

小鼠骨髓源性内皮祖细胞的分离培养与鉴定

李美玲, 刘凤姣, 刘 玲

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 内皮祖细胞; 骨髓; 小鼠

[摘要] 目的 建立一种高效、稳定的从小鼠骨髓中分离培养与定向诱导分化内皮祖细胞的方法。方法 通过密度梯度离心法从小鼠骨髓中分离单个核细胞, 经差速贴壁结合特殊培养基扩增, 诱导分化为内皮祖细胞。应用流式细胞技术鉴定内皮细胞系列标志: CD34、CD31、Flk-1和祖细胞标志 CD133。结果 经密度梯度离心和差速贴壁法分离所得的细胞经 EBM-2 专用培养基培养后, 第 4 天可见集落形成, 培养第 12 天流式细胞仪检测其 CD34、CD133、Flk-1、CD31 的阳性率分别为 $65\% \pm 4\%$ 、 $48\% \pm 3\%$ 、 $37\% \pm 3\%$ 和 $51\% \pm 4\%$ 。结论 从小鼠骨髓中分离培养与定向诱导分化内皮祖细胞的方法效率高, 稳定性和重复性好。

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

Isolation, Culture and Identification of Mouse Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells

LIMEiLing, LU Feng-Jiao, and LIU Ling

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Bone Marrow; Mouse

[ABSTRACT] **Aim** To establish an efficient and stable method for isolation, culture and directional differentiation of endothelial progenitor cells from mouse bone marrow. **Methods** Mononuclear cells were isolated from mouse bone marrow by density gradient centrifugation and differential adhesion method. The remaining cells were cultured and differentiated to endothelial progenitor cells in EBM-2. The expressions of specific antigens (CD34, CD133, Flk-1 and CD31) on cell surface were analyzed by flow cytometer. **Results** Cells were obtained from mouse bone marrow by density gradient centrifugation and differential adhesion method formed clusters at day 4. At day 12, positive ratios of CD34⁺, CD133⁺, Flk-1⁺ and CD31⁺ were $65\% \pm 4\%$, $48\% \pm 3\%$, $37\% \pm 3\%$ and $51\% \pm 4\%$, respectively. **Conclusion**

An efficient, stable and replicable method for isolation and culture of endothelial progenitor cells from mouse bone marrow has been established.

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 是成熟血管内皮细胞的前体细胞, 包括从成血管母细胞到成熟内皮细胞之间的多个阶段的细胞, 有旺盛的增殖分化能力, 可向血管新生部位 (包括缺血组织及肿瘤微环境) 趋化并分化成为成熟内皮细胞^[1]。EPC 主要存在于骨髓之中, 在机体出现缺血、组织损伤或受到细胞因子、药物等刺激的情况下, 可从骨髓向靶部位动员、归巢、分化, 形成新生血管, 参与血管再生及损伤血管的再内皮化。因此其在临床各种缺血性疾病、血管损伤及动脉粥样硬化

方面有着广阔的应用前景^[2-5]。研究发现, EPC 不仅参与胚胎血管生成, 还在胎儿出生后的血管新生和血管内皮损伤修复过程中起着重要作用^[6]。EPC 可以由外周血、脐血、骨髓中的单个核细胞诱导分化而成, 但获取单个核细胞的方法各异, 分离效果亦有较大差异。为获得群体均一、纯度较高的 EPC, 本实验采用密度梯度离心法及差速贴壁法结合特殊培养基成功扩增培养出 EPC, 并进行鉴定, 希望为实验研究和临床应用提供简便和安全可靠的方法。

[收稿日期] 2011-01-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30973159)

[作者简介] 李美玲, 硕士研究生, 研究方向为餐后血脂紊乱与动脉粥样硬化, Email 为 mll2013@163.com。通讯作者刘玲, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为餐后血脂紊乱与动脉粥样硬化, Email 为 feluiling@medmail.com.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

