

TGF- β 1 介导人乳牙牙髓干细胞 分化为血管平滑肌细胞的研究

胡露露^{1,2}, 艾琦^{1,2}, 胡晓燕^{1,2}, 杨梓^{1,2}, 王银龙^{1,2}, 沈军^{1,2}

摘要 **目的** 血管化的主要方案是先生成血管组成细胞(血管内皮细胞和血管周细胞),然后将这些细胞构建成血管结构。由于受体自身内皮细胞和血管平滑肌细胞的稀缺性和异质性,限制了其在血管组织工程学中的广泛运用。因此,本研究对于人乳牙牙髓干细胞(SHED)是否能够诱导分化成为功能性血管平滑肌细胞(vSMCs)进行了相关方面的研究。**方法** 利用转化生长因子(TGF)- β 1作为刺激因子,诱导SHED分化为vSMCs。完成诱导后,通过RT-PCR、流式细胞术分析、Western blot和免疫荧光技术检测基因和特异性蛋白表达情况。此外,借助Matrigel血管生成功能实验来验证SHED来源的vSMCs是否能行使平滑肌细胞的功能。**结果** 通过分析平滑肌细胞特定标志物(如 α -SMA、SM22 α 、Calponin和SM-MHC)的表达,证实了TGF- β 1可以诱导SHED分化为vSMCs,且流式细胞术证实分化的效率处于较高的水平,其标志物表达比例高达 α -SMA 86.1%, SM22 α 93.9%, Calponin 56.8%, SM-MHC 88.2%。体外Matrigel血管生成功能实验表明,由SHED诱导分化的vSMCs在稳定由人脐静脉血管内皮细胞所形成的血管结构中发挥着与原代vSMCs相似的作用。**结论** 在血管组织工程中,SHED可以成功地诱导为vSMCs,能够成为血管组织工程中一种有前景的种子细胞。

关键词 组织工程学; 成血管; 乳牙牙髓干细胞; 平滑肌细胞
中图分类号 Q 813.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0338-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.002

目前,体外构建人工血管的主要策略是利用提取的原代血管构成细胞,如人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和功能性血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, vSMCs)重新构建血管。然而,较难的原代细胞分离技术、有限的原代细胞增殖能力,以及人体组织来源的稀缺性,严重阻碍了原代细胞的实际运用。因此,诱导干细胞成为内皮细胞或血管平滑肌细胞成为解决该问题的主要思路。

转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)目前较广泛地用于诱导干细胞分化成平滑肌细胞^[1]。研究^[2]表明,TGF-Smads信号通路对于诱导多能干细胞分化成平滑肌细胞起到关键作用。TGF- β 1既可单独也可以联合其他因子共同诱导干细胞分化为平滑肌细胞,例如TGF- β 1和骨形态发生蛋白4可以诱导脂肪干细胞分化为平滑肌细胞,TGF- β 1联合血小板衍生因子BB可以诱导人胚胎干细胞分化平滑肌细胞。因此,该研究的目的是采用TGF- β 1生长因子诱导人乳牙牙髓干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)分化为vSMCs,并探索分化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞提取及培养 收集脱落的乳牙,无菌下提

2017-11-21 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金资助计划(编号: KJ2011Z183、KJ2016A324)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医院正畸科, 合肥 230032

作者简介: 胡露露, 女, 医师, 硕士;

沈军, 男, 医师, 责任作者, E-mail: queenyhoo@yeah.net

added, the expression of HER2 in SKOV3 cells increased with the prolongation of stimulation time, and the expression of β -catenin and TCF4 was also enhanced ($P < 0.05$). After adding wnt3a, the expression of β -catenin and TCF4 increased with the duration of stimulation, and the expression of HER2 was higher ($P < 0.05$). After adding iCRT14, the expression of β -catenin and TCF4 decreased with the duration of the stimulus, and the expression of HER2 decreased ($P < 0.05$). The cell migration ability of SKOV3-shHER2 and SKOV3-shTCF4 cells was significantly increased after adding EGF and wnt3a ($P < 0.05$). SKOV3 cells were treated with iCRT14, and the cell migration was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The interaction of HER2 and wnt / β -catenin signaling in ovarian cancer cells plays a common role in promoting the metastasis of ovarian cancer cells.

