

改良法分离培养兔骨髓源性早晚期内皮祖细胞

王佐, 张凯, 王仁, 苏维, 李爽, 杨简, 姜志胜

(南华大学心血管病研究所 动脉硬化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内皮祖细胞; 单个核细胞; 兔骨髓; 密度梯度离心法; 差速贴壁法

[摘要] **目的** 探索简单有效分离培养兔骨髓源性内皮祖细胞的方法, 并比较两种内皮祖细胞生物学性状。方法 4 周龄左右的新西兰兔, 于每侧胫骨取骨髓 2 mL, 密度梯度离心后取单个核细胞接种于培养瓶, 48 h 后将悬浮的细胞收集再次贴壁, 血管内皮生长因子诱导其向内皮祖细胞分化。免疫细胞化学鉴定其表面标志物、免疫荧光功能学测定, 对比前后两种贴壁细胞生长状况。**结果** 早期获取的单个核细胞, 半小时后就开始贴壁, 3 天左右即可长出梭形的细胞, 胞体较大, 有血岛样克隆形成, 随后培养可形成管腔样结构, 10 天左右即可呈漩涡状融合整个培养瓶, 但这种细胞传代能力差, 为早期内皮祖细胞; 第 2 次贴壁的晚期细胞于贴壁后呈椭圆形生长, 贴壁后 5~7 天即可出现集落, 片状生长, 最后呈铺路石样融合, 并可连续传至 10 代以上, 为晚期内皮祖细胞。第 2 次贴壁的内皮祖细胞在分化过程中明显失去 CD133⁺, 而 CD34⁺ 表达有所升高, 大部分第 1 次贴壁内皮祖细胞可以吞噬乙酰化低密度脂蛋白和荆豆凝集素 1, 第 2 次贴壁内皮祖细胞功能学鉴定结果与第 1 次贴壁的结果类似。**结论** 改良后的密度梯度离心法结合差速贴壁法能有效分离培养兔骨髓源性内皮祖细胞, 第 2 次贴壁的内皮祖细胞生长能力更强。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Early and Late Endothelial Progenitor Cells Derived from Rabbit Bone Marrow Isolated and Cultured by An Improved Method

WANG Zuo, ZHANG Kai, WANG Ren, SU Wei, LI Shuang, YANAG Jian, and JIANG Zhi-Sheng

(Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Mononuclear Cells; Rabbit Bone Marrow; Ficoll Density Gradient Ultra Centrifugation; Differential Attachment Technique

[ABSTRACT] **Aim** To establish an available and convenient method to isolate and culture the rabbit bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPC) and compare the characteristics of the two different EPC. **Methods** Obtained 2 mL bone marrow from each shinbone of about 4 weeks old New Zealand rabbit, mononuclear cells (MNC) were isolated by Ficoll density gradient centrifugation method and planted in the first culture flask, after incubated for 48 h, collecting the suspended cells into the second flask, supplemented with vascular endothelial growth factor (VEGF) in order to induce cells differentiation into EPC. To compare the growing characteristics of the former and later cells, immunocytochemistry was used to examine the expression of the surfaces markers and immunofluorescence for function detection.

Results Earlier obtained mononuclear cells adhered after planted 30 minutes, about 3 days late, cells became long spindle shaped, a little bigger, and formed blood island like clone and vessels like formation. To the 10 days, vortex cells can confluence the whole flask, but had less proliferation (early EPC). The second adherent cells, oval shape, and appeared colony forming by the 5~7th day after adhered. At last, cells confluent like slabstone, which can transfer for 10 generations consecutively (late EPC). The second adherent EPC have a deficiency of CD133⁺ obviously during differentiation, but a higher expression of CD34⁺. Most first adherent EPC can uptake Dil ac LDL and Ulex Europaeus agglutinin 1 (UEA 1), that is similar to the function identification of the second adherent EPC. **Conclusion** The im-

