup>、猪 (*Sus spp.*)<sup>[23]</sup>、牛<sup>[24]</sup>、兔<sup>[25]</sup> 等动物 BMECs 分离和培养方法, 首次成功分离培养出高产量、高纯度的蛙 BMECs, 为后续两栖动物细胞水平上的研究提供参考。

由于蛙类大脑皮质体积小, 易损伤, 因此在分离脑微血管段时, 要尽量减少对内皮细胞的损伤。基于此, 本研究通过尝试组织块法<sup>[26]</sup>、过筛法<sup>[27]</sup>、酶消化结合筛网法<sup>[28]</sup> 发现, 用两次酶消化法取代物理分离, 可以避免组织匀浆对内皮细胞的损伤, 从而提高内皮细胞的活力。此外, 不同的酶消化时间对微血管段的获取也存在差异, 实验尝试酶消化的时间分别为 30、40 和 60 min, 结果显示, 酶消化 30 min 既可以保证内皮细胞的活力, 又可以清除周细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等杂细胞的污染。同时, 相较于大鼠、兔、牛等物种的分离方法, 我们舍弃了牛血清蛋白, 大大节省了分离时间。

通过酶消化法获得的蛙 BMECs 仍残留许多

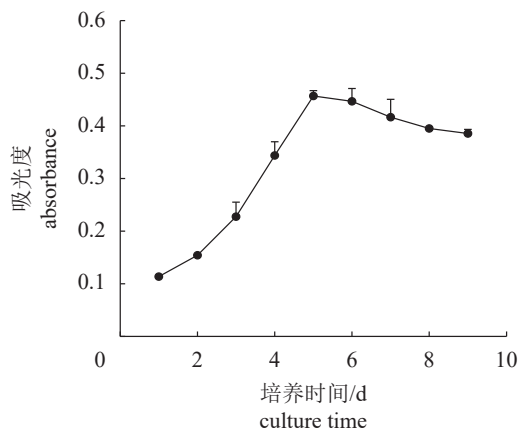


图 1 黑斑侧褶蛙 BMECs 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve for *P. nigromaculata* BMECs

杂细胞, 需要进一步纯化。本研究将消化后的细胞平铺于浓度在 30%、45%、50% 的 Percoll 分离液进行密度梯度离心, 结果显示, Percoll 分离液浓度越大, 脑微血管段离心管底部红细胞及周细胞越远, 分离效果也越好。这与梁朝峰等<sup>[29]</sup>在纯化 SD 大鼠 BMECs 的结果相似。此外, 通过多次尝试还发现, 培养蛙 BMECs 时, 在完全培养基里添加 bFGF 及肝素钠, 不仅可以促进内皮细胞的增殖, 还可以抑制平滑肌细胞的生长。经过以上纯化, 我们分离得到的脑微血管内皮细胞纯度大于 97%。在使用 II 型胶原酶时可以对血管由外到内进行消化, 该步骤是获取 BMECs 的关键<sup>[30]</sup>。联合胶原酶-分散酶消化可以缩短分离时间, 并且也可以节约分离成本, 同时, 还可以达到保护内皮细胞、提高接种存活率、分散杂细胞的目的。BMECs 的原代培养需要涂布基质以利于微血管段贴壁和内皮细胞生长<sup>[31]</sup>。基于此, 我们尝试了鼠尾胶、多聚赖氨酸和明胶等基质后发现, 鼠尾胶最有利于脑微血管段的贴壁。另外还发现, 相比于玻片, BMECs 更易生长于塑料培养皿, 这和 Dömötör 等<sup>[32]</sup> 研究结果一致。

