

· 技术与方法 ·

提高培养内皮祖细胞成功率的探讨*

况春燕, 黄 岚[△], 喻 杨, 邓梦杨, 王 远, 钱德慧

(第三军医大学新桥医院全军心血管研究所, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨培养大鼠内皮祖细胞的最佳适宜条件。方法 通过密度梯度离心法分离培养来源于大鼠骨髓及脾脏的单核细胞, 观察在不同条件下[pH 值、二氧化碳(CO₂)浓度、血清浓度、取材大鼠月龄、内皮祖细胞来源]培养内皮祖细胞的成功率。结果 pH 7. 两组内皮祖细胞培养的成功率明显高于 pH 7. 4 组($P < 0.05$), 5. 5% CO₂ 浓度组内皮祖细胞培养的成功率明显高于 5. 0% CO₂ 浓度组($P < 0.05$), 1 月龄组内皮祖细胞培养的成功率明显高于 2 月龄组($P < 0.05$), 血清浓度及内皮祖细胞来源对细胞培养的成功率无明显影响($P > 0.05$)。结论 大鼠内皮祖细胞适宜在 pH 7. 2 的 DMEM-L 培养液及培养箱 CO₂ 浓度为 5. 5% 的环境下生长, 且年幼的大鼠取材培养的成功率高。

关键词: 细胞培养技术; 内皮祖细胞; 成功率

doi:10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2011. 32. 032

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)32-3291-03

The study of improving endothelial progenitor cells culturing*

Kuang Chunyan, Huang Lan[△], Yu Yang, Deng Mengyang, Wang Kui, Qian Dehui

(Cardiovascular Research Institute, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study an optimal culture condition for rat endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** Mononuclear cells from rat bone and spleen were isolated by density centrifugation and cultured in vitro. Successful rate for culturing EPCs was observed in a different condition, including CO₂ concentration of culture box(5%, 5. 5%), pH in DMEM-L medium(pH 7. 2, pH 7. 4), the serum concentrations of 10%, 20% in medium, one month and two month old rat and bone or spleen derived or bone + spleen derived-EPCs respectively. **Results** Our results showed that successful rate for culturing EPCs in 5. 5% CO₂ concentration of culture box group was higher than 5% CO₂ concentration of culture box group($P < 0.05$). In addition, the higher successful rate for culturing EPCs was also observed in pH 7. 2 of DMEM-L medium($P < 0.05$). At the same time, successful rate of one month old group was hither than two month old group($P < 0.05$). Interestingly, successful rate of different serum concentration group and different derived-EPCs group were not statistically significant($P > 0.05$). **Conclusion** It is an optimal culture condition of 5. 5% CO₂ concentration of culture box and pH 7. 2 of DMEM-L medium for EPCs culturing, and the younger rat, the more successful rate of EPCs culturing.

Key words: cell culture techniques; endothelial progenitor cells; successful rate.

内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞, 在 1997 年被 Asaha 等^[1]首次发现, 它能在各种细胞因子的诱导下, 从骨髓及外周血动员, 归巢到心肌缺血部位及损伤血管局部, 分化为内皮细胞, 促进新生血管的形成及损伤血管的再内皮化^[1-3]。此外, 研究还发现, 外周血内皮祖细胞的数量是心血管疾病的发病率、病死率以及动脉粥样硬化疾病进展独立的预测因素^[4-5]。目前, 内皮祖细胞已被认为是心血管系统的成员, 它与心血管疾病密切相关, 有广泛的临床应用前景^[6]。但由于内皮祖细胞的许多生理特征及影响其功能的机制仍不清楚, 限制其临床应用的进展。这就需要大量的细胞实验来探讨其生理学特性。但在内皮祖细胞培养的实验中, 至今没有一个统一的模式, 什么培养条件最适合内皮祖细胞生长, 目前未见这方面的报道。在作者的前期实验中发现, 内皮祖细胞与其他细胞, 例如平滑肌细胞、肿瘤细胞等相比, 培养的成功率不高。究其原因是没有掌握好最佳的培养条件。因此在本实验中, 给予不同的处理条件, 摸索最适合内皮祖细胞生长的培养环境, 提高培养的成功率。

