

微孔法分离大鼠骨髓内皮祖细胞^{*}

王 佐^{1)**} 童中艺^{1,2)} 周晓峰¹⁾ 姜志胜¹⁾ 唐朝克¹⁾ 宋砚明¹⁾ 田永凤¹⁾

(¹⁾ 南华大学心血管病研究所, 衡阳 421001; ²⁾ 湖南常德职业技术学院医学基础部病理学教研室, 常德 415000)

摘要 用一种杂交瘤皿, 根据内皮祖细胞集落形成单位 (endothelial progenitor cells colony-forming units, EPCs-CFUs) 的形态特征和 EPCs 表面特异性标记物分离 EPCs. 取大鼠股骨、胫骨骨髓, 将全骨髓接种在聚苯乙烯制作的杂交瘤皿上, 培养 4~7 天后出现 CFUs, 将这些集落分别挑选出来后, 取单个集落的部分细胞免疫荧光鉴定 EPCs 表面特异性标记物 CD133/VEGFR-2. CD133/VEGFR-2 双阳性即为 EPCs-CFUs. 与此对应的余下一部分继续传代增殖, 流式细胞术鉴定 CD133/VEGFR-2/CD34, 并把此方法命名为微孔法. 发现接种后第 4 天, 显微镜下可见明显的 CFUs. 免疫荧光鉴定大约 7% 的 CFUs 为 CD133⁺/VEGFR-2⁺, 进一步传代培养, 流式细胞术鉴定 CD133⁺/VEGFR-2⁺/CD34⁺ 细胞纯度达 70% 以上. 传代细胞可在体外形成血管样结构, 并表达内皮细胞特异性标记物 vWF. 结果表明通过微孔法能成功地从大鼠骨髓分离到 EPCs.

关键词 杂交瘤皿, 分离, 大鼠骨髓, 内皮祖细胞, 微孔法

学科分类号 Q813

1997年, Asahara 等^[1]首次报道, 成人血中可分离得到 CD34⁺ 造血干细胞, 因其在体外可向内皮表型细胞分化, 表达内皮细胞标志物并参与血管形成, 故将其命名为内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs). 目前, EPCs 主要用来修复受损血管壁、参与缺血组织血管新生或再生以及包裹血管移植物. 但关键是 EPCs 在循环中的数目非常低, 健康人体出生后 CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ EPCs 占总外周血单个核细胞的 0.002%, 相当于每毫升血中有 70~210 个^[2], 在急性心血管疾病或伴有冠心病危险因素的病人中其数目更低, 其 EPCs 迁移能力下降, 并与冠心病危险因素呈负相关^[3]. 故分离纯化 EPCs 并在体外扩增对心血管疾病治疗有重要的价值. 目前 EPCs 分离方法主要有 Ficoll-Paque 密度梯度离心结合黏附分层培养法、免疫磁珠吸附筛选法. 前者先分离出单个核细胞, 培养 24~48 h 后将未贴壁的细胞重新接种, 数天后计细胞克隆数^[4,5], Aoki 等^[6]甚至用一种特殊的细胞过滤装置 (StemQuickTME) 分离得到了 CD34⁺/CD133⁺ 祖细胞; 免疫磁珠吸附筛法则采用包裹 CD34 或 CD133 抗体的磁珠筛选细胞^[7,8]. 上述方法分选出细胞后, 大多采用 M199、EBM-2、EGM-2 等培养基培养, 还需添加促内皮细胞生长的细胞因子 (如血管内皮生长因子、胰岛素样生长

因子 -1、人表皮生长因子等), 故这些方法虽然可行, 但造价均较高. 本文通过带有许多微孔的杂交瘤皿全骨髓接种法, 根据 EPCs-CFUs 的形态结合免疫荧光鉴定特异性标记物来分离、纯化 EPCs, 希望建立一种经济可行的 EPCs 分离方法, 暂命名为微孔法 (micropore-method).

