

· 论 著 ·

成体间充质干细胞内皮诱导方法的改进*

杨思远¹, 刘琳², 伍长学³, 胡选义^{1△}

(1. 贵阳医学院附属医院心脏外科, 贵州贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院呼吸内科, 贵州贵阳 550002; 3. 泸州医学院附属医院胸心外科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 对现有成体间充质干细胞(MSCs)内皮分化诱导方法进行改进,以期找到更方便、更价廉并具有优良诱导效果的诱导方法。方法 取生长良好的 P3 代 MSCs,分为 3 组。诱导 1 组:以含 10%胎牛血清(FCS)、10 μg/L 血管内皮生长因子(VEGF)、4 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的低糖 DMEM 培养基进行内皮诱导 14 d;诱导 2 组:以含 10%FCS、20 μg/L VEGF、4 μg/L bFGF 的低糖 DMEM 培养基进行内皮诱导 14 d;对照组:以含 10%FCS 低糖 DMEM 培养基培养 14 d,均于倒置相差显微镜下观察细胞形态及排列方式变化,免疫组化检测Ⅷ因子相关抗原表达,免疫荧光检测 CD31 表达,透射电子显微镜观察细胞内超微结构。结果 培养 14 d 后,诱导 1、2 组细胞均变为扁平状,呈“铺路石”样排列,Ⅷ因子相关抗原及 CD31 均高度表达,阳性率均大于 90%,透射电镜发现细胞内有 W-P 小体形成。而对照组细胞未发现此类改变。结论 联合使用低浓度 VEGF 及 bFGF 可使成体 MSCs 获得内皮系细胞的特征,是一种方便、价廉、有效的诱导方法。

关键词:间充质干细胞;内皮细胞;诱导分化;方法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.11.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)11-1049-03

A modified method of endothelial differentiation from adult mesenchymal stem cells*

Yang Siyuan¹, Liu Lin², Wu Changxue³, Hu Xuanyi^{1△}

(1. Department of Cardiac Surgery, the Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of Respiratory medicine, the People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang, 550002, China; 3. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To obtain a better, cheaper and more convenient method of endothelial differentiation from adult mesenchymal stem cells, improvement was carried out. **Methods** P3 MSCs were divided into 3 groups, study group 1, study group 2 and control group. In study group 1, DMEM culture medium including 10% FCS, 10 μg/L VEGF, 4 μg/L bFGF were applied to induce MSCs to endothelial cells for 14 days. 10% FCS, 20 μg/L VEGF, 4 μg/L bFGF were used in study group 2. DMEM culture medium were used for 14 days in control group. Changes of morphology and alignment of 2 groups were observed periodically, Ⅷ factor and CD31 were examined by immunohistochemistry and immunofluorescence respectively, and transmission electron microscope was applied to observe intracellular ultra microstructures of 2 groups. **Results** After 14 days inducement, the cells of study group turned into flat shape, and arranged in a “cobble stone” manner. Ⅷ factor and CD31 were both positive, the positive rates > 90%. And Weibel-Palade body were found in induced cells. **Conclusion** Adult MSCs can be induced to endothelial lineage cells by the way in vitro, which is effective, cheaper and more convenient.

Key words: mesenchymal stem cells; endothelial cells; induced differentiation; method

由干细胞介导的治疗性血管新生(therapeutic angiogenesis)已经成为临床上治疗缺血性心脏疾病新的方法,很多种类的胚胎干细胞及成体干细胞得到了广泛应用。其中成体间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)引起众多学者的关注,自 1966 年 MSCs 被发现以来^[1],多年研究表明其具有自我复制,多系分化,高度增殖潜力,可分化为骨、软骨、脂肪、韧带等多种间叶组织,进行相应组织修复^[2]。近来的研究进一步表明在血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF-1)等诱导因子存在的条件下,体外培养的 MSCs 也能被诱导成为内皮谱系细胞^[3]。因此, MSCs 势必在治疗性血管新生中扮演重要的角色。同时又因为 MSCs 具有便于获得、易于体外大量扩增、生物学性质保持稳定等特点,必将成为未来缺血

性心脏病细胞治疗和心血管组织工程的重要种子细胞之一。

将 MSCs 成功诱导成为内皮细胞,是临床医学、细胞生物学、组织工程学等相关领域研究的前提,而已有的诱导方法存在费用高昂、实验条件要求高、诱导效果不尽如人意等问题,难以满足科研及临床需要。所以,找到一种更低廉、更方便、更有效的内皮诱导方法,是科研人员迫切需要解决的问题。

