

· 论著 ·

人脐血来源内皮祖细胞的纯化鉴定及定向分化的研究

谢松涛 陈璧 陶克



【摘要】 目的 检测 CD133⁺ 血管内皮祖细胞 (EPC) 的细胞表面标志物, 鉴定其生物学特性。方法 采用免疫磁珠法分离人脐血 EPC, 用 EGM-2MV 培养基 [含表皮生长因子 (EGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF) 2 等具有诱导分化作用的细胞因子] 进行体外培养。应用流式细胞术、免疫组织化学等方法检测 CD133⁺ 细胞的比例、原代 EPC 的生长曲线及生长特性。透射电镜查找 Weibel-Palade 小体。同时设计 EPC 裸鼠成瘤实验, 观察瘤体生长及血管增生情况, 以鉴定 EPC 的生物学特性。结果 CD133⁺ 细胞在免疫磁珠分离前后的比例各为 0.91% 及 85.52%。EPC 原代培养时细胞形态正常、密度均匀, 前 3 d 为相对抑制期, 此后快速增殖, 10 d 后达 80% ~ 90% 融合。EPC 生长曲线显示, 接种后 5 d 内细胞数量无明显变化, 从第 7 天开始明显增加, 第 17 天达高峰。光学显微镜下可见, 原代 EPC 贴壁后呈梭形, 接种后 7 d 数量明显增加, 呈克隆状生长。透射电镜观察到, 细胞膜伸出许多伪足丝, 基底膜呈多层; 细胞质内可见一种短棒状小体, 含平行管状的内部结构, 即 Weibel-Palade 小体, 确定其为 EPC。裸鼠成瘤实验可见 EPC 组肿瘤瘤体及血管数量大于或多于对照组; 抗人血管性假血友病因子 (vWF) 免疫荧光染色显示, 大量 EPC 参与肿瘤血管生成。结论 本实验分离培养的 CD133⁺ 细胞具有分化为成熟血管内皮细胞的能力, 即为 EPC。裸鼠成瘤实验初步证明 EPC 参与血管重建, 具有促进血管新生、加速缺血组织血管化的作用。

【关键词】 胎血; 抗原, CD133; 抗原, CD34; 内皮祖细胞; 免疫磁珠

Purification, identification and oriented differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood XIE Song-tao, CHEN Bi, TAO Ke. Center of Burns, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, P. R. China

Corresponding author: CHEN Bi, Email: burns@fmmu.edu.cn, Tel: 029-84775570

【Abstract】 Objective To explore the endothelial progenitor cell markers and biological characteristics of human CD133⁺ umbilical cord blood cells (EPC). Methods CD133⁺ cells were enriched from human umbilical cord blood by immunomagnetic sorting, and cultured with EGM-2MV medium containing epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2. The percentage of CD133⁺ cells in cord blood monocytes, the growth curve and growth characteristics of primary EPCs were measured by flow cytometry and immunochemistry method. Weibel-Palade body was observed with transmission electron microscope. The mixture of EPCs and human stomach cancer cell line GC7901 were injected into athymic mice to observe the tumor growth and vascularization. Results The percentage of CD133⁺ cells in cord blood monocytes was 0.91%, and after sorting, the percentage of CD133⁺ cells was raised to 85.52%. The cultured cells showed a typical spindle-shaped morphology in 3 post-culture days (PCD) and areas of clusters of cobblestone-like cells in 10 PCD. The number of EPC increased from 7 PCD on, peaked on 17 PCD. Obvious amplification and clone-like growth on 7 PCD were observed by light microscope. Typical Weibel-Palade body was observed in the cells under transmission electron microscope. Tumor forming experiment in athymic mice showed that the tumor size of EPC group was larger than that of control with smaller necrosis area and more and larger blood vessels. Immuno-fluorescent staining showed many human vWF antigen-positive endothelial cells being involved in the tumor vascularization. Conclusion Immunomagnetic sorting can efficiently enrich EPC from human umbilical cord blood. Our data support that the EPC may contribute to angiogenesis, speed up vascularization of ischemic tissue.

