

· 实验研究 ·

基于预孵法纯化培养小鼠原代视网膜微血管周细胞

刘光辉¹ 林翠红² 杨田野² 徐朝阳¹ 郑永征¹ 赵利¹ 孟春² 潘铭东¹

¹福建中医药大学附属人民医院眼科,福州 350004;²福州大学生物科学与工程学院 350108

通信作者:潘铭东,Email:drpanmd@163.com

【摘要】 目的 建立简便的小鼠原代视网膜微血管周细胞(RMPs)分离、纯化、培养方法。**方法** 在体视显微镜下机械分离获取小鼠视网膜,并碎化、胶原酶消化、过滤处理,收集视网膜碎片,预孵 24 h 后用接种于含有体积分数 20% 胎牛血清的低糖型 DMEM 6 孔板进行培养,并采用差异消化法纯化原代 RMPs。通过倒置相差显微镜观察细胞形态,免疫荧光法鉴定周细胞标志物,周细胞/内皮细胞共培养系统鉴定周细胞的功能。**结果** 经预孵的视网膜碎片再次孵育 24 h 后,细胞开始从视网膜碎片中迁移出,逐渐增生形成大小不一的细胞集落。原代或子代细胞胞体呈不规则三角形,多个长突触,无接触性抑制。免疫荧光显示第 3 代细胞绝大部分 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、血小板源性生长因子受体 β (PDGFR- β)表达阳性,极少部分胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达阳性,von Willebrand 因子(vWF)表达阴性,RMPs 纯度达 97% 以上。体外培养的小鼠 RMPs 能被血管内皮细胞所募集,共同形成微血管样条索。**结论** 本实验成功建立了一种简便的小鼠原代 RMPs 分离、纯化、培养方法,所培养的小鼠原代 RMPs 为功能性 RMPs。

【关键词】 视网膜微血管周细胞; 预孵; 分离; 纯化; 培养

基金项目: 国家自然科学基金项目(81774369); 福建省自然科学基金项目(2016J01574); 福建省医学创新项目(2015-CXB-23)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.10.002

Purification and cultivation of mouse primary retinal microvascular pericytes based on pre-incubation

Liu Guanghui¹, Lin Cuihong², Yang Tianye², Xu Chaoyang¹, Zheng Yongzheng¹, Zhao Li¹, Meng Chun², Pan Mingdong¹

¹Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China; ²College of Biological Science and Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China

Corresponding author: Pan Mingdong, Email: drpanmd@163.com

【Abstract】 Objective To establish a simple method for isolation, purification and cultivation of primary retinal microvascular pericytes (RMPs) from mice. **Methods** Retinas were isolated from mice following with mechanical morcel, enzymatic digestion and filtration. The retinal fragments were incubated with low glucose DMEM with 20% fetal bovine serum after 24 hours pre-incubation. Differential digestion was used for purification of primary RMPs. Morphological examination of cells was performed by phase contrast microscopy, and further characterization was analyzed by immunocytochemistry. Functional assay was evaluated by the pericytes-endothelial cells (ECs) co-culture system. The treatment and use of experimental animals followed the regulations on the administration of experimental animals promulgated by the state science and technology commission. **Results** Cells migrated out of fragments after 24 hours of incubation, and developed into small or large colonies gradually. The cells and their subpassages presented typical pericyte morphology with large irregular triangular cell bodies and multiple long processes. No contact inhibition was observed. Most cells uniformly expressed the cellular markers α -smooth muscle actin (α -SMA) and platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β), a few cells expressed the cellular markers glial fibrillary acidic protein (GFAP), but no cell expressed von Willebrand factor (vWF). The purity rate of RMPs was up to 97%. In the co-culture system, RMPs directly contacted with ECs to form the capillary-like cords *in vitro*.

Conclusions A simple method for the isolation, purification cultivation of mouse RMPs is established, and active RMPs can be readily obtained by this method.

