

剪应力和血管内皮生长因子诱导骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化

田少华, 张荣庆, 魏丽萍, 刘海涛, 王海昌

(中国人民解放军第四军医大学西京医院心血管内科, 陕西省西安市 710032)

[关键词] 剪应力; 血管内皮生长因子; 骨髓间充质干细胞; 内皮细胞

[摘要] 目的 研究血管内皮生长因子与剪应力对骨髓间充质干细胞分化的作用。方法 分离成人骨髓单个核细胞, 经贴壁法获取骨髓间充质干细胞。所获细胞用血管内皮生长因子、剪应力 (8 和 15 dyn/cm²)、血管内皮生长因子联合剪应力分别作用 7 天、24 h、24 h 观察细胞形态变化, 并进行内皮细胞标记物假性血友病因子定性间接免疫荧光染色, 进行 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白摄取实验以鉴定内皮细胞功能。结果 在剪应力 (8 dyn/cm²)、血管内皮生长因子分别作用 24 h、7 天后, 骨髓间充质干细胞形态变得偏圆、呈多角形, 血管内皮生长因子联合剪应力诱导组细胞平行于流体方向排列, 假性血友病因子染色阳性, 提示内皮细胞表型特征, 同时 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白摄取实验阳性, 提示具有内皮细胞功能。血管内皮生长因子诱导组、15 dyn/cm² 剪应力组作用 24 h 的骨髓间充质干细胞, 假性血友病因子染色与 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白摄取实验均阴性, 提示未出现向内皮细胞分化。血管内皮生长因子和 15 dyn/cm² 剪应力共同作用 24 h 后, 骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化。结论 剪应力可诱导骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化, 且与力的大小有关。血管内皮生长因子可联合剪应力诱导骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化, 且诱导效果优于单独使用剪应力。

[中图分类号] Q254

[文献标识码] A

Shear Stress Cooperate Vascular Endothelial Growth Factor To Induce Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Into Endothelial Cells

TIAN Shao-Hua, ZHANG Rong-Qing, WEI Li-Ping, LIU Hai-Tao, and WANG Hai-Chang

(Department of Cardiovascular Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[KEY WORDS] Shear Stress, Vascular Endothelial Growth Factor, Mesenchymal Stem Cell, Endothelial Cells Differentiation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shear stress on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC).

Methods MSC were isolated from adult marrow mononuclear cells by attaching growth. MSC were subjected to VEGF, different levels of shear stress (8 and 15 dyn/cm²) and VEGF+ shear stress respectively, for 7 d, 24 h or 24 h. Cell shape and orientation were observed at 0 h, 24 h during shear stress. Indirect IF staining was employed to identify the endothelial cell-specific marker von Willebrand factor (vWF). A functional marker of mature endothelial cells was examined by the uptake of Dil-labeled acetylated low density lipoproteins (Dil-ac-LDL). **Results** After subjection to VEGF, shear stress of 8 dyn/cm² for 7 d, 24 h respectively, MSC tended to be a more rounder, polygon-like cell shape, and MSC of shear stress group aligned parallel to the flow, MSC were positive for vWF staining, indicating the endothelial phenotype, and also positive for the uptake of Dil-ac-LDL, indicating the possession of mature endothelial function. Cells treated with VEGF and shear stress of 15 dyn/cm² for 24 h were negative for both the vWF staining and the uptake of Dil-ac-LDL, indicating the lack of differentiation.

After VEGF and shear stress acted 24 h together, MSC can be induced into endothelial cell. **Conclusion** Shear stress can induce the differentiation of MSC into endothelial cells in a stress level dependent way. Shear stress combined with VEGF not only induce the differentiation of MSC into endothelial cells, but also cause cell proliferation, which seems to have a better effect than only shear stress.