【Key words】 Fetal blood; Antigens, CD133; Antigens, CD34; Endothelial progenitor cell; Immunomagnetic sorting

一般认为内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 仅见于胚胎时期, 但近年来的研究表明, 在成年个体中也存在少量的 EPC^[1-3]。1997 年 Asahara 等^[4]报道在成人外周血中分离出 EPC, 体外

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院全军烧伤中心
通信 (讯) 作者: 陈璧, Email: burns@fmmu.edu.cn, 电话: 029-

培养呈梭形,具有形成管腔样结构的能力,且能够表达成熟内皮细胞(EC)的特异性抗原,在动物实验中可参与新生血管的形成。此后又陆续观察到骨髓和脐血中均存在 EPC^[5-7]。笔者采用免疫磁珠法从人脐血中分离 EPC,摸索 EPC 的体外培养条件,观察其生物学特性,以期治疗性血管发生研究及组织器官移植提供种子细胞。

材料与方 法

1. 主要试剂及标本来源:胃癌 GC7901 细胞株由第四军医大学实验动物研究中心细胞库提供。复方枸橼酸钠抗凝液 B(ACD-B 抗凝液,上海市血液中心);比重 1.077 的淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司);免疫磁珠试剂盒(挪威 DYNAL 公司);纤维粘连蛋白(美国 Sigma 公司);异硫氰酸荧光素(FITC)-CD133 单克隆抗体(美国 R&D 公司);抗人血管性假血友病因子(vWF)单克隆抗体(英国 Serotec 公司);FITC-二抗、辣根过氧化物酶标记的二抗及 CD34 单克隆抗体(丹麦 DAKO 公司);EGM-2MV 培养基(美国 Cambrex 公司)。BALB/c、nu/nu 裸鼠(第四军医大学实验动物研究中心)5 只,雌雄不限,鼠龄 4~6 周,体重 18~23 g;人脐血标本来源于本院 34 例妇产科健康产妇(供者均知情同意)。

2. EPC 的分离及诱导分化培养:将抗凝脐血以 1:2 的比例加入磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,取 7 ml 缓慢加入 3 ml 淋巴细胞分离液,621 × g 离心 30 min,取单个核细胞层,PBS 洗涤 3 次去除血小板。将免疫磁珠与 FITC-CD133 单克隆抗体于室温下孵育 30 min,用 PBS 洗去多余的单克隆抗体。将包被 FITC-CD133 的免疫磁珠加入单个核细胞中,室温孵育 30 min,置于磁场中 1 min。弃细胞悬液,参照免疫磁珠试剂盒说明书分离出 CD133⁺ 细胞。加入 EGM-2MV 培养基[含表皮生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF) 2、氢化可的松、胰岛素样生长因子(IGF)],接种于包被纤维粘连蛋白的 25 cm² 培养瓶中,37℃ 饱和湿度培养。24 h 换液除去未贴壁细胞,3 d 后半量换液,培养 3~4 周。

3. 检测指标:(1) CD133⁺ 细胞的比例:梯度离心后在单个核细胞中加入 FITC-CD133 单克隆抗体,室温孵育 30 min,PBS 洗涤,用流式细胞仪检测 CD133⁺ 细胞在单个核细胞中的比例及免疫磁珠分离后 CD133⁺ 细胞比例。(2) 原代 EPC 的生长曲线:将细胞以 5 × 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板。

接种后 1~19 d 隔日随机抽取 4 个培养孔,噻唑蓝法在波长 490 nm 下测定各孔吸光度(A)值,绘制细胞生长曲线。设只加培养液的培养孔为空白对照。(3) EPC 的鉴定:在培养 5、10 d 的细胞中分别加入 FITC-CD133、CD34、vWF 单克隆抗体,室温孵育 30 min,PBS 洗涤。加入辣根过氧化物酶标记的二抗,二氨基联苯胺(DAB)显色。(4) 取培养 10 d 的细胞行透射电镜观察,寻找 Weibel-Palade 小体。

4. EPC 体内促血管生成实验:将培养的胃癌细胞分为 EPC 组:取 1 × 10⁶ 个/100 μl 原代培养的 EPC 与同量的胃癌 GC7901 细胞混合;对照组:仅为胃癌 GC7901 细胞。两组细胞同时接种于裸鼠两侧背部皮下,距离脊柱 1 cm。14 d 见裸鼠背部接种区明显长出肿瘤(肿瘤长度 > 0.5 cm)后,每周测量肿瘤长、宽及高度,计算其体积。30 d 处死裸鼠取出肿瘤,以 40 g/L 多聚甲醛固定 12 h,常规石蜡切片,HE 染色及 vWF 免疫荧光染色。观察瘤体内血管增生情况、瘤体坏死区域及 EPC 参与构成血管情况,以鉴定 EPC 的生物学特性。

