

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.20.004

大鼠脾脏与骨髓源内皮祖细胞生物学特性的对比研究*

贺龙珠¹,张波^{2△},刘苹²,张世昌²,翁土军²,梁鑫¹,李芳菲²,屈晨¹,王萍^{1▲}

(1. 重庆医科大学附属第一医院口腔科 400016;2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

[摘要] **目的** 体外分离培养 Sprague Dawley(SD)大鼠脾脏和骨髓来源内皮祖细胞(EPCs),并比较其生物学特性。**方法** 采用密度梯度离心法,从健康 4 周龄 SD 大鼠脾脏和骨髓中分离出单个核细胞,体外诱导分化为 EPCs,对比分析两种 EPCs 的形态、增殖、迁移、黏附和一氧化氮(NO)分泌能力。**结果** 从脾脏和骨髓均可分离获得大量单个核细胞,但骨髓组织可获得的细胞数量更多,两种来源的细胞在体外诱导培养均可形成类似于血岛样集落,绝大部分细胞吞噬 DiI 荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白和绿色荧光标记的荆豆凝集素双染为阳性;骨髓来源的 EPCs 在细胞增殖、迁移、黏附和 NO 分泌能力等方面均显著高于脾脏来源的 EPCs。**结论** 骨髓较脾脏更适宜作为体外培养 EPCs 的组织来源。

[关键词] 骨髓;脾;内皮祖细胞**[中图分类号]** R318.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)20-2746-04**Biological characteristics of endothelial progenitor cells derived from rat spleen and bone marrow***He Longzhu¹,Zhang Bo^{2△},Liu Ping²,Zhang Shichang²,Wong Tujun²,Liang Xin¹,Li Fangfei²,Qu Chen¹,Wang Ping^{1▲}

(1. Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department Four, Daping Hospital, Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To compare the biological characteristics of endothelial progenitor cells derived from spleen and bone marrow in vitro. **Methods** Mononuclear cells derived from bone marrow and spleen of Sprague-Dawley(SD) rat were isolated by density gradient centrifugation, inoculated on fibronectin-coated culture flask and cultured with complete medium containing vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor. Morphology was observed under an inverted microscope. FITC-labeled Ulexeuropaeus agglutinin-I (FITC-UEA-I) and DiI-labeled acetylated low-density lipoprotein (DiI-ac-LDL) double staining of differentiating endothelial progenitor cells were identified by Laser confocal microscopy. Endothelial progenitor cells proliferation was measured by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay, migration of endothelial progenitor cells by Transwell chamber assay, adhesion and nitric oxide(NO) secretion ability of endothelial progenitor cells by relevant experimental determination. **Results** The mononuclear cells derived from spleen and bone-marrow was isolated by density gradient separation and identified by differentiating into kinds of blood-island like cell clusters and staining FITC-UEA-I and DiI-ac-LDL together observed by fluorescence microscope. On the part of the biological characteristics, such as proliferation, migration, adhesion and NO production, endothelial progenitor cells from the bone marrow is better than from the spleen. **Conclusion** Relative to the spleen, bone marrow is more suitable for the extraction of endothelial progenitor cells in vitro.

[Key words] bone marrow; spleen; endothelial progenitor cells

创伤修复愈合是多种细胞、生长因子与周围介质相互作用的结果。血管化困难是难愈性创面发生的重要原因,特别是糖尿病患者,损伤后伤口难以愈合,经常发展成为慢性溃疡。目前研究显示使用血管内皮细胞生长因子、植皮等常规治疗方法对难愈创面难以达到理想的治疗效果。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)作为血管化发生前体细胞,可通过移植入难愈创面,促进血管新生及创面愈合^[1-3]。目前体外研究 EPCs 的组织来源主要有骨髓、脐血、脂肪组织等。目前实验多侧重于研究不同来源的 EPCs 体外分离培养方法,系统的生物学特性的比较研究较少。本实验分别从大鼠骨髓及脾脏组织中分离培养及鉴定 EPCs,并比较 EPCs 的增殖、迁移、黏

附和一氧化氮(nitric oxide, NO)分泌等生物学特性,为 EPCs 体外实验研究的组织来源选择提供实验依据。

1 材料与方**1.1 材料**

1.1.1 实验动物 4 周龄雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),清洁级,体质量(70±15)g。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;大鼠淋巴细胞分离液、纤连蛋白、绿色荧光标记的荆豆凝集素(FITC-UEA-1)购自美国 Sigma 公司;低糖 DMEM 培养液购自美国 HyClone 公司;血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 项目)资助项目(2011CB964701)。 作者简介:贺龙珠(1988—),住院医师,在读硕士,主要从事口腔医学防治研究。 △ 通讯作者, Tel:13527371337; E-mail:zhangbo67184@163.com。 ▲ 共同通讯作者, Tel:13452146621; E-mail:cqcnwp@sina.com。