1 材料与方法

1.1 材料 SD 大鼠(清洁级,由四川大学华西医学中心实验动物中心提供,雌性,体质量约 150 g)、胎牛血清(FCS, Gibco 公司)、低糖 DMEM 培养基(Gibco 公司)、重组 VEGF(R&D 公司)、bFGF(invitrogen 公司)、FITC 小鼠抗大鼠 CD31 单克隆抗体(Serotec 公司)、兔抗大鼠Ⅷ因子相关抗原(factor Ⅷ related antigen)多克隆抗体、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥公司)等。

1.2 骨髓 MSCs 的培养及其表面抗原检测 本研究采用梯度离心法加贴壁筛选法获取 MSCs。取 SD 大鼠,用颈椎脱臼法处死后,于无菌条件下分离股、胫骨,剪开骨端,暴露骨髓腔。用无血清低糖 DMEM 培养液冲出骨髓,离心后弃上清液,以无菌 PBS 液稀释。取离心管,分别加入等量 Percoll 分离液($\rho = 1.073 \text{ kg/L}$)和骨髓稀释液,3 000 r/min 离心 30 min,仔细吸取白色单核细胞层至另一离心管,以无菌 PBS 液洗涤 2 次后,用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的低糖 DMEM 培养基(pH=7.2~7.4)重悬,并调整细胞浓度至 $4 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 250 mL 培养瓶,放入 37 °C、5% CO_2 、饱和湿度孵箱静置培养。7 d 后全量换液,以后 3 d 换液 1 次。至 14~16 d 时,将融合生长约 80% 的细胞以 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化,按 1:3 比例传代。定期取生长状态细胞进行倒置相差显微镜观察。待生长约 80% 融合时可继续传代。并按照文献[4]的方法,进行 MSCs 的表面抗原检测。

1.3 MSCs 的内皮诱导分化 将生长状态良好的 P3 代大鼠 MSCs 以 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化后,按 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 120 mL 培养瓶中,并分为诱导 1 组、诱导 2 组及对照组。诱导 1 组换入含 10% FCS、10 $\mu\text{g/L}$ VEGF、4 $\mu\text{g/L}$ bFGF 的低糖 DMEM 培养基进行内皮诱导分化;诱导 2 组换入含 10% FCS、20 $\mu\text{g/L}$ VEGF、4 $\mu\text{g/L}$ bFGF 的低糖 DMEM 培养基进行内皮诱导分化;对照组换入含 10% FCS 低糖 DMEM 培养基。3 组均放入 37 °C、5% CO_2 、饱和湿度孵箱静置培养,2 d 换液 1 次,并定期于倒置相差显微镜下观察细胞生长状况及形态变化。

1.4 诱导后细胞的内皮特性鉴定 3 组细胞培养 14 d 后,均于倒置相差显微镜下观察细胞形态及排列方式变化;免疫组化检测 VIII 因子相关抗原表达情况;免疫荧光检测 CD31 表达情况,并计算各自表达阳性率;采用透射电镜观察细胞内超微结构。

2 结 果

2.1 大鼠 MSCs 形态学变化 原代培养 MSCs 3 d 后可见细胞贴壁,5 d 后出现细胞集落,细胞大小均一,呈长梭形或多角型;10 d 后细胞基本达到 90% 以上融合,紧密排列成栅栏状,栅栏中心呈多层分布,细胞界限欠清。传代后细胞生长速度明显加快,多于接种后 4~6 d 即长满瓶底。同时细胞体积增大,形态多表现为长梭形或多角形。细胞不再以集落方式生长,而是均匀分布。

2.2 各组细胞形态变化 诱导 1、2 组细胞于接种后 4 h 均开始贴壁生长,24 h 后大部分细胞贴壁、分散生长,呈现为类三角形或不规则长梭形,此后胞体逐渐开始扩展并伸出伪足。诱导 3~5 d 后,贴壁细胞形成细胞团,梭形细胞从细胞团的边缘出芽长出,细胞团中央为圆形细胞,形成“血岛”样结构(封 2 图 1)。诱导 14 d 后,两组细胞个体逐渐变大,细胞形态由长梭形变为扁平多角形,并呈“铺路石”样排列(封 2 图 2),具有典型内皮细胞形态。而对照组细胞一直为长梭形或多角形,并呈漩涡状排列。

2.3 各组细胞的内皮特性检测 诱导 1、2 组 VIII 因子相关抗原免疫组化检测为阳性,其表达阳性率大于 92%(封 2 图 3);CD31 免疫荧光检测为阳性,表达阳性率大于 95%(封 2 图 4);透射电镜发现细胞内有 Weibel-Palade 小体(W-P 小体)(封 2 图 5)。提示诱导组细胞获得了内皮系细胞特性。而对照组细