6~8周龄 SPF级昆明雄性小鼠 24只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。EBM-2 SingleQuots购自瑞士 Lonza公司;胎牛血清、牛脑垂体提取物购自美国 GIBCO公司;人纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor VEGF)购自美国 R&D公司;小鼠淋巴细胞分离液 Histopaque-1092购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;FITC-antimouse CD34及同型对照、FITC-antimouse CD133及同型对照、PE-antimouse CD31及同型对照、PE-antimouse Flk-1及同型对照购自美国 Bioscience公司。

1.2 仪器与设备

倒置荧光显微镜 (Nikon Eclipse TE2000-s); BD Biosciences FACS Calibur™ system流式细胞仪。

1.3 骨髓单个核细胞的分离

昆明小鼠腹腔注射 0.2 mL肝素后再以 0.1 mL水合氯醛腹腔麻醉。在体积分数为 75%的乙醇中浸泡 10 min,无菌条件下剥离双下肢股骨和胫骨,剪去股骨和胫骨两端的骨髓,暴露骨髓腔。用 1 mL注射器吸取磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS)冲洗骨髓腔,直至冲洗液清亮,骨髓腔变白,收集全部骨髓细胞于离心管,反复吹打以获得单细胞悬液。然后将骨髓单细胞悬液缓慢加于淋巴细胞分离液上,单细胞悬液与分离液的体积比为 2:1。常温下 2 000 r/min离心 25 min,轻轻吸取离心管中间白色云雾状单个核细胞层, PBS洗涤细胞 1次,以洗净残余的淋巴细胞分离液。

1.4 单个核细胞向内皮祖细胞的诱导培养

参照文献的方法^[7],提前 3 h 10 mg/L FN包被 25 cm²培养瓶。将收集的单个核细胞加入 EBM-2完全培养液 [含体积分数 20%的胎牛血清, VEGF 10 μg/L, 牛脑提取物 5 mg/L, 表皮生长因子 (epidermal growth factor EGF) 10 μg/L, 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor bFGF) 2 μg/L, 胰岛素样生长因子 2 μg/L]重悬细胞,反复轻柔吹打制成单细胞悬液后进行细胞计数。将小鼠的骨髓单个核细胞按 $(1.0 \sim 2.0) \times 10^6$ /L密度接种于事先用 FN包被的培养瓶中,置 37℃、体积分数为 5%的 CO₂饱和湿度培养箱中培养。第 4天首次半量换液,弃去悬浮细胞,继续培养,以后每两天半量换液 1次。培养至 12天,收集贴壁细胞供细胞鉴定。

1.5 内皮祖细胞的形态学观察

用倒置荧光显微镜每日观察 EPC的生长增值情况及形态特征并拍照。

1.6 内皮祖细胞表型鉴定

取培养到第 12天的原代 EPC,以 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylene dinitritetraacetic acid EDTA) /PBS消化后用 PBS重悬细胞,1%多聚甲醛 4℃固定 20 min, PBS洗 2次,光镜下计数。分别设立对照管 1、2、3 实验管 1、2、3、4 每管加入 1×10^5 个细胞。对照管 1、2、3 中分别加入同型对照抗体 FITC Rat IgG2a, FITC Rat IgG1, PE Rat IgG2a 实验管 1、2、3、4 分别加入 FITC-antimouse CD34, FITC-antimouse CD133, PE-antimouse CD31, PE-antimouse Flk-1。4℃避光孵育 30 min, PBS洗 1次, PBS重悬,行流式细胞仪检测,分析 CD34⁺、CD133⁺、Flk-1⁺ 和 CD31⁺ 细胞所占的百分率。

1.7 统计学处理

实验数据均以均数 ±标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用 Student t检验,双侧 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的体外培养及扩增

新分离获得的单个核细胞为小圆形,与血细胞不能区分。骨髓单个核细胞种植 24 h后部分细胞开始贴壁、变大,倒置显微镜下贴壁细胞透亮度增强,并逐渐伸出伪足样突起,呈小杆状或梭形。培养第 4天贴壁细胞开始增殖,呈“集落”样生长,中间为圆形细胞,周边为梭形细胞,呈放射状向外周生长 (图 1A)。第 6~7天梭形细胞显著增多 (图 1B)。8~10天增殖加速,并出现条索状结构,可呈微血管样生长。部分细胞一直呈小圆形,不能贴壁,换液时弃去。2周时大部分 EPC呈多角形,细胞集落相互连接,呈典型的“铺路石”样 (图 1C)。

