

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.06.019 [http://www.crter.org]
曹广煜, 陈庆伟, 李兴升, 杨彦, 李桂琼. 大鼠骨髓与外周血来源内皮祖细胞生物学特性比较[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6):1064-1068.

大鼠骨髓与外周血来源内皮祖细胞生物学特性比较★

曹广煜, 陈庆伟, 李兴升, 杨彦, 李桂琼

重庆医科大学附属第二医院老年科, 重庆市 400010

文章亮点:

- 1 实验采用 percoll 密度梯度离心并完全培养基的选择性培养获得纯度较高的内皮祖细胞。
- 2 通过细胞形态的观察、细胞表面标志物的表达、双荧光染色、观察胞浆内 W-P 小体等多种方法, 对骨髓和外周血来源的内皮祖细胞生物学特性进行比较。
- 3 发现骨髓来源内皮祖细胞是早期内皮祖细胞增殖能力强, 而外周血来源的内皮祖细胞是晚期内皮祖细胞, 数量较少, 增殖能力差。

关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 内皮祖细胞; 骨髓; 外周血; 分离; 鉴定; 免疫细胞化学染色; 早期内皮祖细胞; 晚期内皮祖细胞; 生物学特性; 大鼠; 干细胞图片文章

摘要

背景: 内皮祖细胞不仅参与胚胎血管生成, 也参与出生后血管发生和血管内膜损伤后修复, 对治疗缺血性疾病意义重大, 但目前对内皮祖细胞的分离、培养、鉴定还存在争议。

目的: 体外分离、培养大鼠骨髓与外周血来源的内皮祖细胞, 并比较其生物学特性。

方法: 密度梯度离心法分离 SD 大鼠骨髓和外周血单个核细胞, 接种于纤维连接蛋白铺被的培养瓶中贴壁培养, 用加入血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子及表皮生长因子的完全培养基诱导培养, 对获得的贴壁细胞进行细胞形态学, 免疫细胞化学染色, 流式细胞仪, 透射电镜, 以及 Dil-acLDL、FITC-UEA-1 双荧光染色法检测。

结果与结论: 骨髓来源的内皮祖细胞数量多, 集落状生长, 增殖能力强; 外周血来源的内皮祖细胞数量较少, 散在生长, 消化后能贴壁但不能传代。两种不同来源的内皮祖细胞免疫细胞化学检测贴壁细胞 CD133、CD34、Flk-1、VIII 因子在不同时段呈阳性表达; 激光共聚焦显微镜观察, Dil-acLDL、FITC-UEA-1 均为双染。透射电镜检查外周血来源的内皮祖细胞发现 W-P 小体。提示大鼠骨髓和外周血均能分离培养出内皮祖细胞, 但前者是早期内皮祖细胞, 后者为晚期内皮祖细胞, 两者生物学特性各不相同。

曹广煜★, 男, 1984 年生, 山东省临沂市人, 汉族, 2012 年重庆医科大学毕业, 硕士, 主要从事干细胞移植治疗缺血性疾病研究。

cgyu9818@163.com

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344
(2013)06-01064-05

收稿日期: 2012-05-04

修回日期: 2012-07-28
(20120219009/N · S)

Biological characteristics of rat peripheral blood versus bone marrow derived endothelial progenitor cells

Cao Guang-yu, Chen Qing-wei, Li Xing-sheng, Yang Yan, Li Gui-qiong

Department of Gerontology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Abstract

BACKGROUND: Endothelial progenitor cells (EPCs) not only participate in embryonic angiogenesis, but also participate in postnatal angiogenesis and vascular intima damage repair, exhibiting a great significance for the treatment of ischemic diseases. Nevertheless, the isolation, culture and identification of endothelial progenitor cells remain controversial.

OBJECTIVE: To isolate and culture endothelial progenitor cells from peripheral blood and bone marrow *in vitro*, and to compare their biological characteristics.