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料及主要试剂. 4 周龄雄性 SD 大鼠购自南华大学动物部. 小鼠单克隆抗体 VEGFR-2 (abcam-ab9530)、兔多克隆抗体 CD133 (abcam-ab16518)、小鼠单克隆抗体 CD34 (Santa Cruz-sc7324)、FITC 标记山羊抗小鼠二抗以及 rhodamine 标记山羊抗兔二抗均购自 Chemicon 公司; vWF (Chemicon-AB7356); 封闭用羊血清购自武汉博士德生物工程有限公司; 胎牛血清购自元亨圣马生物技术研究所; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 其他试剂均为国产分析纯. 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 荧光显微镜 (美国 Nikon 公

^{*} 中国博士后基金资助项目 (2005038472).

^{**} 通讯联系人. Tel: 0734-8281277, E-mail: nb12@263.net

收稿日期: 2006-12-18, 接受日期: 2007-04-30

司); 流式细胞仪 (COULTER EPICS ALTRA HyperSert™ System, 美国); 杂交瘤皿 (Greiner bio-one: AC- 633160).

1.1.2 杂交瘤皿. 一种特殊的细胞培养皿, 聚苯乙烯(PS)制成(图 1a). 跟普通培养皿相比, 其底部有数百个微孔, 微孔底面积很小, 约 3 mm², 刚好够一个 CFUs(Colony-forming units)生长, 而且其凹陷下去, 在显微镜下, 可以精确到机械地从一个微孔分离细胞, 其适合所有的克隆实验并快速地分离细胞而不损伤细胞. 我们据此将这种分离 EPCs 的方法命名为微孔法.

1.2 方法

1.2.1 骨髓细胞的提取、培养. 将 SD 大鼠断头致死, 75%酒精中浸泡 30 min 后, 无菌操作台中取股骨、胫骨. 用注射器将骨髓冲洗出来, 所得骨髓冲洗液 200 r/min 离心 4 min 去掉组织成分, 然后以密度 10⁹ 个/ml 直接接种到杂交瘤皿, 用 DMEM 培养基 (含 5%~10%胎牛血清, 青霉素 100 kU/L, 链霉素 100 kU/L, VEGF 10 mg/L) 于 37℃、5% CO₂ 细胞孵箱中孵育, 待细胞完全贴壁后更换培养基, 待细胞出现单个细胞集落单位时显微镜下观察并摄像记录.

1.2.2 细胞免疫荧光鉴定 EPCs. 待单个细胞集落长满整个微孔时, 0.25%胰蛋白酶消化收集微孔中 CFUs 细胞, 将一部分细胞接种于盖玻片, 细胞贴壁后, 用多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次后, 5%山羊血清 4℃封闭 10 min, 不洗甩干血清分别加小鼠抗大鼠 VEGFR-2、兔抗大鼠 CD133 一抗在 4℃孵育过夜后, 用 PBS 洗细胞 3 次, 加 FITC 标

记小鼠源二抗和罗丹明(rhodamine)标记兔源二抗, 孵育 30 min, PBS 洗 3 次后, 封片, 荧光显微镜下拍照.

1.2.3 流式细胞术鉴定 EPCs. 将免疫荧光鉴定为 CD133⁺/VEGFR-2⁺ 阳性集落单位对应余下部分的细胞先放在 24 孔板中扩增, 达到一定数量后转移至细胞培养瓶中继续扩增至 10⁶ 个/ml 细胞密度. 用 0.25%胰酶(含 0.1 mmol/L EDTA)消化, 4%多聚甲醛固定, PBS 洗涤、离心, 5%羊血清 4℃封闭 30 min, 离心后分别加入 1%羊血清 PBS 稀释的 VEGFR-2 (1:100)、CD34 (1:100) 各 0.5 ml 重悬细胞, 同时加入不同来源的 CD133 (1:100) 0.5 ml 进行 VEGFR-2/CD133、CD34/CD133 双抗体鉴定, 阴性对照组不加一抗, 用等体积 PBS 代替. 4℃孵育过夜, PBS 洗涤后加入 5%羊血清 PBS 稀释的荧光标记二抗(1:100) 0.5 ml, 室温孵育 30 min, 上机检测, 每个样品平行测 3 次, 取平均值.

