

人循环内皮祖细胞不同克隆成分的体内外血管生成功能不同

张菲斐, 韩战营, 邱春光, 黄振文, 杨海波, 陈庆华, 李 凌, 赵洛沙

(郑州大学附属第一医院心内科, 河南省郑州市 450052)

[关键词] 内科学; 血管生成; 内皮祖细胞; 单个核细胞; 内皮细胞克隆

[摘要] 目的 探讨成人外周血循环来源的内皮祖细胞不同克隆成分表型特点及体内外血管生成差异。方法

密度梯度离心法获得单个核细胞, 用含生长因子的内皮培养基接种于纤维连接蛋白包被的培养板中。7 d 后计数早期克隆并进行下面实验, 另 1 份持续培养直到晚期克隆出现进行相同实验。流式细胞术检测细胞表面抗原, 间接荧光染色法鉴定细胞表达假血友病因子。胶原凝胶细胞体外种植及裸鼠体内移植实验分别测定体外及体内血管生成功能。结果 早期克隆再种植不能形成第二代克隆且无体内外血管形成功能, 细胞表面主要表达 CD14 和 CD45。晚期克隆在培养 21~28 d 间出现, 再种植可形成第二代内皮细胞克隆, 并能在体外和裸鼠体内胶原凝胶中形成管腔样结构, 细胞表达 CD45 和 CD14 显著减少 ($P < 0.001$) 而 CD146 明显增加 ($P < 0.01$)。结论 人外周血单个核细胞在内皮培养条件下可形成早期克隆和晚期克隆, 只有晚期克隆表现出干/祖细胞和内皮细胞双重表型特征并具有体内外血管生成功能。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

In Vitro and in Vivo Angiogenic Capacity Analysis on Different Clonal Endothelial Progenitor Cell Populations Derived from Human Circulating Blood

ZHANG Fei-Fei, HAN Zhan-Ying, QIU Chun-Guang, HUANG Zhen-Wen, YANG Hai-Bo, CHEN Qing-Hua, LI Ling, and ZHAO Luo-Sha

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

[KEY WORDS] Vasculogenesis; Endothelium Progenitor Cells; Mononuclear Cells; Endothelial Cell Clone

[ABSTRACT] **Aim** To explore the in vitro and in vivo angiogenic capacity and phenotypic properties about different clonal endothelial progenitor cell populations derived from human peripheral circulating blood. **Methods** Mononuclear cells were isolated by density-gradient centrifugation and incubated onto fibronectin coated dishes in endothelial medium in the presence of vascular endothelial growth factor. The number of early clones was counted at 7 days and cells from another aliquot were cultivated continually until the late clones generated. Flow cytometry analysis was used to evaluate cells surface antigen expression and von willebrand factor (vWF), the endothelial cells marker was detected by indirect fluorescence staining. The capacities of in vitro and in vivo vascular genesis were assessed by plating cells onto collagen gels and implanting the cellularized gel into nude mice. **Results** Early clones failed to form second clone and were devoid of the capacity of in vitro and in vivo vascular genesis. Furthermore, cells derived from the early clones expressed mainly CD14 and CD45. In contrast to early clones, the late clones emerged until 21 to 28 days after cultivation and exhibited typically endothelial cells properties. Remarkably, cells originated from late clones had the ability to form second endothelial clones after replanted and generated tube-like structures when seeded onto collagen gels or transplanted into nude mice. In addition to the clearly morphological and functional differences, cells derived from late clones expressed obviously increased CD146 ($P < 0.01$) and reduced CD45 and CD14 ($P < 0.001$). **Conclusions** Under endothelial cultivating conditions, human peripheral blood mononuclear cells can generate early and late clones.

Only cells originated from late clones exhibit double phenotypes of stem/progenitor and endothelial cells with the capacity of in vitro and in vivo vasculogenesis.