维细胞生长因子(bFGF)购自美国 Peprotech 公司;DiI 荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL)购自美国 Molecular Probes 公司;结晶紫染液购自中国碧云天公司;NO 检测试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 选用约 70 g 的雄性清洁级 SD 大鼠,断颈处死,消毒,迅速提取其脾脏、股骨和胫骨,收集细胞悬液。将脾脏和骨髓细胞悬液分别加于淋巴细胞分离液之上。1 500 r/min 离心 20 min 后,液体分为 4 层,用吸管将中间云雾状白膜层的单个核细胞吸取到另一离心管中,无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次(1 500 r/min,离心 8 min),弃上清液,用全培养基,含 20%FBS、VEGF 10 ng/mL、bFGF 10 ng/mL、青霉素 100 IU/mL 及链霉素 100 IU/mL 的低糖 DMEM 重悬,以 1×10^7 /mL 接种于纤连蛋白预先包被好的 6 孔板,置于 37 °C、5% CO₂,饱和湿度培养箱中培养。倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.2 摄取 DiI-ac-LDL 与结合 FITC-UEA-1 实验 接种于 24 孔板内培养 7 d 的贴壁细胞,更换新鲜全培养基 1 mL,以每孔体积分数 1% 的比例加入 DiI-ac-LDL 10 mg/L,置于 CO₂ 培养箱中孵育 1 h 取出后用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;再以 4% 多聚甲醛固定 10 min 后,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;加入 10 μL FITC-UEA-1 10 mg/L 继续置于培养箱中孵育 1 h,PBS 漂洗,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色细胞核,荧光显微镜观察并拍照。能够同时吞噬 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 的细胞可以鉴定为正在分化的 EPCs。

1.2.3 增殖能力检测 采用噻唑蓝(MTT)法检测 EPCs 的增殖能力。取 0.25% 的胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)溶液消化收集培养 7 d 左右的原代 EPCs,使用全培养基重悬,调整细胞密度为 5×10^5 /mL。将细胞悬液接种到包被纤连蛋白的 96 孔培养板中,每孔 200 μL,设调零孔(不加细胞,仅加入 200 μL 新鲜全培养基),每组重复 6 孔。每培养 24 h 后,以每孔体积分数 10% 的比例加入 MTT(5 mg/mL),置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中再培养 4 h;轻柔弃去上清液,每孔加 150 μL 的二甲基亚砜(DMSO)溶液,常温下在振荡仪上振荡 10 min,于酶标

仪上 490 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值。

1.2.4 黏附功能检测 0.25% 的胰酶-EDTA 溶液消化收集培养 7 d 左右的原代贴壁细胞,按照 2×10^4 /孔的密度接种在已包被纤连蛋白的 48 孔板中,放入 CO₂ 培养箱 30 min 后,PBS 轻柔洗去未黏附的细胞,已贴壁细胞用 4% 多聚甲醛固定,DAPI 染色细胞核,显微镜下($\times 200$)进行细胞计数。

1.2.5 迁移能力检测 0.25% 的胰酶-EDTA 溶液消化收集培养 7 d 左右的原代贴壁细胞,用含体积分数 0.1% FBS 低糖 DMEM 培养基调整细胞密度为 2×10^6 /mL,取 0.4 mL 细胞悬液于 8 μm 孔径的插入式培养小室内,放入含体积分数 20% FBS 低糖 DMEM 培养基中,37 °C、5% CO₂ 恒温箱培养 24 h。取出插入式培养小室,用棉签擦去小室底部滤膜上层细胞,4% 多聚甲醛内固定 10 min,经双蒸水反复浸洗并干燥后,用 0.1% 结晶紫对滤膜下层细胞染色。

