

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0819-04

•实验研究•

内皮生长晕细胞冻存和复苏的可行性

林以诺, 张怀勤, 黄伟剑, 肖方毅, 余 华

(温州医学院附属第一医院心内科 心血管生物和基因研究所, 浙江省温州市 325000)

[关键词] 细胞生物学; 内皮祖细胞; 内皮生长晕细胞; 冻存; 复苏; 增殖能力; 成血管能力

[摘要] 目的 研究冻存对内皮生长晕细胞增殖能力和成血管能力的影响, 探讨内皮生长晕细胞冻存和复苏的可行性。方法 分离脐血中单个核细胞, 采用贴壁培养法培养扩增内皮生长晕细胞, 免疫组织化学染色和荧光染色法鉴定其内皮细胞特性。扩增后的细胞采用浓度为 650 $\mu\text{mol/L}$ (体积比为 50 mL/L) 和 1 040 $\mu\text{mol/L}$ (体积比为 80 mL/L) 二甲基亚砜的培养基冻存至液氮中, 24 h 后复苏并观察冻存细胞的复苏率、复苏后细胞的增殖能力和成血管能力的改变。结果 采用贴壁法培养的细胞具有多种内皮细胞特性。细胞采用含不同浓度二甲基亚砜 (50 mL/L 和 80 mL/L) 的培养基冻存后, 其复苏率差异无统计学意义, 细胞的增殖能力在复苏后 36 h 内 50 mL/L、80 mL/L 二甲基亚砜组均较未冻存组减弱 ($P < 0.05$), 72 h 后三组间比较差异无统计学意义。而复苏后 6 h 内成血管速率较未冻存组减弱 ($P < 0.05$), 但 30 h 后三组间比较差异无统计学意义。结论 内皮生长晕细胞可以进行冻存和复苏。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Research for the Possibility of Endothelial Outgrowth Cell Being Cryopreserved and Resuscitated

LIN Yi-Nuo, ZHANG Hua-Qin, HUANG Wei-Jian, XIAO Fang-Yi, and YU Hua

(Institute for Cardiovascular Biology and Gene, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; Endothelial Outgrowth Cell; Cryopreservation; Resuscitation; Proliferative Ability; Vasculogenesis Activity

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of cryopreservation on the proliferative ability and vasculogenesis activity of endothelial outgrowth cells (EOC), and to explore the possibility of its resuscitation. **Methods** The mononuclear cells were harvested from umbilical cord blood by density gradient centrifugation, induced into EOC and expanded in vitro. The endothelial characteristics of EOC were identified by immunostaining and fluorescent staining. Then EOC were cryopreserved at -20°C for 4 h, -75°C overnight and then cryopreserved into liquid nitrogen using culture medium containing 50 mL/L and 80 mL/L dimethyl sulfoxide (DMSO). After 24 h cryopreserved EOC were resuscitated, and the resuscitative rate, proliferative ability and vasculogenesis activity were measured. **Results** EOC possessed many endothelial characteristics. Immunostaining showed that surface antigens Factor (II), CD34 and Flk-1 were positive; and fluorescent staining experiment revealed that EOC both bound to FITC-UEA-1 and uptook DiI-ac-LDL. There were no statistical differences between 50 mL/L and 80 mL/L DMSO group in resuscitative rate ($79\% \pm 6\%$ vs $88\% \pm 4\%$, $P > 0.05$). During early period after resuscitation (within 36 h), two cryopreserved groups (50 mL/L and 80 mL/L DMSO group) both showed decrease in proliferative ability compared with non-cryopreserved group ($P < 0.05$). 72 h later there were no significant differences between 50 mL/L, 80 mL/L DMSO group and non-cryopreserved group in the proliferative ability ($P > 0.05$). In contrast, vasculogenesis activity analysis revealed attenuation in vasculogenesis activity within 6 h ($P < 0.05$) while 30 h later such attenuation became insignificant ($P > 0.05$). **Conclusions** EOC can be cryopreserved and resuscitated. The cryopreserved cell shows no significant decrease in proliferative ability and vasculogenesis activity after resuscitation.