Cao Guang-yu★, Master,
Department of Gerontology,
Second Affiliated Hospital of
Chongqing Medical University,
Chongqing 400010, China
cgyu9818@163.com

Received: 2012-05-04
Accepted: 2012-07-28

METHODS: SD rat bone marrow and peripheral blood mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation, inoculated on fibrinin-coated culture flask and cultured with complete medium containing vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth, and epidermal growth factor. Cell morphology, immunocytochemical staining, flow cytometry and transmission electron microscopy as well as Dil-acLDL, FITC-UEA-1 double fluorescence staining were performed on the harvested adherent cells.

RESULTS AND CONCLUSION: A large number of endothelial progenitor cells were harvested from bone marrow, and they were grown in a colony-like manner and show strong proliferative capacity. A small number of endothelial progenitor cells were harvested from peripheral blood. They were grown in a sparse manner and could adhere to flask wall but could not be passaged. Immunocytochemical staining showed that adherent cells from two sources were positive for CD133, CD34, Flk-1 and VII factors at different time periods. Laser confocal microscopy showed that adherent cells from two sources can stain Dil-acLDL and FITC-UEA-1. Transmission electron microscopy showed that W-P body was found in the peripheral blood endothelial progenitor cells. These results indicate that endothelial progenitor cells can be cultured from both bone marrow and peripheral blood, but early-stage endothelial progenitor cells can be cultured from bone marrow and late-stage endothelial progenitor cells can be cultured from peripheral blood. These two kinds of cells show different biological characteristics.

Key Words: stem cells; stem cell culture and differentiation; endothelial progenitor cells; bone marrow; peripheral blood; isolation; identification; immunocytochemical staining; early endothelial progenitor cell; late-stage endothelial progenitor cells; biological characteristics; rats; stem cell photographs-containing paper

Cao GY, Chen QW, Li XS, Yang Y, Li GQ. Biological characteristics of endothelial progenitor cells from rat peripheral blood versus bone marrow. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(6):1064-1068.

0 引言

内皮祖细胞是一类发源于中胚层,能直接分化为血管内皮细胞,但尚未表达成熟血管内皮细胞表型,也未形成血管的前体细胞。不仅参与胚胎血管生成,也参与出生后血管发生和血管内膜损伤后修复^[1],而且可以通过旁分泌效应促进局部血管内皮细胞增殖,增加血管再生,改善血供,对治疗缺血性疾病、恶性肿瘤、炎症性疾病等有着广阔的临床应用前景。但目前对内皮祖细胞的分离、培养、鉴定还存在争议,大多数学者倾向于将CD133⁺/CD34⁺/Flk-1(VEGFR-2或KDR)⁺的细胞定义为内皮祖细胞^[2]。实验对大鼠骨髓和外周血来源的单个核细胞进行体外分离培养,并鉴定比较,为进一步研究其在临床的应用提供理论基础。

1 材料和方法

设计: 原代细胞分离培养鉴定,分组对比观察。

时间及地点: 实验于2010年4月至2011年4月在重庆医科大学生命科学院完成。

材料:

主要试剂及仪器: 血管内皮生长因子、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子购自Peprotech公司; CD133多克隆抗体、CD34多克隆抗体、Flk-1多克隆抗体、vWF多克隆抗体、二抗及免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司; FITC标记的CD45, CD31购自美国BD公司; Dil-acLDL、FITC-UEA-1购自英国Biomeda公司; 激光共聚焦显微镜为德国Zeiss公司产品。

实验动物: 2周龄雄性SD大鼠60只,体质量(15±2)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,实验处置符合动物伦理学标准。

方法:

骨髓来源内皮祖细胞分离培养: 取2周龄雄性SD大鼠,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,无菌条件下快速分离股骨及胫骨,用预冷的4℃L-DMEM反复冲洗骨髓腔变白,吹打成单细胞悬液,按1:1等量缓慢叠加于相对密度1.073 Percoll上,2000 r/min离心20 min,吸取中间白色混浊云雾层,PBS洗涤2次,完全培养基(L-DMEM中加入体积分数20%胎牛血清,血管内皮生长因子

