

[文章编号] 1007-3949(2005)13-04-0393-04

• 实验研究 •

不同诱导条件对人骨髓基质干细胞向内皮分化的影响

武晓静¹, 黄 岚¹, 周 骥², 崔 斌¹, 董红梅¹, 周音频¹

(第三军医大学附属新桥医院 1. 全军心血管内科中心; 2. 外科, 重庆市 400037)

[关键词] 细胞生物学; 骨髓基质干细胞分化; 免疫细胞化学; 内皮细胞; 细胞因子; 细胞培养; 诱导分化

[摘要] 目的 探讨不同诱导条件对人骨髓基质干细胞向内皮分化的影响。方法 采用密度梯度离心法分离培养人骨髓基质干细胞, 用荧光激活细胞分选法分析骨髓基质干细胞 CD34、CD105 和 CD166 的表达率; 用免疫荧光细胞化学法观察骨髓基质干细胞在细胞因子(50 μg/L 血管内皮细胞生长因子、5 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子、100 mg/L 内皮细胞生长补充因子)、内皮条件培养基或与成熟兔主动脉内皮共培养 5 天时 vWF 或/和 Flk-1 蛋白的表达。结果 分离培养的骨髓基质干细胞 CD34 表达率为 4.16% ± 0.16%, 与阴性对照(4.06% ± 0.23%) 相比无统计学差异, CD105 表达率为 90.20% ± 2.35%, CD166 表达率为 82.30% ± 3.22%, 均明显高于阴性对照($P < 0.05$)。诱导前骨髓基质干细胞不表达 vWF 和 Flk-1 蛋白, 经血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和内皮细胞生长补充因子等细胞因子联合诱导 5 天时, 33.42% 骨髓基质干细胞开始表达 vWF 蛋白; 与成熟内皮共培养 5 天时, vWF 染色仍为阴性, 但 25.71% 骨髓基质干细胞开始表达 Flk-1; 用内皮条件培养基培养 5 天时, 骨髓基质干细胞 vWF 和 Flk-1 染色均为阴性。结论 细胞因子和成熟内皮细胞均能诱导骨髓基质干细胞向内皮分化, 而内皮条件培养基不能诱导骨髓基质干细胞向内皮分化。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Plasticity of Bone Marrow Stromal Stem Cells along Endothelial Lineage under Different Culture Condition

WU Xiaojing, HUANG Lan, ZHOU Qi, CUI Bin, DONG Hong-Mei, and ZHOU Yir-Pin

(The Cardiovascular Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Marrow Stromal Stem Cells; Endothelial Cell; Cytokine; Cell Culture; Differentiation; FACS; Fluorescence Immunocytochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the plasticity of bone marrow stromal stem cells(MSCs) along endothelial lineage under different culture condition. **Methods** The human MSCs were isolated by density gradient centrifugation. Fluorescence activated cell sorter (FACS) was used to analyze the phenotypic characteristics of MSCs. Fluorescence Immunocytochemistry was used to observe the vWF and/or Flk-1 protein expression of MSCs after cultured with DMEM medium containing 50 μg/L VEGF, 5 μg/L bFGF, 100 mg/L ECGS or with endothelial cells(ECs) conditioned medium or cocultured with mature rabbit ECs for 5 days.

Results FACS analysis indicated that the MSCs did not express CD34 (CD34 expressing cells vs negative control: 4.16% ± 0.16% vs 4.06% ± 0.23%, $n = 6$, $P > 0.05$), but expressed CD105 and CD166 (CD105 expressing cells vs negative control: 90.20% ± 2.35% vs 4.06% ± 0.23%; CD166 expressing cells vs negative control: 82.30% ± 3.22% vs 4.06% ± 0.23%, $n = 6$, $P < 0.05$). 33.42% MSCs began to express vWF after cultured in DMEM containing VEGF, bFGF and ECGS.

25.71% MSCs began to express Flk-1, but did not express vWF after cocultured with mature ECs for 5 days. The MSCs did not express Flk-1 or vWF after cultured in ECs conditioned medium.

Conclusions Cytokines and mature ECs could induce MSCs to differentiate along endothelial lineage, while ECs conditioned medium could not.

