

· 基础研究 ·

无血清条件下骨髓间充质干细胞增殖及分泌 VEGF 的实验研究*

林育辉¹, 何晓青^{1△}, 陈敏生², 陈晞明¹

(1. 广州医学院第三附属医院心内科, 广州 510150; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

摘要:目的 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)在不同无血清培养时间下增殖及分泌血管内皮生长因子(VEGF)的规律。方法 采用贴壁培养法纯化 BMSCs, 流式细胞仪鉴定第 3 代(P3) BMSCs 的细胞表型; 比较 BMSCs 在不同无血清培养时间下的细胞凋亡率; 将 BMSCs 分为无血清培养 12、24、36、48 及 72 h 组, 用 ELISA 方法检测 VEGF 的分泌。结果 原代 BMSCs 培养 24 h 后贴壁生长良好; 经流式细胞仪检测, BMSCs 表面 CD34、CD45 阴性, 而 CD29、CD44、CD90 阳性, 符合 BMSCs 特征; 无血清培养 12、24、36、48、72 h 后细胞凋亡率组间比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 培养 96 h 后凋亡率与其余各组比较差异有统计学意义($P<0.05$); 随着无血清培养时间的延长, BMSCs 分泌 VEGF 逐渐增多($P<0.05$), 无血清培养 72 h 组分泌 VEGF 水平最高。结论 大鼠 BMSCs 在无血清培养条件下, 72 h 内细胞凋亡无明显增多, 且随着无血清培养时间的延长, 分泌 VEGF 逐渐增多。

关键词:血管内皮生长因子 A; 骨髓间充质干细胞; 贴壁法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.11.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)11-1257-02

Experimental study of proliferation and vascular endothelial growth factor expression of bone marrow mesenchymal stem cells under serum-free medium*

Lin Yuhui¹, He Xiaqing^{1△}, Chen Minsheng², Chen Ximing¹

(1. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510150, China; 2. Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To explore the law that BMSCs proliferation and secretion of VEGF under serum-free medium by different cultured time. Methods Using the adherent method to purify BMSCs, cell phenotypes of third-generation(P3) BMSCs were detected by flow cytometry. Compare the cell apoptosis rate of BMSCs under serum-free medium by different cultured time; According to the serum-free culture time. BMSCs were divided into 12, 24, 36, 48 and 72 h group, then using ELISA method to detection the secretion of VEGF. Results After 24 h culturation, primary BMSCs grew well. Cell phenotypes of BMSCs by flow cytometry, showing CD34, CD45 negative, while CD29, CD44, CD90 positive, in line with BMSC features. The cells apoptosis rate of BMSCs cultured under serum-free medium by 12, 24, 36, 48 and 72 h were no significant difference($P<0.05$), but had statistics difference by 96 h ($P>0.05$). BMSCs had secreted the highest level of VEGF under serum-free medium of 72 h group, and 12 h group<24 h group<36 h group<48 h group<72 h group($P<0.05$). Conclusion Cells apoptosis rate no significant increase within 72h in serum-free culture conditions, and according to the serum-free culture time increased, secretion of VEGF increased too. So this experimental results laiding the foundation for the next experiment.

Key words: vascular endothelial growth factor A; bone marrow mesenchymal stem cells; adherent method

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多向分化、自我增殖的能力,且取材方便、易于培养增殖,成为目前医学组织工程学理想的种子细胞^[1-2]。心肌梗死的治疗与血管新生密切相关, VEGF 是一种促进血管生成的重要细胞因子。因此,能够旁分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是 BMSCs 移植治疗心肌梗死取得疗效的另一个重要因素^[3-4]。目前,越来越多研究证实, BMSCs 在移植治疗心肌梗死方面具有确切疗效,然而对于 BMSCs 移植到缺血缺氧组织后,细胞生存及功能状态的变化尚不清楚。本实验通过无血清培养模拟体内缺血环境,探讨 BMSCs 在缺血环境下自身增殖及分泌 VEGF 的规律,为 BMSCs 在治疗心肌梗死方面提供理论及实验依据。

1 材料与与方法

1.1 材料 3 周龄 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 110~130 g,由

广东省医学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 胎牛血清、胰蛋白酶、HG-DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);大鼠 IgG1-PE、大鼠 IgG1-FITC、仓鼠 IgG1-PE、CD29-PE、CD44-PE、CD90-FITC、CD34-PE、CD45-PE(美国 Sigma 公司);VEGF165 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);Annexin V Apoptosis Detection Kit(美国 BD Pharmingen 公司)。
1.3 主要仪器 FORMA3111 水套 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);倒置相差显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.4 方法

