

· 论 著 ·

在海藻酸钠凝胶上诱导骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的研究*

胡 帅¹, 王 嫣^{1△}, 陈小菊², 周 兰³, 陈文直¹

(1. 重庆医科大学生物医学工程系超声医学工程/重庆市市级重点实验室 400016;

2. 重庆医科大学护理学院 400016; 3. 重庆医科大学检验系 400016)

摘要:目的 探讨使用血管内皮细胞生长因子(VEGF)诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)在海藻酸钠凝胶上向血管内皮细胞(VEC)分化的可行性。**方法** 从 Wistar 大鼠骨髓中分离、提纯和扩增 BMSCs 后,加入 10 ng/mL VEGF 诱导培养,12 d 后采用细胞免疫组化和免疫荧光化学染色检测第Ⅷ因子相关抗原(vWF)的表达;RT-PCR 检测内皮素-1(ET-1)的表达。**结果** 诱导后细胞免疫组化染色可见胞浆染为棕黄色,免疫荧光化学染色呈红色,vWF 表达为阳性;RT-PCR 检测显示,诱导后细胞 ET-1 表达为阳性,提示 BMSCs 向 VEC 分化。**结论** 以 VEGF 为诱导剂,可以在海藻酸钠凝胶上将 BMSCs 成功地诱导为 VEC,海藻酸钠凝胶作为良好的载体,可能为人工立体血管网的形成开辟一条新的路径。

关键词:骨髓间充质干细胞;血管内皮细胞;海藻酸钠凝胶;分化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.001

中图分类号:R457.7;R322.12

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2089-03

Induction of bone marrow mesenchymal stem cells to form vascular endothelial cells on alginate gels*

HU Shuai¹, WANG Yan^{1△}, CHEN Xiao-ju², et al.

(1. Institute of Ultrasound Engineering in Medicine of Chongqing Medical University, Chongqing

Key Laboratory of Ultrasound Medical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Nursing College, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

3. Department of Medical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To induce bone marrow-derived mesenchymal stem cells(BMSCs) to differentiate into vascular endothelial cells(VEC) on the alginate gels. **Methods** BMSCs were isolated and purified by adherent culture, and were cultured on plane alginate gels with the VEGF- α MEM which contains 10 ng/mL VEGF for 12 days. Cells were observed under light microscope. Subsequent cells on the coverslip were observed by immunohistochemistry and immunofluorescence with anti-von Willebrand factor polyclonal antibody(vWF). The mRNA of endothelin-1(ET-1), which were VEC related gene was determined by RT-PCR. **Results** The cytoplasm was stained by immunofluorescence showed red fluorescence and stained by immunohistochemistry showed brownish yellow. The mRNA of ET-1 showed positive and prompted the differentiation of BMSCs to the VEC. **Conclusion** BMSCs can be differentiated into VEC with VEGF on the plane alginate gels.

Key words: bone mesenchymal stem cells; vascular endothelial cells; alginate gels; differentiation

种子细胞的来源及如何为组织工程化器官提供血供是目前血管组织工程面临的两大关键问题^[1]。血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)作为血管组织的种子细胞是组织工程化血管的核心,是血管外科和心脏外科血管移植物的主要材料,但其来源较困难,自体细胞不易获取,体外扩增能力有限,异体细胞存在免疫原性而较难应用。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)获取容易,来源广泛,且具有多向分化潜能,是目前组织工程种子细胞的研究热点。而如何采用干细胞体外诱导分化,产生大量血管内皮细胞一直是该研究领域的焦点和难点^[2]。目前国内外均能在体外诱导 BMSCs 分化为 VEC,但其在培养瓶中培养,细胞只能在平面生长,不利于立体组织的形成;且在诱导后移植过程中又有诸多不便。因此寻找一种既能使细胞在其上生长形成立体血管组织、又便于后续组织工程化血管移植的载体就非常重要。海

藻酸钠凝胶具有无毒性、生物相容性良好和凝胶过程温和等特点,而且在本课题组的前期研究中证实了海藻酸钠凝胶对 BMSCs 生长及向成骨细胞分化均有促进作用^[3-4],由此作者首先进行在平面海藻酸钠凝胶上诱导 BMSCs 分化为 VEC 的初步研究,以探讨诱导 BMSCs 在海藻酸钠凝胶上向 VEC 分化的可行性,并为之之后 BMSCs 在三维立体海藻酸钠凝胶上分化为 VEC,并进一步形成血管组织打下良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 清洁级 Wistar 大鼠购于重庆医科大学动物中心,雄性,1 个月龄,体质量 80 g 左右。海藻酸钠购于挪威 Novamatrix 公司, α -MEM 培养基和胎牛血清购于美国 Hyclone 公司, RNA 试剂盒、随机引物(Olig dT)及逆转录酶(M-MLV)购于鼎国生物技术责任有限公司,重组大鼠血管内皮细胞生长因子(VEGF)购于美国 R&D 公司,抗第Ⅷ因