骨髓基质干细胞是骨髓中存留的一种成体干细胞, 其强大的自我更新能力和分化潜能不仅使其成为组织工程研究的热点, 也推动了心血管疾病细胞

替代治疗的研究与发展^[1]。已有研究表明骨髓基质干细胞能分化成内皮参与缺血组织血管新生和损伤动脉再内皮化^[2,3], 进一步研究骨髓基质干细胞向内皮分化的机制和影响因素对促进心血管疾病内皮细胞替代治疗具有重要意义。本研究通过观察细胞因子、成熟内皮和内皮条件培养基对骨髓基质干细胞向内皮分化的影响, 探讨骨髓基质干细胞在不同诱导条件下向内皮分化的能力。

[收稿日期] 2004-10-22 [修回日期] 2005-06-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30400517 和 30270568)

[作者简介] 武晓静, 博士, 主治医师, 讲师, 主要研究方向为血管损伤及相关修复机制。通讯作者黄岚, 心内科主任, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为血管损伤与修复以及冠心病防治, 电话为 02368755601, E-mail 为 huanglans@21cn.com。周骥, 博士, 主治医师, 讲师, 主要研究方向为心肌肥厚及相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 干粉培养基、胎牛血清: Hyclone, 美国; 4',6'-二乙酰基-2-苯基吲哚(4',6'-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)、内皮细胞生长补充因子(endothelial cell growth supplement, ECGS)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF): Sigma, 美国; 兔抗人 vWF、Flk-1 抗体: Santa Cruz, 美国; 鼠抗人 CD34、CD105、CD166 单克隆抗体: Phamingen, 美国; TRITC、FITC 标记羊抗兔 IgG、FITC 标记羊抗小鼠 IgG: Zymed, 美国; 流式细胞仪: BD FACSCalibur (tm), 美国。

1.2 人骨髓基质干细胞的分离培养^[4]

由本院胸外科提供手术切除的无病变肋骨, 用密度梯度离心法(1.077 g/mL)分离骨髓单个核细胞, 然后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮并调节细胞密度至 1×10^6 cells/L 接种于塑料培养板, 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养。7 天时筛选形成集落的细胞并用胰酶消化传代扩增细胞。

1.3 兔主动脉内皮细胞的原代培养与鉴定

雄性健康新西兰兔(250~500 g)由第三军医大学实验动物中心提供, 无菌条件下取出其胸主动脉, 用酶消化法分离内皮细胞, 培养于含 20% 胎牛血清、100 mg/L ECGS 的 DMEM 培养基中。细胞汇合后传代继续培养, 实验用 3~5 代细胞。内皮细胞通过形态学及 vWF 因子免疫组织化学方法鉴定。

1.4 荧光激活细胞分选

将细胞加入微量离心管, 每管含 10^6 细胞, 分别用 2 μg 鼠抗人 CD105、CD166 和 CD34 抗体在 37℃ 标记 30 min(阴性对照将一抗换成 PBS), 再用 FITC 标记羊抗小鼠 IgG 37℃ 标记 30 min, 1% 多聚甲醛固定后进行流式细胞仪检测。

1.5 内皮条件培养基收集

参照文献[5]将兔内皮细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 待其长至 60% 汇合时换无血清培养基, 继续培养 24 h 后收集培养基, 15 000 g 离心 3 min, 0.22 μm 滤膜过滤后 -20℃ 保存备用。

1.6 免疫荧光细胞化学法

将骨髓基质干细胞以 1×10^7 cells/L 密度接种于盖玻片上, 加入内皮条件培养基或含 50 μg/L VEGF、5 μg/L bFGF、100 mg/L ECGS、20 ku/L 肝素、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。将兔血管内皮细胞以

$\times 10^6$ cells/L 密度接种于盖玻片上, 待其长至 60% 汇合时, 将人骨髓基质干细胞以 1×10^6 cells/L 密度接种于长有内皮细胞的盖玻片上, 6 h 后去掉未贴壁的骨髓基质干细胞, 换无血清培养基继续共培养。骨髓基质干细胞分别与细胞因子、内皮条件培养基或与成熟内皮共培养 5 天时取出盖玻片, 4% 多聚甲醛固定后滴加一抗(兔抗人 Flk-1 抗体 1:50, 兔抗人 vWF 抗体 1:100, 阴性对照用 PBS 代替一抗) 4℃ 孵育过夜, 再用 FITC 标记的羊抗兔二抗 37℃ 孵育 30 min, 然后与荧光标记物 DAPI(5 mg/L) 孵育 30 min 衬染细胞核, 清洗后在荧光显微镜下观察 Flk-1 和 vWF 蛋白表达。