人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)在内皮细胞特殊培养条件下 7~10 d 所形成的早期集落, 目前被多数研究确认为内

皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)。但事实上, 以早期集落数目的多少作为冠心病患者危险程度的预测因子, 或者将早期集落作为治疗性血管再生的移植细胞, 却得出了相互矛盾的结论。据此, 目前一些学者怀疑早期集落是否为真正的 EPC^[1,2]。为探讨这些问题, 本研究根据成人 PBMC 组分中不同细胞种类的生物学特点, 通过序列粘附的方法获得阶段性细胞克隆, 检测不同克隆成分在表达细胞表面标志、向成熟内皮细胞分化以及体内外血管生

[收稿日期] 2007-11-07 [修回日期] 2008-03-26

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划基金(20060045)

[作者简介] 张菲斐, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化发生机制及冠心病防治, E-mail 为 zhangfeifei2@sina.com。韩战营, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为冠心病介入性诊疗。邱春光, 主任医师, 教授, 研究方向为冠心病介入性诊疗。

成等方面的异同点,旨在获得具有真正形态和功能特征的 EPC 克隆及其后代内皮细胞。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Histo-paque (1.077)、FITC 标记的植物凝集素 (Ulex europaeus agglutinin-1, UEA-1)、纤维连接蛋白 (fibronectin)、FITC 标记的抗血管内皮生长因子 2 受体 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2/KDR) 和 iv 型胶原均为 Sigma 公司产品;添加各种生长因子和胎牛血清的内皮细胞完全培养基 (EGM-2 MV Single Quots) 为 Becton Dickinson 公司产品;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (DiI marked acetylated low density lipoprotein, acLDL-DiI) 购自 AbD Serotec 公司;假血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 一抗和 FITC 标记二抗均购自 DAKO 公司; FITC-CD3、FITC-CD14、FITC-CD146、PE-CD45、PE-CD34 及三色流式细胞仪 FACSscan 均为 BD 公司产品。

1.2 外周血单个核细胞分离与接种^[3]

11 名健康志愿者 (男 9 例,女 2 例,年龄 46.5 ± 13.1 岁),肘静脉取血每例 50 mL,肝素 (20 kU/L) 抗凝。Hanks 1:1 稀释血液,加入 Histo-paque 经密度梯度离心法获得单个核细胞 (mononuclear cells, MNC)。用 Hanks 洗涤 MNC 3 次,重悬于 EGM-2,调整细胞计数为 $2 \times 10^5/L$,接种于 100 mg/L 纤维连接蛋白包被的 24 孔培养板中。

1.3 不同时段克隆成分的培养与形态观察

根据单核细胞在体外培养时具有短期松散附壁的特点,应用序列粘附法去除淋巴细胞的混杂^[4]。每例血样在分离出 MNC 并接种后每隔 2 h 去除 1 次未粘附细胞,共 2 次,然后加入 EGM-2 静止培养,4 d 后换液。此后隔天换液一次,至第 7 天计数早期克隆,倒置显微镜下不同放大倍数观察细胞形态,并进行后续实验。每例血样均分成 2 等份,第一份培养至早期克隆阶段进行所有实验;第二份细胞持续培养,直至典型的内皮细胞克隆 (晚期克隆) 出现,然后进行相应实验。

1.4 流式细胞术测定表面抗原表达

附壁细胞用 PBS 洗涤 2 次,0.25% 胰酶/EDTA 消化后制成细胞悬液,密度为 $1 \times 10^6/L$ 。每份细胞悬液取 150 $\mu L \times 2$ 分装 2 个试管,分别加入 FITC-CD3、FITC-CD14、FITC-CD146、FITC-KDR、PE-CD34、PE-CD45 及同型对照单抗各 20 μL ,避光反应 30 min, PBS 洗涤两次测定,每例均复测 2 次。上机后

收集 20 000 个细胞,荧光强度以对数放大,结果以各种抗原表达阳性百分率表示。

1.5 间接荧光染色法鉴定内皮细胞表达假血友病因子

晚期克隆生长至 80% 汇合时消化传代,取 2~3 代细胞鉴定内皮标志 vWF,细胞用 1:1 甲醇/丙酮固定,vWF 一抗及 FITC 标记的二抗均作 1:50 稀释,严格按说明步骤进行。

1.6 胶原凝胶体外血管形成实验^[5]

用冷藏的 EGM-2 配置浓度为 2 g/L 的 iv 型胶原溶液,10% 碳酸氢钠滴定溶液 pH 值为 7.4~7.6,加入 96 孔板中每孔 100 μL ,37℃放置 30 min 使其成胶。分别将早期克隆和晚期克隆细胞制成细胞悬液,加入凝胶之上每孔 5×10^4 个细胞,置培养箱内孵育,不同时间点倒置显微镜下观察血管生成情况。