已经证实内皮祖细胞具有在缺血组织形成新生血管、修复损伤血管内皮的能力, 并且可能具有预

测患者心血管事件危险程度的潜能^[1,2]。Lin 等^[3]从成人外周血中分离出一种具有分化为血管内皮细胞能力的细胞, 它在细胞体外培养周期中出现较传统内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 晚 1~2 周, 因此称之为内皮生长晕细胞 (endothelial outgrowth cell, EOC) 或晚期内皮祖细胞 (late EPC)。这种细胞的单克隆细胞数是传统 EPC 的数千倍, 在细胞数量上可以倍增 100 倍左右而不出现衰减, 而且拥有高水平的端粒酶活性^[4,5]。根据 EOC 的这种增殖动力

[收稿日期] 2007-07-16 [修回日期] 2007-11-18

[基金项目] 浙江省自然科学基金 (303648)

[作者简介] 林以诺, 硕士研究生, 主要从事内皮祖细胞对动脉粥样硬化修复作用的研究, 联系电话为 0577-88840634, E-mail 为 lenoch@126.com。通讯作者张怀勤, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的基础和临床研究, 联系电话为 0577-88840634, E-mail 为 huaiqingzhang@126.com。黄伟剑, 学士, 副主任医师, 从事冠心病的临床研究以及血管损伤与修复的研究, 联系电话为 0577-88840634。

学特点,作者考虑能否将这种细胞长期冻存以利于不同的实验目的。本研究中采用贴壁培养法从脐血中分离扩增 EOC,然后采用含不同浓度二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的培养基冻存细胞,观察细胞从深低温复苏后的复苏率,以及增殖能力和成血管能力有无受影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

EGM-2 培养基购自 Cambrex 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,人纤连蛋白(human fibronectin, HFN)购自 Chemicon 公司,Matrix 胶购自 BD 公司,5 g/L 浓度胰酶及 PBS、Hanks 液购自 GBICO 公司,二苯基四氮唑溴盐(methylthiazolylidiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和异硫氰基荧光素(FITC)标记荆豆凝集素 iv (FITC labeled Ulex Europaeus Agglutinin-1, FITC-UEA-iv)购自 Sigma 公司,DiI 标记的乙酰化 LDL(DiI labeled acetylated Low Density Lipoprotein acLDL -DiI)购自 invitrogen 公司,一抗小鼠抗 flk-1 单克隆抗体(mAb)及兔抗第 8 因子抗体购自 Santa cruz 公司,一抗兔抗 CD34 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,ABC 免疫组织化学检测试剂盒和 AEC 染色试剂盒购自华美生物工程公司;人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司。

1.2 细胞的分离培养

收集(2006 年 6 月~2006 年 8 月)弃用的健康新生儿脐带血液 6 例(温州医学院附属第一医院和附属第二医院产科),每次采集脐血量约 30 mL。采用密度梯度离心法收集脐血中的单个核细胞接种在包被有 HFN 的 10 cm² 培养皿中^[6]。加入 3 mL 含 100 mL/L FBS 的 EGM-2 培养基,24 h 后更换全部培养基。此后 7 天内每天更换一半培养基,7 天后每 3 天更换全部培养基^[5],同时观察细胞生长情况。等待原代细胞生长汇合后传代进行下一步实验。

1.3 免疫组织化学染色

取第 2 代细胞接种至 24 孔板中,培养至贴壁。采用 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min,0.3% H₂O₂ 甲醇液封闭内源性过氧化物酶 10 min, PBS 浸洗后分别加入 1:100 稀释的一抗小鼠抗 flk-1 mAb,兔抗第 8 因子抗体及兔抗 CD34 抗体于 4 ℃下孵育过夜。二抗结合参照 ABC 免疫组织化学检测试剂盒说明书进行,之后用 AEC 染色试剂染色,苏木素复染,在显微镜下(×200 倍)观察染色结果。为排除假阳性或

假阴性结果,免疫组织化学染色检测设空白对照(PBS 代替一抗)、阴性对照(血管平滑肌细胞株 A10)和阳性对照(人脐静脉内皮细胞株 ECV-304)。

1.4 细胞荧光染色

在上述细胞中加入 DiI-ac-LDL (10 mg/L) 37 ℃ 孵育 4 h,用 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, PBS 浸洗后将 FITC-UEA-iv (10 mg/L) 加于上述标本 37 ℃ 孵育 1 h。采用荧光显微镜观察染色结果。DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-iv 双染色阳性细胞为正在分化的 EOC^[7,8]。为排除假阳性、假阴性结果及自发荧光干扰,免疫组织化学染色检测设空白对照、阴性对照(血管平滑肌细胞株 A10)、阳性对照(人脐静脉内皮细胞株 ECV-304)和自发荧光对照。

1.5 细胞冻存和复苏

第 2 代细胞生长至汇合后用 5 g/L 胰酶消化,离心后取部分细胞传代,剩余细胞等分为 2 组,分别加入预冷的含 50 mL/L 和 80 mL/L DMSO 的培养基各 1 mL,混匀并装入冻存管,纱布包裹存入 -20 ℃ 4 h, -75 ℃ 过夜,最后将细胞转入液氮中冻存。