1.2.4 细胞免疫荧光鉴定 EPCs 来源的内皮细胞 采用 vWF 一抗, 其他操作步骤同方法 “1.2.2”.

2 结 果

2.1 大鼠骨髓 EPCs 形态特点

骨髓细胞孵育 24 h 时, 部分细胞开始贴壁, 72 h 后基本完全贴壁, 此时首次换液. 4~7 天时可见明显的干细胞集落形成单位, 不同的集落其形态各异, 但多以一团细胞为中心, 从周围游离出许多细胞. 其中 EPCs-CFUs 形态非常典型, 其以一团细胞为中心, 类似胚胎形成时期的血岛, 其周围游离出许多呈梭形、圆形细胞(图 1b、c), 细胞传代后

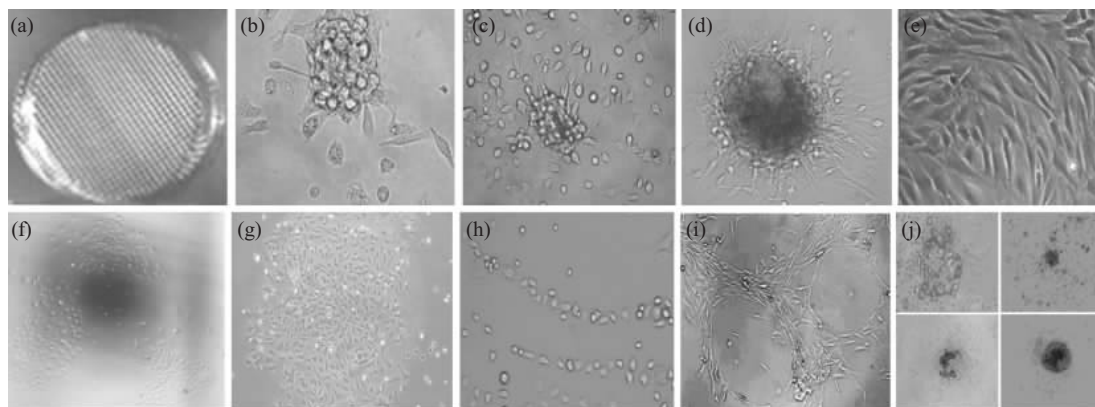


Fig. 1 Characteristics of EPCs isolated by Micropore-Method *in vitro*

(a) Hybridoma dish. (b) and (c) EPCs colony-forming units appeared between 4 and 7 days in culture((b): 20×; (c): 40×). (d) Secondary EPCs colony-forming units (20×); (e) Cells reached confluence quickly (40×). Subcolonies formed after reanimated in (f)(4×) and (g) (20×). (h) and (i) Cord-like structures and capillary tube like formation (10×). (j) Others stem colony-forming units appeared in the hybridoma dish.

仍然可形成次级内皮祖细胞集落形成单位(EPCs-CFU), 其中心主要以圆形细胞为主, 边缘布满了针样的细胞, 并很快扩散布满整个培养板底部(图 1d、e). 将细胞冻存复苏后, 在体外很快形成亚克隆, 并融合铺满整个培养瓶(图 1f、g), 并可见条索状结构(图 1h), 这种亚克隆细胞群体倍增数在 30 代以上. EPCs 是一种成血管母细胞, 传代后培养仍可见血管样结构形成(图 1i), 但是这种结构在后面的培养过程中又会慢慢消失. 采用全骨髓接种, 还会出现其他的多种干细胞集落形成单位(图 1j).