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470885);重庆市自然科学基金计划资助项目(CSTC,2009BB5261)。△ 通讯作者,E-mail: wangyanqc@gmail.com。

子相关抗原(vWF)抗体购于英国 Abcam 公司,罗丹明标记山羊抗兔二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司, CaCl₂、甲胺胺蓝为重庆无机化学试剂厂产品,内皮素-1(ET-1)引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。原代细胞提取冲洗液为 α -MEM、10%胎牛血清、10%青霉素/链霉素等,完全培养液为 α -MEM、10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素等。内皮细胞诱导培养液为 α -MEM、10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素、10 ng/mL VEGF 等。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 分离、纯化和扩增^[3] 将 1 个月龄 Wistar 大鼠断颈处死,浸泡于 75%乙醇中 5 min,无菌取出大鼠四肢骨,尽量除去四肢骨上附着的肌肉和筋膜等杂质,用含普通培养液中所含抗菌药 10 倍量的原代细胞提取冲洗液将骨髓冲入离心管,1 000 r/min 离心 5 min,用完全培养液重悬后,以 5×10^6 个的细胞数接种入 250 mL 塑料培养瓶中,在 37 °C、5%CO₂、饱和湿度条件下培养。24 h 后首次更换培养液,以后每 2~3 天换液 1 次。6~7 d 细胞长满瓶底 90%,用含 10 mmol/L EDTA 的 0.1%胰蛋白酶消化,重悬浮细胞,并以 5×10^5 个的细胞数接种于培养瓶中传代,2~3 d 更换培养液。传至第 2 代备用。

1.2.2 平面海藻酸钠凝胶的制备^[3] 用 0.1%PBS 配制 6%海藻酸钠水溶液,搅拌均匀,高温、高压(120 °C、0.15 MPa)灭菌,4 °C 备用;种入细胞前用 α -MEM 稀释,终浓度为 3%。吸取 3%海藻酸钠水溶液 700 μ L 滴入 12 孔塑料培养板孔内,在孔内形成约 1 mm 厚度的圆盘,再滴入 0.1% CaCl₂ 2 mL 于圆盘上,静置 40 min。待凝胶形成后弃去 CaCl₂,改用 2 mL α -MEM 浸泡,放入 4 °C 冰箱,每 24 小时换液 1 次,72 h 后用于细胞培养。

1.2.3 诱导分化 将 2 或 3 代 BMSCs 以 1×10^5 个/孔接种于已制备的平面海藻酸钠凝胶上,采用内皮细胞诱导培养液培养。

1.2.4 免疫荧光化学染色 细胞爬片 vWF 免疫荧光化学染色,未诱导 BMSCs 作为阴性对照。细胞在诱导到第 12 天后做细胞爬片,用 4%多聚甲醛固定;3% H₂O₂ 去离子水孵育 5~10 min 以清除内源性过氧化物酶活性;用蒸馏水冲洗,0.1 M PBS 浸泡 5 min;滴加 10 μ L 正常山羊血清封闭液,室温下孵育 15 min 倾去;滴加 10 μ L 适当稀释的一抗(抗 vWF 抗体),37 °C 孵育 2~3 h,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;加入罗丹明标记山羊抗兔二抗,37 °C 避光孵育 2~3 h,PBS 冲洗同前;用甘油封片;荧光显微镜下观察并摄像。

1.2.5 免疫组化染色 以 Wistar 大鼠舌组织石蜡包埋切片的血管 vWF 免疫组化染色为阳性对照,未诱导 BMSCs 作为阴性对照。细胞在诱导到第 12 天做细胞爬片后,用 4%多聚甲醛固定。标本与 Wistar 大鼠舌组织石蜡包埋血管切片及未诱导的 BMSCs 细胞爬片同时进行免疫组化染色:用 3% H₂O₂ 去离子水孵育 5~10 min 以清除内源性过氧化物酶活性;蒸馏水冲洗,0.1 M PBS 浸泡 5 min;滴加 10 μ L 正常山羊血清封闭液,室温下孵育 15 min 倾去;滴加 10 μ L 适当稀释的一抗(抗 vWF 抗体),37 °C 孵育 2~3 h,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;滴加生物素化二抗工作液,室温下孵育 15 min;PBS 冲洗同前;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温下孵育 15 min;PBS 冲洗