1.4.1 BMSCs 的分离 取 SD 大鼠,3%戊巴比妥钠 2 mL/kg 腹腔注射麻醉,将其置于 75%乙醇中浸泡 15 min。无菌条件下去除大鼠双下肢皮肤,钝性分离肌肉组织,完整取出股骨。将取出的骨头置于装有无菌磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered

* 基金项目:2012 年广东省医学科研基金面上项目(A2012266);2011 年广州市医药卫生科技一般引导项目(201102A213113);2012 年广州医学院第三附属医院青年项目(2012Y02)。作者简介:林育辉(1984~),住院医师,硕士,主要从事心血管疾病的研究工作。△ 通讯作者, Tel:13560451478;E-mail:xiaoqinghe@126.com。

saline, PBS) 溶液的培养皿中反复冲洗除去骨头外面的血液及残留肌肉组织; 钳剪股骨两端软骨, 剩下骨干。用 10 mL 注射器抽取含 20% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 HG-DMEM 培养基 6 mL, 将注射器针头插入骨髓腔内反复冲洗, 直至骨髓腔无骨髓组织残留。收集骨髓悬液于 15 mL 离心管中, 1 500 r/min 室温离心 8 min, 弃上清, 用 10 mL 含 20% FBS 新鲜 HG-DMEM 培养基重悬细胞, 转移至 2 个 T-25 cm² 细胞培养瓶中。

1.4.2 大鼠 BMSCs 的原代培养 置于 5% CO₂, 37 °C 的饱和湿度培养箱中培养。24 h 后用含 10% FBS 新鲜 HG-DMEM 培养基更换旧培养液, 同时弃去未贴壁细胞, 以后每 3 天更换培养基 1 次。细胞长满瓶底接近 90% 时, 进行传代培养。

1.4.3 大鼠 BMSCs 传代扩增培养 原代细胞长满至培养瓶底约 90% 时, 除去旧培养基, 加入无菌 PBS 溶液以去除残留培养基, 再除去 PBS 溶液。加入 0.25% 胰蛋白酶 1 mL 消化细胞, 镜下观察细胞之间突起消失、细胞变圆钝后, 除去胰蛋白酶; 接着加入含 10% FBS 的 HG-DMEM 细胞培养基, 并用吸管轻柔吹打瓶底贴壁细胞成单细胞悬液。按 1:2 传代, 传代后细胞置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中继续培养。第 1 次传代细胞为 P1 (第 1 代), 以后每隔 3~4 d 传代 1 次。

1.4.4 大鼠 BMSCs 的鉴定 P3 代细胞长至瓶底约 90%, 用胰蛋白酶将细胞消化成单细胞悬液, 细胞计数仪辅助下, 调整每支检测管为 5×10^5 的细胞数目。室温下 1 000 r/min 离心 5 min, 去除上清液。用无菌 PBS 洗涤检测管细胞 2 遍, 最后每个检测管各加入 100 μL 无菌 PBS 溶液, 加入 CD29、CD34、CD44、CD45、CD90 一抗及同型阴性对照各 10 μL, 小心摇晃均匀。室温下避光孵育 15 min, 每检测管再加入无菌 PBS 1 mL 后于流式细胞仪检测各项指标。

1.4.5 无血清培养下 BMSCs 凋亡情况 取 P3 代 BMSCs, 按

1×10^4 个/孔接种于 24 孔培养板中, 接种后先用含 10% FBS 培养 12 h, 待细胞贴壁后, 换为无血清 DMEM 培养基继续培养, 然后在第 12、24、36、48、72、96 h 随机抽取 3 孔 (实验重复 5 次), 消化细胞离心后转移到流式细胞仪专用检测管, 并按凋亡检测试剂盒说明操作 (Annexin V-PE 及 7-AAD 双染), 上机检测细胞凋亡情况。

1.4.6 VEGF 表达水平 根据无血清培养的时间, 将骨髓间充质干细胞分为无血清培养 12、24、36、48、72 h 组, 每组细胞均独立培养在一个 24 孔细胞培养板, 每次检测均做副孔, 实验重复 3 次, 以 ELISA 法检测 VEGF 的分泌水平, ELISA 操作步骤依照说明书进行。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠 BMSCs 的培养 刚转移至培养瓶时 BMSCs 为悬浮呈球形的单个核细胞。6~8 h 显微镜下可观察到部分细胞开始沉降于瓶底并贴壁生长。24 h 首次更换培养液, 多数细胞已贴于瓶底生长, 不随换液而流失。但贴壁细胞数目较少, 可呈短梭形或多角形 (图 1A)。首次换液后细胞生长增殖加快, 细胞偶有双核, 细胞集落形成可于接种后第 3 天开始出现, 细胞形态也发生变化, 可为短棒状或纤维样, 旋涡状或平行排列 (图 1B)。传代后细胞生长迅速, 6 d 后相邻集落可融合成片, 类似纤维细胞状长满培养瓶底, 细胞间界限可变模糊, P3 细胞第 6 天, 见图 1C。