2.2 内皮祖细胞的鉴定

流式细胞仪检测结果显示, EPC CD34、CD133、Flk-1和 CD31阳性率分别为 65% ±4%、48% ±3%、37% ±3%和 51% ±4% ($n = 3$) (图 2)。

3 讨论

内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞,属于多能干细胞,可来源于外周血、脐血、骨髓、胎肝及脂肪组织等。相对于外周血、脐血、胎肝及脂肪组织来

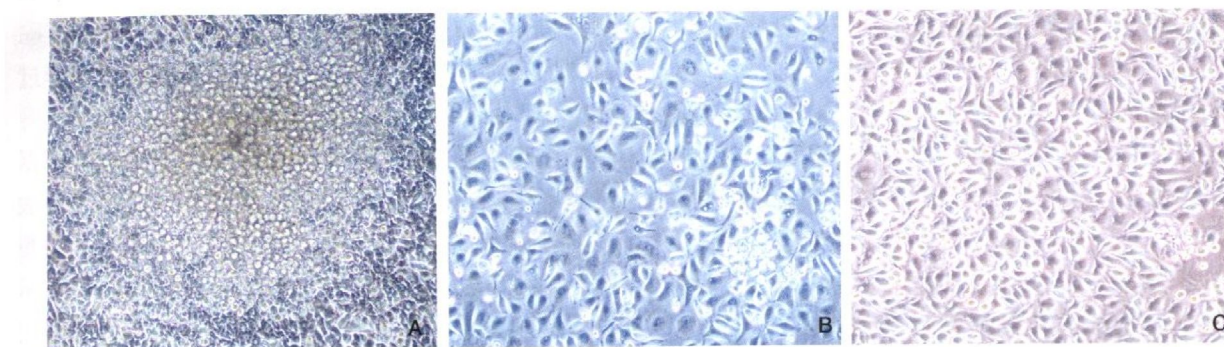


图 1. 原代培养的内皮祖细胞形态学变化 (×40) A 为细胞集落形态, B 为梭形细胞增多, C 为细胞“铺路石”样。

Figure 1. Morphological changes of primary culture endothelial progenitor cells (×40)

