

直接贴壁法体外分离培养大鼠骨髓内皮祖细胞

方 晓,王康康,高维陆,张 辉,尹宗生

摘要 取 90 g SPF 级 SD 大鼠的双后肢骨髓,分别使用直接贴壁法和密度梯度离心法获得大鼠骨髓单个核细胞,用内皮培养体系 EGM-2 培养基进行定向诱导分化 7~14 d 获得大鼠内皮祖细胞。免疫荧光染色和细胞功能学鉴定内皮祖细胞,观察内皮祖细胞出现的时间和数量,CKK-8 法鉴定细胞的增殖能力。与密度梯度离心法相比,直接贴壁法在内皮祖细胞出现的时间、数量和增殖能力差异有统计学意义($P < 0.01$)。因此,相对于密度梯度离心法,直接贴壁法培养出的内皮祖细胞分化时间更短、数量更多且增殖能力更强。

关键词 内皮祖细胞;骨髓;直接贴壁法;密度梯度离心法
中图分类号 R 394.26

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1696-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.034

Asahara et al^[1]于 1997 年首次成功从人外周血中分离出内皮祖细胞,并指出这种细胞是血管生成的前体细胞,参与出生后血管生成,此后对内皮祖细胞的研究不断深入。内皮祖细胞作为内皮细胞的前

体细胞,有向缺血区定向归巢并分化为成熟内皮细胞、迟发的高增殖潜能等特性,在维持血管内皮完整性、修复受损血管内皮细胞、促进新生血管形成及组织修复等方面起重要作用^[2]。内皮祖细胞对心脑血管疾病^[3]、外周血管疾病^[4]及中枢神经系统损伤^[5]等的治疗有重要意义,并为缺血性疾病的治疗提供了新思路。因此,内皮祖细胞的生物学特性在临床疾病上的应用成为了医学界研究的热点。内皮祖细胞主要存在于骨髓中,由骨髓中单个核细胞分化而来,传统的培养方法是使用密度梯度离心法,该研究主要使用直接贴壁法分离培养获得目的细胞,并与密度梯度离心法进行多方面的比较。

1 材料与方法

1.1 材料 90 g 健康 SD 大鼠,雄性,SPF 级,由安徽医科大学实验动物中心提供;EGM-2 完全培养基购自瑞士 LONZA 公司;大鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋科技有限公司;鼠纤维连接蛋白(rat fibronectin, FN)购自瑞士 Gene Operation 公司;CD133 抗体购自美国 Biorbyt 公司;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)购自美国 Invitrogen 公司;异硫氰酸荧光素荆豆凝集素-4(FITC-UEA-4)购自美国 Sigma 公司;TRITC-羊抗兔 IgG 和 FITC-羊抗小鼠 IgG

2016-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171173)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院骨关节与骨肿瘤科,合肥 230022

作者简介:方 晓,男,硕士研究生;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

(NBI-ME) were collected. All patients underwent white light imaging endoscopy, and endoscopic performance was still highly suspected early gastric lesion. Then these patients were using NBI-ME and target biopsy. Eventually, all patients received endoscopic resection(ER) or surgical resection. Taking findings of the histology as the gold standard, the diagnostic accuracy of WLE biopsy was compared with NBI-ME target biopsy. Among 67 cases collected in the study, there were one case of gastritis, 8 cases of low-grade intraepithelial neoplasia, 24 cases of high-grade intraepithelial neoplasia, 34 cases of early gastric cancer. The diagnostic sensitivity, specificity and coincidence rate of WLE biopsy and NBI-ME target biopsy were 48.28%, 88.89%, 53.73% and 72.41%, 77.78%, 73.13%, respectively. The sensitivity and coincidence rates of the NBI-ME guide targeted biopsy were significantly higher than the WLE biopsy in the diagnosis of early gastric cancer ($P < 0.05$); the specificity of the two methods had no statistical significance ($P > 0.05$). The positive rate of diagnosis has nothing to do with gender, age, location of the lesion and endoscopic classification. For suspicious gastric lesions within white light endoscopy should be combined with narrow band imaging-magnifying endoscopy and target biopsy. NBI-ME target biopsy helps us to improve the detection rate of early gastric cancer.