[收稿日期] 2011-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81070221)和湖南省教育厅基金(08C747)资助

[作者简介] 王佐, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脂蛋白(a)对内皮祖细胞的损伤机制, E-mail 为 nb12@263.net。张凯, 在读硕士研究生, 研究方向为脂蛋白(a)对内皮祖细胞的损伤机制。王仁, 讲师, 博士研究生, 研究方向为脂蛋白(a)对内皮祖细胞的损伤机制, E-mail 为 wangren73@yahoo.com.cn。

proved Ficoll density gradient centrifugation integrated with differential attachment technique can efficiently isolate and culture rabbit bone marrow derived EPC, and the late EPC have a stronger growing ability.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是能直接分化成血管内皮细胞的前体细胞,参与损伤血管的重新内皮化以及局部缺血损伤的重新血管化。自1997年Asahara等^[1]首次分离并证实人类外周血中存在血管内皮祖细胞,Zhang等^[2]的实验进一步证明了循环血中含有骨髓来源EPC后,EPC已经成为心血管病研究的一个热点。EPC不但是微血管生成和动脉生成的重要供体细胞,参与血管损伤修复和缺血性疾病的治疗^[3],而且已经成为评价心血管疾病危险度的生物学标志之一。但EPC数量非常少,尤其是循环血中的数目非常低,健康人体出生后 $CD34^+ / CD133^+ / VEGFR 2^+$ EPC占总外周血单个核细胞的 0.0001% ^[4],因此,如何有效获得EPC成了基础和临床急需解决的难题。本研究拟根据EPC的生物学特点,参考几种经典的EPC分离培养方法,探索出一简单、重复性高的EPC分离培养方法,并对该方法不同时段分离培养的EPC的生物学特点做了比较与分析,为进一步研究EPC打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

4周龄左右的新西兰兔购自本校动物部,M199购自Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)购自Peprotech公司,兔淋巴细胞分离液购自中国医学科学院生物工程医学研究所,Dil-LDL购自广州奔源生物公司,明胶、荆豆凝集素1(Ulex Europaeus agglutinin 1, UEA 1)购自Sigma公司,兔多克隆抗体CD34、CD133、VEGFR 2购自Santa Cruz公司,山羊抗兔二抗均购自Chemicon公司,封闭用羊血清购自武汉博士德生物工程有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 兔骨髓源性内皮祖细胞的分离和培养

20%乌拉坦按5 mL/kg麻醉兔,固定后剪去大腿兔毛,常规消毒、铺巾;10 mL一次性注射器16号骨髓穿刺针,肝素预冲,于胫骨(关节下内侧1.0~1.5 cm处)进针,有突破感;每侧取2 mL,将骨髓缓慢注入10 mL无菌离心管,轻轻转动,使肝素与骨髓混匀,置于冰上,注意保持离心管不倾斜;将事先置于常温的D Hanks液4 mL加入到放置骨髓的离心管中,并小心用滴管吹匀,将骨髓按1:1比例稀释;将密度为1.0965的兔淋巴细胞分离液6 mL加入到

15 mL无菌离心管,之后缓慢向其中滴加稀释后的骨髓8 mL,注意不要破坏两者之间的分界面;于水平高速离心:20℃、1800 r/min离心20 min;离心后分为4层,由下往上分别为:红细胞、分离液、单个核细胞和血清,小心吸取中间云雾状的单个核细胞,转移至另一15 mL离心管;加入D Hanks液8 mL,1100 r/min离心8 min,弃上清洗涤细胞,并重复2次;加入2 mL培养液重悬细胞,转入0.1%明胶包被的培养瓶培养,调整细胞密度至 1×10^7 ,48 h后,将悬浮细胞转至另一明胶包被的培养瓶,做第2次贴壁细胞培养,对比两次贴壁细胞的生长情况。