胞形态仍以长梭形为主,VIII 因子相关抗原及 CD31 检测为阴性;透射电镜未发现 W-P 小体(结果未显示)。

3 讨 论

本研究结果表明,联合使用不同浓度的 VEGF 及 bFGF 均能够在体外将来源于成年大鼠骨髓 MSCs 诱导为内皮谱系细胞。诱导后细胞大小均一,外型为扁平状,并呈“铺路石”样排列;表达 CD31、VIII 因子相关抗原等内皮细胞特异抗原;透射电子显微镜发现 W-P 小体。且低浓度 VEGF 及 bFGF 的诱导效果与高浓度 VEGF 及 bFGF 相比,并未显示出明显差异。

近年来采用连续基因表达分析(serial analysis of gene expression, SAGE)及 RT-PCR 技术已经证明单细胞克隆来源的 MSCs 能表达多种细胞系基因,其中包括内皮及表皮特异性分子^[5-6]。这些结果强烈提示中胚层来源的 MSCs 在体内外的分化潜能不仅仅局限于中胚层细胞系,还能跨胚层分化为其他细胞系。Silva 等^[7]将带有标记物的、体外分离培养的 MSCs 注射到慢性缺血动物模型体内,观察 30 d 后发现,缺血区域中毛细血管密度增加,且在增加的血管管壁中发现带标记物细胞,故认为植入的 MSCs 分化为内皮细胞(ECs),介导了缺血区域的血管新生。但这样的体内研究存在着植入细胞被血管壁局部炎细胞吞噬的可能,并不能很好地证明 MSCs 确实分化为 ECs。所以,越来越多的研究采用体外诱导方式。

MSCs 内皮分化的机制和诱导条件目前尚未得到彻底阐明。但大多数观点认为,其与 MSCs 所处微环境密切相关。所以在干细胞内皮分化的众多体外研究中,多种细胞因子被用来刺激细胞的增殖与分化,其中常用的有 VEGF、bFGF、IGF-1 等^[8-11]。VEGF 具有强烈的内皮诱导分化作用,单用高浓度(50 ng/mL)VEGF 诱导成人 MSCs 7 d 后,即发现细胞表达 vwF、KDR 及 FLT-1 等内皮特异性抗原,但并不表达 CD31;同时细胞形态无明显变化,仍多为长梭形或多角形,但诱导后细胞具有能在培养基中形成网状微血管结构的能力^[12]。作者在前期试验中采用 25 ng/mL VEGF 诱导 MSCs,约 10 d 后,发现诱导后细胞能表达 vwF,而细胞形态及排列方式未见明显改变,与文献报道一致。但该研究过程中 VEGF 消耗量巨大,实验花费高。这些缺点限制了单用 VEGF 诱导方法的广泛应用。为节约实验成本,作者继续在前期实验中逐步减少 VEGF 浓度,发现在较低 VEGF 浓度条件下,只需适当延长诱导时间,同样能够使诱导后细胞获得部分内皮特性,表达部分内皮特异性标志物。

而 bFGF 对血管内皮细胞、成纤维细胞、骨细胞、软骨细胞、肾上腺皮质和髓质细胞、神经元和神经胶质细胞等均具有很强的促细胞分裂增殖活性,并具有明显的促有丝分裂作用,也是形态发生和分化的诱导因子之一^[13]。故本研究在诱导方法上进行了改进并获得良好效果,尝试不同浓度 VEGF(10、20 $\mu\text{g/L}$)与 4 $\mu\text{g/L}$ bFGF 联合使用的诱导效果,结果发现经 14 d 诱导后,两种浓度 VEGF 均成功将 MSCs 诱导为内皮谱系,所得细胞具有典型 ECs 形态、排列方式及超微结构,并表达 CD31 及 VIII 因子相关抗原。经过具体实践,总结如下经验:(1)诱导因子的选择,将 VEGF 及 bFGF 联合使用,VEGF 及 bFGF 均对内皮系具有强大的促增殖功能,且二者联合使用具有协同效应^[14],其增殖效果大大加强。另外,分离纯化的骨髓 MSCs 不可避免地受到淋巴细胞、巨噬细胞等污染,联合使用 VEGF 及 bFGF 能促进内皮系细胞的生长和优化,使内皮系相