20 $\mu\text{g/L}$, 碱性成纤维细胞生长因子2 $\mu\text{g/L}$, 表皮生长因子20 $\mu\text{g/L}$ 重悬, 制成单细胞悬液并计数, 种植于提前包埋纤维连接蛋白的培养瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 体积分数5% CO_2 条件下培养, 48 h换液, 以后3 d换液1次, 观察细胞生长。

外周血来源内皮祖细胞的分离培养: 取2周龄雄性SD大鼠, 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 常规消毒, 无菌操作台腹主动脉取血, 肝素抗凝, PBS等比稀释, 按2:1缓慢叠加于Percoll上, 离心方法同骨髓。

细胞生长曲线绘制: 原代细胞以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于Fn铺被的24孔板, 分别于接种后第1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15天取3孔细胞计数, 取平均值绘制细胞生长曲线。

免疫细胞化学染色法检测细胞表面抗原: 按照pv6001试剂盒两步法进行, 分别于第3, 7, 12天对两种不同来源的内皮祖细胞染色, 检测内皮祖细胞表面抗原CD31、CD34、CD133、Flk-1、vWF, 胞浆呈棕黄色为阳性, 镜下随机选取5个视野, 计数细胞总数以及阳性细胞数, 计算阳性细胞百分率。

细胞吞噬功能: 取第7天细胞胰酶消化, 将等量细胞以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种到24孔板, 待细胞贴壁完全后(约24 h)鉴定。细胞在含Dil-acLDL(10 mg/L)的培养基中避光孵育4 h, PBS漂洗2 min \times 2次, 20 g/L多聚甲醛固定10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS振洗2 min \times 3次, 滴加FITC-UEA-1(10 mg/L)覆盖玻片, 放入湿盒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育1 h, PBS冲洗2 min \times 3次(以上操作均在避光环境中), 激光共聚焦显微镜观察, 显示红色荧光的为Dil-acLDL阳性细胞, 显示绿色荧光的为FITC-UEA-1阳性细胞, 显示黄色荧光(双荧光阳性)的细胞被认为是正在分化的内皮祖细胞。

透射电镜检查: 消化收集第7天的细胞, 调节细胞浓度为 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 1 200 r/min \times 10 min, 吸弃上清, 20 g/L多聚甲醛固定10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 送检, 透射电镜观察, 寻找内皮祖细胞生长发育到内皮细胞过程中出现的特异性超微结构W-P小体。

主要观察指标: 内皮祖细胞生长形态变化及表面标志物表达, 双荧光染色鉴定其功能, 胞浆内观察W-P小体。

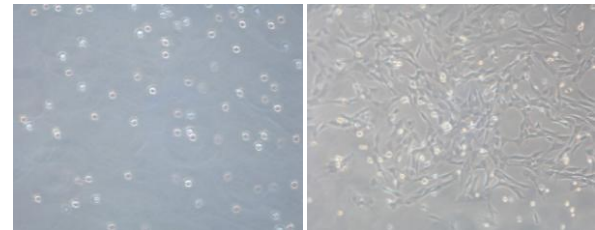
统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件及Microsoft Excel完成统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用完全随机设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同来源内皮祖细胞形态学特征

骨髓来源内皮祖细胞: 新分离的单个核细胞为小圆形,

细胞数量多, $(25.2 \pm 18.7) \times 10^7$ 个, 锥虫蓝染色显示活细胞占95%以上; 2 d后少数细胞变大伸出伪足样突起, 呈梭形或不规则; 4 d左右呈集落状: 中央为一群密集的细胞, 向四周伸出长梭型细胞; 7 d细胞数量显著增多, 呈长梭形且首尾相连, 网状排列, 细胞融合率85%以上。连续传代4代以上细胞形态无明显改变, 生长良好, 见图1。



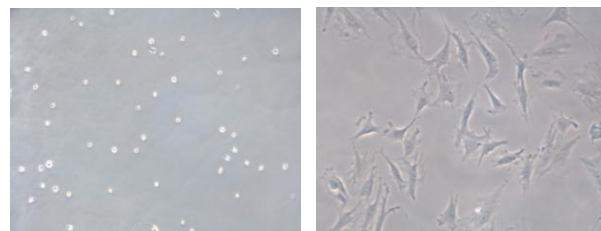
A: 刚分离 1 h 的内皮祖细胞(x200) B: 培养 7 d 的内皮祖细胞(x100)