细胞复苏时将上述 2 组细胞从液氮中取出迅速放入 37 ℃ 水浴箱中加热,待液体溶解后立即转入 10 mL 37 ℃ 含 100 mL/L FBS 的 EGM-2 培养基中 1 kr/min 离心。吸除上清,分别加入 6 mL 100 mL/L FBS-EGM-2 培养基重悬,分别计数并接种在 2 个 HFN 包被的 25 mL 培养瓶中。

1.6 细胞复苏率的计算

细胞在培养瓶中生长 24 h 后收集上清悬浮细胞,离心并计数。复苏率按照公式:(接种细胞-悬浮细胞)/接种细胞×100% 计算。

1.7 细胞增殖能力的检测

取部分上述的复苏细胞,另外取未经冻存的 EOC 计数后按照 1000/孔接种到 HFN 包被的 96 孔板中,生长 36 h 和 72 h 后加入 MTT (1 g/L), 37 ℃ 共同孵育 4 h 后吸除上清,每孔加入 100 μL DMSO 充分振荡 10 min,酶标仪检测 A₅₇₀ 值。

1.8 体外细胞成血管能力检测

将 Matrix 胶至于 4 ℃ 溶解,取 50 μL/孔加入 96 孔板中,37 ℃ 孵育 1 h 成胶。将上述 50 mL/L DMSO 组、80 mL/L DMSO 组、未冻存组细胞按照 5 000/孔接种至胶上,37 ℃ 孵育 30 h,在 6、18、24、30 h 时于倒置显微镜下观察细胞成血管情况。长度为宽度的 4 倍以上即可被认为形成血管^[8]。随机计数 6 个 100 倍视野下的血管数。

1.9 数据统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料比较采用单

因素方差分析和 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮生长晕细胞的鉴定

分离获得的单个核细胞在培养 10 天左右形成许多细胞集落, 细胞呈椭圆形铺路石样(图 1)。用免疫染色法对细胞染色后发现细胞表面第 8 因子、CD34、Flk-1 表达均为阳性(图 2)。采用 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-iv 荧光染色后于荧光显微镜观察, 双

染色阳性细胞被认为是正在分化的 EOC(图 3)。空白对照、阴性对照和自发荧光对照均为阴性结果。

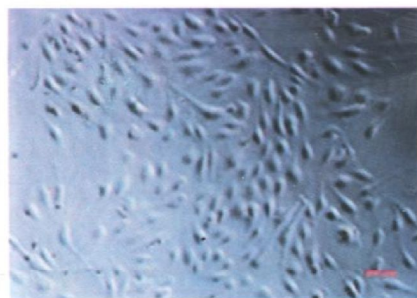


图 1. 内皮生长晕细胞光镜图 ($\times 100$)

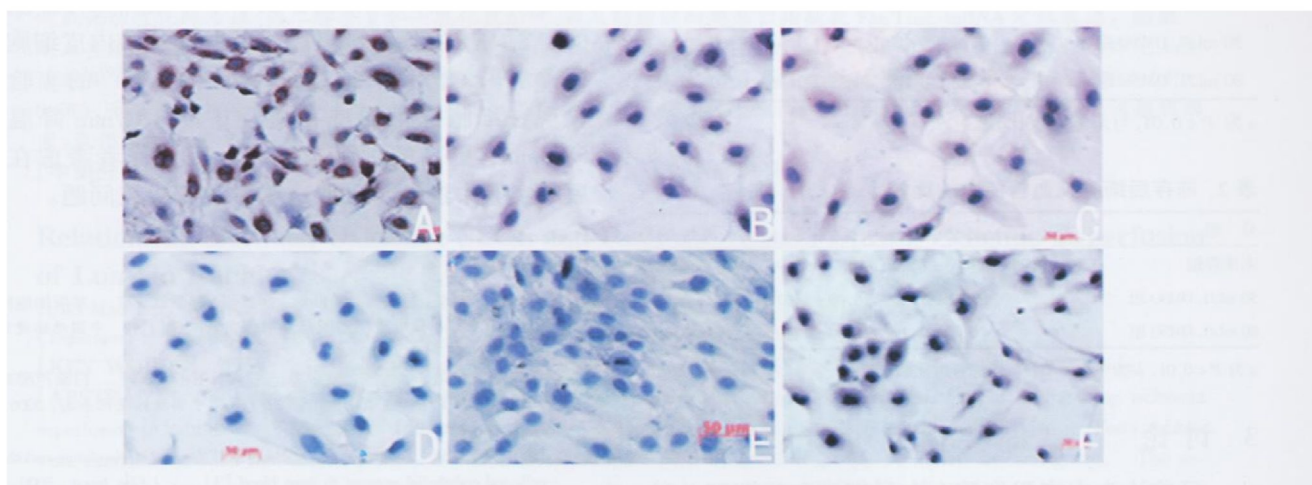


图 2. 内皮生长晕细胞的免疫组织化学染色鉴定 ($\times 200$) A 为第 8 因子相关抗原, B 为 CD34 相关抗原, C 为 Flk-1 相关抗原, D 为空白对照, E 为阴性对照, F 为阳性对照。