Key words ovarian cancer; HER2; wnt; TCF4

取牙髓组织,剪碎后放入 I 型胶原酶和中性蛋白酶混合液中消化 1 h,然后使用孔径为 70 μm 的细胞筛进行过滤,488 r/min 离心 5 min,完成后用常规 DMEM 培养基(含 10% FBS 和 1% P/S)重悬并转入 T25 细胞培养瓶,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱常规培养,每 3 d 换液一次,待生长到 70% 时消化转入到 T75 细胞培养瓶,扩大培养后用于后续实验。在 SHED 进行 vSMCs 诱导前,对其“多能性”进行评估,使用流式细胞仪检测 SHED 的干细胞标志物(CD45、CD90、CD105、CD73)表达情况,并做成脂、成神经和成骨等多向分化能力的鉴定。原代 HUVECs 和 vSMCs 购自美国 ScienCell 公司,并用相应的培养基培养(平滑肌细胞培养基和内皮细胞培养基均购自美国 ScienCell 公司),作为阳性对照。

1.2 诱导 SHED 分化为 vSMCs 取第 4 ~ 6 代 SHED,按照 3×10^3 cells/ cm^2 接种,常规 DMEM 培养基培养,待细胞贴壁后,换成 vSMCs 诱导培养基(5% FBS DMEM + 不同浓度 2.5、5、10、20、30 ng/ml TGF- β 1),获得诱导后不同时间点 SHED-vSMCs。

1.3 RT-qPCR 按照 RNA 提取试剂盒说明,提取细胞样本的总 RNA,取 1 μg 的总 RNA,按照 TaKa-Ra 逆转录试剂盒说明,转成 20 μl cDNA,并同样按照 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒说明,完成 PCR 反应。本实验所用引物序列如下: GAPDH 上游引物: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3',下游引物: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'; α -SMA 上游引物: 5'-CCGACCGAATGCAGAAGGA-3',下游引物: 5'-ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA-3'; SM22 α 上游引物: 5'-AGTGCAGTCCAAAATCGAGAAG-3',下游引物: 5'-CTTGCTCAGAATCACGCCAT-3'; Calponin 上游引物: 5'-GTCAACCCAAAATTGGCACCA-3',下游引物: 5'-ACCTTGTTTCCTTTCGTCTTCG-3'。

1.4 Western blot 用 RIPA 裂解液冰上裂解样本 20 min,后高速离心 15 min,收集上清液并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量样本的蛋白浓度,然后根据测量得到的蛋白浓度,计算 20 μg 样本蛋白所需的剂量,进行 Western blot 实验。本实验所用抗体如下: 鼠单克隆抗 β -actin 抗体(编号: sc-47778) 购自美国 Santa Cruz 公司; 兔多克隆抗 SM22 alpha 抗体(编号: ab14106)、兔抗 Calponin 抗体(编号: ab46794) 购自英国 Abcam 公司。

1.5 免疫荧光 在诱导前将细胞接种到预先放置有处理过的盖玻片的培养皿中进行诱导,完成诱导后用冰 PBS 洗 2 次,然后 4% 多聚甲醛固定 15 min,

PBS 洗 3 次,每次 5 min,然后用 0.5% 的 Triton-100 通透细胞 5 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min; 使用 2% BSA 封闭细胞 1 h,然后根据具体的蛋白孵不同的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 房过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min 后孵二抗 1 h, PBS 洗 3 次,每次 5 min; 封片后荧光显微镜检查目的蛋白。本实验所用抗体如下: α -SMA (编号: A2547) 购自德国 Sigma-Aldrich 公司; SM22 alpha (编号: ab14106)、SMMHC (编号: ab683)、Calponin (编号: ab46794) 为一抗,羊抗鼠 Alexa Fluor 488 (编号: ab150117) 和羊抗兔 Alexa Fluor 488 (编号: ab150077) 为二抗,均购自英国 Abcam 公司。