鉴定 BMECs 的主要方法是通过形态学观察和特异性抗原的鉴定<sup>[33]</sup>。本研究培养的 BMECs 分离后呈短梭型, 长短不一, 随着培养时间的增加, “团簇样”细胞团形成, 并逐步扩大成细胞集落, 待细胞融合并形成紧密接触的单层细胞时则呈典型的“铺路石样”镶嵌式排列, 这些均符合内皮细胞的形态特征<sup>[34-37]</sup>, 且和其他物种无明显差异。利用 VIII 因子相关抗原、Weibel-Palade bodies (WPBs)、紧密连接蛋白、乙酰化低密度脂蛋白等都可以对内皮细胞进行鉴定<sup>[38-39]</sup>, 其中, VIII 因子相关抗原是当前最常用的 BMECs 标志分子<sup>[40]</sup>, 本研究采用免疫荧光染色鉴定 VIII 因子相关抗原表达, 结果显示, 分离培养的细胞呈阳性, 进一步证实分离的细胞为蛙 BMECs。

综上所述, 我们得到了一种操作简单、重复性强的原代蛙 BMECs 分离方法, 该方法能够得到较高纯度的蛙 BMECs, 不仅为后续研究蛙类神经性疾病的发病机制提供基础材料, 也为体外药物的筛选提供了细胞模型。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

[1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.

Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2020[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).

[2] 高博. 我国牛蛙产业现状及前景分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2017.

Gao B. The status and analysis of prospects of bullfrog industry in our country[D]. Xiamen: Jimei University, 2017 (in Chinese).

[3] 杨玉慧, 张德兴, 李义明, 等. 中国黑斑蛙种群的线粒体 DNA 多样性和生物地理演化过程的初探[J]. *动物学报*, 2004, 50(2): 193-201.

Yang Y H, Zhang D X, Li Y M, et al. Mitochondrial DNA diversity and preliminary biogeographic inference of the evolutionary history of the black-spotted pond frog *Rana nigromaculata* populations in China[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(2): 193-201 (in Chinese).

[4] 《一、二、三类动物疫病病种名录》及《三类动物疫病防治规范》发布 [J]. *中国水产*, 2022, 8: 23-26. Publish of 《List of types 1, 2, and 3 of animal diseases》 and 《Specification of control for type 3 animal disease》 [J]. *China Fisheries*, 2022, 8: 23-26.

[5] Chang L M, Zhao T, Zhao C L, et al. Microbiomic and transcriptomic insight into the pathogenesis of meningitis-like disease in cultured *Pelophylax nigromaculatus*[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735736.

[6] Hu R X, Yuan J F, Meng Y, et al. Pathogenic *Elizabethkingia miricola* infection in cultured black-spotted frogs, China, 2016[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(12): 2055-2059.

[7] Huang X L, Feng Y, Tang H, et al. Candidate animal disease model of *Elizabethkingia* spp. Infection in humans, based on the systematic pathology and oxidative damage caused by *E. miricola* in *Pelophylax nigromaculatus*[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019: 6407524.

[8] Lei X P, Yi G, Wang K Y, et al. *Elizabethkingia miricola* infection in Chinese spiny frog (*Quasipaa spinosa*)[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 1049-1053.

[9] Trimpert J, Eichhorn I, Vladimirova D, et al. *Elizabethkingia miricola* infection in cultured black-spotted frogs, China, 2016[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(12): 2055-2059. <https://www.china-fishery.cn>