1 材料与方法

1.1 试剂 DMEM-L 培养基购自 Gibco 公司, 优质胎牛血清购自 Hyclone 公司, 大鼠淋巴细胞分裂液购自中国医学科学院生物医学工程研究所。

1.2 实验动物 雄性 SD 大鼠, 月龄 1~2 月, 体质量 150~200 g, 由第三军医大学实验动物中心提供。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠骨髓源内皮祖细胞的分离培养 (1) 采用颈椎脱臼法处死雄性 SD 大鼠, 聚维酮碘消毒, 无菌条件下取大鼠双侧后肢(股骨、胫骨), 用 0.01 mol/L 磷酸二氢盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) 冲洗骨髓腔, 直到冲洗液清亮为止。(2) 100~200 目筛网过滤。(3) 用大鼠淋巴细胞分离液通过密度梯度离心法分离单个核细胞。(4) 用 0.01 mol/L PBS 液洗涤分离出的单核细胞 3 次, 以除去淋巴细胞分裂液。(5) 按 4×10^6 /mL 密度接种在培养瓶中, 加入含青霉素 100 μ /mL、链霉素 100 μ g/mL 的 DMEM-L 培养液(根据需要添加 10%~20% 胎牛血清, 同时将 pH 分别调为 7.2 及 7.4)。根据需要置于

5%或 5.5%二氧化碳(CO₂)、饱和湿度、37℃培养箱中培养。培养 48 h 后换液。以细胞贴壁生长判断为培养成功,成功率 = 培养成功次数/培养总次数。

1.3.2 大鼠脾源内皮祖细胞的分离培养 采用颈椎脱臼法处死雄性 SD 大鼠,聚维酮碘消毒,无菌条件下取大鼠脾脏,用眼科剪将其剪成碎块。之后用 100~200 目筛网过滤,以后步骤同骨髓源内皮祖细胞的分离培养步骤。

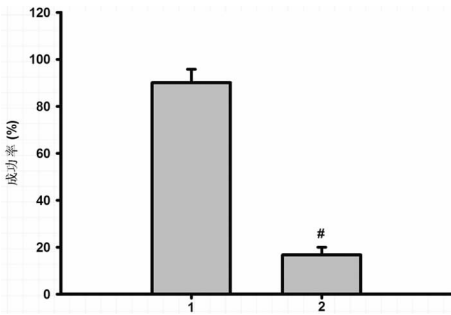
1.4 实验分组 (1)根据 DMEM-L 培养液 pH 值分为:pH 7.4 组及 pH 7. 两组,其他培养条件分别为 20% 胎牛血清、培养箱 CO₂ 浓度为 5%、取材于 2 月龄 SD 大鼠脾脏。(2)根据培养箱 CO₂ 浓度分为 5% CO₂ 浓度组及 5.5% CO₂ 浓度组,其他培养条件分别为 20% 胎牛血清、pH 7.4、取材于 2 月龄 SD 大鼠脾脏。(3)根据 DMEM-L 培养液血清浓度分为 10% 胎牛血清组及 20% 胎牛血清组,其他培养条件分别为 pH 7.4、培养箱 CO₂ 浓度为 5%、取材于 2 月龄 SD 大鼠脾脏。(4)根据大鼠月龄分为 1 月龄组及 2 月龄组,其他培养条件分别为 pH 7.4、培养箱 CO₂ 浓度为 5%、20% 胎牛血清,取材于脾脏。(5)根据内皮祖细胞来源分为骨髓源组、脾源组、骨髓加脾源组,其他培养条件分别为 pH 7.4、培养箱 CO₂ 浓度为 5%、20% 胎牛血清,2 月龄 SD 大鼠。

1.5 统计学处理 采用 SPSS10.0 进行统计学分析,多组间进行单因素的方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较用 Tukey's 方法进行,两个配对样本用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 内皮祖细胞的形态特征 刚贴壁的内皮祖细胞呈圆形、短梭形,随着时间延长呈长梭形、多边形,典型的呈克隆样生长,见封 3 图 1。

2.2 培养液 pH 值对培养内皮祖细胞成功率的影响 pH 7.2 组培养成功率为(90.00 ± 5.70)%,pH 7.4 组培养成功率为(16.67 ± 3.33)%,前者明显高于后者($P < 0.05$),见图 2。