1.6 体外 Matrigel 血管生成实验 为了研究 SHED 诱导分化的 vSMCs 是否可以促进血管结构的稳定性,本研究使用体外 Matrigel 血管生成实验,评估 SHED-vSMCs 在维持血管结构稳定性中的作用。将 $5 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 个细胞接种到 T25 培养瓶,以便细胞 24 h 后达到 80% 融合; 并将 Matrigel 从 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱移放到 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,同时将 48 孔板和 1 ml 枪头置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱; 第 2 天在冰上用预冷的 1 ml 枪头将 Matrigel 转入预冷的 48 孔板(120 ~ 200 μl 每孔),迅速置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱 30 min; 常规消化细胞,按照 5 : 1 比例将 HUVECs 和 SHED-vSMCs 用内皮细胞培养基重悬成浓度为 3.2×10^5 cells/ml 的单细胞悬液,然后取 100 μl 该单细胞悬液轻轻滴在已经凝固的 Matrigel 表面,并继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱常规培养; 于不同时间点在显微镜下观察小管形成情况并随机选择 5 个视野拍照记录,然后用 Image J 软件进行分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有数值数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酶消化法提取的 SHED 具有多能干性 如图 1 所示,流式细胞仪结果显示 SHED 表达干细胞标志物 CD105、CD90 以及 CD73,不表达 CD45。图 2 进一步显示了 SHED 具有成骨、成神经以及成脂能力。

2.2 TGF- β 1 可诱导 SHED 分化为 vSMCs 如图 3A 所示,诱导 7 d 后, TGF- β 1 上调了 vSMCs 特异性标志物(α -SMA、SM22 α 和 Calponin) 的 mRNA 表达水平,不同浓度(10、20、30 ng/ml) 之间结果差异无统计学意义。因此,在进一步研究中仅使用 10 ng/ml TGF- β 1 的剂量。

为了获得最佳的诱导时间,本研究评估不同时间点(第3、5、7天以及第1、2代) 10 ng/ml TGF- β 1 的诱导效果。如图3B、C所示,vSMCs表型标志物的表达在第5天达到最高水平,第7天略有下降,诱