治疗性血管新生^[1]即通过模拟体内血管生成机制以达到促进血管新生, 改善侧支循环, 从而治疗缺血性心脏病的目的, 其中种子细胞的获取尤为重

要。骨髓间充质干细胞 (MSC) 具有容易分离培养、多向分化能力^[2]、免疫排斥反应小^[3]的特点, 成为构建组织工程常用种子细胞。研究表明 MSC 可以在特殊细胞因子或外周环境下向血管内皮细胞分化^[4-6]。本研究观察血管内皮生长因子 (VEGF) 与剪应力相互作用能否诱导 MSC 向血管内皮细胞分

[收稿日期] 2009-02-12

[修回日期] 2009-05-03

[作者简介] 田少华, 硕士研究生, 主要研究生物力学与干细胞及心血管疾病的联系。王海昌, 主任医师, 教授。张荣庆, 技师。

化,为临床应用 MSC 移植治疗缺血性疾病及将来血管组织工程所需种子细胞来源提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

MSC 来源于年龄 18~25 岁健康成人志愿者; VEGF 和二抗 TRITC-羊抗兔购自 Sigma 公司; 一抗兔抗人假性血友病因子 (wF) 多克隆抗体购自武汉博士德公司; Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (Dil-ac-LDL) 购自 Invitrogen 公司; Percoll 液购自 Pharmacia 公司。

1.2 骨髓间充质干细胞的分离和培养

无菌操作下取胸骨 (或髂前上嵴、髂后上嵴) 骨髓液 2~3 mL, 肝素抗凝。向骨髓中加入 DMEM-LG 稀释, 用 1.073 kg/L Percoll 液 710 g 离心 20 min, 分离交界面的细胞层, 将收集的细胞用 PBS 洗 2 次, 接种于培养瓶, 待细胞长至 80% 左右传代。按文献 [2] 分别将 MSC 向脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞诱导分化, 经鉴定具有多向分化能力。实验共分四组: 静态培养对照组、VEGF 诱导组、剪应力 (8 和 15 dyn/cm²) 诱导组和 VEGF+ 剪应力联合诱导组。剪应力组以 10⁴ 个/cm² 将 MSC 接种于平行平板流动腔, 待细胞贴壁 24 h 后, 施加剪应力。VEGF 诱导组以 10⁴ 个/cm² 种植密度传代于 12 孔培养板 (含诱导培养液 10 μg/L) 内, 每 48 h 换液一次, 连续观察 7 天。联合诱导组将 MSC 接种于含 10 μg/L VEGF 诱导培养液的平行平板流动腔, 带细胞贴壁后, 施加

剪应力。所用细胞均为 2~5 代。

1.3 细胞形态观察

在施加各诱导组诱导 0 h、24 h 时用倒置显微镜观察细胞形态变化。

1.4 间接免疫荧光检测

将流动腔内 MSC 用 PBS 冲洗后, 以冷丙酮固定 15 min, PBS 冲洗 3×5 min, 加 1:50 稀释的一抗室温孵育 1 h, PBS 冲洗 3×5 min, 加 1:80 稀释的二抗室温避光孵育 40 min, PBS 冲洗 3×5 min 后, 以 DAPI 室温孵育 2 min, PBS 冲洗 3×5 min 后, 石蜡封片镜检。

1.5 Dil-ac-LDL 摄取实验

MSC 以 PBS 冲洗后, 按照 10 mg/L 加入 Dil-ac-LDL 于 37℃ 孵育 4 h, PBS 冲洗 3×5 min, 多聚甲醛固定后, PBS 冲洗 3×5 min, DAPI 室温孵育 2 min, PBS 冲洗 3×5 min 后, 石蜡封片镜检。

2 结果

2.1 细胞形态变化

对照组细胞在静态培养 24 h 后为成纤维细胞样形态, 细胞排列无明显极性。VEGF 诱导 24 h 组细胞为成纤维细胞样形态。MSC 分别在 VEGF 和剪应力作用 7 天、24 h 后细胞形态趋于偏圆、呈多角形, 可见部分细胞核偏心分布, 具有双核仁, 这与内皮细胞形态相似。VEGF 和剪应力联合诱导 24 h 组可见细胞排列方向与流动方向平行, 且细胞密度明显较单独剪应力诱导组大 (图 1)。