- kingia miricola* infection in multiple anuran species[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021, 68(2): 931-940.
- [10] Abbott N J, Patabendige A A K, Dolman D E M, *et al.* Structure and function of the blood-brain barrier[J]. *Neurobiology of Disease*, 2010, 37(1): 13-25.
- [11] Kim G W, Gasche Y, Grzeschik S, *et al.* Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption?[J]. *Journal of Neuroscience*, 2003, 23(25): 8733-8742.
- [12] Sweeney M D, Zhao Z, Montagne A, *et al.* Blood-brain barrier: from physiology to disease and back[J]. *Physiological Reviews*, 2019, 99(1): 21-78.
- [13] Bernas M J, Cardoso F L, Daley S K, *et al.* Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an *in vitro* cellular model of the blood-brain barrier[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(7): 1265-1272.
- [14] Burkhart A, Thomsen L B, Thomsen M S, *et al.* Transfection of brain capillary endothelial cells in primary culture with defined blood-brain barrier properties[J]. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2015, 12(1): 19.
- [15] Helms H C, Abbott N J, Burek M, *et al.* *In vitro* models of the blood-brain barrier: an overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2016, 36(5): 862-890.
- [16] Al-Obaidi M M J, Desa M N M. Mechanisms of blood brain barrier disruption by different types of bacteria, and bacterial-host interactions facilitate the bacterial pathogen invading the brain[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2018, 38(7): 1349-1368.
- [17] Ngendahimana A. Development of a direct-contact tri-culture model of the human blood-brain barrier and potential applications as a preclinical drug screening tool[D]. West Lafayette: Purdue University, 2017.
- [18] Galla H J. Monocultures of primary porcine brain capillary endothelial cells: still a functional *in vitro* model for the blood-brain-barrier[J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 285: 172-177.
- [19] Quiñonez-Silvero C, Hübner K, Herzog W. Development of the brain vasculature and the blood-brain barrier in zebrafish[J]. *Developmental Biology*, 2020, 457(2): 181-190.
- [20] Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai I A. *In vitro* models of the blood-brain barrier[J]. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 2011, 71(1): 113-128.
- [21] Perrière N, Demeuse P H, Garcia E, *et al.* Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 93(2): 279-289.
- [22] 唐元瑜, 马华根, 刘昭德. 改良原代大鼠脑微血管内皮细胞的培养方法及鉴定[J]. *解剖学报*, 2020, 51(1): 135-138.
- Tang Y Y, Ma H G, Liu Z D. Improvement on the methods about the primary culture of rat brain microvascular endothelial cells and identification[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2020, 51(1): 135-138 (in Chinese).
- [23] Teifel M, Friedl P. Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains[J]. *Experimental Cell Research*, 1996, 228(1): 50-57.
- [24] Lee H S, Namkoong K, Kim D H, *et al.* Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells[J]. *Microvascular Research*, 2004, 68(3): 231-238.
- [25] 陈志, 朱刚, 刘智, 等. 兔脑微血管内皮细胞的培养及鉴定[J]. *医学研究生学报*, 2006, 19(10): 892-894.
- Chen Z, Zhu G, Liu Z, *et al.* Isolation, culture and identification of rabbit brain microvessel endothelial cells *in vitro*[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2006, 19(10): 892-894 (in Chinese).
- [26] 李华, 马明义, 马红艳. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养[J]. *昆明医科大学学报*, 2012, 33(12): 26-29.
- Li H, Ma M Y, Ma H Y. Primary culture of rat brain microvascular endothelial cells[J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2012, 33(12): 26-29 (in Chinese).
- [27] Patabendige A, Abbott N J. Primary porcine brain microvessel endothelial cell isolation and culture[J]. *Current Protocols in Neuroscience*, 2014, 69(1): 3.27. 1-3.27. 17.
- [28] Hou H, Li J, Zhou L, *et al.* An effective method of isolating microvascular endothelial cells from the human dermis[J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(12): 2588-2597.
- [29] 梁朝峰, 郭英, 石德金, 等. 大鼠脑皮质微血管内皮细胞