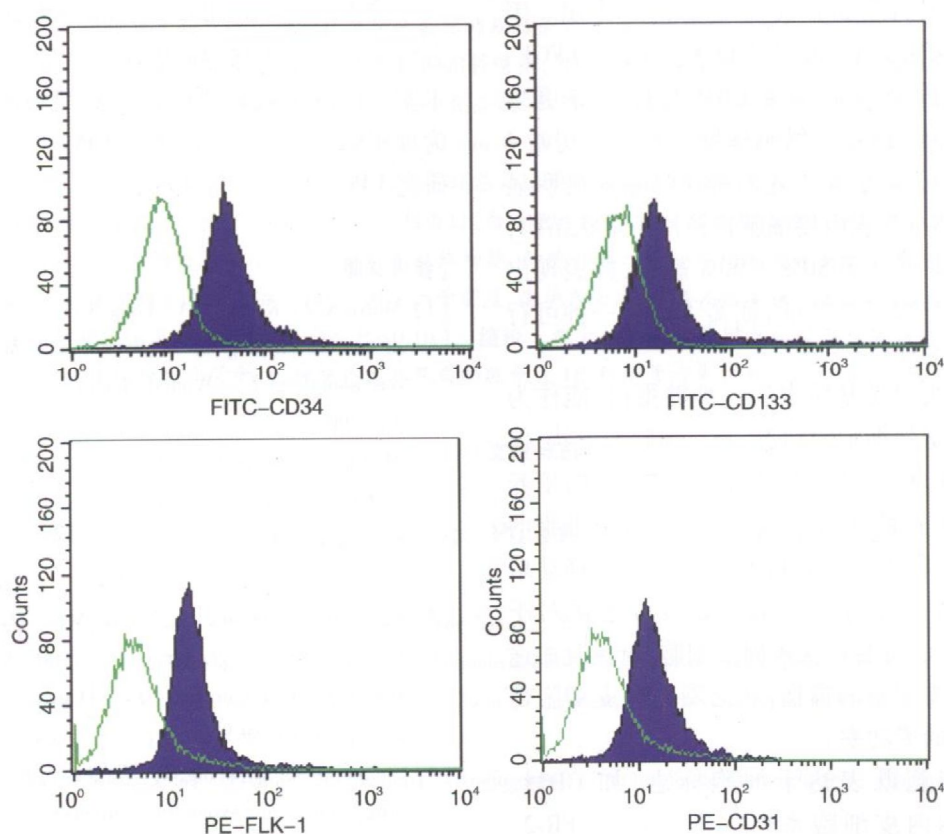


图 2. 内皮祖细胞表型检测 蓝色为相应细胞膜表面标志, 灰色为同型 IgG 对照。

Figure 2. Phenotype detection of endothelial progenitor cells

说,骨髓中含有大量的干细胞和祖细胞, EPC 的含量更为丰富,且增殖能力更强。而且骨髓细胞属自体来源,用于移植治疗无免疫排斥等特点,因此本实验选择骨髓细胞作为 EPC 的来源。

目前对 EPC 的分离方法包括外周血单个核细胞贴壁分离法及包被 CD34 或 CD133 单抗的免疫磁珠吸附法。外周血单个核细胞贴壁分离法易于操作,费用低,仪器要求不高,但得到的 EPC 纯度较低,而免疫磁珠吸附法虽然可以收集到较高纯度的 EPC,但有研究发现,分离得到的 CD34⁺ 或 CD133⁺

细胞单独培养时不能增殖,需与 CD34⁺ 或成熟内皮细胞共同培养才有增殖活性,且费用昂贵,分选难度大,细胞获得量少,满足不了实验需要,不易推广普及。本实验采用密度梯度离心法获取单个核细胞,然后将细胞接种于包被有 FN 的培养瓶中促其贴壁,并用添加了 VEGF、EGF、bFGF、牛脑提取物等各种促内皮细胞生长因子的特殊培养基进行体外培养扩增,4 天后首次半量换液,去除其中不贴壁的造血细胞。经此法培养后能够获得较多数量纯度较高的 EPC。

生长因子是 EPC 培养过程中不可缺少的成分。它一方面可以促进干/祖细胞向 EPC 分化, 另一方面又可提高 EPC 本身的增殖能力。VEGF 是目前所知道的作用最强的促血管生成因子。VEGF 与 EPC 表面的血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 结合, 诱导 EPC 增殖分化; 在 2~10 $\mu\text{g/L}$ 之间, 浓度越高, 其对骨髓单个核细胞诱导分化的能力越强。有报道称 EPC 膜表面表达 bFGF 受体, bFGF 与受体结合, 介导细胞内生长信号传导, 对 EPC 增殖有非特异性诱导作用, 同时 bFGF 可以协同 VEGF 对 EPC 的促增殖作用。EGF 也能发挥促进内皮细胞增生的作用。因此, 我们实验选用含 10 $\mu\text{g/L}$ VEGF、2 $\mu\text{g/L}$ bFGF、10 $\mu\text{g/L}$ EGF 的诱导培养液 EBM-2 以诱导更多 EPC 的生成, 加快 EPC 的增殖速度。细胞在初始 4 天内生长速度较缓慢, 8 天左右细胞增殖速度明显加快, 并在局部排列成内皮细胞特异性条索状结构, 2 周左右细胞即可达到 80%~90% 融合, 并表现出内皮细胞的部分形态学特征, 证实了这是一种可行的 EPC 培养方法。