Key words narrow band imaging; magnifying endoscopy; early gastric cancer; biopsy

均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓源性内皮祖细胞的分离、培养

SD 大鼠用 10% 水合氯醛腹腔麻醉后采用颈椎脱臼法处死, 75% 酒精浸泡消毒 5 ~ 10 min, 将处死后的大鼠置入无菌弯盘中, 超净台内严格行无菌操作原则, 组织剪剪开大鼠双后肢皮肤, 分离肌肉组织, 暴露并离断股骨、胫骨, 去除骨四周附着的软组织, 注意尽可能多保留骨髓含量最丰富的两侧干骺端。用注射器抽吸 10 ml PBS 缓冲液反复冲洗骨髓腔, 骨髓冲洗液不锈钢滤网过滤, 移液管吹打, 得到均匀的骨髓悬液。将所得骨髓悬液分成两份, 一份加入红细胞裂解液后离心重悬制成 1×10^6 /ml 的细胞悬液, 接种到提前铺有 FN 的 6 孔板中; 另一部分按照淋巴细胞分离液说明书使用密度梯度离心法获得单核细胞并制成 1×10^6 /ml 的细胞悬液, 接种到铺有 FN 的 6 孔板中。每孔加入含 EGM-2 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养。接种 48 h 后首次换液, 弃未贴壁细胞, 加入新鲜培养基后继续培养, 每隔 2 ~ 3 d 换液, 加入新鲜培养基, 在倒置显微镜下动态观察培养过程中细胞形态的变化; 接种 10 ~ 20 d, 待原代细胞逐渐融合至 80%, 按 1 : 2 或 1 : 3 比例进行细胞传代。

1.2.2 大鼠骨髓源性内皮祖细胞的鉴定

1.2.2.1 形态学鉴定 首次换液后, 每日在倒置显微镜下观察细胞形态并拍照记录。待每孔细胞形态变为梭形、分化成内皮祖细胞时, 用细胞计数板统计每孔细胞数量。

1.2.2.2 免疫荧光鉴定 取第三代分离培养的细胞进行免疫荧光法鉴定 Flk-1 和 CD133 的表达。将第三代分离培养的细胞制成细胞悬液, 以 1×10^6 /ml 的细胞浓度接种于已行 FN 包被的 24 孔培养板中, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中约 24 h, 使内皮祖细胞贴壁良好, 完成爬片。用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 3 次, 0.2% Triton X-100 作用 10 min 后, PBS 洗 3 次, 加入羊血清室温封闭 30 min, 倾去羊血清, PBS 冲洗 3 次, 加入兔抗大鼠 Flk-1 抗体 (1 : 50) 和小鼠抗大鼠 CD133 抗体 (1 : 50), 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗 3 次, 空白对照用 PBS 代替一抗。加入 FITC 标记的山羊抗兔抗体和 FITC 标记的山羊抗小鼠抗体, 避光室温放置 2 h, PBS 洗 3 次。每孔加入 DAPI 100 μ l, 避光室温放置 5 min, PBS 洗 3 次, 在载玻片上滴加抗荧光淬灭液封片后荧光显微镜下观察。

1.2.2.3 细胞功能学鉴定 同以上方法获得贴壁的内皮祖细胞, 每孔加入 Dil-ac-LDL 浓度为 10 μ g/ml 的 EGM-2 完全培养基 500 μ l, 37 °C 避光孵育 4 h 后弃培养液, PBS 洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每孔中加入 FITC-UEA-I, 37 °C 避光孵育 1 h 后弃去多余染料, PBS 洗 3 次。每孔加入 DAPI 100 μ l, 避光室温放置 5 min, PBS 洗 3 次, 在载玻片上滴加抗荧光淬灭液封片后荧光显微镜下观察。