2.2 大鼠骨髓 EPCs 的鉴定

2.2.1 细胞免疫荧光鉴定. 不同的细胞集落单位长满微孔时, 用胰蛋白酶消化收集细胞, 免疫荧光显

微镜鉴定 EPCs 特异性标记物 CD133、VEGFR-2, 发现约 7% 的集落形成单位的细胞呈 CD133⁺/VEGFR-2⁺ 双阳性(图 2a、b、c). 细胞于 10% 胎牛血清 DMEM 培养基(加 10 μ g/L VEGF) 继续传代培养 4~5 代可分化为内皮细胞, 细胞免疫荧光鉴定内皮细胞特异性标记物 vWF 呈阳性(图 2d).

2.2.2 流式细胞术鉴定. 将 CD133⁺/VEGFR-2⁺ 双阳性集落对应的余下部分细胞继续传代增殖至 10⁶ 个/ml 以上, 约需 7 天时间. 流式细胞术检测 CD133⁺/VEGFR-2⁺ 达 (73.28 \pm 7.43)% ; CD34⁺/CD133⁺ 达 (70.36 \pm 10.17)% (图 3).

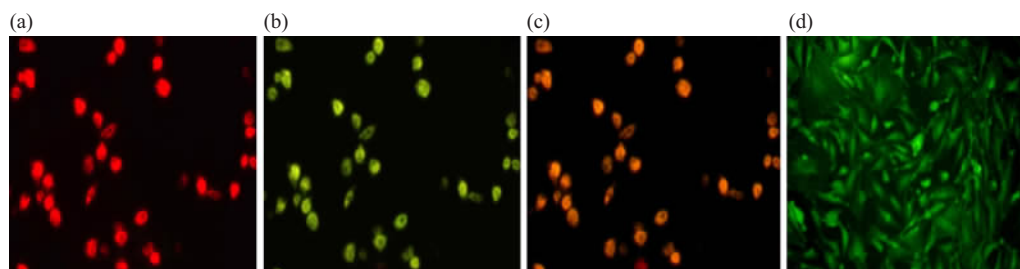


Fig. 2 Identification of 9-days-cultured EPCs with immunofluorescence

(a) CD133 positive EPCs. (b) VEGFR-2 positive EPCs. (c) CD133⁺/VEGFR-2⁺ double positive cells (yellow) (10 \times). (d) EC-like cells differentiated from EPCs with vWF positive marker (20 \times).

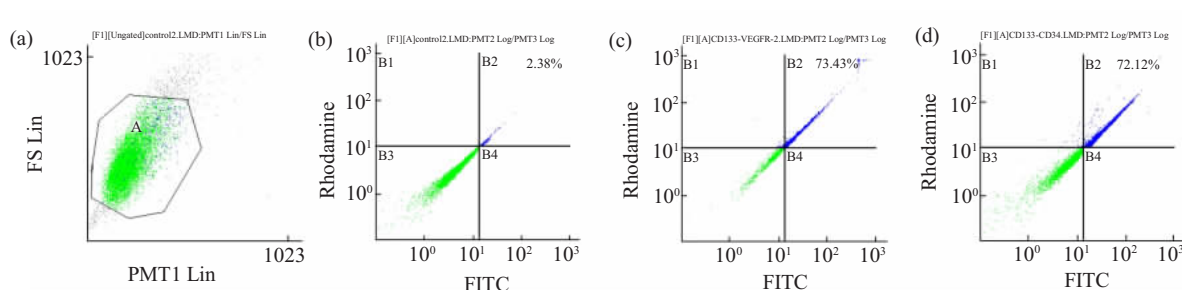


Fig. 3 Analysis of markers on the surface of EPCs by flow cytometric

(a) Areas of cell selected. (b) Control (x-axis presented FITC goat anti-mouse IgG, y-axis presented Rhodamine goat anti-rabbit IgG). (c) x-Axis presented VEGFR-2, y-axis presented CD133, The percent VEGFR-2⁺/CD133⁺ EPCs was 73.43%; (d) x-Axis presented CD34, y-axis presented CD133, The percent CD34⁺/CD133⁺ EPCs was 72.12%.