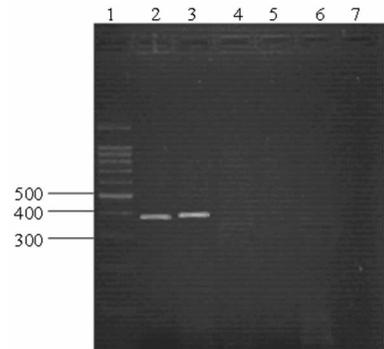
后 DAB 显色剂显色;用自来水充分冲洗后脱水,透明,封片。

1.2.6 RT-PCR 检测 ET-1 表达 提取培养 12 d 细胞的总 RNA 进行 RT-PCR 检测,ET-1 基因引物序列为:5'-AGG AGT GTG TCT ACT CTG CCA CC-3',5'-CGA AAG GAG GTC TTG ATG CTG TTG C-3',扩增产物为 383 bp。

2 结 果

2.1 免疫荧光化学染色和免疫组化染色检测结果 vWF 在荧光显微镜观察下,细胞胞浆发出红色荧光(插图 I 图 1),且为强阳性。用鼠舌组织作为 vWF 免疫组化染色的阳性对照,其血管内皮胞浆染为棕黄色;爬片上诱导后的细胞可见部分细胞胞浆染色阳性(插图 I 图 2)。未诱导的 BMSCs 两种检测结果均为阴性。

2.2 ET-1 的表达 BMSCs 被诱导培养 12 d 后 ET-1 表达阳性(图 3)。



1: Marker; 2: ET-1 的表达; 3: GAPDH 的表达

图 3 BMSCs 分化为 VEC 的相关基因表达结果

3 讨 论

到目前为止,能够用于临床的组织工程产品数量非常有限,仅局限于几种皮肤和软骨的组织工程产品。其中主要原因之一就是组织工程的血管化问题难以解决。一般认为细胞在血管周围 150~200 μ m 内才能通过弥散来维持存活^[5]。如果不能建立内在的血液循环,组织工程化组织细胞将在短期内大量死亡,进而导致构建组织工程化组织失败^[6]。要构建有一定体积的三维组织工程化组织,就必须考虑早期血管化这一关键问题。

目前构建组织工程化血管的途径有^[6]:(1)构建毛细血管网。应用单层 VEC 植入合成材料内壁,构建出明显的毛细血管网。但这种 VEC 属于已成熟细胞,其分裂增殖能力低下且还存在去分化的倾向,致使管壁中段内皮细胞有时不完全,平滑肌生长也不完整。(2)体内埋植构建轴向血管。将组织工程化组织植入机体的皮下、肌肉或骨膜下等区域,该区域必须包含有一定管径的血管,达到可以用显微外科方法吻合。但此法容易损伤预构区组织,带来各种并发症,此外二次转瓣和吻合时对组织工程化组织新生血管是有创伤的,不利于组织再生。以上途径均面临技术上急需解决的关键问题,血管化成功率较低,因此找寻更为优良的种子细胞并于体外构建完善的血供体系是当前研究的热点。

BMSCs 作为种子细胞的作用备受重视,其具有其他细胞所不可比拟的优越性:(1)从自身骨髓培养扩增的 BMSCs 诱导为 VEC 不存在组织相容性问题;即使是同种异体, BMSCs

也属于未分化的前体干细胞,具有免疫独特性,其细胞表型的分化尚不成熟,移植的排斥反应较弱。(2)BMSCs 具有旺盛的增殖分化潜能,多次传代后仍然保持相同形态和无接触抑制的特点^[7],并且在无诱导剂情况下,可保持 25 代内无分化趋势。郭新和李玉林^[8]认为利用 BMSCs 进行血管内皮构建,可促进工程化器官的血管再生、机体缺血性疾病的治疗,同时也解决了再生小口径血管($<5\text{ mm}$)易发生血栓的问题,具有广阔的应用前景。加之骨髓作为 BMSCs 的来源具有易获取、BMSCs 易分离、体外培养条件要求不高等特点,因此被认为是血管组织工程种子细胞的理想来源^[9]。有学者提取 BMSCs 经 VEGF、表皮生长因子和皮质醇激素诱导 3 周,同样诱导出具有内皮特性的细胞,并发现有一些细胞因子分泌^[10]。Liang 和 Wang^[11]应用 VEGF 和碱性成纤维生长因子诱导 BMSCs 后发现,细胞形成血管腔样结构,周围有成铺路石样排列的内皮样细胞。以上研究结果均提示 BMSCs 可向 VEC 分化。

