

· 论 著 ·

大鼠脾脏内皮祖细胞的分离培养及鉴定*

邓梦杨¹, 陶剑群¹, 朱晋坤¹, 王 航¹, 赵晓辉¹, 崔 斌¹, 尹扬光^{2△}, 黄 岚¹

(第三军医大学新桥医院: 1. 心内科; 2. 急诊科, 重庆 400037)

摘要:目的 研究大鼠脾脏内皮祖细胞(EPC)的体外分离、定向培养及鉴定方法。方法 用密度梯度离心法获取大鼠脾脏中单个核细胞,用含血管内皮生长因子的 DMEM 培养液培养,每 4 天更换培养基去除非贴壁细胞,观察经过不同时间培养后的细胞形态、结构和功能变化。结果 培养 4 d 可发现梭形贴壁细胞,7 d 后细胞呈集落状,14 d 左右可观察到条索状、网状血管样结构,原代细胞培养 21 d 左右接近融合并呈典型的鹅卵石样排列。细胞免疫组化显示,培养 7 d 细胞 CD31 表达阳性,细胞 DiI-LDL 摄取和 FITC-Lectin 结合双阳性,流式细胞仪检测细胞 CD133 及 VEGFR2 的阳性率分别为(53.2±3.5)%和(64.5±5.1)%。结论 密度梯度离心法联合贴壁筛选及血管内皮生长因子诱导分化可以获得大鼠脾脏 EPC。

关键词:大鼠;脾脏;细胞培养;内皮祖细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.24.002

中图分类号:Q813.11;R322.21

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)24-3307-02

Culture of rat endothelial progenitor cells derived from spleen*

DEN Mong-yang, TAO Jian-qun, ZHU Jing-kun, et al.

(1. Department of Cardiology; 2. Department of Emergency Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To culture endothelial progenitor cells(EPC)from rat spleen in vitro. **Methods** Rat spleen cell suspension was prepared by gradient centrifugation of Ficoll and mononuclear cells in the middle layer were collected and then put into DMEM culture medium containing VEGF. The non-adhere cells were excluded every four days by changing the medium, and the morphology, structure and function of the cells were studied. **Results** The spindle cells were found on the fourth day. On the seventh day, the cluster of cells appeared. The network structure, which was similar with blood vessel, was found 7 days later. The cells looked like "cobblestone" on the 21st day. Immunological cells staining with CD31 was positive. EPC were characterized as adherent cells, double positive for DiI-LDL up take and Lectin binding by direct fluorescent staining. Respectively, the cells were both positive for CD133 and VEGFR2 identified by flow cytometry. **Conclusion** Density gradient centrifugation combined with adherence cells filtration is an effective way to obtain EPC derived from rat spleen.

Key words: rat; spleen; cell culture; endothelial progenitor cells

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是一种能增殖、分化为内皮细胞的血管前体细胞。近来研究证实, EPC 不仅参与缺血心肌、骨骼肌、脑组织的微血管新生,在缺血组织的侧支循环形成过程中发挥重要作用^[1-2];而且还参与损伤血管的内皮修复,抑制平滑肌细胞的过度增殖,在损伤血管的再内皮化过程中发挥重要作用。骨髓、脐血、外周血及脾脏中均含有 EPC^[3-5],但对脾脏 EPC 研究较少。目前报道获取 EPC 的方法各异,特别是不同动物种类之间,而且获得的 EPC 数量及质量亦有较大差别^[6-7]。本研究拟通过对脾脏单个核细胞分离、培养及鉴定,探讨大鼠脾脏来源 EPC 体外定向分化、扩增方法。

1 材料与方法

1.1 材料 100~150 g 雄性 SD 大鼠(第三军医大学大坪医院动物实验中心),DMEM 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(天津 TBD 公司),大鼠 Percoll 液(Amersham bioscience 公司),胰蛋白酶(Sigma 公司),DiI-乙酰化低密度脂蛋白[acLDL, Molecular probe 公司],FITC 标记的凝集素 I(FITC-Lectin, Sigma),兔抗大鼠 CD31 抗体(北京中杉生物技术有限公司),抗大鼠 FITC-CD133(Parmingen)、抗大鼠 PE-VEGFR2