3 讨 论

基于 EPCs 在缺血后血管新生以及血管损伤后再内皮化等方面的作用, 寻找一种经济可行的 EPCs 分离方法, 对心血管疾病干细胞治疗十分重要. 目前分离纯化 EPCs 主要有密度梯度离心法、分层黏附法、磁珠分选法等. 密度梯度离心法只能

获得单个核细胞, 且 EPCs 纯度不高; 分层黏附法根据各种细胞接种后黏附的时间差异, 全骨髓接种后弃 24 h 前或 48 h 前贴壁细胞, 将上层悬浮细胞接种继续培养得到目的细胞, 因实验条件、操作方法、操作人员差异而十分不稳定, 所得到的细胞纯度也不高; 磁珠分选法是通过包裹 EPCs 特异性标记物的磁头筛选细胞, 纯度相对前两种方法有所提

高, 但细胞流失的较多, 且价格昂贵、操作步骤繁琐, 根据我们以往的经验, 在操作熟练的情况下整个流程需约 8 h, 50 ml 脐带血大约只能分离出 $10^4 \sim 10^5$ 个 EPCs.

本研究根据 EPCs 在体外培养出现 CFUs 这一特征, 用杂交瘤系培养皿并辅助免疫荧光鉴定将其分离出来. 该方法有如下优点: a. 全骨髓接种后有多种细胞能分泌有利于 EPCs 生长的因子, 如将 $CD34^+$ 与 $CD34^-$ 细胞共同培养, $CD34^+$ 细胞增殖率上升 10 倍, 而且还有利于 $CD34^+$ 分化, 形成管样结构^[1]; b. 整个操作过程时间短, 约 30 min, 操作简单, 除杂交瘤皿外, 所需设备均为常规细胞培养装置; c. 多微孔杂交瘤皿能快速将单个 CFUs 分离出来, 而不伤害细胞, 且因细胞主要来源于单个克隆, 故纯度较高; d. EPCs 是一种处在不断分化状态的细胞, 该方法容易得到分化程度低的细胞, 而且免疫荧光鉴定所需细胞数目少; e. 如果为 $CD133^+/VEGFR-2^+$ EPCs, 则相应部分继续培养, 即使在后面的培养过程中细胞开始分化, 也能保证其来源于 $CD133^+/VEGFR-2^+$ EPCs; f. 可直接在显微镜下依据 EPCs-CFUs 形态挑选 EPCs, 操作简便.

由于全骨髓接种还形成多种细胞集落单位, 如成纤维细胞集落形成单位(fibroblast colony-forming units)、树突状细胞集落形成单位(dendritic cell colony-forming units)、粒细胞-巨噬细胞集落形成单位(colony forming units-granulocyte-macrophage)等, 只有约 7% 的 CFUs 为 $CD133^+/VEGFR-2^+$ EPCs-CFUs, 这也给我们从显微镜下筛选 EPCs-CFUs 增加了一定的难度, 但由于 EPCs-CFUs 的形态非常典型, 即以一团细胞为中心, 从四周游离出圆形、梭形及针样的细胞, 故还是能较准确地显微镜下对 EPCs 进行直接筛选. 细胞免疫荧光鉴定发现从杂交瘤皿分离出 EPCs-CFUs 的几率约为 50%. 由于有些 CFUs 形态与 EPCs-CFUs 非常相似(如以一团细胞为中心, 类似胚胎形成时期的血岛, 其周围游离出许多呈梭形、圆形细胞), 实际上却是 $CD133^-/VEGFR-2^-$ 细胞, 这也是干扰准确挑选 $CD133^+/VEGFR-2^+$ EPCs-CFUs 的不利因素, 故总结出 EPCs-CFUs 形态特征对实现其快速准确挑选非常重要. 微孔法得到的 EPCs 纯度高达 70% 以上 $CD34^+/CD133^+/VEGFR-2^+$ EPCs, 但还是有近 30% 非典型的 EPCs, 有可能是 EPCs 已经部分分化(如 $CD133$ 表达下降), 也有可能原先就混有非 EPCs 来源的细胞, 因