1.3 内皮祖细胞的诱导分化及传代

在培养液中加入VEGF,诱导细胞向内皮祖细胞分化,3~5天后集落出现,并呈放射状向四周生长,10~15天即可融合整个培养瓶,待细胞完全融合后即可传代。传代一定要保持细胞的密度,以1:2比例传代较为合适,传代细胞增殖迅速且同源性高,3~4天即可铺满瓶底。

1.4 内皮祖细胞功能学鉴定

6孔板无菌玻片培养EPC至合适密度,无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)轻轻漂洗后加入10 mg/L Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil ac LDL),37℃、5% CO₂培养箱中孵育4 h,无菌PBS漂洗3次,4%多聚甲醛固定30 min, PBS漂洗后,加入荆豆凝集素1 80 mg/L,37℃、5% CO₂培养箱中避光孵育1 h,在荧光显微镜下观察细胞吞噬Dil ac LDL及UEA 1的能力。显示红色荧光的细胞为乙酰化低密度脂蛋白阳性,显示绿色荧光的细胞为荆豆凝集素1阳性,同时显示双荧光阳性的细胞为EPC。

1.5 免疫细胞化学鉴定细胞表面标志

将EPC接种盖玻片上,待细胞生长至适合密度,取出玻片,PBS洗涤2次后,4%多聚甲醛固定10 min, PBS洗涤2次,每次5 min,0.1%的Triton-X100作用3 min, PBS洗涤2次,每次5 min,0.3%的双氧水处理10 min, PBS洗涤2次,每次5 min,4%小牛血清封闭20 min后弃掉封闭液,加入兔多克隆抗体CD133、CD34(1:100),4℃冰箱过夜, PBS洗涤2次,滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:200),室温孵育30 min, PBS洗涤2次,滴加二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色液显色,适时终止反应。以不加一抗的培养细胞做空白

对照。显微镜下计数胞浆呈棕黄色的阳性细胞数, 图像软件进行光密度测定分析, 选择测量面积、平均光密度(mean density) 和累积光密度(integrated optical density, IOD), SPSS 软件统计分析。

1.6 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 兔骨髓源性内皮祖细胞分离与培养

仔细吸取经密度梯度离心分离的中间云雾状单个核细胞, 于 0.1% 明胶包被的培养瓶中培养, 半小

时后就有细胞开始贴壁, 3 天左右即可长出长梭形的细胞, 胞体较大, 有血岛样克隆形成, 10 天左右即可呈漩涡状融合整个培养瓶, 但这种细胞传代能力差, 为早期 EPC(图 1 和 2); 第 2 次贴壁的细胞于贴壁后呈椭圆形生长, 贴壁后 5~7 天即可出现集落, 片状生长, 最后呈铺路石样融合, 并可连续传至 10 代以上, 为晚期 EPC(图 3 和 4)。

2.2 免疫细胞化学鉴定内皮祖细胞表面标志

第 2 次贴壁(晚期) 的 EPC 继续培养至 4 天, 行免疫细胞化学鉴定, 与传至第 5 代 EPC 免疫细胞化学结果相比可见, 随着细胞的分化, CD133⁺ 的表达逐渐降低, 而 CD34⁺ 表达有所升高(图 5 和 6, 表 1)。

