

· 论 著 ·

兔骨髓来源内皮祖细胞分离培养及鉴定*

张玉龙, 方靖琴, 张伟国[△], 陈金华

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所放射科, 重庆 400042)

摘要:目的 研究新西兰大白兔骨髓来源内皮祖细胞(EPC)的分离培养和鉴定方法,证实骨髓是获得内皮祖细胞的理想来源之一,为后续研究提供材料准备。方法 取兔骨髓,密度梯度离心法分离单个核细胞(MNC),置于 DMEM-L 培养基中培养,动态观察细胞生长过程,采用免疫荧光染色和细胞荧光化学法鉴定培养的细胞。结果 培养 10 d 的 EPC 能吞噬 ac-LDL 并与凝集素 UEA-1 相结合,同时表达 CD34 和 CD31 相关抗原。结论 密度梯度离心法从兔骨髓中分离的 MNC 在一定条件下,能够分化为具有内皮祖细胞特征的细胞,为后续的实验研究提供了细胞来源。

关键词:骨髓;内皮祖细胞;分离培养

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.10.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)10-0952-02

Isolation, cultivation and identification of endothelial progenitor cells from rabbit bone marrow*

Zhang Yulong, Fang Jingqin, Zhang Weiguo[△], Chen Jinhua

(Department of Radiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate how to isolate, culture and identify the endothelial progenitor cells from rabbit bone marrow in order to get ready for subsequent experiments. Methods EPCs were obtained from in vitro culture of MNCs which were isolated with density gradient centrifugation from rabbit bone marrow. Process of cell growth was observed. Cultivated cells were identified by immunofluorescence and cell chemical fluorescence detection. Results After 10 days cultured, EPCs were double positive for Dil-acLDL uptaking and FITC-UEA-1 binding and expressing CD34 and CD31 related antigen. Conclusion The mononuclear cells isolated from rabbit bone marrow by gradient centrifugation can be induced into endothelial progenitor cells in vitro. The system of cell culture can be applied to subsequent experiments in cell transplantation.

Key words: bone marrow; endothelial progenitor cells; cell isolation

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)自发现以来一直是干细胞研究的热点之一, EPC 是血管内皮细胞的前体细胞,是干细胞分化成熟过程中的一个阶段。已有研究表明, EPC 可以从成体的骨髓和外周血中分离获取。目前,从兔骨髓中分离 EPC 的研究少见报道,本研究通过从兔骨髓中分离 EPC,并对培养的细胞进行鉴定,证实骨髓可作为获取 EPC 的途径,并为后续的研究提供细胞来源。

1 材料与与方法

1.1 材料 选取 1 个月左右的新西兰幼兔,体质量 600~700 g,第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,人纤维连接蛋白(美国 R&D 公司),兔淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品公司生产),胎牛血清(美国 HyClone 公司),DMEM 培养基、DMEM/F₁₂ 培养基(美国 Gibco 公司),DiI-乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acetylated low-density lipoprotein, DiI-acLDL, 美国 Invitrogen 公司),FITC-UEA-1(美国 Sigma 公司),抗兔 FITC-CD34 抗体(美国 Chemcon 公司),抗兔 PE-CD31(美国 BD 公司),DPBS(美国 HyClone 公司)。

1.2 方法

1.2.1 EPC 的分离和培养 取 30 d 左右的幼兔 2 只,脱颈处死后,无菌环境下分离兔下肢,剔除肌肉组织,剪开长骨两端,用 10 mL 注射器吸取含肝素的 DPBS 液反复冲洗骨髓腔,将冲出的骨髓吹打均匀;每管加入 5 mL 兔淋巴细胞分离液,上加 10 mL 的骨髓,注意保持二者界面清晰;将离心管置于水平离心机,以 2 000 r/min 离心 20 min 后,可见离心管中下端白膜

