

· 基础研究 ·

犬骨髓成年多能祖细胞诱导分化血管内皮细胞的实验研究

任晓庆 王方正 张澍 浦介麟 贾玉和 赵欣然 孟亮

【摘要】 目的 内皮细胞移植对损伤组织的修复治疗至关重要,本研究旨在探讨骨髓成年多能干细胞(MAPCs)体内外诱导分化血管内皮细胞的可行性。方法 采用 Percoll 密度梯度法分离培养 MAPCs。应用 10 ng/ml 血管内皮细胞生长因子(VEGF)对骨髓 MAPCs 进行体外诱导分化 2~3 周,使其定向分化成为血管内皮细胞。采用细胞形态学、细胞免疫组化以确定诱导分化的效果。将标记 BrdU 的 MAPCs 自体移植于犬心肌内,观察局部微环境对于骨髓 MAPCs 的分化能力。结果 应用 10 ng/ml VEGF 孵育骨髓 MAPCs 2~3 周,可见 MAPCs 分化为血管内皮细胞:细胞形态呈鹅卵石样;形成血管样结构;细胞 vWF 免疫染色阳性。移植于心肌内的 MAPCs 在体内形成新生血管,血管内皮 BrdU 染色与 vWF 染色均阳性。结论 骨髓 MAPCs 可在体外 VEGF 诱导下或在体内微环境作用下分化为成熟血管内皮细胞。骨髓 MAPCs 可为损伤组织的移植修复治疗提供内皮细胞资源。

【关键词】 骨髓成年多能干细胞;犬;内皮细胞;诱导分化;血管内皮细胞生长因子

Differentiation of vascular endothelial cells from canine bone marrow multipotent adult progenitor cells

REN Xiaoqing, WANG Fangzheng, ZHANG Shu, et al

Division of Clinical Electrophysiology, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Chinese Union Medical University, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To study the feasibility of *in vitro* and *in vivo* differentiation of vascular endothelial cells (EC) from canine bone marrow multipotent adult progenitor cells (MAPCs) in order to provide an ideal cell source for the restoration therapy of damaged tissue. Methods MAPCs isolated from canine bone marrow using Percoll density gradient solution were grown in DMEM medium supplemented with 10 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF) for 2–3 weeks. The morphology and special antigen of differentiated cells were observed by microscopy and immunohistochemical staining. *In vivo* differentiation of endothelial cells from bone marrow MAPCs labeled with bromodeoxyuridine (BrdU) was identified by morphology and immunohistochemical staining for observing the effects of physiological environment on differentiation of endothelial cells. Results After 2–3 weeks of incubation with 10 ng/ml VEGF, the cells formed a monolayer with a typical EC morphology, vascular structure, and vWF positive. *In vivo*, MAPCs labeled with BrdU could differentiate, in response to the effect of local microenvironment, into endothelial cells that contributed to angiogenesis in myocardium. Conclusion Multipotent adult progenitor cells isolated from canine bone marrow could differentiate into vascular endothelial cells by VEGF induction *in vitro* or under the influence of physiological environment *in vivo*, which may provide an important source of endothelial cells for cellular transplantation therapy of damaged tissue.

【Key words】 multipotent adult progenitor cells, bone marrow, canine; endothelial cells; differentiation; vascular endothelial growth factor

血管再生对于缺血、损伤器官的功能恢复至关重要。传统观念认为,出生后血管形成仅仅是由血

管内皮细胞发芽所引起。然而,最新研究表明成年骨髓内含有一种数量很少的血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs),可被动员进入循环,并进入缺血组织以血管发生方式形成血管^[1]。目前已从骨髓造血干细胞^[2]、外周血 AC133⁺细胞^[3]、CD34⁺/flk-1⁺细胞^[4]分离出血管内皮祖细胞,这些细胞可在体内外分化成熟的血管内皮细胞并形成血管。然而,从骨髓间叶干细胞(mesenchymal stem

收稿日期:2004-02-03

基金项目:国家自然科学基金(30170374);中国博士后科学基金(2002032128);高校博士点基金资助课题(2000年,00058)