注: 新分离的骨髓来源单个核细胞为小圆形, 细胞数量多; 培养 7 d 细胞数量显著增多, 呈长梭形且首尾相连, 网状排列, 细胞融合率 85%以上

图 1 体外培养不同时期大鼠骨髓来源内皮祖细胞形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells cultured for different time periods

外周血来源内皮祖细胞: 新分离的单个核细胞为小圆形, 细胞数量较骨髓来源的少, $(60.1 \pm 16.7) \times 10^6$ 个, 锥虫蓝染色显示活细胞占全部细胞的95%以上; 48 h第1次换液细胞稀少, 4 d可见散在增大细胞, 呈短梭形或小杆状; 无细胞集落形成, 细胞较松散, 15 d左右可见梭形细胞首尾相连, 呈条索状排列, 见图2。



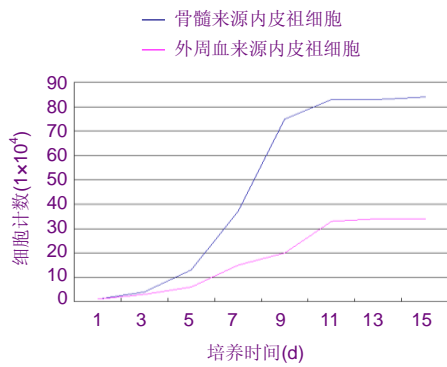
A: 分离 1 h 的内皮祖细胞(x200) B: 培养 7 d 的内皮祖细胞(x100)

注: 新分离的外周血来源单个核细胞为小圆形, 细胞数量较骨髓来源少; 培养 7 d 无细胞集落形成, 细胞较松散, 不能传代

图 2 体外培养不同时期大鼠外周血内皮祖细胞形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of rat peripheral blood-derived endothelial progenitor cells cultured for different time periods

2.2 不同来源内皮祖细胞生长曲线比较 骨髓来源内皮祖细胞培养前2 d增殖不明显, 为生长潜伏期, 3 d后呈指数递增, 11 d后细胞增殖进入平台期, 细胞可达到 $8.3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$; 而外周血来源内皮祖细胞第4天进入细胞增殖期, 最大细胞浓度只能达到 $3.2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。见图3。

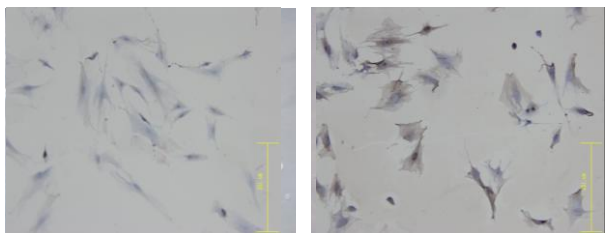


注: 骨髓来源的内皮祖细胞较外周血来源内皮祖细胞数量多, 增殖能力强。

图3 大鼠骨髓来源及外周血来源内皮祖细胞体外培养不同时间生长曲线

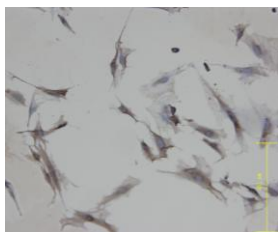
Figure 3 Growth curves of endothelial progenitor cells from rat bone marrow and peripheral blood after cultured for different time periods

2.3 免疫细胞化学染色法检测细胞表面抗原 骨髓来源内皮祖细胞诱导培养第3天, CD133阳性表达率为(79.4±4.5)%, 之后呈减弱趋势; 自诱导培养的第6天开始, Flk-1与vWF呈高表达, 阳性率为(74.2±3.5)%和(72.2±4.3)%, 并随培养天数的延长表达逐渐降低。外周血来源内皮祖细胞CD133持续低表达, 而Flk-1与vWF呈高表达, 见图4, 5。