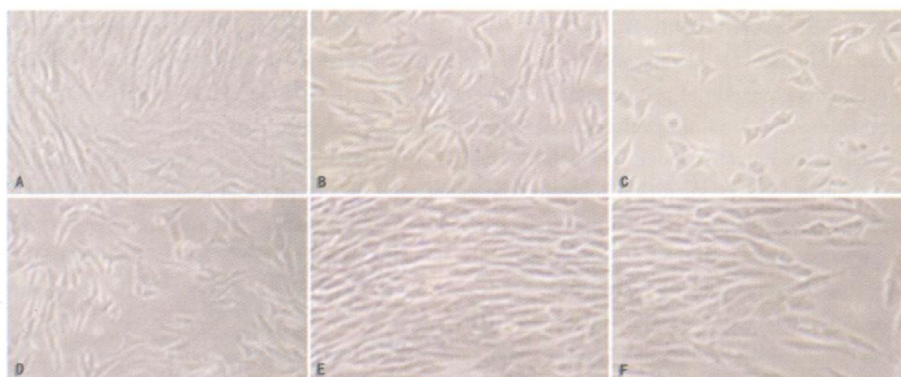


图 1 剪应力和 VEGF 的诱导对 MSC 形态的影响 (×100) A 为 MSC 静态培养 24 h, B 为 8 dyn/cm² 剪应力组, C 为 15 dyn/cm² 剪应力组, D 为 VEGF 诱导 7 天组, E 为 VEGF+8 dyn/cm² 剪应力组, F 为 VEGF+15 dyn/cm² 剪应力组。箭头所示方向为流动方向。

2.2 假性血友病因子的表达

对照组细胞静态培养 24 h 后 wF 染色阴性, 与正常 MSC 不表达内皮细胞标记物相符。VEGF 诱导 24 h 后 wF 染色阴性, 诱导 7 天后 wF 染色

阳性。MSC 在 8 dyn/cm² 剪应力作用 24 h 后 wF 染色弱阳性, 提示可诱导 MSC 向内皮细胞分化。在 15 dyn/cm² 剪应力作用 24 h 后 wF 染色阴性。VEGF 和 8 dyn/cm² 联合诱导组 24 h 后 wF 染色强阳性, VEGF 和 15 dyn/cm² 剪应力联合诱导组 24 h

后 α WF 染色阳性 (图 2)。

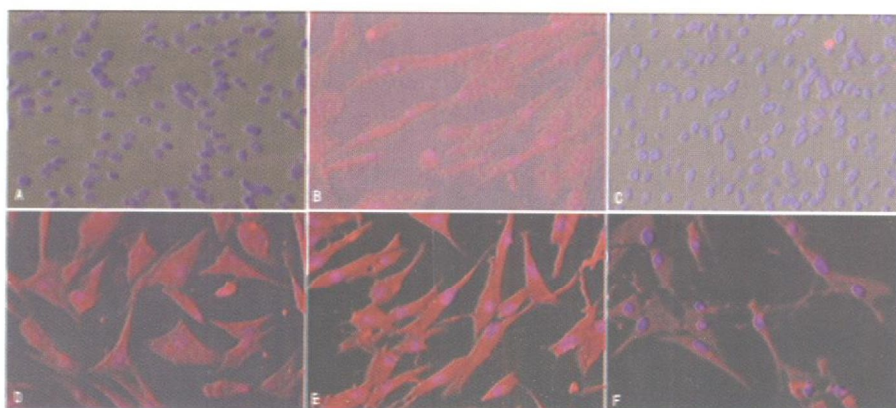


图 2 剪应力和 VEGF 的诱导对 MSC α WF 表达的影响 ($\times 200$) A 为 MSC 静态培养 24 h, B 为 8 dyn/cm^2 剪应力组, C 为 15 dyn/cm^2 剪应力组, D 为 VEGF 诱导 7 天组, E 为 VEGF + 8 dyn/cm^2 剪应力组, F 为 VEGF + 15 dyn/cm^2 剪应力组。蓝色为细胞核染色, 红色为 α WF 抗原染色阳性。