2.2 大鼠 BMSCs 细胞表型 P3 BMSCs 细胞表面标志物经流式细胞仪鉴定结果: CD29、CD44、CD90 阳性, 而 CD34、CD45 阴性, 符合大多数文献所报道的 BMSCs 表面特征。

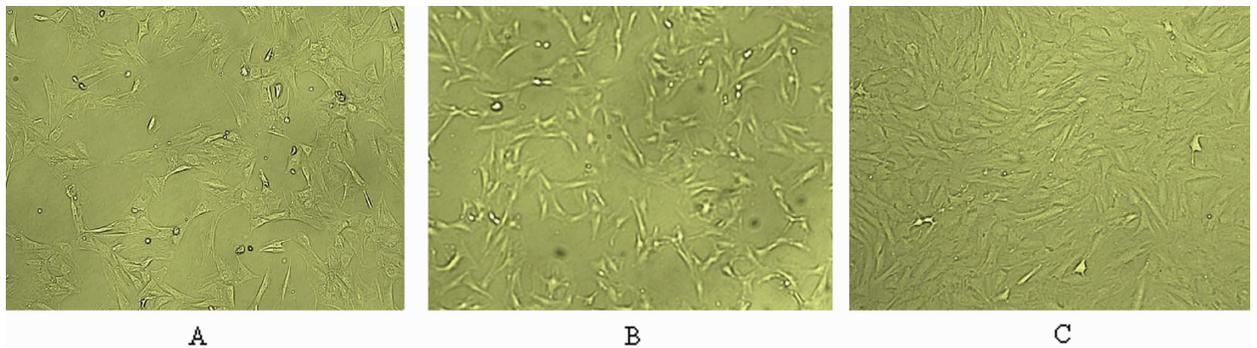


图 1 大鼠 BMSCs 培养 (10×10)

2.3 无血清培养下 BMSCs 凋亡情况 BMSCs 无血清培养 12、24、36、48、72 h 后细胞凋亡率分别为 (7.93 ± 0.41)%、(8.51 ± 0.55)%、(8.58 ± 0.31)%、(8.67 ± 0.25)%、(8.43 ± 0.41)%。组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在培养 96 h 后凋亡率为 (9.93 ± 0.44)%。与其余各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 VEGF 表达水平 BMSCs 无血清培养 12、24、36、48、72 h 后 VEGF 浓度分别为 (354.3 ± 12.9) pg/mL、(395.8 ± 11.2) pg/mL、(432.7 ± 16.1) pg/mL、(472.9 ± 13.5) pg/mL、(512.1 ± 12.3) pg/mL。随着无血清培养时间的延长, BMSCs 分泌 VEGF 逐渐增多 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

BMSCs 移植治疗心肌梗死等缺血性心脏病取得疗效包括

以下几方面因素^[5-7]: 分化为心肌样细胞、血管内皮样细胞、分泌多种细胞因子、促进新生血管形成, 从而增加缺血部位血液供应、改善心脏功能, 达到治疗目的。

已经证实 BMSCs 在体内或体外都能分泌一些促进血管生成的细胞因子^[4], 其中就包括了 VEGF。VEGF 是一种强效促进血管生成的细胞因子, 可促进心肌缺血区血管新生, 形成新的毛细血管网, 增加侧支循环, 改善血供, 缩小心肌梗死面积。VEGF 存在多种亚型, 其中 VEGF165 是其主要活性形式之一, 在机体中最常见、浓度最高, 为可溶性, 可以分泌到细胞外基质中发挥作用, 故本实验以 VEGF165 作为检测 VEGF 分泌水平的指标^[8]。

无论在急性心肌梗死区域还是在慢性心肌缺血部位, 缺血都是引起心肌细胞坏死凋亡的首要因素。若 (下转第 1262 页)

感等呼吸性传染病事件,托幼机构则主要是手足口病等接触性传染病事件,这与其他省市类似^[7-8]。中小学校和托幼机构是一个特殊场所,具有明显的聚集性、流动性和社会性,为传染病的传播提供了有利条件^[3],一旦卫生设施不足、防病意识不够,很容易导致传染病疫情的传播。因此预防控制学校类突发公共卫生事件,(1)要大力改善学校的环境、饮水、食堂等卫生设施;(2)要大力强化卫生防病健康教育,提高学生自我防病意识和能力;(3)要切实落实学校的晨检和缺勤登记制度,及时发现和隔离救治患病学生;(4)疾病预防控制机构关口前移,加强对学校各项防病措施的指导和督促落实。