导效果能维持到第1和第2代。免疫荧光结果(图4)进一步表明了诱导后的SHED表达vSMCs标志物。

为了评估SHED诱导为vSMCs的分化效率,通过流式细胞术来分析 α -SMA、SM22 α 、Calponin和

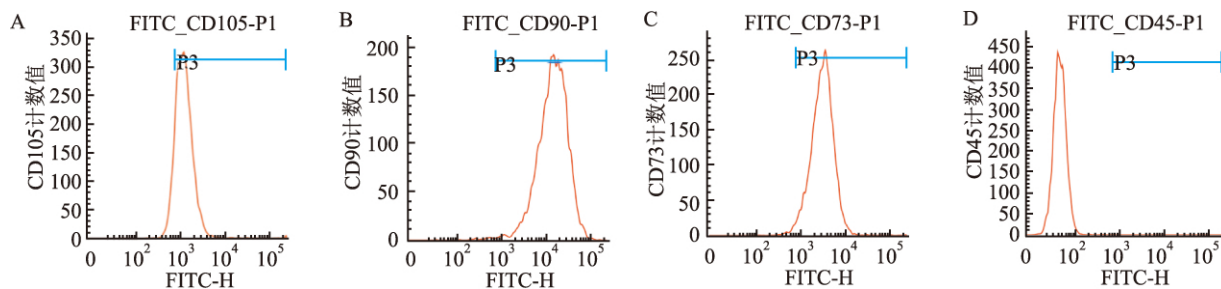


图1 细胞流式仪结果

A: CD105 ; B: CD90 ; C: CD73; D: CD45

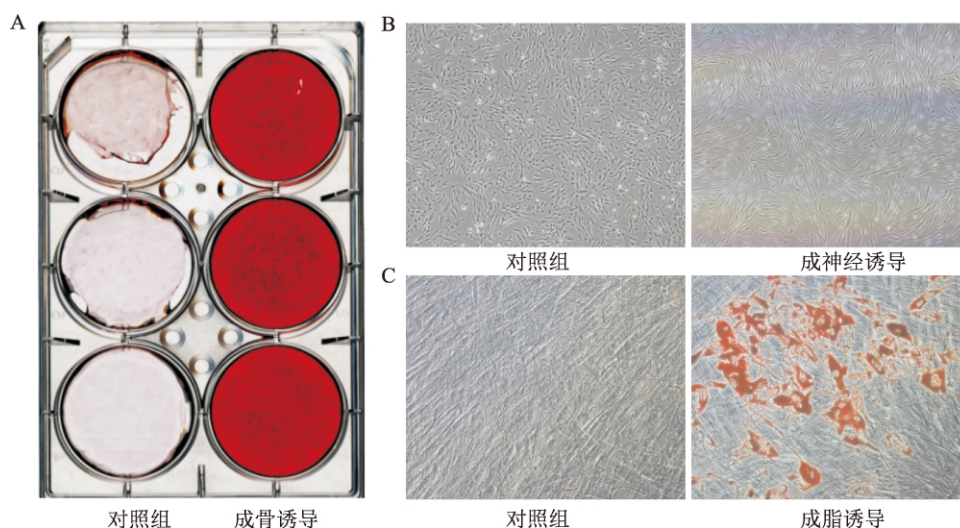


图2 SHED具有成骨、成神经及成脂能力

A: SHED 成骨诱导,茜素红染色; B: SHED 成神经诱导 $\times 4$; C: SHED 成脂诱导,油红 o 染色 $\times 4$

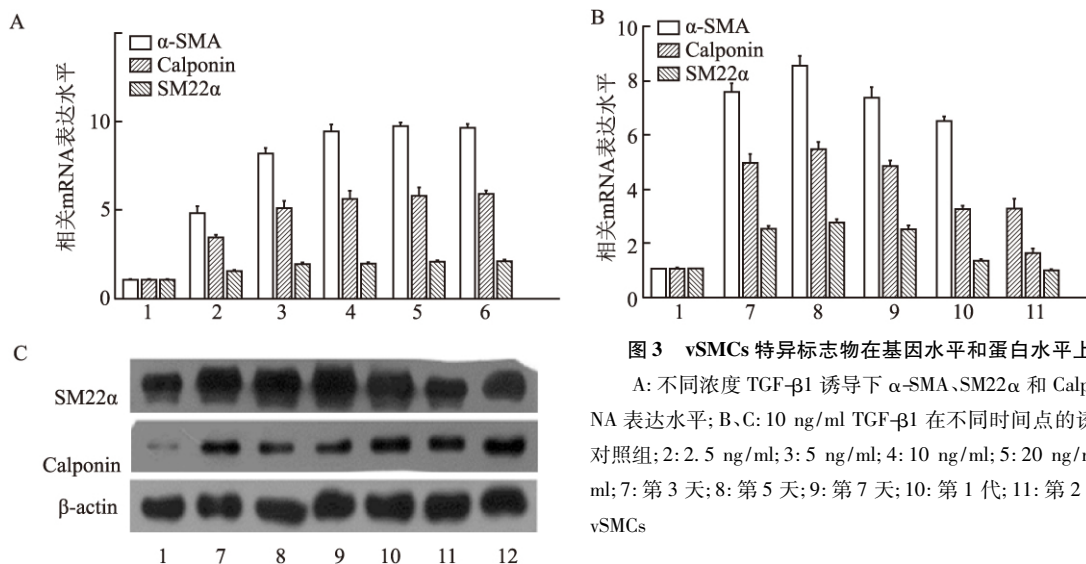


图3 vSMCs 特异标志物在基因水平和蛋白水平上的表达

A: 不同浓度 TGF- β 1 诱导下 α -SMA、SM22 α 和 Calponin 的 mRNA 表达水平; B、C: 10 ng/ml TGF- β 1 在不同时间点的诱导效果; 1: 对照组; 2: 2.5 ng/ml; 3: 5 ng/ml; 4: 10 ng/ml; 5: 20 ng/ml; 6: 30 ng/ml; 7: 第3天; 8: 第5天; 9: 第7天; 10: 第1代; 11: 第2代; 12: 原始 vSMCs