1.2.3 内皮祖细胞增殖能力的鉴定 自首次换液后, 每日倒置显微镜下观察细胞生长情况。记录出现梭形细胞的时间和细胞铺满瓶底的时间。分别取生长状态良好的第 3 代细胞胰酶消化后制作成单细胞悬液, 以 1×10^5 /ml 的密度接种在 5 个 96 孔培养板中, 每孔 100 μ l。从第 2 天开始, 每 24 h 随机取一块板, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ l, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h 后置酶标仪上空白孔调零, 选择 490 nm 波长下测各孔光密度 (optical density, OD) 值, 连续测 5 d, 以时间为横轴, OD 值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较使用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 刚分离获得的细胞为圆形 (图 1A), 体积较小, 悬浮于培养液中。培养 48 h 后, 弃去未贴壁细胞, 直接贴壁组镜下可见贴壁细胞呈梭形或多角形 (图 1B, 箭头所指为梭形细胞), 核呈椭圆形, 部分细胞形成集落, 也有部分长梭形细胞首尾相连排列成直线状。密度梯度离心组镜下见大量小而圆的贴壁细胞, 未见明显梭形或多角形细胞, 直至培养 96 h 后见贴壁的梭形或多边形细胞。直接贴壁法首次出现梭形形态细胞的时间为 (49 ± 1.55) h, 而密度梯度离心法首次出现梭形形态细胞的时间为 (95.5 ± 2.26) h, 两者相比差异有统计学意义 ($t = 41.59$, $P < 0.01$)。培养 1 周后, 直接贴壁组细胞汇合度约 80% (图 1D), 密度梯度离心组细胞汇合度小于 50% (图 1C)。待贴壁细胞完全分化成内皮祖细胞时, 直接贴壁组细胞数量为 $(82.17 \pm 1.48) \times 10^4$ 个每孔, 密度梯度离心组细胞数量为 $(62.08 \pm 0.92) \times 10^4$ 个每孔, 两者相比差异有统计学意义 ($t = 28.25$, $P < 0.01$)。

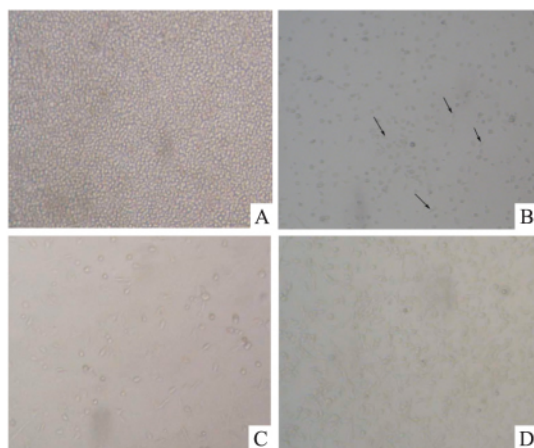


图1 内皮祖细胞生长情况 ×200

A: 刚分离获得的单核细胞; B: 48 h 已开始分化的内皮祖细胞;
C: 7 d 密度离心组内皮祖细胞; D: 7 d 直接贴壁组内皮祖细胞

2.2 内皮祖细胞的细胞表型鉴定 将获得细胞诱导培养后行免疫荧光染色,直接贴壁法和密度梯度离心法获得的细胞染色皆为 Flk-1 和 CD133 双阳性,红色为 Flk-1 阳性,绿色为 CD133 阳性,蓝色为 DAPI 对核的染色(图2),符合内皮祖细胞的免疫荧光鉴定。