作者单位:100037 北京市,中国医学科学院中国协和医科大学阜外心血管病医院心律失常诊治中心

作者简介:任晓庆,男,1963年2月生,山东省菏泽市人,医学博士,副主任医师。Tel: 010-86051216

cells, MSCs)分离内皮祖细胞并诱导其分化成熟内皮细胞的报告少见。骨髓间叶干细胞也称为多能成年祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs),是一类贴壁生长、可分化多种间叶组织、其特性不同于骨髓造血干细胞的另一类骨髓干细胞,能够自身获取,易于培养与扩增,有高度增殖潜力,在修复损伤组织方面有很大临床应用潜力^[5]。因此,本课题旨在探索骨髓 MAPCs 体内外诱导分化血管内皮细胞的方法,为损伤组织的移植修复治疗提供理想成体干细胞来源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 杂种犬 10 只,体重 25~35 kg,每只犬抽取骨髓液 10 ml。Percoll 分离液:密度:1.063 g/ml, Sigma; MSC 培养基: PT3001 培养基 MSCGM (PT-4105 血清); MSCBM (PT-3238 培养液) (POIETICS); 胎牛血清: Gibco; 胰蛋白酶(trypsin): Sigma; 0.25% Trypsin + 1% EDTA; VEGF (vascular endothelial growth factor): PEPRO TECH INC; 地塞米松(dexamethasone) Sigma 公司; 抗坏血酸(ascorbate) Sigma 公司; 胰岛素(insulin), Sigma 公司; 抗人 vWF (factor VIII related antigen) 抗体, 二步法免疫组化检测试剂(polymer detection system for immuno-histological staining), PV-9000 Poly-HRP anti-Mouse/Rabbit IgG Detection System: 北京中山生物技术有限公司; BrdU 标记与检测试剂盒(5-Bromo-2'-deoxy-uridine labeling and detection kit II, Cat No. 1299964); Roche 公司。

1.2 犬骨髓 MAPCs 的分离培养方法^[2-4,6-8] 杂种犬(体重 25~35 kg),雌雄不拘。全麻下由犬髂后上棘抽取骨髓液 10 ml(注射器内含肝素 12 500 U),混匀防凝。将所抽取骨髓液放入 50 ml 消毒离心管,加 2 倍量 DMEM 培养液(20 ml)稀释混匀;取 15 ml 消毒离心管,先加入 6 ml Percoll 分层液(密度:1.073 g/ml);在分层液界面上小心加入与分层液等量的稀释骨髓液(6 ml);分层离心:离心力 900 × g,离心时间 30 min;用吸管小心吸取分层液界面的絮状物,此分层液富含所分离的单核细胞;将所吸取的分层单核细胞加入 10 ml DMEM 混匀;洗涤离心:2000 r/min, 5 min;去除上清液,加 DMEM 稀释沉积物,再次洗涤离心;去上清液,沉积物用 10 ml MSC 培养液悬浮。将分离的细胞悬液转移至 75 ml 培养瓶,放置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。

培养基: LG-DMEM(Gibco), 加 10% FBS(Gibco);

或应用骨髓间叶干细胞专用培养基(POIETICS)。培养液含有 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 0.2 μg/ml Amphotericin B(Sigma)。孵育 24 h 后更换培养液,去除红细胞、悬浮生长的骨髓造血干细胞及其他未贴壁的骨髓干细胞。以后每 3 d 更换一次培养液。

1.3 体外诱导犬骨髓 MAPCs 分化内皮细胞的条件与特点

^[1-4,9,10] (1) 原代细胞诱导分化: 分离的 MAPCs 培养 24~48 h, 即可见少量的梭形细胞贴壁。

此时细胞换液,去除造血干细胞与其他未贴壁杂细胞。培养液中添加胰岛素 10 mg/L, 地塞米松 10 nmol/L, 抗坏血酸 0.05 mmol/L, 同时添加 10 ng/ml 的 VEGF。所用培养液中含低浓度 2% 胎牛血清。每 3~5 d 更换一次培养液,每次换液均加用 10 ng/ml VEGF 孵育细胞及应用低浓度血清,连续培养 2~3 周。(2) 传代细胞诱导分化: 原代骨髓 MAPCs 增殖融合后,消化传代。将 MAPCs 以 1×10^4 细胞/孔接种于 24 孔培养板。培养液中加入胰岛素 10 mg/L, 地塞米松 10 nmol/L, 抗坏血酸 0.05 mmol/L, VEGF 10 ng/ml。每次换液均加用 10 ng/ml VEGF 孵育细胞,所有培养液为 2% FCS 的 MSCBM。3~5 d 换液一次。