【Key words】 Retinal microvascular pericyte; Pre-incubation; Isolation; Purification; Cultivation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81774369); Natural Science Foundation of Fujian (2016J01574); Fujian Medical Innovation Foundation (2015-CXB-23)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.10.002

视网膜微血管周细胞 (retinal microvascular pericytes, RMPs) 是血-视网膜屏障 (blood retinal barrier, BRB) 的主要组成成分, 其与内皮细胞、基底膜共同构成视网膜微血管壁, 成为当前研究关注的热点之一。既往原代 RMPs 体外研究多基于牛源性细胞进行, 少部分基于人源或猴源性细胞^[1]。由于取材、伦理、培养等限制, RMPs 原代细胞相关体外研究的开展受到一定影响。2005 年后, 原代大鼠 RMPs 的体外培养方法得到了开发和优化, 扩大了 RMPs 体外培养的来源^[1-3]。然而, 当前尚未见有基于小鼠原代 RMPs 的体外应用研究或体外分离培养报道。建立简便、可行的小鼠原代 RMPs 细胞模型, 有助于进一步探讨 RMPs 在 BRB 生理和病理过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康 3 周龄昆明小鼠 20 只, 体质量 (16±5) g。饲养环境温度为 21~25℃, 相对湿度为 50%~55%。普通颗粒饲料喂养, 自由饮水, 12 h/12 h 明暗交替光照。实验动物的处理及使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 低糖 (1 g/L) 型 DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素双抗 [10 kU/ml (商品单位) 青霉素+10 mg/ml 链霉素] (美国 HyClone 公司); 内皮细胞专用培养基 (美国 ScienCell 公司); 二甲亚砜 (DMSO)、I 型胶原酶 (美国 Sigma 公司); 血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 羊多克隆抗体 (编号 ab11713, 工作浓度 1:2 500)、 α 型平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 兔多克隆抗体 (编号 ab5694, 工作浓度 1:100) (美国 Abcam 公司); 血小板源性生长因子受体- β (platelet-derived growth factor receptor- β , PDGFR- β) 小鼠单克隆抗体 (编号 sc-374573, 工作浓度 1:250)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 小鼠单克隆抗体 (编号 sc-71143, 工作浓度 1:250)、TRITC 标记的山羊抗兔荧光二抗 (编号 ab6717, 工作浓度 1:2 500)、FITC 标记的山羊抗小鼠荧光二抗 (编号 ab6786, 工作浓度 1:2 500)、FITC 标记的兔抗山羊荧光二抗 (编号 ab6737, 工作浓度 1:2 500) (美国 Santa Cruz 公司); 人工基质胶 Matrigel (美国 BD 公司); 细胞示踪剂 (美国 Molecular Probes 公司); 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (美国 Corning 公司); 四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) (南京凯基生物

技术有限公司); 抗荧光淬灭封片液 (上海碧云天生物技术有限公司); 6 孔板及培养皿 (美国 Corning 公司); 体视显微镜 (江西凤凰光学集团有限公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); LSM 710 型激光扫描共焦荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司); CO₂ 细胞培养箱 (美国 NUARE 公司); Model550 酶标仪 (奥地利 Tecan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RMPs 分离培养 所有操作均在无菌环境下进行, 所用器具事先均经高温灭菌处理。小鼠颈椎脱臼法处死后摘取双侧眼球, 浸入含质量分数 1% 青霉素-链霉素双抗的 PBS 中漂洗 1 min, 移至体积分数 75% 乙醇中浸泡 30 s, 取出再次浸入 PBS 漂洗 1 min。将眼球置于含 PBS 的直径 6 cm 培养皿中, 在体视显微镜的辅助下沿角巩膜缘处全周剪开, 用显微虹膜恢复器自视神经端向切口端轻轻推离出完整视网膜。取出视网膜后置于 PBS 中, 轻轻漂洗 3 次以去除残留玻璃体。

