

人骨髓基质细胞体外分离及定向培养内皮细胞

冯 滨* 刘迎龙 冯 凯¹ 陈 虎¹ 龚 茹²

(中国医学科学院、中国协和医科大学阜外心血管病医院外科, 北京 100037; ¹军事医学科学院附属医院全军造血干细胞移植中心, 北京 100039; ²第三军医大学成都军医学院, 成都 610083)

摘要 用Ficoll(比重1.077 g/ml)从正常成人骨髓中分离骨髓基质细胞(BMSCs), DMEM-HG培养基内含20%FBS、GM-CSF(100 u/ml)、VEGF(10 ng/ml)、FGF(5 ng/ml)、L-谷氨酰胺(2 mmol/L)、肝素(90 u/ml), 以及抗生素液进行定向培养和扩增其中的内皮细胞(ECs), VIII因子相关抗原的免疫组化法和透射电镜观察(TEM)鉴定其细胞的性质。结果 5.0×10^5 个BMSCs在体外经定向ECs培养和扩增8代后, 获得了 6.0×10^9 个ECs, 扩增了约 1.2×10^4 倍。70%~80%的细胞对VIII因子相关抗原免疫组化呈阳性反应; 光镜下细胞呈典型的“鹅卵石”样; TEM下可观察到胞浆内有Weibel-palade小体, 证实为内皮细胞。实验表明, BMSCs在体外分离和定向培养的ECs, 经扩增后可能是心血管组织工程所需种子细胞的又一个重要来源。

关键词 人骨髓; 骨髓基质细胞; 内皮细胞; 定向培养

骨髓中除了间充质干细胞和造血干细胞外, 另外还含有骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)。BMSCs并非由单一的细胞群体组成, 而是由形态和表型各不相同的多种细胞群体构成。最近的研究表明^[1,2], 骨髓基质细胞中含有多种细胞的前体细胞/祖细胞克隆, 其中包括内皮细胞(endothelial cells, ECs), 单核/巨噬细胞等, 并能向这些细胞的成熟型分化。因此, 将骨髓基质细胞与组织工程学结合, 即将骨髓基质作为种子细胞, 与生物材料结合并实施移植, 依靠在体内局部组织的微环境诱导BMSCs分化和扩增为相应的组织细胞, 这样的设想在心血管组织工程中已有成功的报道^[1,3]。

基于上述原由, 我们设想体外分离人骨髓基质细胞, 定向培养和扩增内皮细胞, 并进行鉴定, 以开辟心血管组织工程种子细胞的新来源。

1 材料与方 法

1.1 材料

骨髓样品取自军事医学科学院附属医院全军造血干细胞移植中心的健康成人献髓员, 年龄在25~40岁。

1.2 试剂与仪器

DMEM-HG培养基(Sigma公司, 美国); 胎牛

血清(FBS, 天津市川页生化制品有限公司, 批号: 2003年0509); Ficoll-Hypaque(比重1.077, 天津血液学研究所提供); 粒-巨噬系集落刺激因子(GM-CSF)(Immunex公司, 美国); 血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(Pepro Tech EC LTD公司, 英国); L-谷氨酰胺、肝素、青霉素及链霉素等均为国内产品。兔抗人VIII因子相关抗原(VIII-RAg)多克隆抗体(北京中山生物技术公司)。细胞培养板和培养皿(NUNCLON公司, 德国); 生物净化工作台(北京中化生物技术研究所); 超速低温离心机(CS-15R, Beckman公司, 美国); CO₂培养箱(NAPCO, 美国); 倒置显微镜(Olympus, 日本); 透射电镜(TEM, JEM-1010, 日本)。

1.3 BMSCs的分离与定向诱导培养为内皮细胞

肝素化骨髓(肝素终浓度为40~50 u/ml)以含10%FBS的DMEM-HG培养液对半稀释后, Ficoll细胞分离液(比重1.077 g/ml)梯度离心(1800 r/min, 20 min)制备单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)。细胞经PBS洗涤两遍后计数, 按 2×10^5 个细胞/cm²

收稿日期: 2003-11-06 接受日期: 2004-05-20

国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2001AA216061)、国家自然科学基金(No.30271289)、中国博士后科学基金(No.2003033224)资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-68314466-8376, Fax: 010-68313012, E-mail: fsn9977@yahoo.com.cn