5. 统计学处理:部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

结 果

1. CD133⁺ 细胞的比例:CD133⁺ 细胞在脐血单个核细胞中的比例为 0.91%,免疫磁珠分离后为 85.52%。

2. EPC 原代培养时,细胞形态及密度均匀,前 3 d 为相对抑制期,此后快速增殖,10 d 后达到 80%~90% 融合。EPC 生长曲线显示:人脐血 EPC 接种后 5 d 内细胞数量无明显变化,从第 7 天开始明显增加,第 17 天达高峰,以后增殖趋于平缓。见图 1。

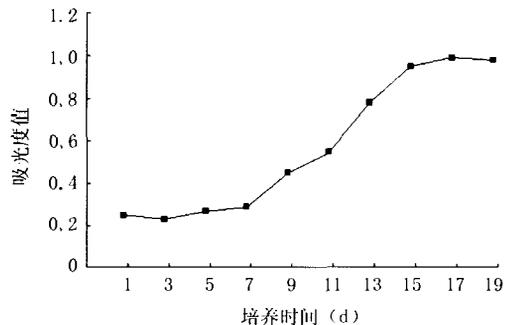


图 1 EPC 生长曲线

3. EPC 的鉴定:原代 EPC 贴壁缓慢,1 d 后将悬浮细胞重新接种培养仍有细胞贴壁生长。EPC 培养 1 d 后,可见部分圆形大单个核细胞黏附于培养瓶

底;3 d后细胞完全贴壁,少量细胞开始伸展。随着诱导培养时间的延长,圆形细胞逐渐减少,梭形细胞逐渐增多。7 d左右出现由十几个细胞形成的细胞集落,并可见较多数量的细胞排列成EC特异性条索状结构或网格状结构。10 d后形成明显克隆,并有梭形贴壁细胞从其边缘不断长出。2~3周细胞长满培养瓶底,单层细胞呈多角形融合成片状。原代细胞诱导培养5 d时,仅见少数CD133及部分CD34、vWF染色阳性;10 d时CD133染色均为阴性,CD34、vWF染色均为阳性(图2)。表明诱导培养出的梭形贴壁细胞就是处于分化状态的EPC。

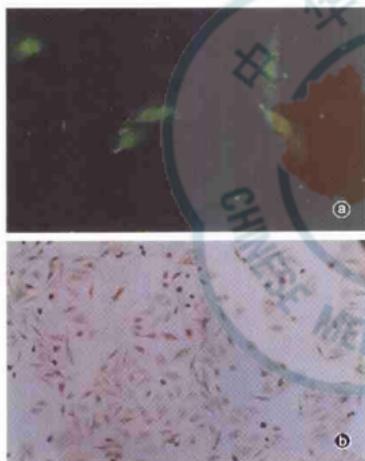


图2 EPC的生长情况。a.培养5 d时仅有少数EPC,CD133染色阳性 FITC $\times 400$; b.培养10 d EPC vWF染色阳性 DAB $\times 100$

4. 原代EPC培养10 d时透射电镜显示,细胞平均直径 $15\ \mu\text{m}$,核质比大。细胞膜伸出许多伪足丝,基底膜呈多层。细胞质内可见一种短棒状小体,含平行管状的内部结构,即Weibel-Palade小体(图3),是EC最具特征性的细胞器。

5. EPC参与构成血管情况及其生物学特性:5只裸鼠接种细胞7 d后均见肿瘤快速生长,EPC组肿瘤瘤体 $(2.4 \pm 0.9)\ \text{cm}^3$,明显大于对照组 $(1.3 \pm 0.6)\ \text{cm}^3$,两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HE染色可见两组肿瘤中心均有不同程度坏死,但对对照组坏死区域明显大于EPC组;血管数量及血管内皮细胞明显少于或小于EPC组。抗人vWF免疫荧光染色显示天量EPC参与肿瘤血管构建(图

4)。

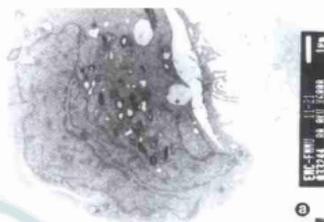


图3 原代EPC培养10 d透射电镜观察结果。a. EPC超微结构,透射电镜 $\times 5,000$; b. Weibel-Palade小体透射电镜 $\times 50,000$



图4 裸鼠肿瘤HE染色及vWF免疫荧光染色。a. EPC组血管明显增生 HE $\times 60$; b. EPC参与血管构建 vWF免疫荧光染色 $\times 60$

讨论

EPC和成熟EC都表达EC特异性标志物,如血管内皮生长因子受体(VEGFR)2、Tie-1、Tie-2、CD34