突发公共卫生事件的报告质量和处置能力亟待提高。2007~2011年,本市达到及时报告的事件数仅占23.4%,与报告规范有较大距离,也低于安徽(28.7%)^[6]、江苏(49.6%)^[8]等地的报道。另外,研究结果显示传染病类事件处置持续时间较长,控制效果不佳。因此要进一步加强各级医疗卫生人员对突发公共卫生事件的早期识别、及时报告的能力和意识,加强与教育等其他部门的联防联控,建立健全敏感的监测体系,提高及时报告水平和处置效果,尽可能预防事件的发生和将事件控制在未分级或低等级事件中,降低事件造成的危害。

参考文献:

- [1] 韩俊峰,王子军.我国2006~2008年学校传染病突发公共卫生事件分析[J].中国学校卫生,2010,31(4):463-

465.

- [2] 雷芝樱,龚健,孟军,等.广西壮族自治区突发公共卫生事件监测与防控对策分析[J].疾病监测,2008,23(7):430-432.
- [3] 王雪燕,龚健,雷芝樱,等.2010年广西突发公共卫生事件流行病学特征及处置情况分析[J].华南预防医学,2011,37(3):5-10.
- [4] 朱小波,师鉴,高伟,等.河北省2008年突发公共卫生事件特点分析[J].河北医药,2009,31(14):1831-1832.
- [5] 陈彩邺,洪荣涛,陈武,等.福建省2004~2009年学校突发公共卫生事件流行病学分析[J].中华疾病控制杂志,2010,14(8):781-783.
- [6] 邢秀雅,陈叶纪,刘永孝,等.安徽省2004~2009年学校突发公共卫生事件分析[J].中国学校卫生,2011,32(10):1231-1233.
- [7] 吴金菊,胡明霞,张俊青,等.合肥市2005~2010年学校突发公共卫生事件分析[J].中国学校卫生,2011,32(12):1471-1472.
- [8] 武晶,祖荣强,汪华.江苏省2007~2008年学校突发公共卫生事件流行病学分析[J].中国学校卫生,2010,31(5):583-585.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-01-22)

(上接第1258页)

周围血管可以形成侧支循环,则可以挽救濒死心肌细胞,而且,侧支循环血管越早形成,血液越早供应至缺血部位,损伤心肌细胞就可以越快恢复功能。血管的形成与血管内皮生长因子密切相关,故移植 BMSCs 至缺血梗死部位后,若能分泌更多的 VEGF,则可以更快地促进血管的形成,以改善心肌供血。但对于 BMSCs 的移植时机尚存在争议,因为 BMSCs 移植到梗死部位后必定面临一个缺血的微环境,移植后其存活及作用能持续多长时间,何时需进行第二次移植,尚未有明确结论。这有赖于对 BMSCs 在缺血环境下的功能状态有着深入了解。由于移植后 BMSCs 整合于心肌组织内,对其功能状态的测定不易进行。故本实验通过体外无血清培养模拟体内缺血微环境,以确定 BMSCs 在这种环境下可存活时间及分泌 VEGF 的时间曲线。实验结果提示 72 h 内 BMSCs 在无血清环境下凋亡率未明显增加,且在 72 h 内 VEGF 随时间延长分泌逐渐增加。

总之,本实验采用贴壁筛选法纯化扩增 BMSCs,获得了足够数量且活力良好的细胞进行实验。通过体外无血清培养条件下,对 BMSCs 的凋亡及分泌 VEGF 的情况进行观察,表明 BMSCs 在一定时间内对无血清培养耐受良好,凋亡无明显增加,并且很好地分泌 VEGF,这对我们下一步体内移植实验在移植时机及移植细胞预处理方面提供了良好的科学依据。

参考文献:

- [1] Mezey E. The therapeutic potential of bone marrow-derived stromal cells[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(10): 2683-2687.
- [2] Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone

marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(3): 377-383.

- [3] Huang NF, Lam A, Fang Q, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin augmented angiogenesis in the chronically infarcted myocardium[J]. Regen Med, 2009, 4(4): 527-538.
- [4] Mu Y, Cao G, Zeng Q, et al. Transplantation of induced bone marrow mesenchymal stem cells improves the cardiac function of rabbits with dilated cardiomyopathy via upregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2011, 236(9): 1100-1107.
- [5] Wang T, Tang W, Sun S, et al. Improved outcomes of cardiopulmonary resuscitation in rats with myocardial infarction treated with allogenic bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Crit Care Med, 2009, 37(3): 833-839.
- [6] Wen Z, Zheng S, Zhou C, et al. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(5): 1032-1043.
- [7] Nguyen BK, Maltais S, Perrault LP, et al. Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2010, 3(5): 547-558.
- [8] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors[J]. FASEB J, 1999, 13(1): 9-22.

(收稿日期:2012-12-09 修回日期:2013-01-22)