将取出的视网膜组织置于含少量 PBS 的单孔皿中, 使用显微角膜剪将视网膜反复剪切直至均匀糊状。加入 2 g/L I 型胶原酶 3 ml, 37℃ 下消化 10 min。过直径 55 μ m 滤网, 翻转滤网, 用 DMEM 冲洗滤网沉积的视网膜碎片, 收集含视网膜碎片的洗脱液, 4℃ 条件下 300×g 离心 5 min。吸除上清液, 加入 20% FBS 的 DMEM 将下方沉淀轻轻吹打混匀, 接种于 6 孔板中。

将接种视网膜组织碎片的 6 孔板置于体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中 37℃ 下预孵 24 h。将完成预孵的组织碎片连同培养基转移至新的 6 孔板, 培养 48 h, 期间禁止移动培养板。培养后 72 h 从培养孔边缘吸除含有未沉底组织碎片的培养基, 加入新培养基。换液时, 避免吹打孔底, 以免影响细胞贴壁, 每 3 天换液 1 次。当原代细胞长满孔底约 80% 时, 吸除旧培养基后, PBS 漂洗 1 遍, 加入质量分数 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 条件下消化 1~2 min, 待杂质细胞开始收缩变圆而 RMPs 变化尚不明显时, 加入 DMEM 终止消化并轻轻吹打孔底致杂质细胞脱落, 弃 DMEM, PBS 清洗 2 遍。再次加入胰蛋白酶消化 2~3 min, RMPs 回缩变圆时, 加入 DMEM 终止消化, 吹打致细胞脱壁。将消化下来的 RMPs 转入离心管, 4℃ 条件下 300×g 离心 5 min, 弃上清, 以 DMEM 按 1:3 的比例进行传代培养。

1.2.2 细胞鉴定 在倒置显微镜下观察细胞形态及生长, 依据大体形态及生长特征进行初步鉴定, 细胞胞体呈不规则三角形、生长无接触性抑制者即初步判断为 RMPs。选取周细胞标志物 α -SMA、PDGFR- β 作为阳性标志物, 内皮细胞标志物 vWF、胶质细胞标志物 GFAP 作为阴性标志物, 参照文献 [1] 方法对第 3 代细

胞进行免疫荧光鉴定,激光扫描共焦显微镜下观察。

1.2.3 功能学鉴定 参照文献[4-5]的方法获取、培养小鼠视网膜微血管内皮细胞(endothelial cells, ECs),并进行相关鉴定,确认为 ECs。参照文献[6],将第 3 代 RMPs 和 ECs 用细胞示踪剂标记后,按 1:10 的比例混匀接种于 Matrigel,进行 RMPs/ECs 三维成管试验,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 细胞生长规律 取细胞密度为 1×10^4 的单细胞悬液 100 μl ,接种于 96 孔板中进行培养,每 3 天换液 1 次。每日相同时间点收集细胞,加入 5 g/L MTT 溶液 20 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 4 h。弃上清液,每孔加入 150 μl DMSO 振荡 10 min,于酶标仪上测定波长 490 nm 处各孔吸光度(A)值,连续 12 d,绘制 RMPs 生长曲线。

2 结果

2.1 RMPs 生长及形态学表现

经碎化、酶消化、过滤后,获得大量含微血管的活性视网膜碎片(图 1A)。这些经预孵的碎片再次孵育 24 h 后,即可见细胞从视网膜碎片中溢出,以碎片为中心向外迁徙,贴壁生长(图 1B)。细胞逐渐增生,围绕碎片形成大小不等的细胞集落(图 1C)。原代细胞和子代细胞均不存在接触性抑制,细胞可重叠生长,具有