对于其他细胞具有生长优势,从而进一步得到富集^[15]。(2)诱导因子浓度的选取,根据作者前期研究结果及相关文献报道,将 VEGF 浓度调整到 10、20 $\mu\text{g/L}$,将 bFGF 浓度调整到 4 $\mu\text{g/L}$ (均较文献报道低),两种浓度均能获得满意的实验结果。较低的 VEGF 浓度可以大量减少贵重诱导因子的用量,从而节约研究成本。(3)诱导时间的确定,14 d 左右。一般来说,在诱导的第 10 天开始,个别细胞形态即开始改变,细胞数量不断增加,彼此接触形成小片细胞集落。到 14 d 时,诱导细胞获得很好的形态均一性。此后细胞形态变化不再明显。同时内皮特异性标志物检测也说明 14 d 时,诱导细胞已经获得内皮特性,继续诱导已无意义。本研究发现两种浓度诱导所得细胞形态均一,Ⅷ因子相关抗原及 CD31 阳性,其表达阳性率均大于 90%,说明通过联合使用较低浓度的 VEGF 及 bFGF 进行诱导,能获得纯度较高的内皮样细胞,具有较高的诱导效率。

在 MSCs 定向内皮分化过程的 3~5 d 中,诱导组细胞形成细胞团,梭形细胞从细胞团的边缘出芽长出,而细胞团中央为圆形细胞,构成了类似胚胎血管生成过程中“血岛样”结构^[16],而在对照组培养体系中未观察到该结构。这一发现提示在 VEGF 及 bFGF 存在的环境中,MSCs 启动了向 ECs 分化的过程,获得了内皮系细胞的某些生物学特性。另外,为最大限度避免培养体系中杂细胞所造成的检测误差,本研究在诱导 14 d 后同时检测两种内皮特异性标志物——Ⅷ因子相关抗原及 CD31,发现诱导组细胞均高度表达上述两种特异性标志物。而多个标记物的同时出现也是干细胞内皮分化中一个必然过程^[17],这也从另一角度证实了 MSCs 的内皮分化过程。本研究通过形态学、细胞免疫荧光、细胞免疫组化及透射电子显微镜等方法,证实经过诱导的细胞具有明显 ECs 特征。

参考文献:

- [1] Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1966, 16(3):381-390.
- [2] 刘永亮,叶钢,方针强,等.兔骨髓间充质干细胞培养与多向分化潜能鉴定的实验研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(8):842-843.
- [3] Chen MY, Lie PC, Li ZL, et al. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(5):629-640.
- [4] 杨思远,赁可,石应康,等.间充质干细胞定向诱导为内皮细胞的体外研究[J]. *贵阳医学院学报*, 2008, 33(5):449-452.
- [5] Tremain N, Korkko J, Ibberson D, et al. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(5):408-418.
- [6] Young JM, Myoung WL, Mal SY, et al. Expression profile of genes representing varied spectra of cell lineages in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells [J]. *Acta Haematol*, 2005, 114(2):117-120.
- [7] Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model [J]. *Circulation*, 2005, 111(2):150-156.
- [8] Sieveking DP, Ng MK. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench [J]. *Vas Med*, 2009, 14(2):153-166.
- [9] Neumüller J, Neumüller-Guber SE, Lipovac M, et al. Immunological and ultrastructural characterization of endothelial cell cultures differentiated from human cord blood derived endothelial progenitor cells [J]. *Histochem Cell Biol*, 2006, 126(6):649-664.
- [10] Petrini M, Pacini S, Trombi L, et al. Identification and purification of mesodermal progenitor cells from human adult bone marrow [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(6):857-866.
- [11] Jazayeri M, Allameh A, Soleimani M, et al. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(10):1183-1192.
- [12] 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.
- [13] Matus DQ, Thomsen GH, Martindale MQ. FGF signaling in gastrulation and neural development in *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian [J]. *Dev Genes Evol*, 2007, 217(2):137-148.
- [14] Mader JS, Smyth D, Marshall J, et al. Bovine lactoferricin inhibits basic fibroblast growth factor- and vascular endothelial growth factor165-induced angiogenesis by competing for heparin-like binding sites on endothelial cells [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(5):1753-1766.
- [15] Das H, Abdulhameed N, Joseph M, et al. Ex vivo nanofiber expansion and genetic modification of human cord blood-derived progenitor/stem cells enhances vasculogenesis [J]. *Cell Transplant*, 2009, 18(3):305-318.
- [16] Tsunoda T, Takashima Y, Tanaka Y, et al. Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32):14199-14204.
- [17] Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, et al. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+ VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages [J]. *Development*, 1998, 125(9):1747-1757.