1.4 体外分化血管内皮细胞鉴定^[1-4] (1) 分化内皮细胞形态学观察: 在 MAPCs 加入血管内皮细胞生长因子后,经常镜下观察细胞形态的变化: 细胞的外形是否呈典型内皮细胞形态,是否形成血管网状结构等。(2) 八因子相关抗原多克隆抗体鉴定: 骨髓 MAPCs 在加入 VEGF 诱导分化 3 周后进行免疫组化鉴定。八因子为血浆中的一种糖蛋白,八因子相关抗原存在于人的血管内皮细胞、巨噬细胞与血小板。此抗体与位于八因子大亚基上的相关抗原反应,可用于血管内皮细胞的鉴定。

1.5 体内微环境下诱导骨髓 MAPCs 分化血管内皮细胞及其鉴定

^[11-14] 原代分离培养的 MAPCs,应用胰岛素 10 mg/L, 地塞米松 10 nmol/L, 抗坏血酸 0.05 mmol/L, VEGF 10 ng/ml 孵育 72 h。此后去除诱导液,换普通干细胞培养液,扩增培养细胞至 $(1 \sim 1.5) \times 10^7$ 。或将原代分离培养的 MAPCs 不加任何诱导剂,直接培养扩增后备用。

应用 BrdU 10 μmol/L 对待移植细胞进行体外标记,孵育时间为 12 h。直视下将标记细胞注射到犬房室结区、窦房结区与右室壁。移植 10 周后,取移植区心肌组织进行病理和免疫组化检测,进行 BrdU 与 vWF 检测,以确定移植细胞是否分化为血管内皮细胞。

2 结果

2.1 骨髓 MAPCs 的分离培养 骨髓 MAPCs 的分离培养基本同间叶干细胞。但由于骨髓液稀释、分离液的密度与离心力的不同,所分离的 MAPCs 中含有较多的内皮祖细胞。因此在细胞培养早期 48 ~ 72 h,除有纤维细胞状的间叶干细胞外,尚可见管状排列的细胞。随着细胞换液,未贴壁的绝大多数血细胞被清除,瓶底仅剩有贴壁骨髓 MAPCs 生长。

2.2 分化血管内皮细胞的形态学特点 添加 VEGF 等诱导分化 48 ~ 72 h,即可见管网状排列的内皮祖细胞(图 1a)。其他则为纺锤状的间叶干细胞。连续培养至第 14 ~ 21 天,这些管网状的细胞逐渐演变成血管样的结构(图 1b,图 1c),呈现明显的管腔、管壁形态。在这些血管样结构的周围,有许多鹅卵石样排列的细胞,呈内皮细胞样形态(图 1d)。其他则是梳状排列、纺锤状的间叶干细胞。未加 VEGF 等诱导剂培养的 MAPCs 没有上述形态上的变化,或虽有类似改变,但罕见。

2.3 分化血管内皮细胞的免疫组化检测 骨髓

MAPCs 经 VEGF 诱导培养 2 ~ 3 周,其形态出现鹅卵石样改变,且呈现血管样结构时,对分化细胞进行八因子相关抗原免疫组化染色。大部分诱导分化细胞呈现 vWF 免疫染色阳性(图 2),表明骨髓 MAPCs 已发育形成血管内皮细胞。

2.4 体内分化血管内皮细胞的鉴定 标记 BrdU 的 MAPCs 移植心肌后 10 周,取移植区心肌组织进行病理和 BrdU、vWF 检测,以确定移植细胞是否分化为血管内皮细胞。在细胞移植区可见新生血管形成,其内皮细胞 BrdU 阳性,且 vWF 染色也呈现阳性(图 3)。

3 讨论

新生血管包括胚胎期的血管发生(vasculogenesis)和此后的血管再生(angiogenesis)。由血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)或成血管细胞(angioblast)在原位分化为内皮细胞,聚合形成原始毛细血管丛,这就是胚胎发育过程中的血管系统形成或血管发生^[15]。而血管再生是由已有血管的发芽方式而形成的新血管,它在胚胎发育期及出生后均可发生^[15,16]。传统观念认为出生后血管形成仅仅