层即单个核细胞层,提取白膜层置于另一离心管中;以 1 500 r/min 离心 10 min,可见细胞沉于管底,弃上清液,加入适量 DPBS 液吹打混匀,制成细胞悬液,再以 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入适量的 DMEM 培养基,吹打混匀,制成细胞悬液,再接种于铺有人纤维连接蛋白的 25 cm² 培养瓶,置于 CO₂ 孵箱中培养。培养 3 d 后,半量换液继续培养,以后每隔 3 d 全量换液,倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.2.2 EPC 鉴定 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1 双荧光染色鉴定:贴壁细胞与 DiI-acLDL(2.4 mg/mL)37 °C 孵育 1 h 以检测 EPCs 对乙酰化低密度脂蛋白的摄取。然后,多聚甲醛 4 °C 固定细胞 10 min,DPBS 液冲洗 2~3 次,将 FITC-UEA-1(10 mg/L)滴加于染色标本 37 °C 孵育 1 h。倒置荧光显微镜下观察并照片,激光共聚焦显微镜(LSCM)鉴定 FITC-UEA-1 和 DiI-acLDL 染色双阳性细胞为正在分化的 EPCs。CD34、CD31 表达的免疫荧光染色:细胞培养约 10 d 后,4%多聚甲醛固定 20 min, PBS 液洗去多余固定液,分别加入 10 μL 抗兔 FITC-CD34 和 PE-CD31(0.2 mg/mL)湿盒避光孵育 2 h,以 PBS 作为空白对照。PBS 和三蒸水洗去多余抗体,60%缓冲甘油封片后置于激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 细胞形态观察 新分离的单核细胞呈小圆形(封 2 图 1A)。培养 7 d 后,细胞开始增殖,细胞成圆形,出现梭形细胞(封 2 图 1B)。培养 14 d 后,细胞出现典型的“管腔”结构(封 2 图 1C)。

* 基金项目:第三军医大学大坪医院国家重点实验室开放基金(SKLF200922)。△ 通讯作者, Tel:(023)68757621; E-mail: wguo.zhang@gmail.com。

2.2 EPC 的细胞荧光染色鉴定 用 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1 对细胞进行染色后,采用荧光显微镜和激光共聚焦鉴定,红色荧光的细胞为 DiI-acLDL 摄取阳性(封 3 图 2A)。绿色荧光的细胞为 FITC-UEA-1 摄取阳性(封 3 图 2B)。而共聚焦下双阳性细胞为同时摄取 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1 被认为是正在分化的 EPCs(封 3 图 2C)。

2.3 CD34 及 CD31 表达的免疫荧光染色检测 免疫荧光染色显示,培养第 10 天的细胞 CD34 及 CD31 均成阳性反应(封 3 图 3A、B)。

3 讨论

自从 Ashara 等^[1]1997 年从外周血分离培养出 EPC 以来,EPC 的研究一直是干细胞领域的热点之一。目前的研究表明,EPC 参与了出生后的血管生成^[2],能在病理条件下替代修复损伤的内皮细胞,促进缺血组织的新生,维持血管内环境的稳定及内皮的完整性^[3-4]。EPC 的鉴定是根据其细胞表面标记来实现的,目前公认的把同时具有 CD34、AC133、VEGFR-2 表面标志,且可吸收 DiI-acLDL 结合 FITC-UEA-1 的 EPC 认为是正在分化的 EPC^[5]。

EPC 的分离方法主要有:(1)免疫磁珠法,利用 CD34、VEGFR-2 或 CD133 表面抗原从不同来源的单个核细胞分离 EPC^[6]。(2)密度梯度离心法,根据血液细胞成分比重的不同,利用淋巴细胞分离液提取单个核细胞进行贴壁培养。考虑到免疫磁珠法操作复杂、费用高、反复操作还会降低细胞活性,本研究采用密度梯度离心法分离 EPC,并预涂纤维连接蛋白促使细胞贴壁并向内皮细胞分化,在这种培养体系环境中,将单个核细胞接种于完全培养液后,通过换液可将红细胞去除,从而得到较纯的 EPC。体外扩增培养法大多从外周血获取 EPC,这就要求有大量的外周血液,而骨髓作为一个巨大的干细胞库,其 EPC 含量远高于外周血^[7],为获得更高浓度的目标细胞,本文采用骨髓作为细胞来源。