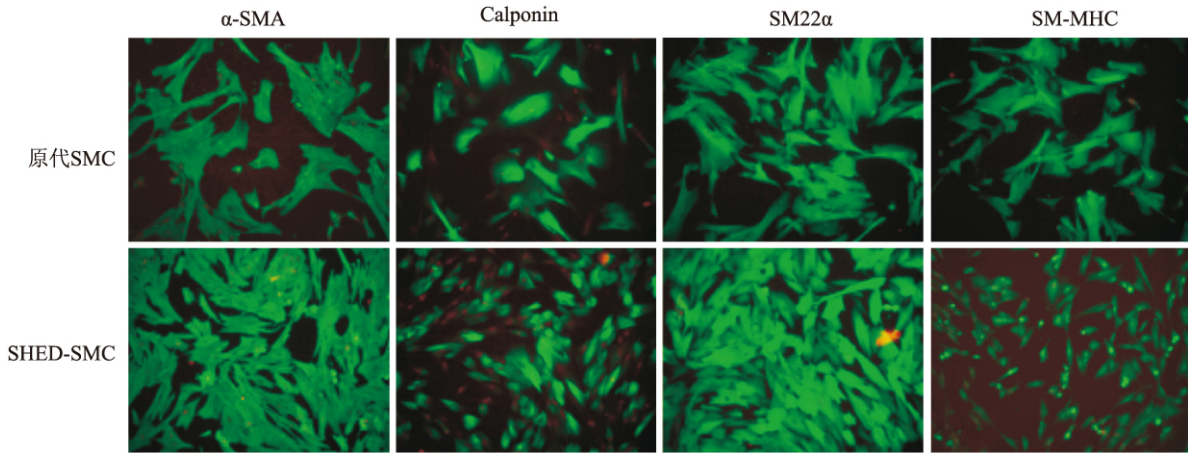


图4 免疫荧光下 vSMCs 标志物的表达 免疫荧光染色 $\times 20$

SM-MHC 阳性细胞的百分比。结果如图 5 所示, 这些标志物具有较高的表达 (α -SMA86.1%, SM22 α 93.9%, Calponin 56.8%, SM-MHC 88.2%)。

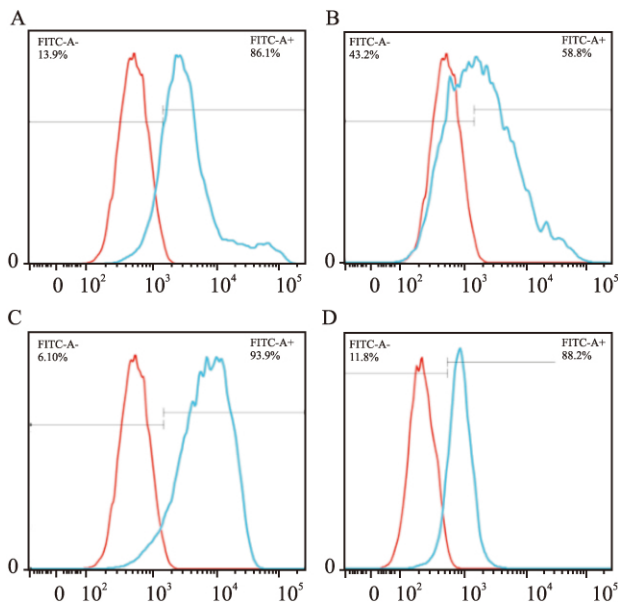


图5 SHED 诱导 vSMCs 具有较高的诱导效率
A: α -SMA; B: Calponin; C: SM22 α ; D: SM-MHC

2.3 SHED 诱导分化的 vSMCs 表现出与原发性 vSMCs 相似的功能特性 Matrigel 血管形成实验结果表明, 诱导 SHED 分化的 vSMCs 具有与原发性 vSMCs 相类似的功能。如图 6A 所示, SHED 诱导分化的 vSMCs 紧密附着在 HUVEC 形成的三维血管结构的表面, 并显著增加了血管结构的存活时间(图 6B)。