抗体(Santa Cruz),激光共聚焦荧光显微镜(Leica),流式细胞仪(Becton Dickinson)。

1.2 方法 脱臼处死大鼠,无菌条件下取大鼠脾脏,研磨后与 DMEM 以 1:2 体积稀释,将大鼠 Percoll 液加入无菌离心管,再将研磨后的稀释液沿管壁缓慢平铺于 Percoll 液面之上,二者体积比为 5:3,4℃、2 000 r/min 离心 20 min。离心后管内液体分为 3 层,吸取中间白雾状细胞层即单个核细胞,再用 DMEM 反复洗涤 3 次。以 $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 密度接种于 1 mg/L 纤维连接蛋白包被 24 孔板,再加入含青霉素 100 u/mL、链霉素 100 μg/mL、VEGF 50 ng/mL(Pepro Tech 公司)、20% 优质胎牛血清(Hyclone 公司)的 DMEM 培养液 1 mL 于培养箱 37℃、饱和湿度、50 mL/L CO₂ 培养,每 4 天换液,观察细胞贴壁、生长及增殖情况^[8-9]。

1.3 EPC 鉴定 于细胞培养的 1、4、7、14、21 d 用倒置相差显微镜观察大鼠脾脏 EPC 的生长增殖情况及形态特征,并拍照。细胞爬片后用 PBS 浸洗,4℃、4% 多聚甲醛固定,5 g/L Triton ×100 常温孵育 20 min,30 mL/L H₂O₂ 孵育 15 min,加入

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30900620);贵州省自然科学基金资助项目[黔科合 SY 字[2009]3100]。△ 通讯作者,E-mail: yyg751206@163.com。

CD31 抗体 4 °C 过夜, PBS 清洗 2 次, 再加山羊抗兔 IgG 抗体 37 °C 孵育 1 h, DAB 显色后显微镜下观察。培养 7 d 的脾脏单个核细胞与 2.4 μg/mL DiI-acLDL (Molecular Probe 公司) 37 °C 下孵育 1 h, 以检测 EPC 对 acLDL 的摄取。然后用 2% 多聚甲醛固定细胞 10 min。固定后用 PBS 液浸洗, 再将 10 μg/mL FITC-Lectin (Vector 公司) 加于上述标本 37 °C 下孵育 1 h。激光共聚焦荧光显微镜鉴定 DiI-acLDL 和 FITC-Lectin 染色双阳性细胞为正在分化的内皮祖细胞^[10]。大鼠脾脏单个核细胞培养 7 d 后的梭形贴壁细胞经 0.1% 胰酶、1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化后, 约 10⁶ 个细胞重悬于 EP 管中, 加入抗大鼠 FITC-CD133 和抗大鼠 PE-VEGFR2 抗体各 10 μL, 阴性对照管加入 FITC 标记的同型大鼠 IgG 抗体 10 μL, 4 °C 避光孵育 30 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用流式细胞检测缓冲液洗涤 2 次, 以 10 g/L 多聚甲醛重悬, 以 488 nm 氩离子激光激发, 流式细胞仪检测, CellQuest 软件分析双色荧光标记阳性细胞所占比例, 以测定管所测定的荧光标记细胞比例减去同型对照管所测定的荧光标记细胞比例 (即非特异性的背景染色), 作为实际荧光标记阳性细胞比例, 其值以百分比表示^[11]。

2 结 果

2.1 EPC 生长和形态学特征 细胞培养 1 d, 相差显微镜下可见单个核细胞呈圆形, 胞体透亮, 折光性好, 散在分布于培养液中, 部分细胞贴壁; 培养 4 d 可以观察到细胞数明显增多, 绝大多数细胞贴壁生长, 贴壁细胞增大并伸展呈椭圆形、短梭形, 有少量细胞突起 (封 2 图 1A); 培养 7 d, 贴壁细胞大部分呈长梭形或小杆状, 细胞数较前明显增多, 簇状生长, 有一定方向性, 形成细胞团 (封 2 图 1B); 培养 14 d 可看到细胞首尾相连形成索状或网状血管样结构 (封 2 图 1C); 培养 21 d, 细胞相互融合呈铺路石状 (封 2 图 1D)。

2.2 EPC 标志物表达和表形特征 免疫细胞化学染色显示, 培养 7 d 的贴壁细胞 CD31 表达阳性, 阳性细胞呈棕褐色染色, 阴性对照未见染色 (封 2 图 2A)。流式细胞仪检测显示培养 7 d 的贴壁细胞 CD133 及 VEGFR2 的阳性率分别为 (53.2 ± 3.5)% 和 (64.5 ± 5.1)%。激光共聚焦荧光显微镜下观察显示绿色荧光者为 FITC-Lectin 阳性, 显示红色荧光者为 DiI-acLDL 阳性, 显示黄色荧光者为 DiI-acLDL 和 FITC-Lectin 双染色阳性细胞, 为正在分化的 EPC (封 2 图 2B)。