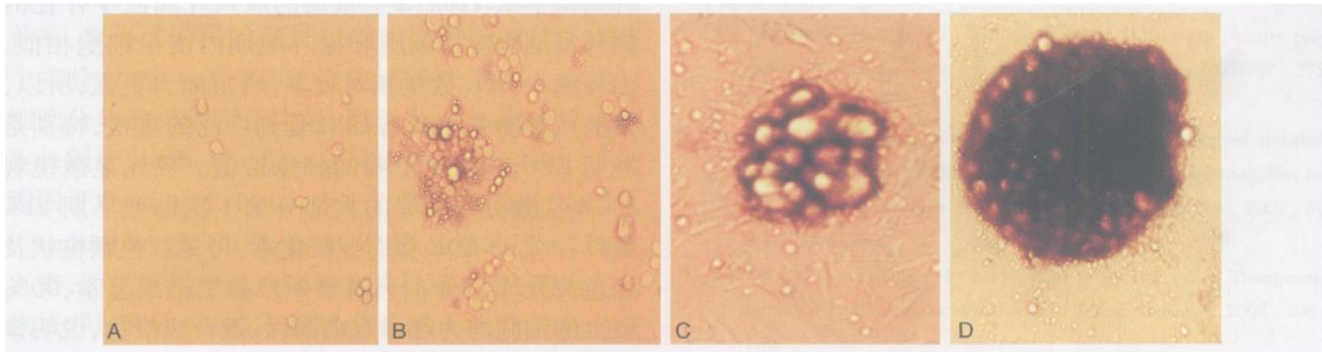


图 1. 原代培养早期 EPC(第 1 次贴壁) (200 ×) A 为第 1 天, 可见贴壁细胞; B 为第 3 天, 集落初步形成; C 为第 5 天, 集落呈血岛样, 周围细胞放射状生长; D 为第 10 天, 细胞融合整个培养瓶, 长梭形。

Figure 1. Primary culture early EPC

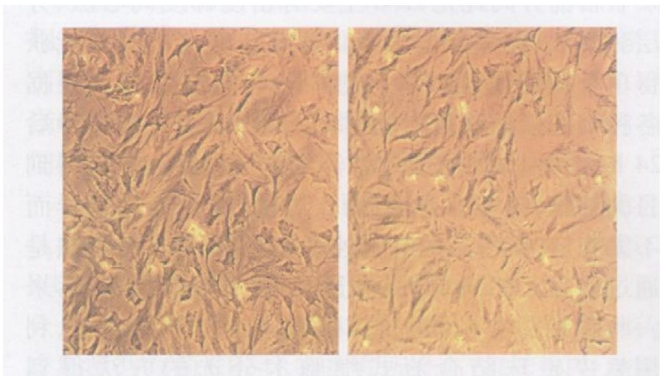


图 2. 传代培养早期 EPC (200 ×) 传代早期 EPC, 细胞形状有些不规则, 部分细胞变形。

Figure 2. Subculture early EPC

表 1. 早、晚期 EPC 免疫细胞化学 CD133⁺、CD34⁺ 累积光密度($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The CD133⁺, CD34⁺ integrated optical density comparison of early and late EPC by immunocytochemistry method

项 目	CD133 ⁺	CD34 ⁺
早期 EPC	7538.48 ± 226.27	4334.81 ± 626.27
晚期 EPC	2311.76 ± 13.7 ^a	7936.31 ± 331.03 ^a