- 胞的分离和培养[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(5): 1038-1040.
- Liang C F, Guo Y, Shi D J, *et al.* Isolation and primary culture of rat brain microvascular endothelial cells[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2008, 24(5): 1038-1040 (in Chinese).
- [30] 姜晋宁. 微血管内皮细胞的培养及其在医学研究中的应用[J]. *微循环学杂志*, 2004, 14(3): 5-8.
- Lou J N. Culture of microvascular endothelial cells and the application in medicine researches[J]. *Chinese Journal of Microcirculation*, 2004, 14(3): 5-8 (in Chinese).
- [31] 许熊飞, 李润平, 李泉, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养[J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(1): 84-88.
- Xu X F, Li R P, Li Q, *et al.* Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2005, 27(1): 84-88 (in Chinese).
- [32] Dömötör E, Sipos I, Kittel A, *et al.* Rapid communication improved growth of cultured brain microvascular endothelial cells on glass coated with a biological matrix[J]. *Neurochemistry International*, 1998, 33(6): 473-478.
- [33] Ito S, Oishi M, Ogata S, *et al.* Identification of cell-surface proteins endocytosed by human brain microvascular endothelial cells *in vitro*[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(6): 579.
- [34] Prasadarao N V, Wass C A, Kim K S. Endothelial cell GlcNAc beta 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64(1): 154-160.
- [35] Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, *et al.* *In vitro* blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from neonatal and adult rats retain age-related barrier properties[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55166.
- [36] 查雨锋, 张顺, 苏航, 等. 一种高纯度和高活力的大鼠脑微血管内皮细胞的提取及原代培养方法[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(11): 1616-1619.
- Zha Y F, Zhang S, Su H, *et al.* A highly purified and active extract and primitive culture method for rat microvascular endothelial cells[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2014, 30(11): 1616-1619 (in Chinese).
- [37] 田林郁, 李胜富, 周东. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离、培养及不同纯化方法的比较[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2010, 41(5): 869-872.
- Tian L Y, Li S F, Zhou D. Separation, culture and purification of rat brain microendothelial cell[J]. *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*, 2010, 41(5): 869-872 (in Chinese).
- [38] Metcalf D J, Nightingale T D, Zenner H L, *et al.* Formation and function of Weibel-Palade bodies[J]. *Journal of Cell Science*, 2008, 121(1): 19-27.
- [39] 李晓宇, 孙建国, 郑媛婷, 等. 三七总皂苷对抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致大鼠脑微血管内皮细胞损伤的物质基础研究[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(8): 1030-1034.
- Li X Y, Sun J G, Zheng Y T, *et al.* Protective effect study of major constituent in total panax notoginsenoside on rat brain microvessel endothelial cell (RBMEC) damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2007, 23(8): 1030-1034 (in Chinese).
- [40] Ge S J, Pachter J S. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2006, 177(1-2): 209-214.

## Primary culture and identification of *Pelophylax nigromaculata* brain microvascular endothelial cells (BMECs)

AI Danhan<sup>1,2</sup>, HOU Jiahao<sup>1,2</sup>, LIU Fangyuan<sup>1,2</sup>, GU Zemao<sup>1,2,3,4</sup>, HU Ruixue<sup>1,2,4\*</sup>

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China;

3. Shuangshui Shuanglü Institute, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

4. Engineering Research Center of Green development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** In order to isolate the brain microvascular endothelial cells(BMECs) from *Pelophylax nigromaculata*, the brain tissue was used in this study. Under an aseptic condition, the cerebral cortex was digested with 0.1% collagenase type II and collagenase/dispase, then separated by Percoll density gradient centrifugation. BMECs were inoculated in culture flask coated with rat tail glue, and cultured at 28 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Then, the cells were identified by morphologic observation and immunofluorescence staining with factor VIII. Besides, the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay was used to detect the cell viability. The results showed that after 1 day, the microvascular fragments grew adherently and proliferated in a clustered monolayer, then expanded in culture and formed confluent monolayers with the characteristic cobblestone shape on 7th day. Positive VIII expression was frequently observed in *P. nigromaculata* BMECs cytoplasm. Besides, MTT assay showed the cell viability of *P. nigromaculata* BMECs grew the fastest on the 3rd day to the 5th. In this study, an available method of culturing *P. nigromaculata* BMECs was established for the first time, which is of great significance for studying the pathogenesis of frog neurological diseases *in vitro*, providing a cell model for the development and screening of related drugs.

**Key words:** *Pelophylax nigromaculata*; brain; microvascular endothelial cells; primary culture

**Corresponding author:** HU Ruixue. E-mail: hrx@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (32202990); Natural Science Foundation of Hubei Province (2021CFB128); China Postdoctoral Science Foundation (2021M701351)