的密度接种于 75 cm² 培养瓶中。

骨髓基质细胞中的内皮细胞定向培养体系参考文献^[4]并加以改进,其组成为:DMEM-HG, 20%FBS、GM-CSF(100 u/ml)、VEGF(10 ng/ml)、FGF(5 ng/ml)、L-谷氨酰胺(2 mmol/L)、肝素(90 u/ml)、青霉素液(100 u/ml)、链霉素液(100 u/ml)。原代培养每隔 3~4 天半量换液去除部分悬浮细胞,继续培养 2~3 周后形成黏附基质细胞层。贴壁层细胞达到 90% 以上汇合后,经 0.125% 胰蛋白酶消化按 6×10^3 个细胞/cm² 的密度接种于 75 cm² 培养瓶中。重复上述细胞传代的操作即可实现细胞的有效扩增。

1.4 ECs 的形态学观察

当光镜下诱导的细胞长成单层,呈“鹅卵石”(cobblestone)样时行细胞摄像;并制备细胞悬液,分别用 5% 戊二醛和 1% 四氧化钨固定,制成电镜标本进行透射电镜(TEM)观察。

1.5 ECs 的免疫组化鉴定

VIII 因子(vWF)相关抗原的免疫组化鉴定(ABC 法):选择 BMSCs 经定向培养体系培养 21~28 天的细胞,消化后离心(1200 r/min, 8min),用离心涂片机涂片于载玻片上,丙酮固定细胞。采用 ABC 法进行检测,并设阴性对照组;滴加 1:100 的兔抗人 VIII-RAg 多克隆的抗体(一抗)。倒置显微镜下观察,拍照。细胞浆内出现棕褐色颗粒为阳性反应。随机选取光镜下 10 个视野,计数阳性细胞占总细胞的比例,以确定 BMSCs 定向培养为 ECs 的效率。

2 结果

2.1 骨髓基质细胞的分离、定向分化、扩增及形态学观察

原代培养 72 h 后 BMSCs 可出现贴壁、呈单个分散,或形成几个成团的细胞集落;细胞的形态不均一,呈现圆形、多角形、梭形(图 1)。已经贴壁的细胞开始增殖分裂,1 周后贴壁细胞体积增大,形态多样,细胞群聚而形成单独的细胞群;12 天左右形成集落;培养至 21~28 天细胞生长达 80%~90% 汇合单层,呈“铺路卵石样”,每个集落含有数百至数千个细胞(图 2)。

汇合单层的细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化后可获得 $4.5 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^5$ 个,将这些细胞扩增培养后,形态与原代相似,传代细胞一般生长 7~10 天达汇合单层,可继续传代扩增。在本实验中,培养的 ECs

共传代 8 代,由 5.0×10^5 个 BMSCs 最后获得了 6.0×10^9 个 ECs,扩增了约 1.2×10^4 倍。

2.2 ECs VIII 因子相关抗原的免疫组化结果

有大约 70%~80% 的细胞呈阳性反应,胞浆内出现棕褐色颗粒,证明定向培养的是内皮细胞(图 3);而阴性对照组细胞胞浆无棕褐色颗粒(图 4)。

2.3 ECs 的 TEM 观察

电镜下胞浆内可见 Weible-palade 小体(简称 W-P 小体),是 ECs 特有的颗粒,长约 3 μm ,直径 0.1~0.3 μm ,外包多层单位膜,内有 6~26 条直径约 15 nm 左右的平行细管,包埋于中等电子密度的基质中,W-P 小体的横断面内可见细管呈涡状排列(图 5)。

3 讨论

目前,一般根据 BMSCs 的形态特点将其分为髓子样细胞、网状细胞、脂肪细胞、前体脂肪细胞、平滑肌细胞、成纤维样细胞、内皮样细胞和上皮样细胞等。而由其组成的黏附细胞层(贴壁细胞层),主要由 4 类细胞组成:60%~70% 为成纤维细胞,10%~20% 内皮和上皮样细胞,10%~20% 单核巨噬细胞,5%~10% 外网膜状细胞^[5]。低密度种植骨髓,可以形成成纤维母细胞样的外观集落,这些成纤维母细胞样的集落可以分化成不同的细胞型,如成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞、脂肪细胞等^[1,6]。实际上,BMSCs 中含有多种细胞的前体/祖细胞,其中包括内皮前体/祖细胞^[1,2]。

BMSCs 能分泌 VEGF^[7,8]。Kaigler 等^[7]发现骨髓基质细胞分泌的 VEGF 量为 2.4~3.1 ng/10⁶ 个细胞/天,能提高内皮前体细胞的活性和分化,并调控体内血管的生长,这进一步说明了 VEGF 在内皮前体/祖细胞分化中起关键作用,Lin 等^[9]研究发现,骨髓单个核细胞经 VEGF 作用 27 天后扩增了约 1 000 倍,并表达内皮细胞特异抗原,也证实了骨髓中含有高增殖潜能的内皮前体/祖细胞。