EPC 不仅参与胚胎血管生成,也参与出生后的血管新生^[8],它可成功归巢到缺血组织,参与组织的修复^[9-11],提示 EPC 在缺血性疾病中有重要意义。对肿瘤新生血管的研究发现,EPC 是肿瘤新生血管生长必不可少的条件之一,EPC 不仅整合到新生血管壁上构成新生血管的一部分,而且还通过分泌促血管生长因子来促进新生血管成熟,增强新生血管的稳定性^[12-13]。EPC 对骨折新生血管的影响也可能存在类似过程,血管化是骨愈合过程中最基本的环节^[14]。Rozen 等^[15]发现自体移植的 EPC 能有效修复骨缺损,EPC 是否能促进骨折愈合,是下一步的研究内容。

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):964-966.
[2] Rumpold H, Wolf D, Koeck R, et al. Endothelial progeni-

tor cells: A source for therapeutic vasculogenesis[J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 4:509-518.

- [3] Rosenzweig A. Circulating endothelial progenitors cells as biomarkers[J]. *N Eng J Med*, 2005, 353:1055-1057.
[4] Yue KK, Lee KW, Chan KK, et al. Danshen prevents the occurrence of oxidative stress in the eye and aorta of diabetic rats without affecting the hyperglycemic state[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 106(1):136-141.
[5] Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(1):5210-5212.
[6] 吴英锋,谷涌泉,张建,等.犬骨髓源血管内皮祖细胞体外扩增效能的动态研究[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(10):63-65.
[7] Shirota T, Murohara T, Ikada H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation[J]. *Circulation*, 2001, 103:897-903.
[8] 王代红,李芙蓉,张莹,等.内皮祖细胞移植对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管毛细血管重建的影响[J]. *重庆医学*, 2009, 38(23):2994-2996.
[9] Hamada H, Kim MK, Iwakura A, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2006, 114(21):2261-2263.
[10] He T, Smith LA, Harrington S, et al. Transplantation of circulating endothelial progenitors cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries[J]. *Stroke*, 2004, 35(10):2378-2380.
[11] Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, et al. CD34⁺ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds[J]. *J Vasc Res*, 2003, 40:368-377.
[12] Gao DC, Nolan D, McDonnell K, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression [J]. *Biochimica et biophysica Acta*, 2009, 1796:33-40.
[13] Ahn JB, Rha SY, Shin SJ, et al. Circulating endothelial progenitor cells(EPC) for tumor vasculogenesis in gastric cancer patients[J]. *Cancer Letters*, 2010, 288:124-132.
[14] 吴雪晖,谢肇,罗飞,等. EPCs 促进血管化组织工程骨修复大段骨缺损的早期组织学评价[J]. *重庆医学*, 2009, 38(22):2839-2843.
[15] Rozen N, Bick T, Bajayo A, et al. Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells(EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects[J]. *Bone*, 2009, 45:918-924.

(收稿日期:2010-09-19 修回日期:2010-11-17)

(上接第 951 页)

[12] Onori P, Morini S, Franchitto A, et al. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats[J]. *J Hepatology*, 2000, 33:555-563.
[13] 李锐,华兴.声学造影剂肝静脉显影时间诊断早期肝硬化的实验研究[J]. *重庆医学*, 2004, 33(11):1684-1685.
[14] Hirota M, Kaneko T, Sugimoto H, et al. Intrahepatic cir-

culatory time analysis of an ultrasound contrast agent in liver cirrhosis[J]. *Liver Int*, 2005, 25(2):337-342.

- [15] Sugimoto H, Kaneko T, Hirota M, et al. Earlier hepatic vein transit-time measured by contrast ultrasonography reflects intrahepatic hemodynamic changes accompanying cirrhosis[J]. *J Hepatol*, 2002, 37(5):578-583.

(收稿日期:2010-11-24 修回日期:2011-01-17)