1.2.6 分泌 NO 功能检测 收集 7 d 左右的原代贴壁细胞上清为样品,按照 NO 检测试剂盒说明操作。根据标准品计算出样品中 NO 的水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间统计采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置显微镜下不同来源 EPCs 形态学观察 新分离的骨髓来源单个核细胞为小圆形。培养 3 d 后,可见部分细胞贴壁,约占整个视野的 40% 左右,贴壁细胞大多呈圆形,形成集落样,集落较小且松散,未形成集落的贴壁细胞大多呈梭形及不规则形(图 1A)。7 d 后长梭形及不规则细胞数量显著增多,形成大量集落,集落的中央主要为圆形细胞群,周围的细胞呈放射状,类似于血岛,集落体积较大且稳固贴于瓶壁上,折光率高(图 1B),细胞融合率 85% 以上(图 1C)。脾脏来源的单个核细胞初始形态类似于骨髓来源(图 1D)。培养 3 d 后,贴壁细胞数量较骨髓来源少,大部分呈圆形,形成集落,松散漂浮于瓶壁上,仅可见极少量梭型细胞(图 1E),培养 7 d 少量细胞集落形成(图 1F),细胞较松散。

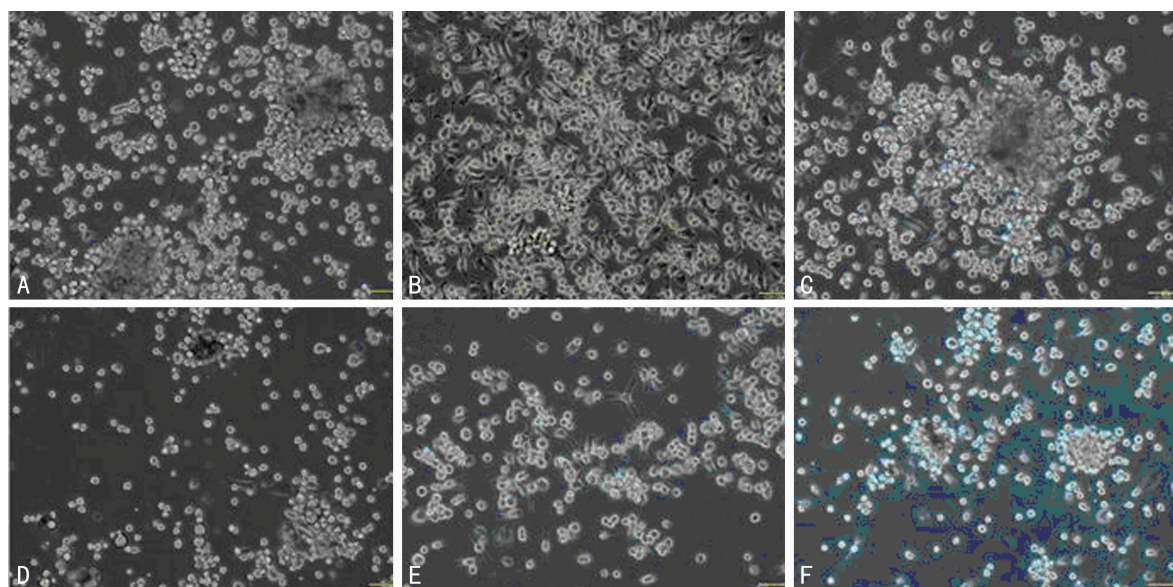
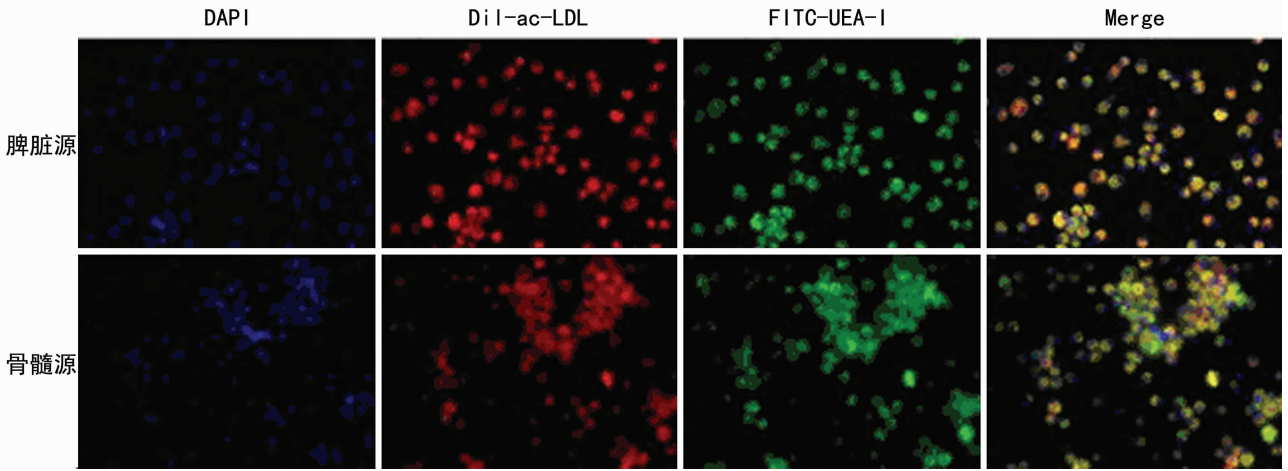
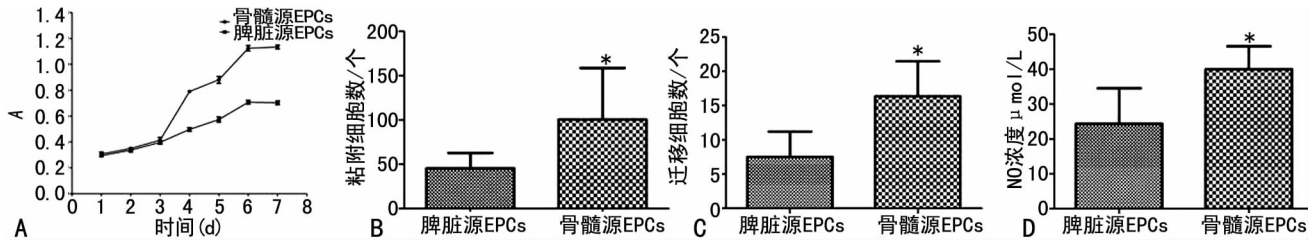