1.7 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 SPSS10.0 统计软件包行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 骨髓基质干细胞的形态和分子表型特征

经贴壁筛选的骨髓细胞 3 天时数量少, 散在分布, 大多呈梭形, 少数呈小圆形, 1 周左右可见明显的细胞集落形成, 集落中央细胞呈簇样, 周围为放射状排列的扁平形或梭形细胞, 传 2~3 代后呈较均一的长梭形(图 1, Figure 1)。流式细胞仪检测结果表明 CD34、Flk-1 和 vWF 表达率分别为 $4.16\% \pm 0.16\%$ 、 $3.86\% \pm 0.25\%$ 和 $3.39\% \pm 0.28\%$, 与阴性对照组相比无统计学差异($n = 6, P > 0.05$)。CD105 表达率为 $90.20\% \pm 2.35\%$, CD166 表达率为 $82.30\% \pm 3.22\%$, 均明显高于阴性对照($n = 6, P < 0.05$) (图 2, Figure 2)。

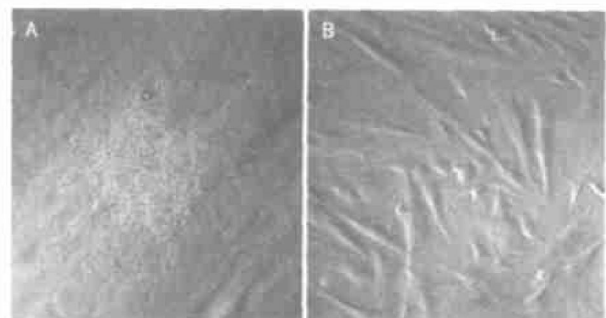


图 1. 骨髓基质干细胞的形态学特点 A 为培养 1 周左右形成细胞集落, 集落中间细胞呈簇样, 周围为放射状排列扁平形或梭形细胞 ($\times 50$ 倍); B 为传 2~3 代后的骨髓基质干细胞呈较均一的长梭形 ($\times 200$ 倍)。

Figure 1. The morphological characterization of MSCs

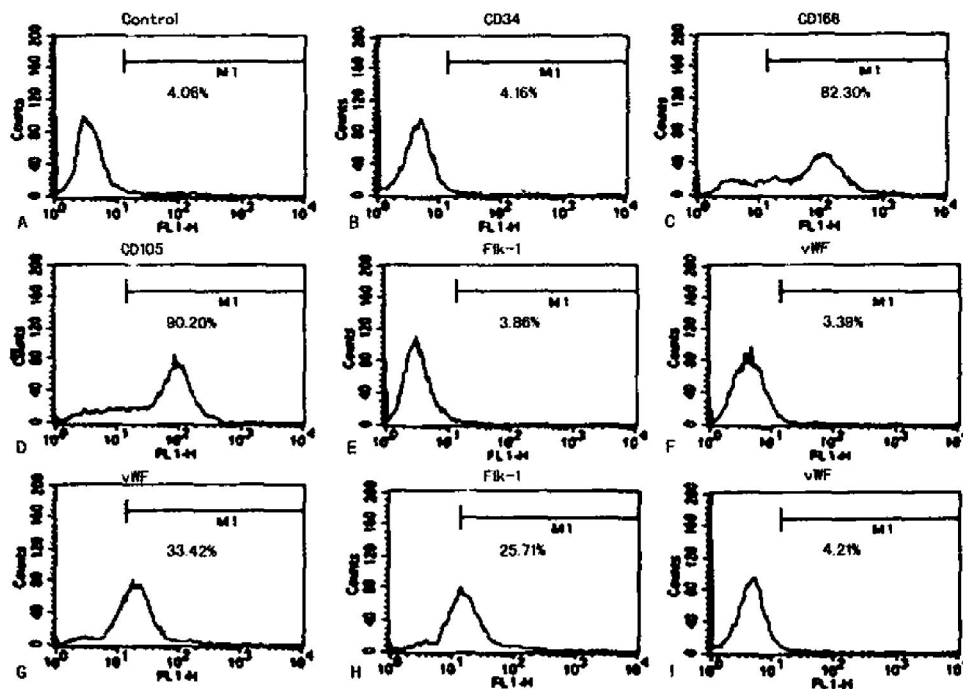


图 2. 骨髓基质干细胞的分子表型特征 A 为阴性对照, B~ F 为新鲜分离骨髓基质干细胞 CD34、CD166、CD105、Flk-1 和 vWF 表达, G 为经细胞因子诱导后骨髓基质干细胞 vWF 表达, H 和 I 为与成熟内皮共培养骨髓基质干细胞 Flk-1 和 vWF 表达。M1 为阳性细胞分选标定点。