1.7 细胞移植裸鼠体内血管生成实验

18 只无胸腺裸鼠,7~11 周龄,购自郑州大学实验动物中心,细胞移植按 Schechner 等^[6]所报道的方法并略加改良。收集早期和晚期克隆细胞,制成浓度为 $2 \times 10^6/L$ 的细胞悬液。用 1.5 g/L 的碳酸氢钠、25 mmol/L HEPES、10% 胎牛血清、30% EGM-2 制备浓度为 3 g/L 的胶原溶液。将等量的细胞悬液与胶原溶液混合,每只裸鼠后肢皮下注射 1 mL 细胞-胶原溶液。将裸鼠置于饲养笼 28℃条件下 30~60 min,触摸裸鼠移植部位皮丘呈胶冻感为移植成功,然后常规条件饲养。21~30 d 间处死裸鼠,取出移植体行病理切片分析。

1.8 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间的比较采用 t 检验,多个均数间的比较采用单因素方差分析,然后进行两两比较的 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 早期克隆的数目与细胞特征

MNC 接种当时为圆形、悬浮,流式细胞术测定 CD3 表达阳性率为 $56.92\% \pm 3.26\%$,经 2 次序列去除未粘附细胞后 CD3 表达阳性率降至 $10.38\% \pm 1.47\%$ ($P < 0.05$)。细胞种植后隔日观察 1 次,至第 7~11 d 可见有簇状聚集的早期克隆出现。40 倍倒置显微镜下每孔随机选 3 个视野进行计数,每例重复 3 次,从 2×10^6 个 MNC 中获得的克隆数为 4.28 ± 2.15 。早期克隆的形态特征为中间是圆形细胞,周边有向外爬行生长的梭状或多角形细胞 (图 1A,

×40)。将早期克隆细胞消化、悬浮、再种植后,未观察到有二代克隆形成。

2.2 晚期克隆的数目与细胞特征

在获得早期克隆细胞后持续培养,至 21~28 d 间可观察到晚期克隆的出现,每个培养孔计数到的晚期克隆数目为 3.47 ± 1.88 。与早期克隆相比,晚期克隆表现出内皮细胞样特征:紧密贴壁,聚集向外

生长,细胞呈多角形或纺锤形(图 1B, ×40)。将晚期克隆消化种植后,可生长出第二代克隆,并增殖、汇合,呈现出内皮细胞典型的铺路石样外观,其间可见呈旺盛增殖象的圆形细胞(图 1C, ×100),体外传 6~12 代未见明显衰老征相,取 2~3 代细胞测 vWF 表达阳性证实为内皮细胞(图 1D, ×200)。

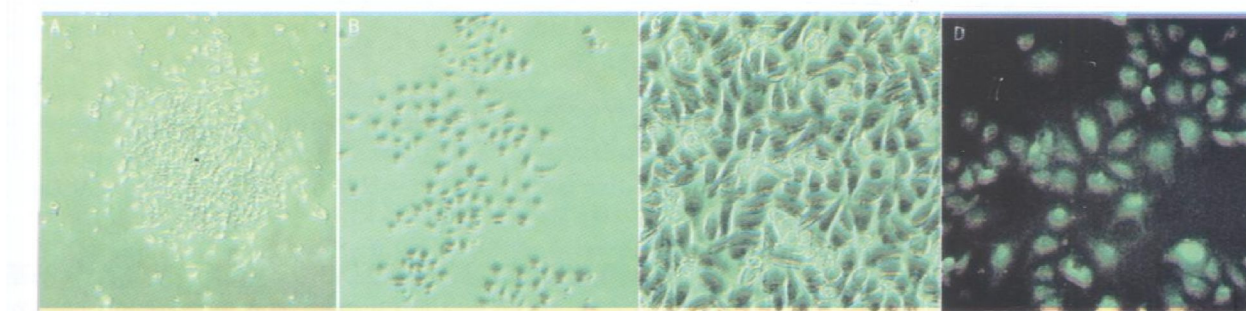


图 1. 成人外周血单个核细胞体外培养及不同时段细胞形态

2.3 早期与晚期克隆细胞表达抗原标志的差异

流式细胞技术测定早期克隆与晚期克隆细胞抗原表达百分率,结果表明,早期克隆细胞表达一定程度的干/祖细胞标记 CD34 和 KDR,高表达泛白细胞抗原 CD45 和单核细胞特异抗原 CD14,也有少量泛内皮细胞标记 CD146 表达;与早期克隆相比,晚期克隆 CD34 和 KDR 表达进一步增加,CD45 表达基本消失,CD14 表达也明显减弱($P < 0.001$),而 CD146 表达则显著提高($P < 0.01$,表 1)。