此需要进一步的分析. 接种细胞密度为 10^9 个/ml, 因为微孔的面积很小, 每孔面积大约 3 mm^2 , 故形成多个集落的可能性很少, 实验中出现每孔 2 个集落或 2 个以上集落的几率大约为 1%, 遇到这种情况时一般采用放弃收集该小孔集落细胞.

循环 EPCs 何时分化为成熟的内皮细胞还不清楚, 可能与 EPCs 特异性标记物 $CD133$ 的丢失以及 EC 特异性标记物 WF 的获得有关. 早期骨髓或刚刚从骨髓迁移到循环中的 EPCs 为 $CD133^+/CD34^+/VEGFR-2^+$, 然而循环中 EPCs 为 $CD34^+/VEGFR-2^+/CD31^+/VE-cadherin^+$, 明显失去 $CD133$, 并开始表达 vWF, 这就暗示血液中至少存在 2 种类型的 EPCs^[9]. EPCs 分化过程中有可能在失去 $CD133$ 的同时开始表达 vWF, 也可能随后才开始表达 vWF. EPCs 分化可能从骨髓向外周血迁移开始, 到黏附并整合到成熟内皮单层细胞结束. 关于循环中 EPCs 的寿命以及未被消耗 EPCs 的去向目前并不清楚^[10].

体外培养的 EPCs 在 VEGF、bFGF、SCF 存在条件下, 培养 14 天后 $CD133$ 和 $CD34$ 阳性率呈明显下降趋势, 内皮细胞特异性标志 Flk-1 表达明显增加, 同时 vWF 抗原呈强阳性表达(77.19%). 培养基中没有加细胞因子时, 在 30 天内 $CD133^+$ 细胞既可以向内皮细胞分化, 又可以向造血细胞分化^[11]. 本实验分离出 $CD34^+/CD133^+/VEGFR-2^+$ 细胞, 传代培养 4~5 代后可完全分化为内皮样细胞, 并表达内皮细胞特异性标记物 vWF, EPCs 失去 $CD133$ 并表达 vWF 可能与所处的微环境(培养条件)及细胞固有的性质(自身生物学活性和基因调控)有关, 其可能最终决定了细胞表面特异性标记物丢失时间、成熟快慢、存活时间长短等等. 为了提供有利于内皮祖细胞生长环境, 我们采取 5%~10% 胎牛血清培养并加了有利于内皮细胞生长的细胞因子 VEGF, 因为骨髓源多能干细胞仅在高密度接种无血清或低血清培养基培养下诱导为内皮样细胞, 当血清浓度大于 10% 时则倾向于分化为其他细胞类型, 如成骨细胞、脂肪细胞等^[12].

目前, 构建组织工程化血管所用内皮种子细胞多是从成年动物或人体大血管消化得到的成熟内皮细胞, 这不仅造成新的机体创伤, 而且内皮细胞在体外培养过程中, 细胞扩增量和活性均不理想, 不能完全覆盖血管内壁, 并易受血流剪切力作用脱落, 导致植入的组织工程血管, 尤其是直径小于 5 mm 的血管内形成血栓, 最终引起治疗失败; 内

皮损伤是动脉粥样硬化和血管介入治疗后再狭窄病理过程的关键环节, 促进血管再内皮化是抑制内膜增生的有效方法, 研究证明, EPCs 具有修复受损血管内皮, 实现快速再内皮化的能力^[13,14]. 我们通过微孔法能得到较高纯度的 EPCs, 且这种 EPCs 在体外具有增殖、形成血管样结构、分化为内皮细胞等活性, 其群体倍增数在 30 代以上, 细胞冻存复苏后, 依然具有很强的增殖能力. 因此, 本研究可望为血管组织工程血管化和血管再狭窄干细胞治疗提供高活力的内皮种子细胞.