Figure 2. The molecular phenotypic characterization of MSCs

2.2 细胞因子对骨髓基质干细胞 vWF 蛋白表达的影响

诱导前骨髓基质干细胞不表达 vWF 蛋白, 经 VEGF、bFGF 和 ECGS 诱导 5 天后, 33.42% 骨髓基质干细胞开始表达 vWF 蛋白, 细胞质中开始出现红色颗粒状荧光(图 3, Figure 3)。

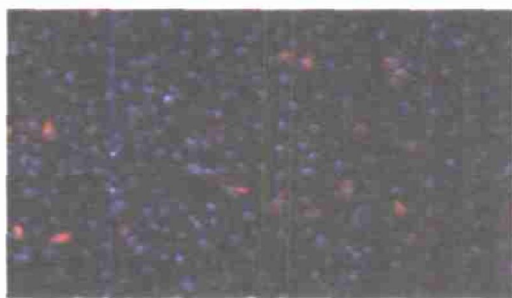


图 3. 细胞因子对骨髓基质干细胞 vWF 蛋白表达的影响(×100) 蓝色荧光为 DAPI 衬染的细胞核, 红色荧光为开始表达 vWF 蛋白的骨髓基质干细胞。

Figure 3. Effect of cytokines on the vWF protein expression of MSCs

2.3 成熟内皮细胞对骨髓基质干细胞 vWF 和 Flk-1 蛋白表达的影响

进行共培养前骨髓基质干细胞不表达 Flk-1 和 vWF, 与成熟内皮共培养 5 天时虽 vWF 染色仍为阴

性, 但 25.71% 骨髓基质干细胞开始表达 Flk-1(图 4, Figure 4)。

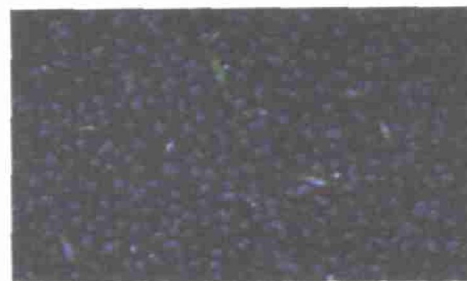


图 4. 成熟内皮细胞对骨髓基质干细胞 Flk-1 蛋白表达的影响(×100) 蓝色荧光为 DAPI 衬染的细胞核, 胞浆呈绿色荧光的为开始表达 Flk-1 蛋白的骨髓基质干细胞。

Figure 4. The Flk-1 protein expression of MSCs after co-culture with mature endothelial cells

2.4 内皮条件培养基对骨髓基质干细胞 vWF 和 Flk-1 蛋白表达的影响

用内皮条件培养基培养 5 天时, 骨髓基质干细胞 vWF 和 Flk-1 染色仍为阴性。

3 讨论

迄今骨髓基质干细胞的研究已有 30 余年, 其鉴定仍主要靠形态、分子表型特征和一定的分化潜能

等多种特点综合判断^[4]。本研究用密度梯度离心法分离人骨髓单个核细胞,以低密度接种并筛选形成集落的细胞,结果发现起初这些细胞形态不完全均一,传2~3代后才逐渐呈较均一的长梭形。Colter等^[4]发现组成集落的细胞包括长梭形、大扁平形和小圆形(RS)等不同形态,其中小圆形RS细胞增殖和分化能力最强。因此,这些骨髓细胞早期形态不完全均一可能与其中包含有处于不同分化阶段或不同增殖能力的细胞有关。荧光激活细胞分选结果表明我们分离的这群骨髓细胞不表达造血干祖细胞和内皮细胞标志CD34、vWF和Flk-1,而表达基质细胞标志CD105和CD166,说明此细胞是骨髓中区别于造血干祖细胞和内皮细胞的一群基质细胞。经VEGF和bFGF等促内皮生长分化的细胞因子诱导5天后,部分骨髓细胞开始表达内皮细胞特征性标志vWF蛋白,说明它们具有细胞因子诱导分化为内皮细胞的能力。结合细胞形态学特点、分子表型特征和诱导分化潜能,这些结果进一步证实我们分离的这群细胞是骨髓基质干细胞。