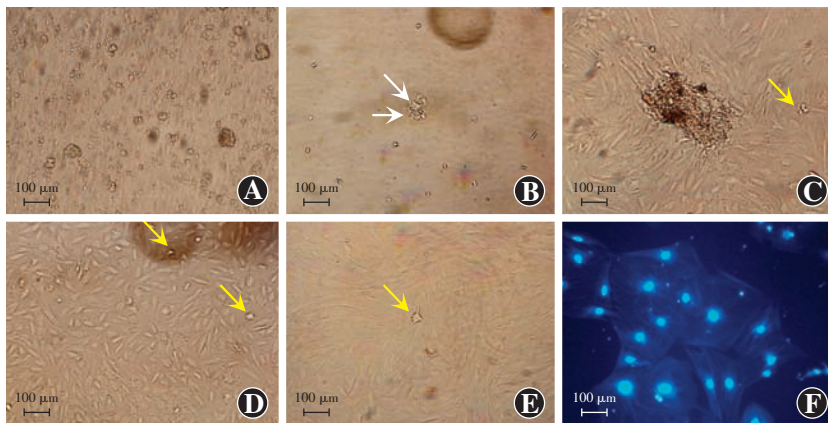


图 1 小鼠原代 RMPs 培养(标尺=100 μm) A:视网膜经碎化、酶消化后预孵,可见大量大小不均匀的视网膜碎片 B:正式接种后 24 h,可见体积微小的细胞从视网膜碎片中迁移出(白箭头) C:接种后 5 d,细胞围绕视网膜碎片增生形成细胞集落,并混杂有异质细胞(黄箭头) D:原代细胞重叠生长,生长无接触性抑制,其中伴有胞体细小的异质细胞(黄箭头) E:第 2 代细胞,无接触性抑制生长的细胞为优势细胞,存在少量异质细胞(黄箭头) F:第 2 代细胞,细胞体宽大呈不规则三角形,细胞内肌丝浅染,细胞核深染,细胞核位于细胞中央(DAPI)

明显的周细胞特征性(图 1D,E)。原代及子代 RMPs 细胞胞体绝大部分均呈不规则三角形或类三角形,伴多个长突触,与既往报道的周细胞形态一致。原代细胞胞体相对细小,子代细胞的胞体稍大,特别是接种密度低者,细胞体宽大扁平(图 1F,2A)。培养细胞中杂质细胞数量少,细胞体积小,或伴细小突触(图 1C~E)。

2.2 RMPs 细胞免疫荧光染色

绝大部分细胞均周细胞标志物 α -SMA 和 PDGFR- β 表达双阳性(图 2A~E),证实为 RMPs。极少量细胞 GFAP 表达阳性,为视网膜胶质细胞;未见 vWF 阳性表达的细胞(图 2F~I)。RMPs 细胞纯度达 97% 以上。