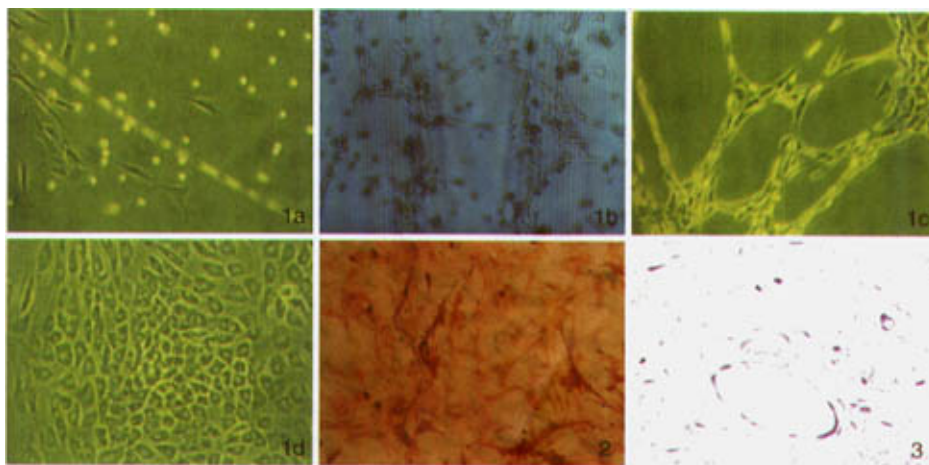


图1 骨髓内皮祖细胞早期增殖图

1a. 添加 VEGF 等诱导因子 72 h,可见骨髓内皮祖细胞分化增殖;1b. VEGF 诱导分化 1 ~ 2 周,骨髓内皮祖细胞逐渐演变成管网状结构;1c. VEGF 诱导分化 2 ~ 3 周后,内皮祖细胞逐渐演变成血管状结构;1d. VEGF 诱导分化 2 ~ 3 周后,内皮祖细胞呈鹅卵石样排列形态,表现内皮细胞样特征

图2 诱导分化细胞 vWF 免疫染色阳性图

图3 骨髓内皮细胞体内分化图

在细胞移植区可见新生血管形成,其内皮细胞 BrdU 阳性,表明新生内皮细胞来源于移植的骨髓干细胞,移植的骨髓内皮细胞在体内可发育为新生血管

是由血管内皮细胞发芽即血管再生所引起。然而最新研究表明,血管内皮祖细胞可以持续存在到成年期,并在成年体内形成新生血管,这说明成年的新生血管形成(neoangiogenesis)至少部分有类似胚胎期血管发生的形成过程^[1,9]。目前已从骨髓造血干细胞、外周血 AC133⁺ 细胞、CD34⁺/Flk-1⁺ 细胞分离出血管内皮祖细胞^[2-4,17],这些细胞可在体内外分化成熟的血管内皮细胞并形成血管。然而,从骨髓间叶干细胞(MSCs),或称为 MAPCs 诱导分化成熟内皮细胞的报告少见。MSCs 分化内皮细胞的个体发生学也不清楚。

目前研究显示,成年骨髓内存在内皮祖细胞,属于 MAPCs 的一个亚群。在一些情况下如伤口愈合及肢体缺血、心肌梗死时,这些细胞可以再生血管^[18-22]。其体内动员的途径是^[1,23]:血管损伤、组织缺血导致促血管生成细胞因子释放,如 VEGF 等因子。而 VEGF 则通过它位于骨髓内皮祖细胞上的受体 VEGFR2(Flk-1)与 VEGFR1(Flt1)的相互作用,动员骨髓内皮祖细胞到达外周循环,促进循环中的内皮祖细胞进入缺血损伤组织,从而再生血管、促进血管愈合、防止因血栓形成与低氧而造成的血管并发症。

本研究利用一些改进的方法可从骨髓液中分离出含有较多内皮祖细胞亚群的 MAPCs。这些干细胞在体外 VEGF 等因子诱导下可产生大量血管内皮细胞,并能形成似血管样结构,具备成熟内皮细胞一样的功能特点。诱导分化的内皮细胞以及未分化的 MAPCs 进行体内移植,均可在体内形成新生血管。MAPCs 容易自身骨髓获取,易于培养与扩增,有高度增殖潜力,在修复损伤组织方面有很大临床应用潜力,是进行临床治疗的理想内皮细胞资源。另外,由于 MAPCs 是更为原始的骨髓干细胞,它对于了解内皮细胞的定向及分化特点是非常有用的。

骨髓 MAPCs 的分离培养方法因种属不同而异,但基本上都沿用密度梯度离心分离单核细胞,再根据 MAPCs 粘附贴壁生长这一特性而获得。含有较多骨髓内皮祖细胞的犬 MAPCs 分离方法与其他间叶干细胞分离方法有所不同:(1)本实验所用梯度离心液的密度为 1.073 g/ml;(2)离心力为 900 × g,时间为 30 min;(3)骨髓液与 DMEM 的比例为 1:2,即稀释倍数为 2 倍。犬骨髓 MAPCs 的培养条件与一般骨髓间叶干细胞的培养条件大致相同,在人类骨髓间叶干细胞培养基上生长良好。