^a 为 $P < 0.05$, 与早期 EPC 比较。

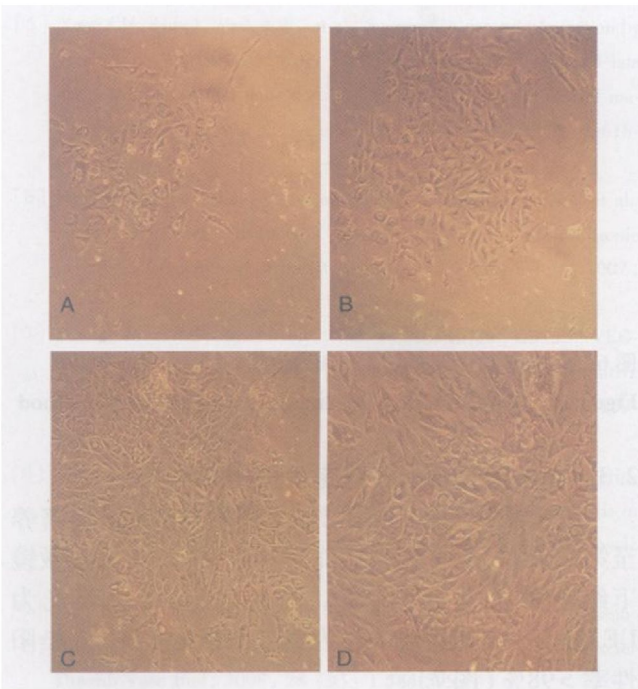


图 3. 晚期 EPC 原代培养(第 2 次贴壁) (200 ×) A 为贴壁后第 3 天; B 为第 7 天, 集落形成; C 为第 10 天, 集落呈片状不断扩大; D 为第 15 天, 细胞融合整个培养瓶, 典型的铺路石样, 短梭形。

Figure 3. Primary culture late EPC

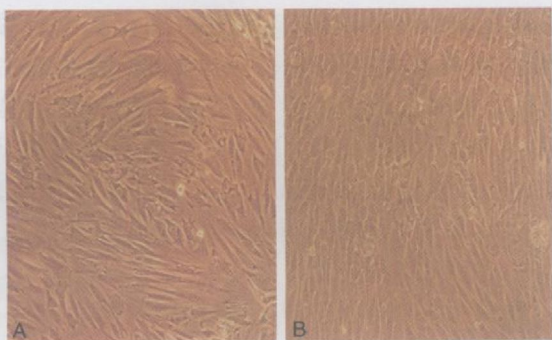


图4. 晚期 EPC 传代培养(200 ×) 传代的晚期内皮祖细胞, 细胞形状规则,增殖能力旺盛。A 为第2代;B 为第5代。

Figure 4. Subculture late EPC

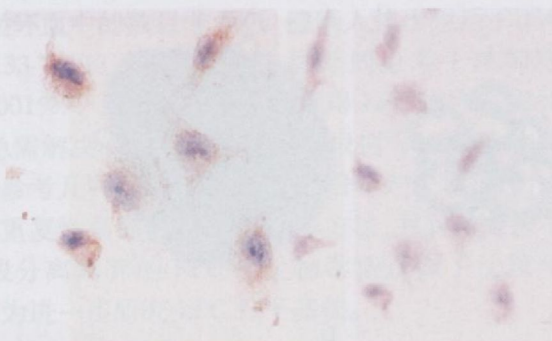


图5. 免疫细胞化学鉴定 CD133⁺ (200 ×)

Figure 5. Identify CD133⁺ by immunocytochemistry method

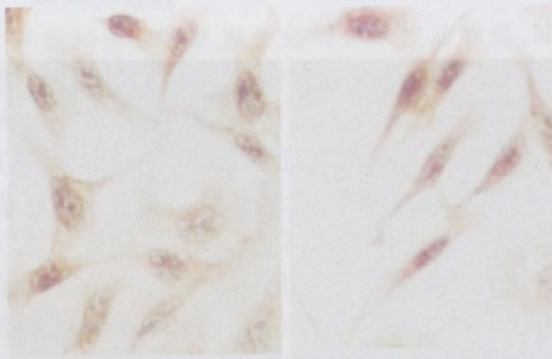


图6. 免疫细胞化学鉴定 CD34⁺ (200 ×)

Figure 6. Identify CD34⁺ by immunocytochemistry method

2.3 免疫荧光功能学鉴定内皮祖细胞

第1次(早期)和第2次(晚期)贴壁细胞培养至第7天时,免疫荧光功能学鉴定 EPC, 荧光显微镜下红色荧光为 Dil ac LDL 阳性细胞, 绿色荧光为 UEA Ⅰ 阳性细胞, 桔黄色为双染阳性的 EPC, 双染阳性率 >98% (图7)。