2.4 胶原凝胶体外血管生成情况

早期克隆及晚期克隆附壁细胞分别消化再种植于 iv 型胶原凝胶上,36 h 后可见晚期克隆细胞伸展呈纺锤状,并相互连接形成管腔样结构(图 2A),72 h

后可见原管腔增大,管壁可见有细胞向管腔中央呈发芽状生长(图 2B)。持续观察早期克隆细胞未见形成管腔样结构,至 1 周后仅见细胞呈圆形或多角形融合成片(图 2C)。

表 1. 早期克隆与晚期克隆细胞表达的抗原标志 ($n = 33$)

抗原种类	早期克隆	晚期克隆	P 值
CD45	90.32% $\pm$ 1.83%	1.27% $\pm$ 0.83%	0.0009
CD14	88.07% $\pm$ 1.49%	2.69% $\pm$ 0.35%	0.0009
KDR	17.84% $\pm$ 1.96%	33.92% $\pm$ 1.76%	0.0875
CD34	35.68% $\pm$ 2.71%	42.46% $\pm$ 1.89%	0.0831
CD146	22.38% $\pm$ 4.55%	95.23% $\pm$ 3.78%	0.0037

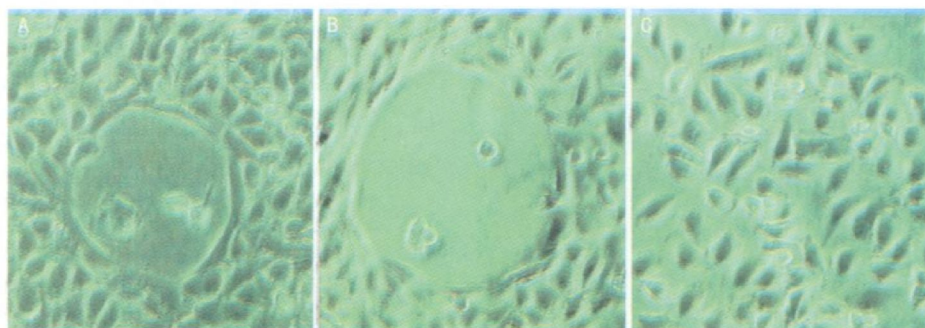


图 2. 胶原凝胶体外血管生成(×100)

2.5 裸鼠体内血管生成结果

18 只裸鼠细胞移植均获成功(早期和晚期克隆组各 9 只),饲养期间未发现裸鼠有异常反应。移植

体病理切片 HE 染色发现,晚期克隆组 9 只裸鼠中有 7 只在胶原凝胶移植体中观察到了典型的微血管结构,其间可见红细胞(图 3A)。而早期克隆组仅在

1只裸鼠的移植体中观察到了类似微血管样结构(图3B),其余8只裸鼠移植体中均显示出不规则的

细胞聚集现象,未观察到血管结构(图3C)。

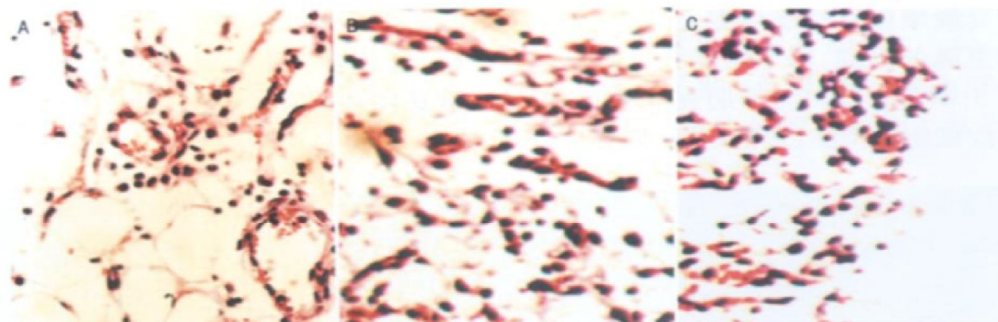


图3. 细胞移植裸鼠体内血管生成(HE染色, $\times 200$)