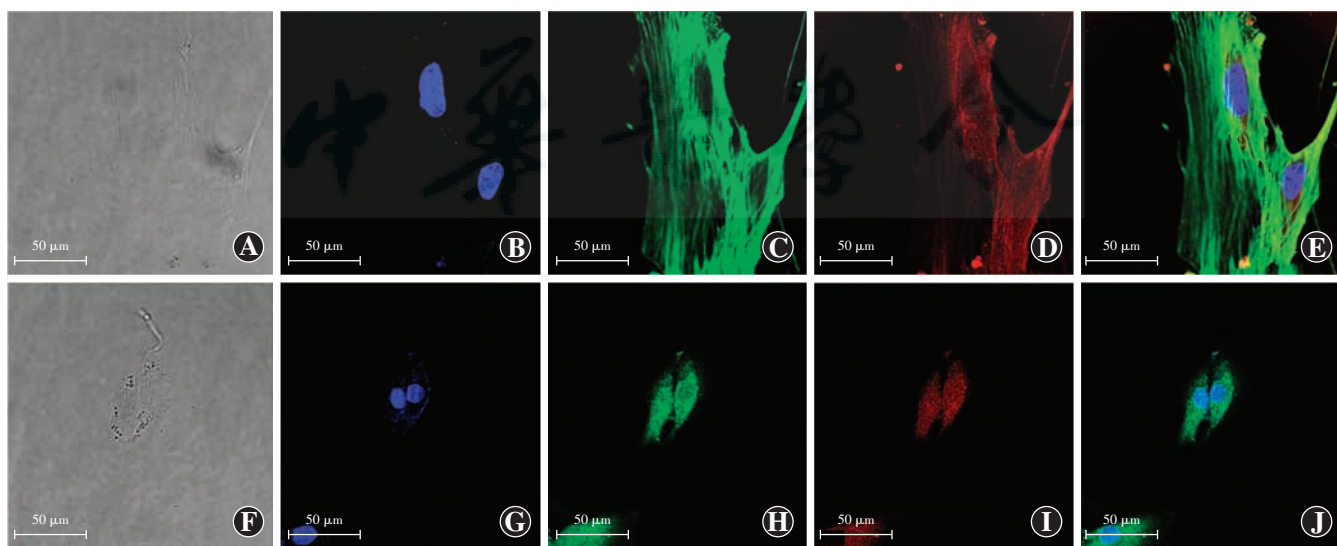


图 2 第 3 代小鼠 RMPs 免疫荧光染色鉴定(标尺=50 μm) A:光学显微镜下 RMPs 细胞胞体宽大扁平 B:DAPI 染色见细胞核居于细胞体中央 C:细胞 α -SMA 染色阳性,肌丝清晰可见(FITC) D:细胞 PDGFR- β 染色阳性,表达于细胞膜(TRITC) E:B、C 和 D 融合图 F:光学显微镜下可见少量杂质细胞,细胞体较小 G:DAPI 染色可见少量杂质细胞,细胞核较小 H:细胞 GFAP 表达阳性(FITC) I:细胞 vWF 表达阴性(TRITC) J:G、H 和 I 融合图,表明杂质细胞为胶质细胞

2.3 RMPs/ECs 三维共培养成管试验

在 Matrigel 三维培养系统中, RMPs 与 ECs 共培养后 48 h 可在 Matrigel 中形成微血管条索样, 其中 RMPs 位于条索的外周(图 3A), ECs 构成条索的主体(图 3B)。条索后期可以相互融合成大的聚合物。

2.4 RMPs 生长规律

第 3 代 RMPs 约在培养的第 5 天进入对数生长期, 持续 5~6 d, 约在第 10 天进入平台生长期(图 4)。

3 讨论

RMPs 是 BRB 的重要组成部分, 其参与视网膜微血管的生理活动, 如能够调节 BRB 的通透性、调控内皮细胞的增生、参与生理性血管新生等^[7-9]。研究发现, RMPs 参与视网膜微血管的病理过程, 在病理性新生血管形成中扮演重要角色, 与糖尿病视网膜病变等视网膜新生血管性疾病密切相关^[9-10]。基于常用的模型动物, 分离培养原代 RMPs, 建立简便、可行的原代细胞模型, 有助于促进 RMPs 体外研究的开展。

迄今, 已从人、猴、牛等视网膜组织材料中分离培养出原代 RMPs 应用于体外研究^[11-13]。受伦理道德、组织材料稀少或获取不易等原因的影响, 这些 RMPs 分离培养方法的应用受到了限制^[1]。2005 年, 王应利等^[2]首次将大鼠视网膜作为组织材料应用于原代 RMPs 培养, 采用免疫磁珠法成功地分离、纯化、培养出了大鼠原代 RMPs。由于该方法复杂、昂贵, 未能得到有效推广。2014 年, 杨密清等^[3]和刘光辉等^[14]对大鼠原代 RMPs 的分离、培养、纯化方法进行了优化, 扩大了原代 RMPs 体外培养组织原料的来源, 简化了分离、纯化过程, 推动了 RMPs 体外研究的发展。小鼠是实验室常见的模型动物, 也是常用的糖尿病模型动物, 基于小鼠分离、纯化、培养的 RMPs 用于视网膜新生血管性疾病的体外研究无疑具有重大的意义, 但目前国内外尚未见原代小鼠 RMPs 的分离、纯化、培养方法报道。