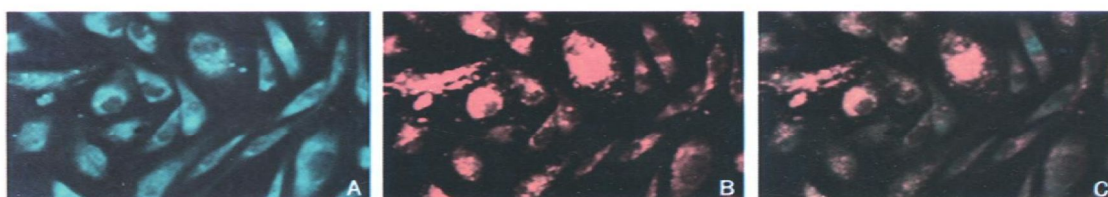


图 3. 内皮生长晕细胞的 DiI-acLDL 及 FITC-UEA-1 双荧光染色鉴定 ($\times 200$) A 为 EOC 表面结合 FITC 标记的 UEA-iv 呈现绿色荧光, B 为 EOC 内吞 DiI 标记的 acLDL 呈现红色荧光, C 为内吞 DiI-acLDL 并同时与 FITC-UEA-iv 结合的红绿荧光双染 EOC。

2.2 冻存后细胞复苏率的差异

采用不同浓度 DMSO (50 mL/L 和 80 mL/L DMSO) 冻存的细胞, 接种 24 h 后收集上清悬浮细胞并计算各组的复苏率, 50 mL/L DMSO 组比 80 mL/L DMSO 组复苏率差异无统计学意义 (0.79 ± 0.06 比 0.88 ± 0.04 , $P > 0.05$)。

2.3 冻存对细胞增殖能力的影响

采用 MTT 比色法检测冻存对细胞增殖能力的

影响, 发现在复苏后 36 h 内 50 mL/L DMSO 组和 80 mL/L DMSO 组增殖能力均低于未冻存组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 1)。在 72 h 后 50 mL/L DMSO 组和 80 mL/L DMSO 组与未冻存组相比差异无统计学意义。不同浓度 DMSO 冻存组的增殖能力在 36 h 和 72 h 的差异均无统计学意义。

2.4 冻存对细胞成血管能力的影响

从各组细胞接种到预先铺有 Matrix 胶的 96 孔

板开始,分别在6 h、18 h、24 h和30 h于镜下观察细胞成血管改变并计数血管数,发现在接种6 h后未冻存组细胞开始聚集,有形成血管趋势。而2组冻存组细胞仍为分散状态。18和24 h 3组细胞进行性形成血管网,在同一时刻组间比较发现未冻存组细胞的成血管速率稍快于其他2组。30 h后3组血管网形成差异无显著性(表2)。

表1. 冻存后细胞增殖能力的改变 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	36 h	72 h
未冻存组	0.41 \pm 0.06	0.37 \pm 0.09
50 mL/L DMSO 组	0.26 \pm 0.04 ^a	0.34 \pm 0.07
80 mL/L DMSO 组	0.28 \pm 0.04 ^a	0.36 \pm 0.07

a 为 $P < 0.01$, 与未冻存组比较。

表2. 冻存后细胞成血管能力的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	6 h	18 h	24 h	30 h
未冻存组	3.17 \pm 0.75	17.83 \pm 0.98	18.67 \pm 2.34	20.00 \pm 4.72
50 mL/L DMSO 组	0 ^a	14.83 \pm 2.48 ^b	16.00 \pm 1.67 ^b	18.50 \pm 2.43
80 mL/L DMSO 组	0 ^a	16.00 \pm 2.19	16.00 \pm 2.19 ^b	15.67 \pm 3.88

a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.05$, 与未冻存组比较。

3 讨论

目前认为内皮祖细胞存在早期型和晚期型2种不同的类型^[4,7]。与单核-巨噬细胞来源、增殖能力很有限的早期内皮祖细胞相比,晚期内皮祖细胞(也称为内皮生长晕细胞)为均一同种的细胞群,细胞具有很强的克隆增殖能力,能产生更多的一氧化氮,更好的形成血管网,并且更易融入脐静脉内皮细胞层^[5]。因此在细胞形态、表型和功能上 EOC 更接近于内皮细胞,同时也更具备内皮干/祖细胞的特征。