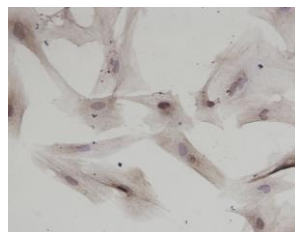


A: 培养第3天骨髓源内皮祖细胞高表达CD133(79.4±4.5)%

B: 培养第7天外周血来源内皮祖细胞CD34的表达



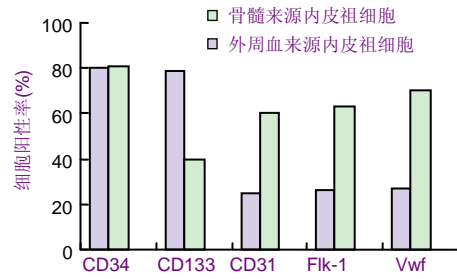
C: 培养第12天骨髓源内皮祖细胞CD133的表达



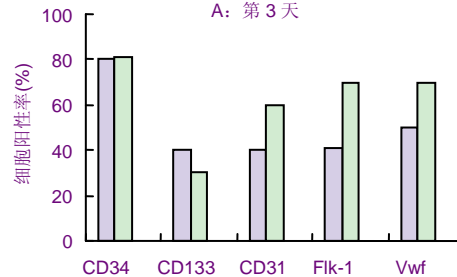
D: 培养第12天外周血来源内皮祖细胞高表达vWF

图4 免疫细胞化学染色检测大鼠骨髓来源及外周血来源内皮祖细胞表面抗原表达(×200)

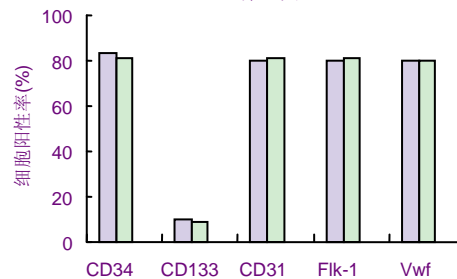
Figure 4 Surface antigen expression on endothelial progenitor cells from rat bone marrow and peripheral blood as detected by immunocytochemical staining (×200)



A: 第3天



B: 第7天



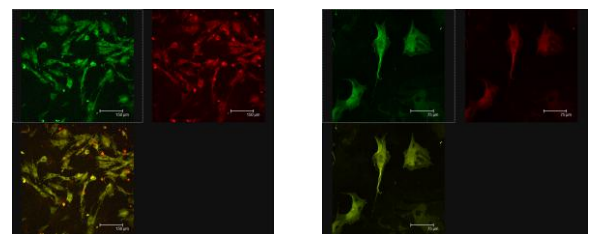
C: 第12天

注: 外周血来源内皮祖细胞持续低表达CD133, 而Flk-1与vWF呈高表达, 说明其为晚期内皮祖细胞; 骨髓源内皮祖细胞高表达CD133, 培养7d后高表达Flk-1与vWF, 说明其是早期内皮祖细胞。

图5 大鼠骨髓来源及外周血来源内皮祖细胞培养不同时间表面抗原阳性率比较

Figure 5 Percentage of surface antigen expression on endothelial progenitor cells from rat bone marrow versus peripheral blood

2.4 细胞吞噬功能 见图6。



A: 骨髓来源内皮祖细胞

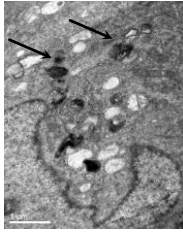
B: 外周血来源内皮祖细胞

注: 培养第7天均可吞噬Dil-acLDL显示红色荧光, 同时与FITC-UEA-1结合显示绿色荧光, 重合后为黄色荧光。

图6 激光共聚焦显微镜观察两种不同来源内皮祖细胞吞噬功能(×200)

Figure 6 Expression of Dil and FITC on endothelial progenitor cells from bone marrow and peripheral blood as shown by confocal microscopy (×200)