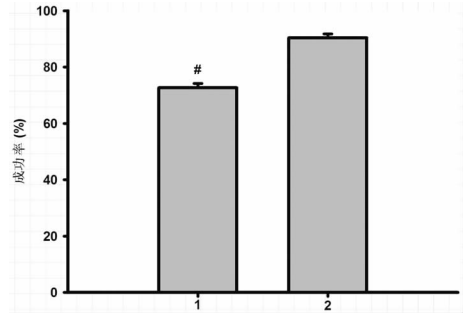
1:pH 7. 两组;2:pH 7.4 组。#: $P < 0.05$,与 pH 7. 两组相比。

图 2 培养液 pH 值对培养内皮祖细胞成功率的影响($n=3$)

2.3 CO₂ 浓度对内皮祖细胞培养成功率的影响 5% CO₂ 浓度组培养成功率为(72.67 ± 1.45)%,5.5% CO₂ 浓度组培养成功率为(90.33 ± 1.45)%,前者明显低于后者($P < 0.05$),见图 3。

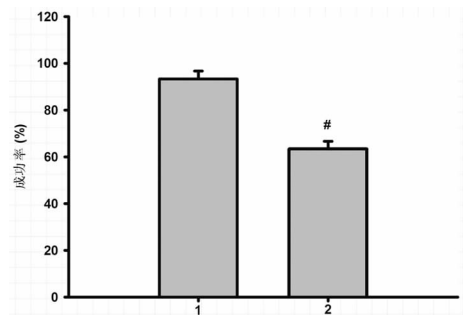
2.4 培养液血清浓度对内皮祖细胞培养成功率的影响 10% 胎牛血清组培养成功率为(86.67 ± 3.33)%,20% 胎牛血清组培养成功率为(92.33 ± 1.45)%,二者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 取材大鼠的月龄对内皮祖细胞培养成功率的影响 1 月龄组培养成功率为(93.33 ± 3.33)%,2 月龄组培养成功率为(63.33 ± 3.33)%,前者明显高于后者($P < 0.05$),见图 4。



1:5% CO₂ 浓度组;2:5.5% CO₂ 浓度组。#: $P < 0.05$,与 5.5% CO₂ 浓度组相比。

图 3 CO₂ 浓度对内皮祖细胞培养成功率的影响($n=3$)



1:1 月龄组;2:2 月龄组。#: $P < 0.05$,与 1 月龄组相比。

图 4 取材大鼠的月龄对内皮祖细胞培养成功率的影响($n=3$)

2.6 取材来源对内皮祖细胞培养成功率的影响 骨髓源组培养成功率(90.67 ± 2.33)%,脾源组为(89.67 ± 3.71)%,骨髓加脾源组为(90.33 ± 2.72)%,3 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

内皮祖细胞培养的方法很多,常用的有免疫磁珠分选法,此种方法培养的内皮祖细胞纯度较高,但价格昂贵,且对内皮祖细胞有一定的损伤,不适宜做大量的实验^[7]。另一种比较经济又方便的方法是密度梯度离心法,此种方法培养内皮祖细胞成本低,比较方便,受到广泛的应用^[8]。本实验采用此种方法比较合理。成功培养内皮祖细胞的培养液有多种,如 M199 培养基^[9]、EGM2 培养基及 DMEM-L 培养基^[8,10-11],而 DMEM-L 培养基相对便宜,因此作者选择 DMEM-L 培养基用于本实验,至于几种培养基培养成功率孰优孰劣,需要进一步研究。

体外细胞的培养除要求满足营养的需要外,培养环境还必须具备细胞生存的适宜条件,包括温度、pH 值等,CO₂ 为细胞生长所需要,并与维持培养基的 pH 值有关,各种细胞对 pH 的要求不尽相同,大多数细胞适宜在 pH 7.2~7.4 条件下生长^[12]。内皮祖细胞培养通常是在 5% CO₂ 浓度培养箱中培养^[8]。为了探讨内皮祖细胞培养最适合的 pH 值和 CO₂ 浓度,作者在不同的 pH 值和 CO₂ 浓度下培养内皮祖细胞,结果发现在培养液 pH 7.2 及培养箱 CO₂ 浓度在 5.5% 时,内皮祖细胞的贴壁成功率增高,由此说明内皮祖细胞适宜在 pH 7.2 及