本研究中采用简便的方法自小鼠视网膜中分离培养出了原代 RMPs。幼龄鼠 RMPs 增生能力较成年鼠强^[3], 因此本研究中选用 3 周龄小鼠视网膜用于取材。小鼠眼球较小, 在视网膜分离获取过程中, 需要借助体视显微镜。体视显微镜下操作获取的视网膜组织相对

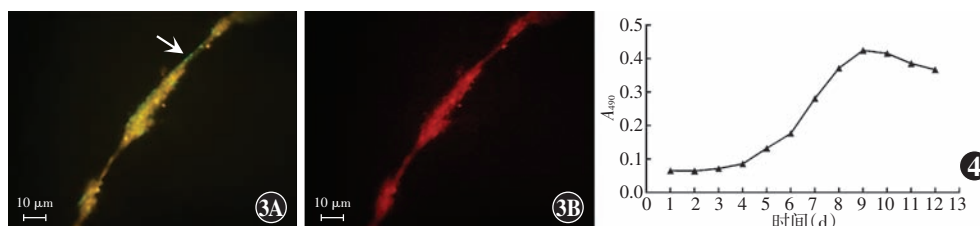


图 3 RMPs/ECs 三维共培养成管试验(标尺 = 10 μ m) RMPs 与 ECs 在 Matrigel 培养基中能共同形成毛细血管样条索 A: 绿色细胞示踪剂标记的 RMPs, 绿色的 RMPs (箭头) 位于条索的外周 B: 红色细胞示踪剂标记的 ECs, ECs 构成条索的主体 图 4 小鼠 RMPs 生长曲线 第 3 代 RMPs 于培养的第 5 天进入对数生长期, 持续 5~6 d, 培养的第 10 天进入平台生长期

纯净, 夹杂的玻璃体等杂质组织较少, 有利于 RMPs 的培养纯化。

细胞纯化是 RMPs 体外培养中的关键问题。视网膜组织是多细胞成分的组织, 在获取的小鼠视网膜组织碎片中含大量活性的 RMPs、内皮细胞和胶质细胞。内皮细胞和胶质细胞是 RMPs 培养过程中主要的贴壁生长型杂质细胞^[2,15]。视网膜组织碎片消化时间越长, 杂质细胞污染越多^[16]。本研究中优化了小鼠视网膜组织碎片的消化时间。小鼠视网膜组织较薄, 本研究中发现将胶原酶消化时间控制在 10 min, 可保留良好的细胞活力, 又可避免因消化过度带来过多的杂质细胞。杂质细胞多处于视网膜碎片的外层, 本研究中发现胶质细胞之类杂质迁移出视网膜碎片的时间早, 贴壁时间快。针对这一特点, 本研究中创新性地提出了预孵法用于 RMPs 的纯化培养, 即在培养起始阶段, 将视网膜组织碎片预孵 24 h, 再孵育培养 RMPs, 经过预孵处理, 去除溢出、贴壁时间更早的胶质细胞, 减少后续培养中胶质细胞的数量。培养使用的孔板未进行明胶等包被、培养基亦非专用型内皮细胞培养基, 不利于内皮细胞移行、贴壁和存活, 故内皮细胞数量也较少。本研究在细胞传代时应用了差异消化法进行除杂。研究表明, RMPs 细胞体宽大、扁平, 突起多, 可重叠生长, 消化时需要较长的时间才能脱壁, 而消化内皮细胞和胶质细胞需要的时间较短, 进行差异消化法可以去除消化耗时较少的杂质细胞, 提高培养的 RMPs 纯度^[1]。经过上述处理, 即获得相对纯净的原代 RMPs, 免疫荧光法证明经差异消化法处理的子代细胞无内皮细胞污染, 仅可见极少量胶质细胞污染。纯净度接近既往免疫磁珠法纯化培养的原代大鼠 RMPs^[2]。