3 讨 论

EPC 是内皮细胞的前体细胞, 同时表达 CD31、vWF 和 VEGFR2 等内皮细胞特异性标志物及 CD34、CD133 和 Sca-1 等干细胞特异性抗原。外周血中 EPC 在缺血或血管内皮生长因子刺激下, 可以分化为成熟的内皮细胞, 参与血管内皮修复, 促进血管新生^[1-3]。然而, 外周血中 EPC 数量较少, 不能满足血管修复和再生治疗及科学研究之用^[12-13]。目前国内外有关 EPC 体外培养扩增的实验较多集中在骨髓及外周血方面^[14]。对大鼠而言, 骨髓穿刺十分困难, 培养骨髓源性 EPC 须处死动物, 取四肢骨髓进行分离培养, 最大的缺点是不能进行自体移植研究^[9]。大鼠的外周血容量甚少, 通常情况下不足以用来分离培养 EPC。除骨髓和外周血外, 脾脏也是 EPC 的来源之一, 而有关大鼠脾脏 EPC 分离、培养的研究较少, 限制了其进一步应用。切除脾脏来获取 EPC 较外周血途径创伤大, 但却可以保持大鼠存活, 可以进行自体 EPC 移植研究。

目前常用的分离 EPC 的方法有两种, 一种是免疫磁珠分离法, 另一种是密度梯度离心联合贴壁培养法。免疫磁珠分离

法操作复杂, 价格昂贵, 国内外仅少数实验室采用此方法分离获取 EPC。目前大多数实验室采用密度梯度离心联合贴壁培养的方法来分离、获得 EPC。本研究采用密度梯度离心联合贴壁培养的方法成功完成了大鼠脾脏 EPC 的体外分离、培养, 通过细胞形态学观察、免疫组化方法及流式细胞仪鉴定获得的细胞为 EPC。本研究采用纤维连接蛋白包被促进培养细胞贴壁, 添加 VEGF 促进培养细胞向 EPC 定向分化及促进培养细胞增殖。大鼠脾脏来源的圆形单个核细胞随时间的变化逐渐具备内皮细胞形态学特点, 培养 15~20 d 细胞单层贴壁生长并相互融合, 形成鹅卵石样的外观, 显示其增殖能力明显较成熟内皮细胞强。免疫化学染色 CD31 阳性表示其正逐渐向内皮细胞分化, DiI-acLDL 摄取和 FITC-Lectin 结合能力证实培养细胞为正在分化的 EPC^[8]。CD133 抗原分布于干/祖细胞表面, 为干/祖细胞特异性抗原, 而 VEGFR2 则为内皮细胞特异性抗原, 体现了细胞的内皮分化特性^[15-16]。本实验采用流式细胞仪分析细胞表面 CD133 及 VEGFR2 的表达, 发现培养细胞高表达 CD133 和 VEGFR2, 证实其为具有干/祖细胞特征的内皮细胞, 即 EPC。

本研究结果显示, 采用密度梯度离心联合贴壁培养法, 培养基中添加 VEGF 诱导定向分化, 可成功分离、培养大鼠脾源性 EPC, 为进行大鼠自体 EPC 移植研究提供充足的移植细胞。

参考文献:

- [1] Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells[J]. *Blood*, 2000, 95(10): 3106.
- [2] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3422.
- [3] Bouvard C, Gafsou B, Dizier B, et al. alpha6-integrin subunit plays a major role in the proangiogenic properties of endothelial progenitor cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(8): 1569.
- [4] Kebir A, Harhour K, Guillet B, et al. CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo[J]. *Circ Res*, 2010, 107(1): 66.
- [5] Huang PH, Chen YH, Wang CH, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(8): 1179.
- [6] Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation[J]. *Microvasc Res*, 2010, 79(3): 200.
- [7] Zhao X, Wu N, Huang L. Endothelial progenitor cells and spleen: new insights in regeneration medicine[J]. *Cytherapy*, 2010, 12(1): 7.
- [8] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. *Circ Res*, 2003, 93: e17.
- [9] 徐盛开, 江洪, 陈思思, 等. 大鼠骨髓源 (下转第 3311 页)

化所必需的黏附蛋白^[3-5]。HSCT 是血液病患者和肿瘤患者常用的治疗方法,从形态上观察骨髓红系造血岛的重建或增加是 HSCT 成功的常用标准^[12]。然而,形态学判断造血情况具有一定的主观性。本研究检测 46 例进行 HSCT 患者移植前、后骨髓中 EMP 在核酸和蛋白水平表达的变化,结合骨髓涂片的形态特征,研究 EMP 表达与骨髓造血功能之间的关系。