由于 EOC 这种很强的增殖能力,作者考虑能否将这种细胞冻存以利于大规模实验研究。细胞的复苏率、复苏后的生物活性与冻存使用的 DMSO 浓度、降温速率有很大相关^[9]。为了降低 DMSO 对细胞的毒性作用,实验中使用的 DMSO 浓度不超过 80 mL/L 并将其预冷至 4℃。本实验增加了 50 mL/L 浓度组观察该浓度的 DMSO 对细胞的活性和复苏率是否有影响。实验过程中冻存介质的降温速率约 5℃/min,两组冻存组的复苏率在 85% 左右。冻存细胞复苏后 36 h 内,细胞的增殖能力较未冻存组降低有统计学意义;在成血管能力的检测中 18 h 内冻存组细胞成血管的速率较未冻存细胞有所减慢,以上结果与 Ketheesan 等^[10]的实验结果符合。但是超过 36 h 和 18 h 后这种差异就不明显。这可能由于细胞经过冻

存后,最初的一段时间细胞尚处于顿抑状态,细胞内各种酶如一氧化氮合酶的活性尚未恢复,导致细胞各种生物活性的降低。经过短期的体外培养后,细胞重新恢复活力。

本研究中冻存并复苏了 EOC,证明这种细胞能够被深低温保存并且可以成功复苏,避免重复分离培养内皮祖细胞,为以后大规模研究内皮祖细胞的实验提供便利。但是细胞的复苏率偏低。这可能与细胞复苏过程中冻存液快速升温至 37℃ 引起胞质内一过性 Ca^{2+} 升高造成不可逆的细胞损伤有关^[11]。Moriga 等^[12]提出在肝脏移植手术中增加冻存介质中的血管内皮生长因子可以降低肝窦状隙内皮细胞的凋亡水平,并且 Ketheesan^[10]和 Rigol 等^[9]的实验均发现在细胞深低温冻存过程中以 1℃/min 降温较 5℃/min 有更高的细胞复苏率。因此作者考虑在以后的实验中进一步采取这些方法解决该问题。

[参考文献]

- [1] 尹扬光, 黄 岚, 赵晓辉, 于世勇, 方玉强, 赵景红, 等. 基质细胞衍生因子 1 α 介导小鼠内皮祖细胞修复损伤血管内膜[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (1): 6-10.
- [2] 顾 俊, 王长谦, 张大东, 范华骅, 何 奔, 王彬晓, 等. 白藜芦醇对损伤动脉再内皮化和内膜增生的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (10): 829-834.
- [3] Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood [J]. J Clin Invest, 2000, 105 (1): 71-77.
- [4] Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood [J]. Blood, 2004, 104 (9): 2752-760.
- [5] Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovascularization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24 (2): 288-293.
- [6] 张怀勤, 胡盛寿, 杨德业, 张 浩, 周 浩, 黄晓燕, 等. 脐血来源的人类内皮前体细胞培养的试验研究[J]. 中国循环杂志, 2003, 18 (6): 4562-571.
- [7] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. Circ Res, 2001, 89 (1): 1-7.
- [8] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type 2 diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures [J]. Circulation, 2002, 106 (22): 2781-786.
- [9] Rigol M, Heras M, Martinez A, Zurbano MJ, Agusti E, Roig E, et al. Changes in the cooling rate and medium improve the vascular function in cryopreserved porcine femoral arteries [J]. J Vasc Surg, 2000, 31 (5): 1018-025.
- [10] Ketheesan N, Whiteman C, Malczewski AB, Hirst RG, La Brooy JT. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells [J]. Transfus Apheresis Sci, 2004, 30 (1): 47-54.
- [11] Auger S, Vallerand D, Haddad PS. Cold preservation/warm reperfusion perturbed cytosolic calcium ion homeostasis in rat liver sinusoidal endothelial cells [J]. Liver Transplantation, 2003, 9 (2): 150-159.
- [12] Moriga T, Arai S, Takeda Y, Furuyama H, Mizumoto M, Mori A, et al. Protection by vesicular endothelial growth factor against sinusoidal endothelial damage and apoptosis induced by cold preservation [J]. Transplantation, 2000, 69 (1): 141-151.

(此文编辑 李小玲)