图 1 倒置显微镜下不同来源 EPCs 形态学观察 ($\times 200$)
A:骨髓源 EPCs 原代 3 d;B:骨髓源 EPCs 原代 7 d;C:骨髓源 EPCs 集落原代 7 d;D:脾脏源 EPCs 原代 3 d;E:脾脏源 EPCs 原代 7 d;F:脾脏源 EPCs 集落原代 7 d。

图 1 倒置显微镜下不同来源 EPCs 形态学观察 ($\times 200$)

图2 EPCs 鉴定 ($\times 200$)

A: 不同来源 EPCs 增殖曲线; B: 细胞黏附能力分析图; C: 细胞迁移能力分析图; D: 细胞 NO 分泌能力分析图。* : $P < 0.05$, 与脾脏源 EPCs 比较。

图3 脾脏和骨髓来源 EPCs 生物学特性比较

2.2 EPCs 鉴定 EPCs 吞噬 DiI-ac-LDL 后细胞质呈红色, 摄取 FITC-UEA-1 后细胞质呈绿色, 红色和绿色荧光重合后呈现黄色荧光, 为正在分化的 EPCs。激光共聚焦观察, 脾脏和骨髓单个核细胞培养 7 d 时, 二者均可形成双染黄色荧光细胞, 见图 2。

2.3 不同来源 EPCs 功能比较 增殖实验生长曲线结果显示, 骨髓和脾脏来源 EPCs 培养前 3 d 无明显增殖, 细胞处于潜伏期; 3 d 后细胞进入对数期, 呈指数递增; 6 d 后细胞进入平台期。3 d 后, 从增殖曲线的趋势来看, 骨髓源 EPCs 相对于脾脏源 EPCs, 增殖能力更强(图 3A)。黏附实验结果显示, 计数两组贴壁细胞数量发现骨髓源 EPCs 贴壁细胞数量显著高于脾脏源 EPCs(图 3B)。迁移实验结果显示, 骨髓源组迁移至小室外侧的细胞数量明显多于脾脏源 EPCs。统计两组迁移至小室外侧的细胞发现脾脏源 EPCs 迁移至小室外侧的细胞数量显著低于骨髓源 EPCs(图 3C)。检测两组细胞培养上清中 NO 的分泌量发现两组来源 EPCs 的 NO 分泌能力有显著性差异, 表明脾脏源 EPCs 的 NO 分泌能力较弱(图 3D)。