BMSCs 与骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)同存在于骨髓中,而且都具有贴壁性,但它们各有其特点。MSCs 是用相对密度 1.073 的 Percoll 梯度离心获得,而 BMSCs 用相对密度 1.077 的 Ficoll-Paque(淋巴细胞分离液)梯度离心获得。由于 Ficoll 的比重较 Percoll 高,这就保留了部分存在于 Percoll 液面下的细胞。体外培养的原代和一代的 BMSCs 包括的细胞是非同质性的,有造血干细胞和基质细胞;原代和一代的 MSCs 却是同质性的成纤



图1 BMSCs原代培养第72 h形成的几个成团的细胞集落(光镜, $\times 200$)

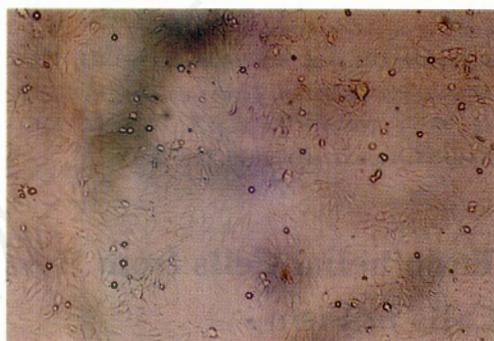


图2 BMSCs原代培养第28天, 细胞生长达80%~90%汇合单层, 呈“铺路卵石样”(光镜, $\times 100$)



图3 BMSCs定向培养的ECs的VIII因子(vWF)免疫组化鉴定(光镜, $\times 200$)

维样细胞。虽然MSCs和BMSCs都表达SH-2和SB-10, 但MSCs不表达CD14和CD45, 而BMSCs则表达CD14和CD45。将CD34⁺造血干/祖细胞分别与MSCs和BMSCs共同培养后发现, BMSCs能够更有效地支持造血干/祖细胞的分化。

尽管BMSCs的形态受诸多因素的影响, 但BMSCs中的ECs具有如下特征^[5]: 呈卵圆形但更趋于马蹄状, 平均直径32 μm , 多为单个核, 偶见双核, 胞浆内有空泡。它表达凝血因子VIII/vWF、CD31、血小板反应素(thrombospondin)、Flk-1、



图4 BMSCs体外定向培养ECs的VIII因子(vWF)免疫组化鉴定阴性对照组, 胞浆中无棕褐色颗粒(光镜, $\times 200$)

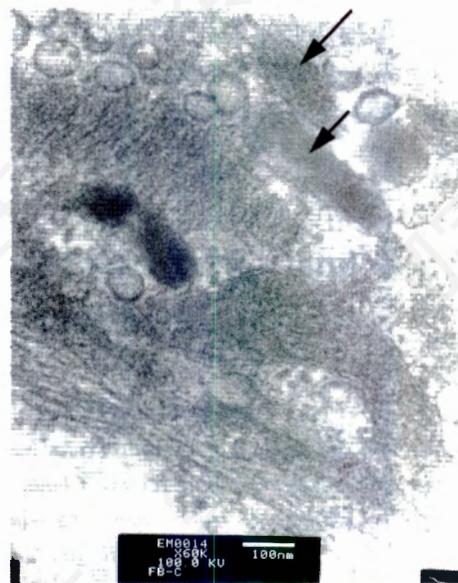


图5 TEM鉴定BMSCs定向培养ECs的W-P小体(↓)(TEM, $\times 60\,000$)

Tie-2、乙酰LDL和UEA-1。原代培养的ECs CD34表达阳性, 但从第二代转为阴性。

已有学者进行了建立人或小鼠的BMSCs分化为内皮细胞系的研究工作^[10-12]。阎艳等^[12]发现在CFU-F培养体系中加入GM-CSF(100 u/ml), 对小鼠和人骨髓的ECs的生长有明显刺激作用, 这提示应用GM-CSF培养BMSCs, 有可能获得纯的ECs。然而, 目前BMSCs定向培养ECs遇到很大困难, 主要在于分离的BMSCs容易混入较多的成纤维细胞和巨噬细胞等, 这些细胞的生长速度超过了ECs生长。因此, 为了抑制这些细胞的生长, 应在培养介质中加入肝素(90 u/ml)^[10, 13]。在定向培养体系中, 我们采用ECs的标准培养介质DMEM-HG, 内含20%~30%胎牛血清、抗生素液(青霉素100 u/ml、链霉素100 u/ml), 并加GM-CSF(100 u/ml)、