所有实验组中,HSCT 前组 EMP mRNA 表达最低,EMP/ β -actin 平均灰度值为 0.28 ± 0.04 ,骨髓涂片显示骨髓增生低下或极度低下,造血岛数量最少,平均造血岛数为 (3.2 ± 1.4) 个;HSCT 后 30、90、180 d 组和正常对照组 EMP/ β -actin 平均灰度值分别为 1.32 ± 0.07 、 1.27 ± 0.06 、 1.21 ± 0.06 和 0.31 ± 0.05 ,均显示骨髓增生活跃(表 1)。与 HSCT 前组和正常对照组相比,HSCT 后 30、90、180 d 组 EMP mRNA 表达水平和造血岛数量均明显增高($P < 0.05$),3 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。RT-PCR 产物序列经测序证实与 NM-001017405 同源,即人类幼红巨噬细胞黏附蛋白 mRNA 序列。虽然所有实验组均可检测到 EMP mRNA 表达,但只在 HSCT 后 30、90、180 d 组中检测到 EMP 蛋白表达,且这 3 组之间核酸和蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。正常对照组和 HSCT 前组未检测到 EMP 蛋白,可能与这两组造血岛数量和检测方法的灵敏度有关,只有当造血岛达到一定数量才能用 Western blot 方法检测到 EMP 蛋白。HSCT 1 年后 8 位随访者骨髓造血岛数量有所减少,用相同方法检测不到 EMP 蛋白。以上结果表明,随着骨髓造血岛数量增加,EMP mRNA 表达也有所增加,EMP 蛋白为阳性时,其 EMP mRNA 的表达水平明显高于 EMP 蛋白呈阴性的标本,此结果尚需进一步证实。

总之,本研究在临床上证实了 EMP 的表达与骨髓造血岛的形成有密切的关系,对评估骨髓造血功能有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Hanspal M, Hanspal JS. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: A 30 kD heparin-binding protein is involved in this contact[J]. *Blood*, 1994, 84(15): 3494.
- [2] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京:科

学出版社,1998:33.

- [3] Hanspal M, Smockova Y, Uong Q. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages [J]. *Blood*, 1998, 92(8): 2940.
- [4] Hanspal M. Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis [J]. *Curr Opin Hematol*, 1997, 4: 142.
- [5] Chasis JA. Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis [J]. *Curr Opin Hematol*, 2006, 13: 137.
- [6] Nemer P, Gane Y, Colin, et al. The Lutheran blood group glycoproteins, the erythroid receptors for laminin, are adhesion molecules [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 16686.
- [7] Southcott M, Tanner M, Anstee D. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system [J]. *Blood*, 1999, 93: 4425.
- [8] Hanspal M. Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis [J]. *Curr Opin Hematol*, 1997, 4: 142.
- [9] Parsons SF, Spring FA, Chasis JA, et al. Erythroid cell adhesion molecules Lutheran and LW in health and disease [J]. *Bailliere Clin Hematol*, 1999, 12: 729.
- [10] Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen-4 Vascular cell adhesion molecule-1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands [J]. *J Exp Med* 1995, 181: 411.
- [11] Mankelov TJ, Spring FA, Parsons SF, et al. Identification of critical amino-acid residues on the erythroid intercellular adhesion molecule-4 (ICAM-4) mediating adhesion to alpha integrins [J]. *Blood*, 2004, 103: 1503.
- [12] Cutler C, Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(2): 108.

(收稿日期:2010-06-18 修回日期:2010-07-22)

(上接第 3308 页)

- 内皮祖细胞分离和培养 [J]. 郧阳医学院学报, 2009, 28(5): 448.
- [10] 陈剑飞, 黄岚, 宋明宝, 等. 高敏 C 反应蛋白对骨髓内皮祖细胞的黏附和增殖抑制作用 [J]. 重庆医学, 2008, 37(22): 2559.
- [11] 姜靖, 黄岚, 赵晓辉, 等. Klotho 水平与小鼠月龄相关并抑制其骨髓源性内皮祖细胞衰老 [J]. 重庆医学, 2009, 38(24): 3111.
- [12] Allegra A, Coppolino G, Bolignano D, et al. Endothelial progenitor cells: pathogenetic role and therapeutic perspectives [J]. *J Nephrol*, 2009, 22(4): 463.
- [13] Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endotheli-

al progenitor cells [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(8): 890.

- [14] Müller P, Kazakov A, Jagoda P, et al. ACE inhibition promotes upregulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis in cardiac pressure overload [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 106.
- [15] Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(9): 1584.
- [16] Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(3): 413.

(收稿日期:2010-08-02 修回日期:2010-08-19)