VEGF 是从牛脑垂体星状细胞培养液中分离提纯的一种特异性促血管内皮细胞有丝分裂因子,分子量为 34 ~ 46 kD,由两个相同分子量(17 ~ 23 kD)的亚基以二硫键结合形成二聚体。对于血管内皮细胞,VEGF 是一种强烈的有丝分裂素,以可溶性调节物的形式调节内皮细胞的生长和血管形成。但 VEGF 促进 MAPCs 向血管内皮细胞分化、促血管形成的机制尚不清楚。可能的机制是^[1,24],VEGF 通过结合内皮祖细胞上的受体 VEGFR2(Flk-1)与 VEGFR1(Flt1),活化磷脂酶 C 和刺激第二信使 IP3,直接促进内皮祖细胞的分裂增殖以及向血管内皮细胞的转化。本实验结果表明,成年骨髓 MAPCs 含有内皮祖细胞,在体外 VEGF 等细胞因子的诱导下可增殖分化为成熟血管内皮细胞,在体内微环境作用下可分化为成熟血管。由于骨髓 MAPCs 能够自身获取,易于培养与扩增,有高度增殖潜力,在体内外可诱导分化成熟血管内皮细胞与血管,因此这为损伤组织的移植修复治疗提供了理想内皮细胞资源。

参考文献

- 1 Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Med*, 2003, 9:702-712.
- 2 Quirici N, Soligo D, Caneva L, et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133⁺ cells. *Br J Haematol*, 2001, 115: 186-194.
- 3 Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC 133-positive progenitor cells. *Blood*, 2000, 95: 3106-3112.
- 4 Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 2002, 109: 337-346.
- 5 Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther*, 2002, 9: 754-758.
- 6 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- 7 Guo ZK, Yang JQ, Liu XD, et al. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chin Med J*, 2001, 114: 950-953.
- 8 Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, et al. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant*, 1997, 6: 125-134.
- 9 Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin

- of endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, 85: 221-228.
- 10 Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 2002, 105: 732-738.
- 11 Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123: 1132-1140.
- 12 Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, 1999, 100(suppl II): II 247-II 256.
- 13 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410: 701-705.
- 14 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10344-10349.
- 15 Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95: 952-958.
- 16 Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and *ex vivo* expansion of post-natal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001, 98: 2615-2625.
- 17 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964-967.
- 18 Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3422-3427.
- 19 Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*, 2000, 87: 728-730.
- 20 Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, 107: 1395-1402.
- 21 Ederberg JM, Tang L, Hattori K, et al. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res*, 2002, 90: E89-E93.
- 22 Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 2001, 103: 2776-2779.
- 23 Rabbany SY, Heissig B, Hattori K, et al. Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol Med*, 2003, 9: 109-117.
- 24 Young PP, Hofling AA, Sands MS. VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of newborn murine recipients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 11951-11956.

· 消 息 ·

欢迎投稿 欢迎订阅

《中华老年多器官疾病杂志》是经国家新闻出版署正式批准的医学期刊,创刊于2002年6月,由王士雯院士任总编辑、国内相关多学科知名专家组成编委会。

本刊已被评定为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),自2004年起(用刊为2003年)收入国家科技部中国科技论文与引文数据库(CSTPC)。

本刊主要内容是交流老年心脏病和老年多器官疾病(两个及两个以上器官相继或同时患病)的诊治经验与教训,探讨其发病机制和有效防治措施,重点报道我国在老年心脏病尤其是涉及多器官疾病的临床、基础和预防方面的最新成果和经验,努力推广老年心脏病和老年多器官疾病的新观点、新方法、新措施和新药物。

本刊设有以下栏目:专题笔谈、述评、基础研究、临床研究、论著摘要、经验交流、英文临床病理讨论(附中文摘要)、综述、讲座、病例报告、学术动态、英文医学论文和摘要写作方法等。读者对象为广大从事医学特别是老年医学的临床、科研、教学工作及保健人员。

本刊暂为季刊,大16开本,80页,每册定价12元,全年48元。CN 11-4786/R,ISSN 1671-5403,邮发代号:82-408。欲订购者请到当地邮局订阅或汇款至本刊编辑部邮购。地址:北京市复兴路28号《中华老年多器官疾病杂志》编辑部,邮编:100853。电话/传真:010-68163229/88270497。E-mail:zhldnqg@yahoo.com.cn