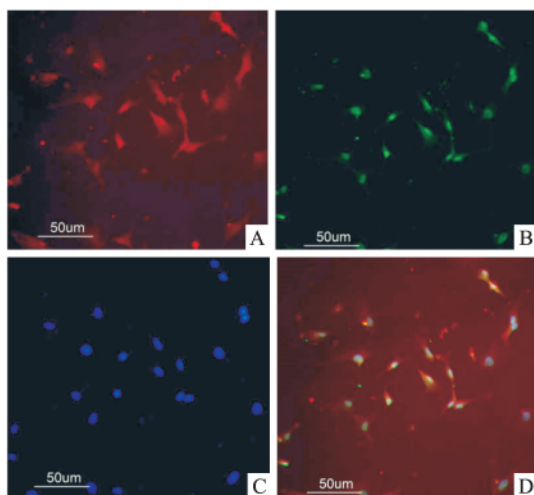


图2 内皮祖细胞免疫荧光鉴定结果 ×200

A: Flk-1 阳性; B: CD133 阳性; C: DAPI 标记的细胞核; D: 合成图像

2.3 细胞功能学鉴定 将获得细胞诱导培养后行 Dil-ac-LDL 及 FITC-UEA-1 荧光检测,倒置荧光显微镜下观察经过两种不同方法获得的细胞摄取 Dil-ac-LDL 在 565 nm 波长激发光激发时呈现红色荧光,而其结合 FITC-UEA-1 在 525 nm 波长激发光激发时呈现绿色荧光,蓝色为 DAPI 对细胞核的染色(图3),双荧光标记的细胞被认为是可以分化为内皮细胞的

前体细胞。

2.4 细胞增殖能力鉴定 在原代培养中,直接贴壁组在首次 48 h 换液即可见梭形或多角形形态的细胞,密度梯度离心组在 96 h 才开始出现梭形形态细胞。根据 CCK-8 法所绘制的生长曲线显示,直接贴壁组 OD 值为 0.251 ± 0.067 ,密度梯度离心组 OD 值为 0.225 ± 0.049 ,细胞原代培养后两组细胞增殖能力比较差异有统计学意义($t = 3.37, P < 0.05$),见图4。

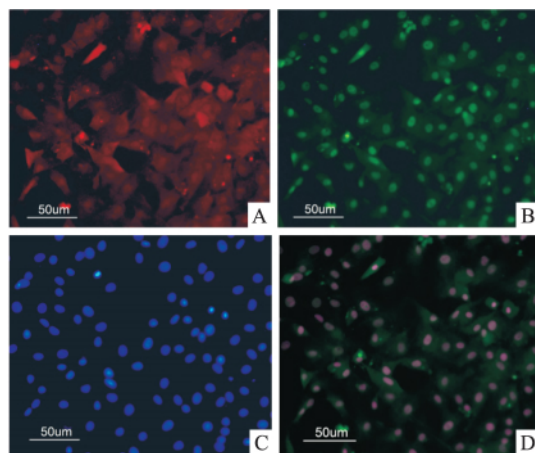


图3 细胞功能学鉴定 ×200

A: 摄取 Dil-ac-LDL 的细胞; B: 结合 FITC-UEA-1; C: DAPI 标记的细胞核; D: 合成图像

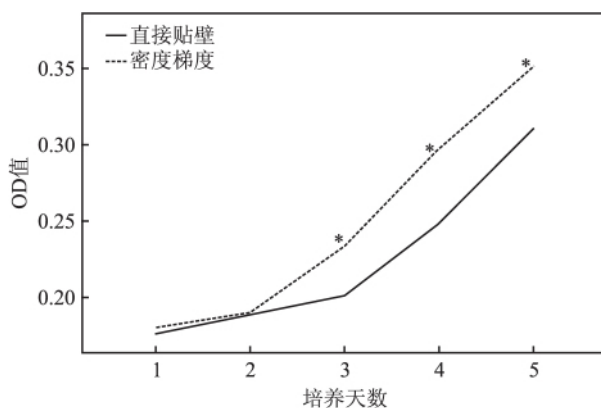


图4 CCK8 法检测内皮祖细胞增殖能力
与密度梯度离心组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

分离获得内皮祖细胞可以有很多来源部位,成人外周血、脐血、脾脏及骨髓等组织中均存在内皮祖细胞,其中,骨髓中内皮祖细胞数量最多^[6],大约是外周血中的内皮祖细胞数量的 500 倍。由于目前内皮祖细胞表面缺乏特异性表面标志物,学术界对内皮祖细胞的鉴定有较大争议,但是大多数人认为

Flk-1 和 CD133 双阳性和吞噬 Dil-ac-LDL 及结合 FITC-UEA-1 实验双阳性的细胞可以被认为是内皮祖细胞^[7]。本实验采用该方法来鉴定内皮祖细胞。