免疫学方法是 RMPs 体外鉴定的主要方法之一。目前, 已经发现大量周细胞的分子标志物, 如 α -SMA、PDGFR- β 、NG2、Desmin、CD13、RGS5、SUR2、Kir6.1、Endosialin、DLK1、XlacZ4 和 NG2dsRED 等^[17]。这些周

细胞标志物在不同的组织器官中表达不同,其表达水平还会随着周细胞发育、病理状态及体外培养情况等的变化而波动。因此,并非所有的标志物在 RMPs 的鉴定中都具有实际应用价值。 α -SMA 被视为周细胞内存在收缩蛋白、具有收缩功能的一线证据^[18]。 α -SMA 常表达于体内血管重建处周细胞^[19]。7 日龄大鼠体外原代 RMPs 几乎完全 α -SMA 表达阳性^[20]。因此, α -SMA 作为一种细胞内结构蛋白已被视为周细胞常规性标志物^[21]。PDGFR- β 是周细胞在血管生成的生理活动和新生血管的病理活动中重要的功能蛋白。PDGFR- β 表达于周细胞表面,周细胞通过 PDGF-B 与 ECs 发生应答,在血管发生及成熟过程中被募集参与此类生理病理活动^[22]。

本研究中选择 α -SMA、PDGFR- β 作为主要的阳性标志物,vWF 和 GFAP 作为阴性标志物,采用双重标记法及高分辨率激光扫描共焦显微镜用于 RMPs 的鉴定,结果显示所培养的子代 RMPs 纯度达 97% 以上,无内皮细胞污染,仅有少量胶质细胞。 α -SMA 阳性表明所培养的小鼠 RMPs 在体外培养中仍然保留有收缩能力;PDGFR- β 阳性表明所培养的小鼠 RMPs 可以应用于体外视网膜新生血管的研究。

功能学鉴定也是体外 RMPs 培养鉴定中不可缺失的环节。周细胞/ECs 共培养试验是确认体外培养周细胞功能的有效方法^[6]。共培养体系中 RMPs 能够被 ECs 所募集,在三维系统中共同形成毛细血管条索样组织。采用本研究方法所培养的小鼠 RMPs 在体外仍然保留了与 ECs 密切联系的能力,是功能性 RMPs。