2.3 脂质摄取功能变化

VEGF 诱导 24 h 后 DiI-ac-LDL 摄取实验阴性, 7 天后 DiI-ac-LDL 摄取实验阳性。MSC 在接受 8 dyn/cm^2 剪应力作用 24 h 后, DiI-ac-LDL 摄取实验阳性; 15 dyn/cm^2 剪应力作用 24 h 后, DiI-ac-LDL 摄取实验阴性。VEGF 和剪应力 (8 和 15 dyn/cm^2) 联合诱导 24 h 后, DiI-ac-LDL 摄取实验阳性。说明

MSC 在 15 dyn/cm^2 剪应力作用 24 h 后无摄取脂质功能, 8 dyn/cm^2 剪应力、VEGF 和剪应力 (8 和 15 dyn/cm^2) 联合诱导 24 h 后具有内皮细胞样摄取脂质功能 (图 3)。因此, 8 dyn/cm^2 剪应力作用 24 h 可诱导 MSC 具有内皮细胞功能特征, VEGF 与剪应力联合诱导 24 h 组 MSC 具有内皮细胞功能特征, 这与 α WF 染色结果一致。

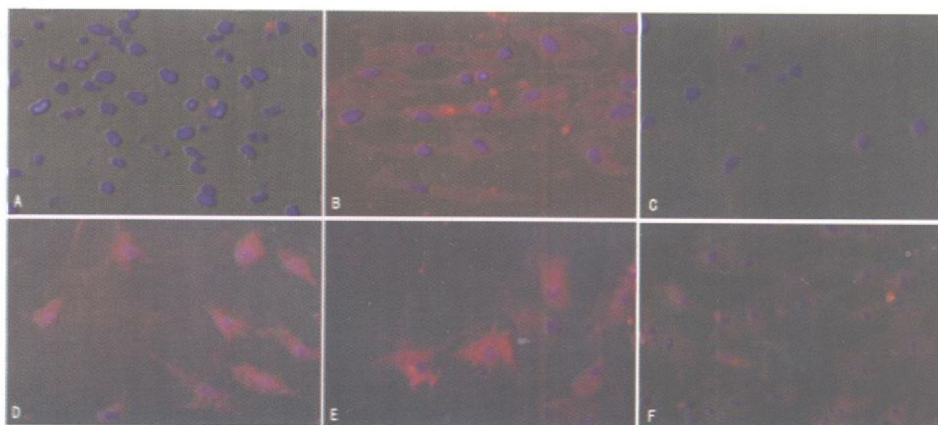


图 3 剪应力和 VEGF 的诱导对 MSC DiI-ac-LDL 摄取的影响 A 为 MSC 受力 0 h, B 为 8 dyn/cm^2 剪应力组, C 为 15 dyn/cm^2 剪应力组, D 为 VEGF 诱导 7 天组, E 为 VEGF + 8 dyn/cm^2 剪应力组, F 为 VEGF + 15 dyn/cm^2 剪应力组。蓝色为细胞核染色, 红色为 ac-LDL 染色阳性。

3 讨论

成人骨髓干细胞主要分为两大类: 一类是以 $\text{CD}34^+$ 为代表的造血干细胞, 另一类是以 $\text{CD}34^-$ 为主的 MSC。研究证明流体应力可以诱导鼠的胚胎干细胞和内皮祖细胞向血管内皮细胞表型分化^[7]。Kreke 等^[8]将 SD 大鼠的 BMSC 培养于成骨诱导培养液 (含地塞米松、抗坏血酸), 隔天分别重复给予 5、30 和 120 min 的流体剪应力 (1.6 dyn/cm^2), 在不同时间点加力并检测细胞数量和成骨分化表型标