3 讨论

本研究结果表明,成人外周血循环中的单个核细胞在体外内皮培养条件下,于不同时间段内可形成早期和晚期克隆。早期克隆的结构特征与 Asahara 等^[7]所报道的多重簇状结构相同,中心为圆形细胞,周边为放射状排列的梭状或多角形细胞;晚期克隆须在持续培养3周后方能形成,形态上具有内皮细胞特征。在抗原表达方面,早期克隆的组成细胞呈现出髓系单核细胞的特点,可表达泛白细胞抗原^[8] CD45 和单核细胞特异抗原 CD14。而晚期克隆构成细胞 CD45 和 CD14 表达基本消失,干/祖细胞标记 CD34 和 KDR 表达进一步提高,并显著增加泛内皮细胞标志^[9] CD146 的表达。尤为重要的是,早期克隆再种植不能形成二代克隆,且无体内外血管形成能力,而晚期克隆再种植能分化成典型的内皮细胞,并有血管生成功能。这些现象均表明,早期克隆属于单核细胞系列,而晚期克隆具备干/祖细胞和内皮细胞双重生物学特征,符合真正 EPC 的定义。

对于 EPC 的确认,除了上述细胞标志外,最重要的手段就是分析其后代细胞的形态及生物学功能。本研究结果表明,晚期克隆来源的细胞, vWF 鉴定阳性,再种植呈现典型的内皮细胞铺路石样形态特征,体外传6~12代未见明显衰老征象。而在分析其血管生成功能时,我们采用了更具说服力的细胞胶原凝胶内种植和裸鼠体内移植的方法。以往多数研究在分析内皮细胞体外血管形成时,均采用 Matrigel 凝胶,但 Matrigel 来自小鼠肿瘤组织,其中含有能使细胞侵袭、穿行的基质降解物质如基质金属蛋白酶等^[5],因此,普通的内皮细胞也可在其中形成管腔样结构。如果使用单纯的胶原或纤维蛋白凝胶,则未受刺激的普通内皮细胞因不能分泌基质降

解酶而难以形成管腔结构。相反,能自行分泌基质降解酶的细胞,如肿瘤细胞或干/祖细胞,可以在单纯的胶原或纤维蛋白凝胶中形成管腔结构^[10]。本研究发现,将晚期克隆细胞种植于胶原凝胶中,可生成典型的管腔样结构;同时,将胶原凝胶-细胞悬液种植小鼠体内后发现,只有晚期克隆细胞在移植体内形成微血管结构,管腔中尚可见到红细胞。这些结果说明,晚期克隆细胞能够在动物体内增殖并形成血管,因而具有 EPC 完整的生物学特征。

[参考文献]

- [1] Hristov M, Weber C. The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease: past, present and future [J]. *Basic Res Cardiol*, 2006, 101 (1): 1-7.
- [2] Zhang SJ, Zhang H, Wei YJ, et al. Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture [J]. *Cell Res*, 2006, 16 (6): 577-584.
- [3] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *EMBO J*, 1999, 18 (10): 3 964-972.
- [4] Semizarow D, Glesne D, Laowar A, et al. A lineage-specific protein kinase crucial for myeloid maturation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (26): 15 412-417.
- [5] Greenburg G, Hay E. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. *J Cell Biol*, 1982, 95 (1): 333-339.
- [6] Schechner J, Nath A, Zheng L, et al. In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (16): 9 191-196.
- [7] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275 (5302): 964-967.
- [8] Rohde E, Malischnik C, Thaler D, et al. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells [J]. *Stem Cell*, 2006, 26 (2): 356-367.
- [9] Duda DG, Cohen KS, di Tomaso E, et al. Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24 (9): 1 449-453.
- [10] Hughes SE. Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis [J]. *Exp Cell Res*, 1996, 225 (1): 171-185.

(此文编辑 许雪梅)