VEGF(10 ng/ml)、FGF(5 ng/ml)和肝素(90 u/ml); 此外还可加入营养添加剂 L- 谷氨酰胺。VEGF 在培养基中起定向培养 ECs 的关键作用。我们经 Ficoll 分离可收获 5.0×10^5 个 BMSCs, 在体外经含 VEGF 的定向诱导分化后, VIII 因子免疫组化和 TEM 观察均证实定向培养的细胞为 ECs。ECs 经传代培养、扩增 8 代后, 最后获得了 6.0×10^9 个 ECs, 扩增了大约 1.2×10^4 倍, 能满足临床上组织工程的高密度 ($>10^5$ 个细胞/cm²) 种植需要。

应用人类 BMSCs 作为组织工程研制的种子细胞有几个优点: (1) 用一个简单的骨髓穿刺针, 容易收集, 可避免损伤血管的完整性; (2) 体外经定向扩增培养能成为多种种子细胞的来源。因此, 成人 BMSCs 来源的 ECs 可能是心血管组织工程种子细胞的又一个重要来源。今后的工作将是进一步优化

BMSCs 体外分离和定向培养为 ECs 技术, 使之成为更加简便, 实用的特点。

参考文献 (References)

- [1] Kadner A *et al.* *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, **21**: 1055
- [2] Reyes M *et al.* *J Clin Invest*, 2002, **109**: 337
- [3] Hoerstrup SP *et al.* *Circulation*, 2002, **106**: 1143
- [4] Jiang Y *et al.* *Exp Hematol*, 2002, **30**: 869
- [5] 罗成基等主编。造血微环境基础与临床, 江苏: 世界医药出版社, 2001
- [6] Gojo S *et al.* *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 2002, **103**: 616
- [7] Kaigler D *et al.* *Tissue Eng*, 2003, **9**: 95
- [8] Villars F *et al.* *J Cell Biochem*, 2000, **79**: 672
- [9] Lin Y *et al.* *J Clin Invest*, 2000, **105**: 71
- [10] Schweitzer CM *et al.* *Exp Hematol*, 1995, **23**: 41
- [11] Almeida-Porada G *et al.* *J Lab Clin Med*, 1996, **128**: 399
- [12] 阎 艳等。中国应用生理学杂志, 1998, **14**: 236
- [13] Kang SS *et al.* *Surgery*, 1995, **118**: 280

Orientalional Culture and Evaluation of Endothelial Cells from Human Bone Marrow Stromal Cells *in Vitro*

Bin Feng*, Ying-Long Liu, Kai Feng¹, Hu Chen¹, Ru Go²

(Department of Cardiac Surgery, Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China; ¹The Hemopoietic Stem Cell Transplantation Center, Affiliated Hospital of Military Medical Academy of Science, Beijing 100039, China; ²Chengdu Army Medical College, Third Military Medical University, Chengdu 610083, China)

Abstract Human bone marrow stromal cells (BMSCs) were separated by gradient centrifugation on Ficoll (density 1.077 g/ml) from human bone marrow (HBM) *in vitro*, orientational cultured and amplified endothelial cells (ECs) in DMEM (high glucose) with 20% fetal bovine serum (FBS), GM-CSF (100 u/ml), VEGF(10 ng/ml), FGF(5 ng/ml), L-glutamine (2 mmol/L), heparin (90 u/ml) and antibiotics for about 21–28 days. The property of these ECs was evaluated by morphology with light microscopy and transmission electron microscopy (TEM), and immunohistochemistry with factor VIII related antigen. After orientational cultured for endothelial cells, 5.0×10^5 of BMSCs in the primary culture was increased to 6.0×10^9 of ECs, or to increase 1.2×10^4 times after 8 generations incubated. More than 70%–80% of the cells from BMSCs cultured after 21–28 days were positive stain for factor VIII related antigen by immunohistochemistry assay. The typical “cobblestone” of these cells presented was observed by light microscopy. The Weible-palade corpuscle, which form is typical morphology of ECs, was also observed by TEM in the cytoplasm. The results showed that BMSCs from HBM had the capability in orientational culture for ECs, which after amplification *in vitro* might be another source of the seed cells in the cardiovascular tissue-engineering.

Key words human bone marrow; bone marrow stromal cells; endothelial cells; orientational culture

Received: November 6, 2003 Accepted: May 20, 2004

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2001AA216061), the National Natural Science Foundations of China (No. 30271289) and the Postdoctoral Science Foundations of China (No. 2003033224)

*Corresponding author. Tel: 86-10-68314466-8376, Fax: 86-10-68313012, E-mail: fsn9977@yahoo.com.cn