纤维连接蛋白是基质中的一种糖蛋白, 能作为一种中介蛋白增强细胞间粘连, 调节细胞的形状, 促进细胞铺展。EPC 不易贴壁, 故在培养 EPC 的培养瓶中预先用 FN 包被, 以利于 EPC 贴壁, 促进细胞的增殖、分化。并在前 3 天的培养中避免快速移动培养瓶, 以利于细胞的贴壁生长。是否肝素化对于 EPC 的影响较大, 抗凝可保护内皮细胞, 避免凝血途径的激活对内皮细胞的损伤, 从而增加内皮细胞得率以提高培养的成功率。

内皮祖细胞既表达干细胞标志, 如 CD34、CD133 又表达内皮细胞系列标志, 如 VEGFR-2、vWF、VE 钙黏素、Tie2、CD31 等。研究证实, 体外培养的 EPC CD31 表达率高于内皮细胞, 而 VEGFR-2 则低于内皮细胞; 但随着培养时间的延长, VEGFR-2 表达逐渐增加, 而其干细胞标志 CD34、CD133 则逐渐下降。本实验选用 CD34、CD133、Flk-1 及 CD31 四种细胞表面标志, 阳性细胞被鉴定为 EPC。CD34 主要表达于造血干细胞和成熟内皮细胞表面, 被认为是分离纯化 EPC 的合适标志物之一。CD133 是造血干细胞和内皮前体细胞的分子标志。VEGFR-2 在鼠为 Flk-1, 人为 KDR, 作为血管系统最早出现的细胞标志, 是胚胎期血管发生的关键受体, 是 EPC、造血干细胞和内皮细胞共有的特征性分子标志。CD31 是早期血管发生的标志, 同时也是内皮细胞分

化的最早标志。通过检测这几种抗体, 可基本排除成熟内皮细胞和造血干细胞。本研究的细胞培养过程中, 弃去培养 72 h 后的未贴壁细胞, 可以避免骨髓中巨噬细胞、成纤维细胞等对实验的干扰。根据细胞形态, EPC 为长梭形细胞, 而造血干细胞却不表现这种形态。贴壁细胞形成类似“血岛”结构的集落, 并且形成条索状结构及“铺路石”样外观, 显示这些细胞具有内皮细胞的形态和生长特性。这说明使用该方法分离的细胞中有较高的比例具有向内皮细胞方向分化的能力。因此, 通过细胞形态学及表型鉴定, 可以认为这些细胞都是比较纯的 EPC。

综上所述, 利用小鼠骨髓分离单个核细胞, 结合特殊培养基扩增, 应用细胞形态学及流式细胞技术鉴定内皮细胞系列标志及祖细胞标志, 是一种较为理想的分离、培养及鉴定 EPC 的方法, 为进一步研究 EPC 提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Morris LM, Klanke CA, Lang SA, et al. Characterization of endothelial progenitor cells mobilization following cutaneous wounding [J]. *Wound Repair Regen* 2010; 18(4): 383-390
- [2] Medina RJ, O'Neill CL, Humphreys MW, et al. Outgrowth endothelial cells: characterization and their potential for reversing ischemic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(11): 5906-913
- [3] Khoo CP, Valorani MG, Brittan M, et al. Characterization of endothelial progenitor cells in the NOD mouse as a source for cell therapies [J]. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25(1): 89-93
- [4] Steinmetz M, Nickenig G, Werner N. Endothelial-regenerating cells: an expanding universe [J]. *Hypertension* 2010; 55(3): 593-599
- [5] 陈剑飞, 黄岚, 宋明宝, 等. 晚期糖基化终末产物调节氧化应激对内皮祖细胞生物学功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; 17(8): 634-638
- [6] Mohandas R, Segal MS. Endothelial progenitor cells and endothelial vesicles: what is the significance for patients with chronic kidney disease? [J]. *Blood Purif* 2010; 29(2): 158-162
- [7] Hideki U, Takeshi M, Osamu T, et al. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis [J]. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(4): 997-1004

(此文编辑 曾学清)