3 讨论

血管化组织工程复合体的构建是制约组织工程

技术在临床上有效应用的关键问题。如何让体外构建的组织器官快速获得血供, 从而保证其早期存活以及功能维持, 是组织工程学研究的一个热点和难点。目前, 最有效的策略是在体外构建组织器官过程中同时进行预血管化^[3]。预血管化组织工程复合体可以迅速与受体形成血管吻合, 从而快速建立血液循环, 确保构建组织器官内部的营养供应以及代谢物质的排除。预血管化的方案主要是将血管组成细胞, 包括血管内皮细胞和血管壁细胞(血管周平滑肌细胞 vSMCs 以及周细胞 Pericytes), 植入人工支架, 通过细胞在支架内的增殖以及分化, 最终形成类似机体的血管样结构^[4]。因此, 用于构建血管的种子细胞特性及组织来源对预血管化起到决定性作用。受体自身血管组织被认为是最合适的细胞来源, 然而由于提取困难、细胞数量不足及增殖率低等因素, 目前无法在实验及临床中进行广泛应用。干细胞具有多向分化潜能、增殖速度快、来源广泛等优势, 利用干细胞作为种子细胞运用于组织工程具有诱人的临床应用前景。

目前, 在组织工程预血管化研究中, 研究较多的有胚胎干细胞和诱导多能干细胞。有胚胎干细胞和诱导多能干细胞是一类具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能的细胞, 能够被诱导为几乎机体所有类型的细胞。然而, 获取有胚胎干细胞所产生的伦理问题和使用过程中存在的免疫排斥反应, 以及生成诱导多能干细胞的过程中可能会出现危险变异从而导致产生一些未知的疾病, 使得利用有胚胎干细胞/诱导多能干细胞作为种子细胞处于严重窘境。

最近研究^[5]表明, 成体干细胞(骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞以及血管内皮前体细胞)同样具有定向分化为 vSMCs 的潜能, 然而, 获取这些成体