但是在之前的研究中采用的平面培养系统,不利于立体血管组织的形成;且在诱导后移植过程中又有诸多的不便。因此需要寻找一种既能使细胞在其上生长形成立体组织,且便于后续组织工程化血管移植的载体。海藻酸钠凝胶具有良好的生物相容性,即无毒性、不致敏、不致癌和不致畸,植入后也无免疫原性,同时具有良好的可塑性,能被方便加工成所需的形状,以形成符合设计外形的新组织,因此得到了越来越多专家和学者的重视和应用^[12]。Sasa 等^[13]采用海藻酸钠凝胶作为微球载体,在其上对人 BMSCs 培养及定向分化进一步证实了海藻酸钠凝胶载体对 BMSCs 生长、增殖及诱导分化为成骨细胞和脂肪细胞过程中的促进作用。本课题组前期研究表明,BMSCs 在海藻酸钠凝胶上能很快适应微环境改变,迅速黏附、贴壁进入增殖期,并且能促进 BMSCs 诱导分化为成骨细胞^[3-4]。因此作者进一步尝试在海藻酸钠凝胶上诱导 BMSCs 分化为 VEC,初步探讨在海藻酸钠凝胶上形成立体血管网的可行性。

目前鉴定 VEC 的特征性标志,包括 vWF、CD31、KDR(又称 VEGFR-2)、fit-1、Tie-1、Tie-2 和 VE-钙黏素、ET-1 等,早期还表达 CD34 抗原^[14]。本研究选择了 2 种因子(vWF 和 ET-1)分别进行检测,对 vWF 的表达进行免疫组化染色和免疫荧光化学染色,发现在海藻酸钠凝胶上诱导 12 d 的细胞经免疫组化染色为棕黄色,免疫荧光化学染色呈红色,证明诱导的细胞中分泌 vWF。ET-1 属于内皮素家族,是由 21 个氨基酸组成的多肽,是已知的最有力的内源性血管收缩因子,它主要由血管内皮产生并介导包括血管收缩、白细胞激活和细胞增生(血管重构)等一系列反应,血管 VEC 通过释放 ET 收缩血管和促进 VEC 增殖^[15]。本研究结果显示,ET-1 表达为阳性,也进一步提示 BMSCs 已经分化为 VEC。这一结果也显示了海藻酸钠凝胶不影响 BMSCs 向 VEC 分化。

本研究结果初步证实了在平面海藻酸钠凝胶上 BMSCs 能够定向诱导分化为 VEC,为进一步研究 BMSCs 在三维立体海藻酸钠凝胶上向 VEC 分化进而形成便于移植的血管组织打下坚实的实验基础。

综上所述,以 VEGF 为诱导剂可以将 BMSCs 在海藻酸钠

凝胶上成功地诱导为 VEC,为组织工程血管化提供获取方便、可以大量扩增种子细胞,同时也为海藻酸钠凝胶成为组织工程化血管形成过程中可选择的、较好的支架提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 张志,姚敏,许伟石. 组织工程血管化的研究进展[J]. 中华烧伤杂志,2004,20(5):318.
- [2] 丁洋,万圣云. 体外诱导骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化的研究[J]. 医学综述,2008,14(7):987.
- [3] 王嫣,陈小菊,周兰,等. 海藻酸钠凝胶对骨髓间充质干细胞生物学效应的初步研究[J]. 重庆医科大学学报,2006,31(4):478.
- [4] 王嫣,陈小菊,周兰,等. 在海藻酸钠凝胶上诱导骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(9):38.
- [5] Colton C. Implantable biohybrid artificial organs[J]. Cell Transplant,1995,4:415.
- [6] 董青山,毛天球. 骨组织工程血管化技术的构建思路[J]. 国际口腔医学杂志,2008,35(3):321.
- [7] 董鸿铭,柏树令. 小鼠骨髓基质干细胞的培养及常见的组化染色方法[J]. 中国医科大学学报,2004,33(4):294.
- [8] 郭新,李玉林. 间充质干细胞分化为 VEC 的意义和细胞学基础[J]. 生理科学进展,2005,36(3):204.
- [9] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cell[J]. Science,1999,284:143.
- [10] Gang EJ, Jeong JA, Han S, et al. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells[J]. Cytotherapy,2006,8(3):215.
- [11] Liang F, Wang YF. In vitro differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into blood vessel endothelial cells[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao,2005,27(6):665.
- [12] Humacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage[J]. Biomaterials,2000,21(24):2529.
- [13] Sasa Trkov, George Eng, Rosa DL, et al. Micropatterned three-dimensional hydrogel system to study human endothelial-mesenchymal stem cell interactions[J]. Tissue Eng Regen Med,2009,10(2):231.
- [14] Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, et al. Tek, a novel tyrosine gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their precursors[J]. Oncogene,1992,7(8):1471.
- [15] 冯勇,胡海地,段志泉,等. 大鼠自体移植静脉血管平滑肌细胞增殖与血浆内皮素变化关系的动态研究[J]. 中国医科大学学报,2002,31(5):341.