3 讨 论

内皮祖细胞分离培养的难度和数量的稀少, 使其临床应用成为一个瓶颈, 而相关的实验证实, 晚期

EPC 更适用于心血管疾病的治疗, 因此, 获得晚期 EPC 就成为内皮祖细胞非常基础、非常有意义的研究。本实验发现: 从骨髓早期获取的单核细胞, 半小时后就开始贴壁, 3 天左右即可长出长梭形的细胞, 胞体较大, 有血岛样克隆形成, 周围细胞放射状生长, 随后培养可形成管腔样结构, 10 天左右即可呈漩涡状融合整个培养瓶。但这种细胞传代能力差, 传至 2 代以后, 细胞形状开始改变, 部分细胞呈分叉树叶状, 增殖能力急剧降低。第 2 次贴壁的细胞于贴壁后呈椭圆形生长, 贴壁后 5 ~ 7 天即可出现集落, 片状生长, 最后呈铺路石样融合。这与 2004 年韩国科学家 Yoon 等^[5]报道的成人外周血中存在的循环早期内皮祖细胞和循环晚期内皮祖细胞相似。而骨髓中 EPC 数量相对较多, 增殖能力更强, 所以, 目前从骨髓中分离出 EPC 受到广泛的重视, 特别是晚期 EPC, 具有更重要的临床价值。荧光显微镜观察, 本实验分离培养的大部分第 1 次贴壁早期 EPC 可以吞噬 ac LDL 和荆豆凝集素, 可见红色颗粒状及绿色荧光均匀分布于胞浆中。叠加结果显示, 90% 以上的细胞均为红绿双染阳性、融合成橙色, 说明该细胞可以同时吞噬 Dil ac LDL 并结合 UEA Ⅰ, 符合内皮祖细胞的特征, 第 2 次贴壁的晚期 EPC 免疫荧光结果与第 1 次贴壁的结果类似。

目前分离纯化 EPC 主要有密度梯度离心法、分层黏附法、磁珠分选法等。密度梯度离心法只能获得单个核细胞, 且 EPC 纯度不高; 分层黏附法根据各种细胞接种后黏附的时间差异, 于全骨髓接种后 24 h 或 48 h 内, 将上层悬浮细胞接种继续培养得到目的细胞, 因实验条件、操作方法、操作人员差异而不太稳定, 所得到的细胞纯度也不高; 磁珠分选法是通过包裹 EPC 特异性标记物的磁头筛选细胞, 后来一些研究采用不同的抗体磁珠, 从单个核细胞中, 利用免疫磁珠结合流式细胞术分选的方法得到 EPC^[6,8], 这种方法分离的 EPC 纯度相对前两种方法有所提高, 但细胞流失的较多, 且价格昂贵、操作步骤繁琐, 根据我们以往的经验, 在操作熟练的情况下整个流程需约 8 h, 50 mL 脐带血大约只能分离出 $10^4 \sim 10^5$ 个 EPC。

本研究将 Ficoll 密度梯度离心法分离得到的全部单个核细胞, 接种于包被纤连蛋白的培养皿中, 利用选择性 M199 培养基有效地扩增 EPC, 再结合 EPC 贴壁晚的特点, 将分离得到的单个核细胞的再次贴壁, 这样所获得的细胞纯度高、克隆能力强, 而且能极大地节省实验经费。同时, 我们实验组