目前,在体外分离内皮祖细胞的方法有很多种,主要有密度梯度离心法和免疫磁珠分选法^[8]。免疫磁珠分选法主要采用 CD34 或 CD133 抗体,此方法最大的优点是可以收集到纯度较高的内皮祖细胞^[9]。但是目前内皮祖细胞缺乏特异性的表面标志物,同时免疫磁珠分选法要求实验条件较高、操作复杂、价格昂贵、获得细胞量少,因此难以推广。然而密度梯度离心法相对于免疫磁珠分选法操作简单,使用方便^[10],但可能获得的细胞纯度低,只能将骨髓中整个单核细胞(包括内皮祖细胞)分离出来,并包括部分血小板、成纤维细胞等。虽然密度梯度离心法操作相对简单,但是在操作过程中需要对细胞进行反复离心,对细胞损伤较大。相对于其他原代细胞,内皮祖细胞非常脆弱,在后期诱导培养过程中贴壁分化需要较长时间、增殖缓慢,这些可能和在提取过程中反复离心有很大关系。因此先使用红细胞裂解液去除骨髓中的大量红细胞,然后将获得的标本直接接种在 6 孔板里进行诱导培养,通过多次的传代纯化得到纯度较高的内皮祖细胞。通过免疫荧光鉴定和细胞功能学检测,由此两种方法获得的细胞皆是内皮祖细胞。并且直接贴壁法实验操作更加简单,获得的细胞增殖能力更强,可以为后期实验方便快捷的提供更多优质的内皮祖细胞。

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(5302): 964 - 7.

[2] Friedrich E B, Walenta K, Scharlau J, et al. CD34⁻/CD133⁺/VEGFR-2⁺ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities [J]. Circ Res, 2006, 98(3): e20 - 5.

[3] Aragona C O, Imbalzano E, Mamone F, et al. Endothelial progenitor cells for diagnosis and prognosis in cardiovascular disease [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 8043792.

[4] Wang S, Chen Z, Tang X, et al. Transplantation of vascular endothelial growth factor 165-transfected endothelial progenitor cells for the treatment of limb ischemia [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 4967 - 74.

[5] Bai Y Y, Peng X G, Wang L S, et al. Bone marrow endothelial progenitor cell transplantation after ischemic stroke: an investigation into its possible mechanism [J]. CNS Neurosci Ther, 2015, 21(11): 877 - 86.

[6] 张 硕, 杜怡斌, 杜公文, 等. 骨髓源性 EPCs 对脊髓源性 NSCs 增殖分化的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(1): 20 - 4.

[7] Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. Blood, 2000, 95(3): 952 - 8.

[8] Tepper O M, Capla J M, Galiano R D, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells [J]. Blood, 2005, 105(3): 1068 - 77.

[9] Wang S, Chen Z, Tang X, et al. Transplantation of vascular endothelial growth factor 165-transfected endothelial progenitor cells for the treatment of limb ischemia [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 4967 - 74.

[10] 王 丽, 张会峰, 袁慧娟, 等. 大鼠骨髓内皮祖细胞的分离培养与鉴定 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10): 1733 - 6.

Isolation and culture of endothelial progenitor cell by direct adherent method *in vitro*

Fang Xiao, Wang Kangkang, Gao Weilu, et al

(Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract The bone marrow taken from both hindlimbs of SD rats was divided into two parts, mononuclear cell was obtained by direct adherent method and density gradient centrifugation, respectively. Endothelial progenitor cell (EPC) was induced to differentiate from mononuclear cell when cultured 7 to 14 days in EGM-2. EPC was identified by immunofluorescence staining and experimental study of cell function; number of EPC and the time of EPC appeared were recorded; proliferation ability was examined by CCK-8 method. The time when EPC first emerged, number of EPC, and proliferation ability in direct adherent group were significantly than those in density gradient centrifugation group. Therefore, compared with density gradient centrifugation, the cell isolated by direct adherent method could get more cells, need less time to differentiate into EPC and have bigger proliferation potential.

Key words endothelial progenitor cell; bone marrow; direct adherent method; density gradient centrifugation