本研究中成功建立了一种简便的小鼠 RMPs 分离、纯化、培养方法,所培养的原代小鼠 RMPs 为功能性 RMPs,将能够作为体外视网膜新生血管相关性疾病研究的有力工具。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu G, Meng C, Pan M, et al. Isolation, purification, and cultivation of primary retinal microvascular pericytes; a novel model using rats [J]. *Microcirculation*, 2014, 21(6): 478-489. DOI: 10.1111/micc.12121.
- [2] 王应利, 郭斌, 惠延年, 等. 免疫磁珠法原代分离培养大鼠视网膜微血管周细胞[J]. *眼科新进展*, 2005, 25(6): 498-502. Wang YL, Guo B, Hui YN, et al. Primary isolation of rat retinal microvascular pericytes with immunomagnetic beads [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2005, 25(6): 498-502.
- [3] 杨密清, 刘光辉, 王航, 等. 初断乳大鼠视网膜微血管周细胞的分离培养[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(7): 963-969. DOI: 10.11844/cjcb.2014.07.0410. Yang MQ, Liu GH, Wang H, et al. Isolation and cultivation of retinal microvascular pericytes from weanling rats [J]. *Chin J Cell Biology*, 2014, 36(7): 963-969. DOI: 10.11844/cjcb.2014.07.0410.
- [4] Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, et al. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Exp Eye Res*, 2012, 96(1): 181-190. DOI: 10.1016/j.exer.2011.12.003.
- [5] 胡健艳, 吴强, 宋蓓雯, 等. 大鼠视网膜微血管内皮细胞的原代培养及鉴定改进[J]. *眼科*, 2012, 21(4): 261-263. Hu JY, Wu Q, Song BW, et al. Improved primary culture and identification of rat retinal microvascular endothelial cells *in vitro* [J]. *Ophthalmol Chin*, 2012, 21(4): 261-263.
- [6] Bryan BA, D'Amore PA. Pericyte isolation and use in endothelial/pericyte coculture models [J]. *Methods Enzymol*, 2008, 443: 315-331. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)02016-8.
- [7] von TD, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(5): 623-629. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.10.019.
- [8] Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions [J]. *Circ Res*, 2005, 97(6): 512-523.
- [9] Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis [J]. *Int J Develop Biology*, 2011, 55(3): 261-265.
- [10] Motiejūnaitė R, Kazlauskas A. Pericytes and ocular diseases [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86(2): 171-177. DOI: 10.1016/j.exer.2007.10.013.
- [11] 刘洪雷, 王雨生, 刘军, 等. 人视网膜微血管周细胞原代培养及鉴定 [J]. *国际眼科杂志*, 2005, 5(1): 55-58. Liu HL, Wang YS, Liu J, et al. Primary culture and characterization of microvascular pericytes from human retina [J]. *Int J Ophthalmol*, 2005, 5(1): 55-58.
- [12] Buzney SM, Frank RN, Robison WG. Retinal capillaries: proliferation of mural cells *in vitro* [J]. *Science*, 1975, 190(4218): 985-986. DOI: 10.1126/science.810891.
- [13] Schor AM, Schor SL. The isolation and culture of endothelial cells and pericytes from the bovine retinal microvasculature; a comparative study with large vessel vascular cells [J]. *Microvasc Res*, 1986, 32(1): 21-38.
- [14] 刘光辉, 孟春, 徐朝阳, 等. 大鼠视网膜微血管周细胞的选择性培养 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(1): 18-22. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.004. Liu GH, Meng C, Xu CY, et al. Selective culture of rat retinal microvascular pericytes [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(1): 18-22. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.004.
- [15] Nayak RC, Herman IM. Bovine retinal microvascular pericytes: isolation, propagation, and identification [J]. *Methods Mol Med*, 2001, 46: 247-263. DOI: 10.1385/1-59259-143-4:247.
- [16] 陈百华, 姜德咏, 唐罗生. 牛视网膜微血管周细胞的选择性培养 [J]. *眼视光学杂志*, 2003, 5(1): 39-41. Chen BH, Jiang DY, Tang LS. Selective culture of bovine retinal capillary pericytes [J]. *Chin J Opt Ophthalmol*, 2003, 5(1): 39-41.
- [17] Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(2): 193-215. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- [18] Wallow IH, Burnside B. Actin filaments in retinal pericytes and endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1980, 19(12): 1433-1441.
- [19] Hellberg C, Ostman A, Heldin CH. PDGF and vessel maturation [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 180: 103-114. DOI: 10.1007/978-3-540-78281-0_7.
- [20] Dore-Duffy P, LaManna JC. Physiologic angiodynamics in the brain [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(9): 1363-1371. DOI: 10.1089/ars.2007.1713.
- [21] Dore-Duffy P, Cleary K. Morphology and properties of pericytes [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 686: 49-68. DOI: 10.1007/978-1-60761-938-3_2.
- [22] Smith SW, Chand S, Savage CO. Biology of the renal pericyte [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(6): 2149-2155. DOI: 10.1093/ndt/gfs134.

(收稿日期:2018-01-05 修回日期:2019-08-19)

(本文编辑:杜娟)