3 讨论

在创面愈合这一复杂的生理过程中, 炎症反应、肉芽组织形成、细胞增殖和组织重建等阶段在不同时段发挥着不同作用。血管化困难是难愈性创面发生的重要原因。创面形成新生血管的速度、密度和质量直接关系创伤的预后。研究表明伤后 24 h, 创面附近大量内皮细胞(EC)增殖形成新生血管^[3]。内皮细胞是一种终末细胞, 其增殖能力较弱, EPCs 是具有潜在分化成为成熟内皮细胞的细胞^[4], 相对于成熟内皮细胞增殖能力强^[5]。因此, EPCs 对促进创面愈合及缺血部位血管新生起着关键性作用^[6]。目前, 大部分研究者认为 EPCs 主要发源于骨髓, 只在某些生理、病理状态下释放, 通过循环运行至受损部位^[7-8]。国内外有关 EPCs 研究较多集中在骨髓、脐血和外周血方面。外周血中 EPCs 的水平极低^[9], 体外扩增能力也相对较弱, 其应用受到限制。脐带血单个核细胞体外培养时能产生更多 EPCs^[10], 但由于脐带血难以获取及相关伦理问题, 移植治疗受到很大限制。骨髓中含有丰富的 EPCs, 取材方便, 而且取自身骨髓不存在免疫问题, 所以骨髓源 EPCs 极具研究价值和前景。但对于小动物来说, 活体提取骨髓操作较难。脾脏作为 EPCs 体外提取的组织来源, 优点在于可以在保持动物存活的基础上, 提取自体 EPCs 用于后期自体移植实验, 不涉及免疫的问题。目前对脾脏源 EPCs 生物学特性研究较少, 无法判断脾脏 EPCs 细胞体外生物学功能是否能用于体外移植。本实验首先通过分离骨髓和脾脏两种不同来源的 EPCs, 诱导培养 7 d 后, 形态学观察发现细胞大量形成类似于血岛样集落, 同时根据其能够特异性吞噬 DiI-ac-LDL 并结合 FITC-UEA-1^[11] 鉴定其均为 EPCs, 证实脾脏和骨髓均能提取到较纯的 EPCs^[12]。

本实验对两种来源的 EPCs 的增殖、黏附、迁移和 NO 分泌等体外生物学特性进行了比较。血管新生过程中, EPCs 能够识别损伤和缺血部位的分子信号, 动员至受损部位, 黏附于缺血组织, 迁移趋化至相应创伤部位, 然后大量增殖分化为内皮细胞, 促进创面新生血管生成。在这一过程中, EPCs 黏附、增殖、迁移和 NO 分泌能力起着重要的作用。体外 MTT 实验、插入式培养小室等实验结果显示骨髓源 EPCs 相对于脾脏源, 其增殖、黏附、迁移能力和 NO 分泌能力更强, 这意味着在血管新生过程中, 骨髓源 EPCs 促进创面的愈合能力可能更强。综上所述, 从骨髓中培养出的 EPCs 不仅增殖力优于脾脏

源 EPCs,而且在促进血管生成的部分生物学功能上也强于脾脏源 EPCs,提示骨髓可能更适宜作为体外培养 EPCs 的组织来源。

参考文献

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(532):964-967.
- [2] Li DW, Liu ZQ, Wei J, et al. Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review)[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(5):1000-1006.
- [3] Jozkowicz A, Dulak J, Nanobashvili J, et al. Vasculogenesis—a new strategy for induction of peripheral neovascularization[J]. Eur Surg, 2002, 34(2):114-117.
- [4] 曹广煜, 陈庆伟, 李兴升, 等. 大鼠骨髓与外周血来源内皮祖细胞生物学特性比较[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6):1064-1068.
- [5] Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(1):H1-18.
- [6] Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia[J]. Circulation, 2001, 103(5):634-637.
- [7] Yao L, Heuser-Baker J, Herlea-Pana O, et al. Bone marrow

endothelial progenitors augment atherosclerotic plaque regression in a mouse model of plasma lipid lowering[J]. Stem Cells, 2012, 30(12):2720-2731.

- [8] Briasoulis A, Tousoulis D, Antoniadis C, et al. The role of endothelial progenitor cells in vascular repair after arterial injury and atherosclerotic plaque development[J]. Cardiovasc Ther, 2011, 29(2):125-139.
- [9] Rafii S, Heissig B, Hattori K, et al. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vector expressing angiogenic factors[J]. Gene Ther, 2002, 9(10):631-641.
- [10] Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial Progenitor cells using human PeriPheral and umbilical cord blood[J]. Blood, 2004, 104(9):2752-2760.
- [11] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. Circ Res, 2003, 93(2):e17-24.
- [12] Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells[J]. Eur Heart J, 2009, 30(8):890-899.

(收稿日期:2015-01-08 修回日期:2015-03-16)

《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 M(QR)表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。
4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 三种表达方式,无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95%可信区间(CI)。