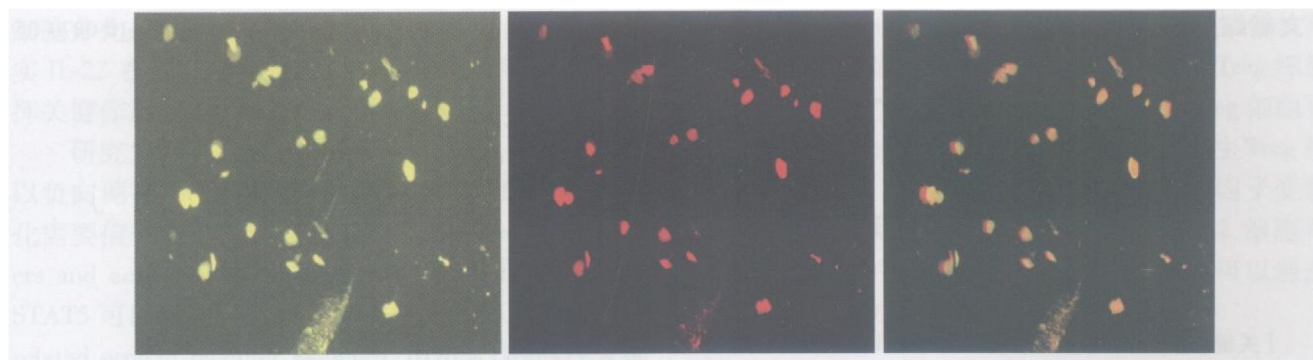


图 7. 免疫荧光鉴定 EPC(200 ×)

Figure 7. EPC function detected by immunofluorescence

用价格便宜的明胶替代昂贵的进口纤连蛋白包被培养瓶,取得了同样的促进祖细胞贴壁的效果。在整个实验中,除了 VEGF 这个能诱导干细胞向内皮祖细胞分化的必须因子之外,其他如碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)等昂贵的因子,均被省略,而是采用半量换液的方式换液培养,因为在细胞培养过程中,细胞本身就会分泌一些因子来促进细胞的生长。经密度梯度离心,骨髓细胞由下往上分别为:红细胞、分离液、单个核细胞和血清层,吸取中间的云雾状的单个核细胞层,在 0.1% 明胶包被 2 h 以上的培养瓶中培养 48 h 后,吸取所有的悬浮细胞重新贴壁于另一明胶包被的培养瓶中继续培养。实验结果显示,第 2 次贴壁得到的晚期 EPC 具有更强的增殖和生长能力,且以这种方式分离培养的祖细胞纯度高,达到 78.26%,费用低,操作简单。

关于 EPC 表面标志目前尚存在争议,但较为公认的观点是 EPC 被定义为 CD133⁺、CD34⁺、VEGFR 2⁺ 的细胞^[9]。免疫细胞化学结果显示, EPC 在分化过程中明显失去 CD133⁺,而内皮祖细胞和内皮细胞共有的 CD34⁺表达有所升高,提示 EPC 随着传代的增多,逐渐分化为成熟内皮细胞,我们的实验发现晚期 EPC 分化为成熟内皮细胞前可连续传至 10 代以上。

本研究以富含干细胞的骨髓作为细胞来源,将密度梯度离心法与差速贴壁法融合一体,不仅最大限度地获得了单个核细胞,而且经过 2 次贴壁后所获得的 EPC 数量多、纯度高、操作简单、可重复性高,大幅度减少了经费开支,为血管组织工程血管化和血管再狭窄干细胞治疗的内皮种子细胞获得提供了一个可行性途径。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275 (5302): 964-967.
- [2] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. Bone marrow derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse[J]. Circ Res, 2002, 90 (3): 284-288.
- [3] Takashi U, Yukihito H. Endothelial progenitor cells: Therapeutic target for cardiovascular diseases[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 108: 1-6.
- [4] Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors[J]. Gene Ther, 2002, 9 (10): 631-641.
- [5] Yoon CH, Hur J, Park KW, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25 (11): 2168-2175.
- [6] Philippe Foubert, Jean Sebastien Silvestre, Boussad Souttou, et al. PSGL-1 mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells[J]. J Clin Invest, 2007, 117: 1527-1537.
- [7] Case J, Mead LE, Bessie WK, et al. Human CD34⁺ CD133⁺ VEGFR 2⁺ cells are not endothelial progenitor cells but distinct primitive hematopoietic progenitors[J]. Exp Hematol, 2007, 35: 1109-1118.
- [8] Christian Werner, Michael Bohm, Erik B, et al. Role of integrin-linked kinase for functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377: 331-336.
- [9] Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28 (9): 1584-1595.

(此文编辑 曾学清)