2.5 透射电镜检查W-P小体 骨髓来源内皮祖细胞未找到W-P小体,外周血来源内皮祖细胞找到W-P小体,见图7。



注:说明外周血来源内皮祖细胞为晚期内皮祖细胞。

图7 外周血来源内皮祖细胞中的W-P小体(箭头,x20 000)

Figure 7 Expression of W-P body on endothelial progenitor cells (arrows) from peripheral blood (x20 000)

3 讨论

内皮祖细胞具有游走特性,能进一步增殖分化的幼稚内皮细胞,缺乏成熟内皮细胞的特征性表型,不能形成管腔样结构,但内皮祖细胞并不是一种单一的细胞,分为早期内皮祖细胞和晚期内皮祖细胞,而两种细胞在生物学特性上有明显差异^[3-6]。目前体外培养内皮祖细胞的主要来源是骨髓和外周血,相比较外周血,骨髓中的内皮祖细胞含量更丰富,且增殖能力更强^[7],为早期内皮祖细胞。

对于内皮祖细胞的鉴定一直存在争议,目前主要通过观察细胞形态学、免疫学鉴定细胞表面特异性标志物、功能学检查及透射电镜等方面进行。在细胞生长的不同阶段,内皮祖细胞表面标记各有不同。CD34可同时识别造血干细胞、内皮祖细胞和血管内皮细胞,因而无法区别内皮祖细胞的分属时期。而CD133则可特异性区别早期和晚期的内皮祖细胞^[8],CD133更早出现于造血干细胞表面,而分化成熟的内皮祖细胞则不表达,骨髓来源内皮祖细胞经历了从高表达CD133到低表达的过程,而外周血来源的内皮祖细胞则持续低表达CD133,说明骨髓来源内皮祖细胞是早期内皮祖细胞,而外周血来源内皮祖细胞是晚期内皮祖细胞。CD31、vWF、Flk-1作为成熟内皮细胞的表面标志物^[9],在早期骨髓来源的内皮祖细胞中鲜有表达,细胞培养第7天,才逐渐增多,而外周血来源内皮祖细胞则持续高表达,更说明其为晚期内皮祖细胞。

实验通过比较两种不同来源内皮祖细胞的生物学特性,说明从骨髓中能够得到大量的早期内皮祖细胞,经过体外诱导培养能分化为成熟血管内皮细胞,而外周血来源内皮祖细胞为晚期内皮祖细胞,数量较少,增殖能力较差。因此骨髓是临床治疗缺血性疾病一个较理想的内皮祖细胞来源。

作者贡献: 曹广煜进行实验设计,实验实施为曹广煜、杨彦、李桂琼,实验评估为曹广煜,资料收集为曹广煜,曹广煜成文,陈庆伟审校,曹广煜对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1185-1189.
- [2] Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(9):1584-1595.
- [3] Mukai N, Akahori T, Komaki M, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res.* 2008;314(3):430-440.
- [4] Duan HX, Cheng LM, Wang J, et al. Angiogenic potential difference between two types of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood. *Cell Biol Int.* 2006;30(12):1018-1027.
- [5] Ren JL, Wang ZG, Zhang Y, et al. Transfection efficiency of TDL compound in HUVEC enhanced by ultrasound-targeted microbubble destruction. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34(11):1857-1867.
- [6] Liu XX, Hu JF. Shiyong Linchuang Yixue. 2010;11(4):125-168. 柳晓霞,胡坚方. SDF-1/CXCR4介导骨髓干细胞归巢至损伤肝脏的研究进展[J]. *实用临床医学*,2010,11(4):125-168.
- [7] Odörfer KI, Walter I, Kleiter M, et al. Role of endogenous bone marrow cells in long-term repair mechanisms after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6B):2867-2874.
- [8] Zhang HF, Zhao ZG. Shiyong Zhenduan yu Zhiliao Zazhi. 2010;19(4):270-272. 张会峰,赵志刚. 内皮祖细胞及其治疗下肢缺血疾病的研究进展[J]. *实用诊断与治疗杂志*,2010,19(4):270-272.
- [9] Devanesan AJ, Laughlan KA, Girn HR, et al. Endothelial progenitor cells as a therapeutic option in peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009;38(4):475-481.