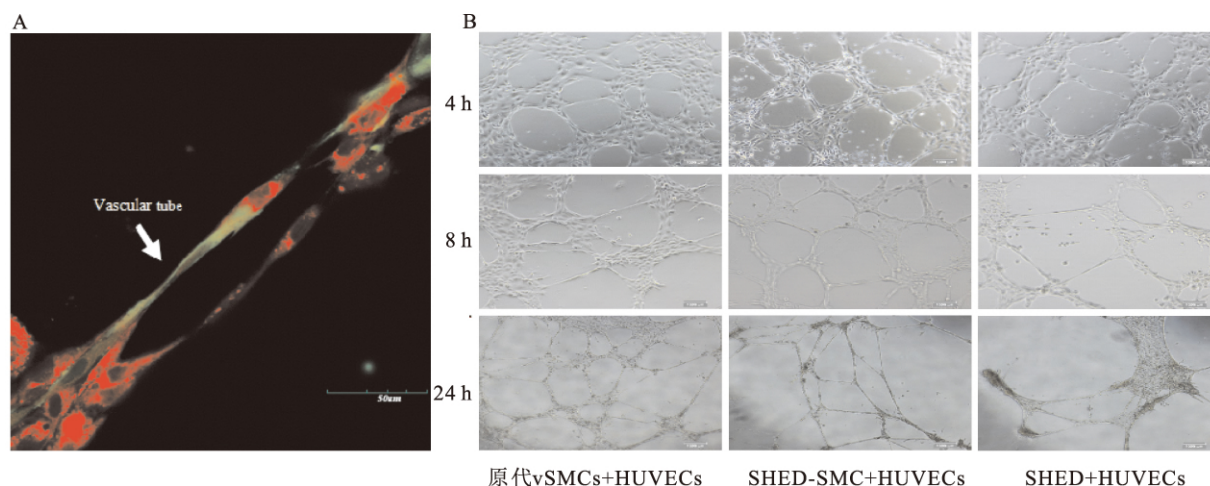


图6 Matrigel 血管生成实验结果 免疫荧光染色 $\times 10$

干细胞需要较为繁琐的手术过程,以及常规诱导方法血管内皮细胞诱导效率过于低下等问题,限制了其将来的临床应用前景。相对于上述成体干细胞,SHED 具有以下优势:① SHED 来源于自然脱落的乳牙,不会对供者产生任何额外的损害;② 由于是自身来源,从而也避免了免疫排斥反应;③ 除了表达早期间充质干细胞标志物 STRO-1 和 CD146 等,SHED 亦表达胚胎干细胞的标志物 Oct4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4^[6],并具有多向分化能力,如可以分化为成骨/成牙本质细胞,脂肪细胞,神经细胞。另外,SHED 最近还被证实能够分化为内皮细胞^[7],然而,尚未有 SHED 分化为 vSMCs 的报道。在本研究中使用生长因子 TGF- β 1 诱导 SHED,结果表明 SHED 可以分化为功能性的 vSMCs。

本研究采用 α -SMA、SM22 α 、Calponin、SM-MHC 作为鉴定 vSMCs 的表型标志物,其中 SM-MHC 只在可收缩性的 vSMCs 中表达,结果表明,SHED 在生长因子 TGF- β 1 刺激下,表达这些 vSMCs 标志物。成熟 vSMCs 同时还需具有相应功能,例如稳定血管的能力,促进血管形成能力,以及收缩功能。为了评价 SHED 来源的 vSMCs 的血管稳定能力,本研究进行了 Matrigel 血管生成实验,将 HUVECs 与 SHED 诱

导分化来源的 vSMCs 在 Matrigel 上进行共培养, HUVECs 在 Matrigel 上能够形成血管状结构,SHED-vSMCs 能够稳定 HUVECs 形成的血管结构,证明了 SHED 来源的 vSMCs 具有相应的功能。

参考文献

- [1] 唐翔,李玢,丁静,等. TGF- β 1 诱导绵羊肌源性干细胞向平滑肌分化的研究[J]. 中国妇产科临床杂志,2015,16(5): 433-5.
- [2] Shi N, Xie W B, Chen S Y. Cell division cycle 7 is a novel regulator of transforming growth factor- β -induced smooth muscle cell differentiation[J]. J Biol Chem, 2012,287(9): 6860-7.
- [3] 李焰,张建设,董秀华. 组织工程骨的体外预血管化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(33): 6013-20.
- [4] Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, et al. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels[J]. Nat Commun,2013, 4: 1399.
- [5] 刘晓芳,王延洲,徐惠成,等. 细胞间接触诱导骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2010,32(6): 516-9.
- [6] Jamal M, Chogle S, Goodis H, et al. Dental stem cells and their potential role in regenerative medicine[J]. J Med Sci,2011, 4(2): 53-61.
- [7] Zhang Z, Nör F, Oh M, et al. Wnt/ β -catenin signaling determines the vasculogenic fate of postnatal mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells,2016,34(6): 1576-87.

The study of functional smooth muscle cells differentiation from SHED induced by TGF- β 1

Hu Lulu^{1,2}, Ai Qi^{1,2}, Hu Xiaoyan^{1,2}, et al

(¹The Affiliated Stomatologic Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032; ²Stomatologic Hospital & College, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective The main strategy of vascularization is to generate vascular cell (endothelial cells and vascu-

网络出版时间: 2018-3-16 9:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.003.html>

白花丹醌对 CIA 大鼠滑膜细胞增殖及 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-3 表达的影响