记, 结果发现重复给予流体剪应力可以促进 MSC 内皮细胞分化的晚期表型标记表达, 而且这种促进作用依赖于重复加力的时间。各种细胞因子虽可成功诱导 BM-MSC 向血管内皮细胞分化^[9-11], 但价格昂贵, 存在潜在生物安全性问题 (致癌性, 质和量都不能和体内相比等)。目前已有的研究显示, 剪应力可成为一种诱导 MSC 向内皮细胞分化的新方法。

本研究中, 常规 MSC 分离培养方法所获的 MSC 具有多向分化功能。在持续剪应力作用下 MSC 形

态趋于偏圆,呈多角形,可见部分细胞核偏心分布,具有双核仁,这与内皮细胞形态相似。在 VEGF 诱导下施加剪应力,细胞排列与流动方向平行,推测是 VEGF 与剪应力相互作用下细胞粘附力的适应性改变,这有待于进一步研究。同时发现随着力的增大,细胞密度降低,提示剪应力越大,细胞脱落越严重。而 VEGF 诱导下施加较大剪应力细胞密度无明显降低,提示 VEGF 可与大剪应力相互作用增强细胞粘附能力。

间接免疫荧光显示, 8 dyn/cm^2 剪应力作用后, MSC 表达内皮细胞标记物 vWF 弱阳性,提示 MSC 向内皮细胞分化。为了进一步验证所分化的内皮细胞是否具有内皮细胞功能,将细胞置于含 10 mg/L DiI-ac-LDL 培养基中孵育 4 h 后,镜检荧光阳性,说明 MSC 分化来的内皮细胞具有典型的内皮细胞摄取脂质的功能。在接受较大的剪应力后, MSC 并未向内皮细胞分化,而在 VEGF 诱导下施加剪应力后, MSC 表达内皮细胞标记物 vWF 强阳性且具有内皮细胞摄取脂质的功能。提示 VEGF 可联合不同大小剪应力诱导 MSC 向内皮细胞分化。

本研究通过密度梯度离心后贴壁培养获取 MSC,在 VEGF 诱导的同时以剪应力装置平行平板流动腔对 MSC 施加剪应力,通过对内皮细胞标记物及功能的鉴定,证明 VEGF 可与不同大小的剪应力联合诱导 MSC 向内皮细胞分化。通过研究 VEGF 与不同大小剪应力的细胞生物学效应,有助于合理地设计生物反应器,实现组织工程培养环境的最优

化。

[参考文献]

- [1] Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest* 1999; **103** (9): 1231-236
- [2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science* 1999; **284** (5411): 143-147.
- [3] Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells heading into the clinic [J]. *Bone Marrow Transplant* 2001; **27** (3): 235-239
- [4] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro [J]. *Stem Cells* 2004; **22** (3): 377-384
- [5] Gojo S, Gojo N, Takeda Y, et al. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells [J]. *Exp Cell Res* 2003; **288** (1): 51-59
- [6] Kadner A, Hoerstrup SP, Zund G, et al. A new source for cardiovascular tissue engineering: human bone marrow stromal cells [J]. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2002; **21** (6): 1055-060
- [7] Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, et al. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **288** (4): H1915-924
- [8] Kreke MR, Huckle WR, Goldstein AS. Fluid flow stimulates expression of osteopontin and bone sialoprotein by bone marrow stromal cells in a hormonally dependent manner [J]. *Bone* 2005; **36** (6): 1047
- [9] Wu YN, Yang Z, Hui JH, et al. Cartilaginous ECM component modification of the micro-bead culture system for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials* 2007; **28** (28): 4056-067
- [10] Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease [J]. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; **231** (1): 39-49
- [11] Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, et al. Gender differences in injury-induced mesenchymal stem cell apoptosis and VEGF, TNF, IL-6 expression: Role of the 55 kDa TNF receptor (TNFR1) [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2007; **42** (1): 142-149

(此文编辑 文玉珊)