参 考 文 献

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964~967
- Peichev M, Naiyer A J, 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
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 2001, **89**: e1~e7
- Ito M, Matsubara K, Matsubara Y. Circulating endothelial progenitor cells during normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 2006, **56**: 79~85
- Hill J M, Zalos G, Halcox J P, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 593~600
- Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells*, 2004, **22** (6): 994~1002
- Paola R, Francesco A, Francesco L, *et al.* CD14⁺ CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res*, 2005, **97** (4): 314~322
- Friedrich E B, Walenta K, Scharlau J, *et al.* CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res*, 2006, **98** (3): e20~25
- Hristov M, Erl W, Weber P C. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (7): 1185~1189
- Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*, 2004, **8**: 498~508
- 张威, 周莉, 金惠铭, 等. 用 CD133 免疫磁珠分离脐血内皮祖细胞的实验研究. *中国病理生理杂志*, 2005, **21** (9): 1675~1680
Zhang W, Zhou L, Jin H M, *et al.* Chinese Journal of Pathophysiology, 2005, **21** (9): 1675~1680
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, *et al.* Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 2002, **109**: 337~346
- Werner N, Junk S, Laufs U, *et al.* Intra venous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*, 2003, **93**: e17~e24
- Griese D P, Ehsan A, Melo L G, *et al.* Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation*, 2003, **108**: 2710~2715

Isolation of Rat Bone Marrow Derived-Endothelial Progenitor Cells by Micropore-Method*

WANG Zuo^{1)**}, TONG Zhong-Yi^{1,2)}, ZHOU Xiao-Feng¹⁾, JIANG Zhi-Sheng¹⁾,
TANG Chao-Ke¹⁾, SONG Yan-Ming¹⁾, TIAN Yong-Feng¹⁾

¹⁾ Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China;

²⁾ Basic Medical Department of Changde Vocational College, Changde 415000, China)

Abstract To explore a new way to purify EPCs, hybridoma dish was used to isolate EPCs from rat bone marrow-derived cells, according to the morphology of endothelial progenitor cells colony-forming units (EPCs-CFUs) and special markers of EPCs. The bone marrow derived cells, from rat femoral bone and shinbone, were plated and cultured on hybridoma dish which was made of polystyrene. Between 4th and 7th days in culture, stem cells colony-forming units were picked out respectively under microscope. Then one part of this cells was identified by immunofluorescence staining of CD133⁺vEGFR-2⁺, the special markers of EPCs. If the both markers of this part was positive, the rest part of the cells was continuously cultured for passaging. This method was named as “Micropore-Method”. The conspicuous stem cells colony-forming units were observed under microscope after four days in culture, about 7% CFUs were CD133⁺/VEGFR-2⁺ positive EPCs-CFUs. After further culturing 7 days, Purity of cells with special markers of CD133⁺/VEGFR-2⁺/CD34⁺ was over 70% identified by flow cytometry. Passaging cells can form capillary tube like formation and differentiate to endothelial like cells expressing EC special marker vWF. It can be concluded that “Micropore-Method” is a new successful way to isolate EPCs from rat bone marrow.

Key words hybridoma dish, isolation, rat bone marrow, endothelial progenitor cell, Micropore-Method

*This work was supported by a grant from China Postdoctoral Foundation (2005038472).

**Corresponding author . Tel: 86-734-8281277, E-mail: nb12@263.net

Received: December 18, 2006 Accepted: April 30, 2007