多项研究表明移植的骨髓基质干细胞能在局部微环境中重新编程(reprogramming),分化成与其周围细胞生物学特性相似的细胞^[6,7]。我们将骨髓基质干细胞与成熟内皮细胞共培养观察其是否也具有微环境依赖向内皮分化的能力。为从成熟内皮中将正在向内皮分化的骨髓基质干细胞区分出来,本研究选择了将人骨髓基质干细胞与兔内皮细胞共培养,一方面是由于骨髓基质干细胞缺乏组织相容性复合物质Ⅱ类抗原,免疫原性较弱^[8],异体移植免疫排斥反应小^[9];另一方面,兔抗人Flk-1和vWF抗体不能与兔来源内皮细胞Flk-1和vWF蛋白结合,在本研究体系中只能特异结合人细胞的Flk-1和vWF蛋白,因此共培养中荧光阳性细胞均来自分化的骨髓基质干细胞。结果发现共培养前其不表达Flk-1和vWF蛋白,共培养后虽然vWF染色仍为阴性,但25.71%骨髓基质干细胞开始表达Flk-1。Flk-1是一种酪氨酸激酶,为早期内皮细胞分化的主要表面标记,与血管发生密切相关^[10]。因此,虽然这些细胞不表达vWF,但仍说明成熟内皮细胞能诱导其向内皮分化。然而目前关于骨髓基质干细胞的分化调控机制仍未阐明,种植的骨髓基质干细胞并未迅速分化成与其周围细胞形态、表型相似的内皮。Spees等^[7]用热休克方法刺激上皮细胞,发现与上皮细胞共培养的骨髓基质干细胞能迅速表达上皮细胞的表型标志,在本研究中内皮细胞未加任何损害刺激,我们推测内皮损伤本身可能在促进骨髓基质干细胞分化中起重

要作用。另外,细胞因子能诱导体外培养的骨髓基质干细胞表达内皮细胞表面抗原,而成熟内皮细胞本身就能分泌VEGF等细胞因子^[11],骨髓基质干细胞向内皮分化可能还与其周围成熟内皮细胞的旁分泌作用有关。然而内皮条件培养基成分比较复杂,虽然其中含有促内皮分化的细胞因子,但其在培养过程中会不断代谢,而成熟内皮则能持续分泌促内皮分化细胞因子,因此,单纯用内皮条件培养基培养和与成熟内皮共培养并不完全相同,我们的结果也表明单纯内皮条件培养基并不能诱导骨髓基质干细胞表达Flk-1和vWF蛋白。

总之,我们的结果表明细胞因子和成熟内皮细胞均能诱导骨髓基质干细胞向内皮分化。骨髓基质干细胞移植促进缺血组织血管新生和损伤动脉再内皮化,一方面与缺血组织本身分泌的促内皮分化的细胞因子上调有关,另外也与损伤周围成熟内皮的诱导作用有关。进一步阐明骨髓基质干细胞在局部微环境向内皮分化的调控机制,通过基因或相关启动子修饰使移植的骨髓基质干细胞迅速分化为内皮,可能会取得更好的疾病治疗效果。

[参考文献]

- [1] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001, **19** (3): 180-192
- [2] Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*, 2003, **9** (6): 702-712
- [3] 黎健. 干细胞移植治疗心肌梗死. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 1-4
- [4] Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **98** (14): 7841-845
- [5] Gorog P, Kovacs IB. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by intact endothelium is nitric oxide-mediated: interference by oxidized low density lipoproteins. *J Vasc Res*, 1998, **35** (3): 165-169
- [6] Bittira B, Kuang JQ, AFKhaldi A, ShumTim D, Chiu RC. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg*, 2002, **74** (4): 1154-159
- [7] Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100** (5): 2397-402
- [8] Fandrich F, Lin X, Chai CX, Schulze M, Ganten D, Bader M, et al. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med*, 2002, **8** (2): 171-178
- [9] 牛丽丽, 郑敏, 曹丰, 谢超, 李海民, 岳文, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞在大鼠心脏的迁移及分化. *中华医学杂志*, 2004, **84** (1): 38-42
- [10] Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000, **408** (6808): 92-96
- [11] Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem*, 1995, **270** (52): 31189-195

(此文编辑 朱雯霞)