钟毓娟¹, 李 丽², 李勇文³, 杨成芳³, 方舒萍⁴, 程 琪⁴

摘要 目的 研究白花丹醌对脂多糖(LPS)诱导的体外培养 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞(CIA-FLS)的增殖及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)和基质金属蛋白酶-3(MMP-3)表达的影响。方法 采用Ⅱ型胶原蛋白+弗氏完全佐剂建立大鼠关节炎模型(CIA);原代培养 CIA-FLS, MTT 法检测药物对 CIA-FLS 增殖的影响;随机设立 CIA 对照组、LPS 对照组、甲氨蝶呤组、白花丹醌 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组、白花丹醌 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、白花丹醌 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组;各药物与细胞共同孵育 48 h 后, ELISA 法检测细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-3 的含量; Western blot 检测细胞内 MMP-3 的蛋白含量。结果 MTT 显示, 白花丹醌能不同程度抑制 CIA-FLS 的增殖, 呈浓度和时间依赖性;与 LPS 对照组比较, 甲氨蝶呤或白花丹醌均能明显下调细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-3 的含量($P < 0.001$), 明显降低细胞中 MMP-3 的蛋白含量($P < 0.001$)。结论 白花丹醌能抑制 CIA-FLS 的增殖, 并能通过下调 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-3 的表

达而抑制 LPS 诱导 CIA-FLS 的炎症反应。

关键词 白花丹醌; Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎; 滑膜细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-1 β ; 基质金属蛋白酶-3; 脂多糖

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0343-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.003

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节组织慢性炎症性病变为主要表现的自身免疫性疾病。RA 的特征性表现是:滑膜炎、滑膜增生, 软骨吸收和骨质破坏。大量研究^[1-2]显示 RA 的病理过程及疾病的发生、发展与滑膜细胞、巨噬细胞和软骨细胞等分泌的高水平的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)密切相关。

白花丹是白花丹科白花丹属植物。在我国, 主要生长于广西、广东、四川、福建等地区, 民间用于治疗风湿性关节疼痛、血瘀闭经和跌打损伤等。白花丹醌是白花丹的主要活性成分, 其具有很强的活血化瘀作用, 已证实其抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗纤维化等作用^[3]。白花丹醌抗类风湿关节炎研究国内尚未

2017-11-27 接收

基金项目: 广西高校科学技术研究项目(编号: KY2015LX279)

作者单位: 桂林医学院¹ 免疫学教研室、² 生理学教研室、³ 药理学教研室、⁴ 研究生学院, 桂林 541001

作者简介: 钟毓娟, 女, 研究生, 实验师;

杨成芳, 女, 硕士研究生, 实验师, 责任作者, E-mail: 308823789@qq.com

lar smooth muscle cells), and then recombine these cells into vascular structures. The scarcity and heterogeneity of primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells (vSMCs) hinder the advancement of vascular tissue engineering. Therefore, we investigated whether vSMCs could be generated from human exfoliated deciduous teeth (SHED). **Methods** Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) was utilized to induce SHED differentiation into vSMCs. The mRNA and protein expression were analyzed using RT-PCR, flow cytometry, Western blot and immunostaining. Furthermore, *in vitro* Matrigel angiogenesis assay was used to examine whether those SHED-derived vSMCs possess the similar function as primary SMCs. **Results** The results of analysis of SMCs specific markers' (SM22 α , α -SMA, SM-MHC, and Calponin) expression confirmed that TGF- β 1 could induce the differentiation of SMCs from SHED, and the efficiency of differentiation assessed by flow cytometry was relatively high (α -SMA 86.1%, SM22 α 93.9%, Calponin 56.8% and SM-MHC 88.2%). The results of *in vitro* Matrigel Angiogenesis Assay confirmed that SHED-derived SMCs possessed the similar function with primary SMCs in stabilizing the vascular structures generated by human umbilical vein endothelial cells. **Conclusion** SHED possesses the potential to generate functional SMCs, and could be a promising cell candidate in vascular tissue engineering.

Key words tissue engineering; angiogenesis; dental pulp stem cells; smooth muscle cells