培养箱 CO₂ 浓度在 5.5% 的条件中生长。文献报道用含 20% 胎牛血清的 DMEM-L 培养基可以成功分离培养内皮祖细胞^[13]。作者在实验中发现,用 20% 胎牛血清的 DMEM-L 培养基培养内皮祖细胞成本增高,为了解能否用低浓度的血清培养内皮祖细胞,作者用含 10% 胎牛血清的 DMEM-L 培养基培养内皮祖细胞,结果发现培养贴壁成功率与 20% 胎牛血清的 DMEM-L 培养基组明显,这与 Jianguo 等^[14]的研究一致。因此认为用含 10% 的胎牛血清的 DMEM-L 培养基既适合内皮祖细胞生长,又节约实验费用。培养内皮祖细胞常用的实验动物有猪、兔及大鼠,用大鼠作实验动物经济方便,常用幼年大鼠 1~2 月龄,为了明确大鼠年龄与培养内皮祖细胞成功率有无关系,作者分别观察了 1 月龄组及 2 月龄组内皮祖细胞培养的成功率,结果发现 1 月龄组大鼠成功率高于 2 月龄组,考虑这可能与年龄越小造血组织的活力越强,贴壁生长的成功率就越高有关。内皮祖细胞的取材来源多样,比如脐带血、外周血、肝脏、骨髓、脾脏等^[15-17],脐带血来源有限,外周血内皮祖细胞数量少,难满足实验要求,而大鼠骨髓、脾脏来源经济,内皮祖细胞的增殖分化能力强,能满足实验要求,为了评价来源于骨髓及脾的内皮祖细胞的贴壁成功率,作者分别培养来源于大鼠骨髓、脾脏及骨髓加脾脏的内皮祖细胞,结果发现单独来源于骨髓或脾脏以及二者混合培养的内皮祖细胞的成功率无明显差异。这为作者培养大鼠骨髓及脾来源的内皮祖细胞提供参考。当然影响培养内皮祖细胞成功的原因还很多,比如细胞接种密度^[14]、不同的培养基、生长因子、细菌污染、操作过程中的动作粗暴、取材标本放置时间的长短等,需要在实验过程中严格的无菌观念及不断摸索最适宜内皮祖细胞培养成功的条件,以提高培养成功率,加快实验进程。

总之,本实验结果明确了培养大鼠骨髓及脾来源的内皮祖细胞在 pH 7.2 的 DMEM-L 培养液、5.5% CO₂ 浓度的培养箱中培养成功率高,同时取材大鼠的年龄越小培养成功率越高,为经济、高效的大鼠内皮祖细胞培养提供参考。

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] Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2003, 107(3): 461-468.
- [3] Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(8): 1690-1699.
- [4] Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair [J]. *Circulation*, 2005, 111(22): 2981-2987.
- [5] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(10): 999-1007.
- [6] Fadini GP, Agostini C, Sartore S, et al. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 194(1): 46-54.
- [7] Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, et al. CD34⁺ blood-derived human endothelial cell progenitors [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(4): 304-312.
- [8] Kuang CY, Yu Y, Guo RW, et al. Silencing stromal interaction molecule 1 by RNA interference inhibits the proliferation and migration of endothelial progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(2): 315-320.
- [9] 张社红, 项平. 大鼠骨髓内皮祖细胞的分离培养及其生物学特性 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2008, 33(5): 509-511.
- [10] 王杰, 黄军华, 汪浩文, 等. 大鼠骨髓内皮祖细胞的体外扩增培养 [J]. *疑难病杂志*, 2010, 9(6): 427-429.
- [11] Yu Y, Gao Y, Qin J, et al. CCN1 promotes the differentiation of endothelial progenitor cells and reendothelialization in the early phase after vascular injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(6): 713-724.
- [12] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 2 版. 西安: 世界图书出版西安公司, 2007.
- [13] Yu Y, Gao Y, Wang H, et al. The matrix protein CCN1 (CYR61) promotes proliferation, migration and tube formation of endothelial progenitor cells [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(17): 3198-3208.
- [14] Jianguo W, Tianhang L, Hong Z, et al. Optimization of culture conditions for endothelial progenitor cells from porcine bone marrow in vitro [J]. *Cell Prolif*, 2010, 43(4): 418-426.
- [15] Schwartzenberg S, Afek A, Charach G, et al. Comparative analysis of the predictive power of different endothelial progenitor cell phenotypes on cardiovascular outcome [J]. *World J Cardiol*, 2(9): 299-304.
- [16] Au P, Daher LM, Duda DG, et al. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels [J]. *Blood*, 2008, 111(3): 1302-1305.
- [17] Zhao L, Cao F, Yin T, et al. Moderate dose insulin promotes function of endothelial progenitor cells [J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(3): 215-220.