

猪外周血内皮祖细胞的分离培养和鉴定

陈书艳* 王飞 周卿 颜雪芸 许勤 舒红 荣焯之

(上海第二医科大学附属新华医院心内科, 上海 200092)

摘要 从猪外周血分离出单个核细胞, 置于EGM-2培养基中培养, 通过挑选细胞集落并对之进行免疫组织化学染色和荧光染色来鉴定内皮祖细胞。结果显示猪的内皮祖细胞为长梭形或纺锤形并呈集落生长, 能够吞噬已酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)并结合凝集素 BS-1, 同时具有内皮细胞标志 CD31、flk-1 和 von willebrand factor(vWF)。这些结果表明能够从猪的外周血中分离培养出内皮祖细胞, 为自体内皮祖细胞移植促进猪慢性心肌缺血模型血管新生的研究打下了基础。

关键词 猪外周血; 内皮祖细胞; 血管新生

治疗性血管新生是目前研究的一个热点。最初的研究显示单纯给予促血管生长因子如血管内皮细胞生长因子(VEGF)、酸性成纤维细胞生长因子(a-FGF)、胰岛素样生长因子(IGF)等能够促进缺血组织的血管新生。近来的研究表明在各种成年动物和人的骨髓、脐带、外周血中均可分离出内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)^[1-3], 将它们移植到下肢缺血和心肌缺血的动物模型中, 能有效地促进缺血组织的血管新生^[4-5], 同时发现在缺血组织中有标记的内皮祖细胞。因此本研究拟从猪的外周血中分离培养出内皮祖细胞, 为进一步研究自体内皮祖细胞移植促血管新生提供细胞学基础。

1 材料和方法

1.1 猪外周血单个核细胞的分离和培养

从猪股静脉抽取外周血, 肝素抗凝, D-Hanks 液稀释。小心加到 Histopaque1077(Sigma 公司)上, 密度梯度离心, 吸取中间的白色云雾层, 将获得的细胞接种于培养板, 加入 EGM-2(Clonetics 公司)培养液。每孔在接种前用纤维连接蛋白(Sigma 公司)温育 1~2 h。在培养第 4 天时, 倒置显微镜观察细胞生长情况, 用 D-Hanks 液洗去未贴壁生长的细胞, 贴壁生长的细胞给予 EGM-2 继续培养至 10~14 天。

1.2 细胞集落的挑选

经上述培养的细胞形成多个集落, 在倒置相差显微镜挑选每个集落予以传代。在选取的细胞集落区域小心加入少许 0.25% EDTA 胰蛋白酶, 显微镜下观察细胞消化情况, 加入 EGM-2 终止消化, 置入新的培养孔中继续培养, 约每 2~3 天进行传代。

1.3 内皮祖细胞的鉴定

1.3.1 细胞荧光染色 内皮祖细胞具有吞噬已酰化低密度脂蛋白和结合凝集素的功能。因此, 用细胞双染色的方法来鉴定此特性。在培养的细胞中, 加入 15 μ l/ml DiI 标记的已酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL, molecular probes 公司), 37 $^{\circ}$ C 放置 24 h 后, PBS 洗涤, 用中性福尔马林固定 15 min, 再加入 20 μ g/ml FITC 标记的凝集素 BS-1(vector 公司), 室温放置 30 min 后用 PBS 清洗, 荧光显微镜下观察, 显示红色荧光的为吞噬了 ac-LDL 的细胞, 绿色荧光为结合 BS-1 的细胞。

1.3.2 免疫组织化学染色 内皮祖细胞具有内皮细胞的特异性标志 CD31、内皮细胞生长因子受体-2(flak-1)和 vWF。通过免疫组织化学染色来确定培养的细胞是否具有上述标志, 并以人胚肾细胞 HEK293 作为阴性对照, 以不加一抗的培养细胞作为空白对照。简而言之, 将培养的细胞用中性福尔马林固定 15 min, 内源性过氧化物酶用 2% H₂O₂ 灭活, 非特异性结合用牛血清白蛋白阻断。然后分别与单克隆抗体 CD31(Antibody 公司)、flak-1(Santa cruz 公司)和多克隆抗体 vWF(Antibody 公司)温育 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 清洗后加入二抗 30 min, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 显微镜下观察, 胞浆棕色为阳性反应细胞。

收稿日期: 2004-09-29 接受日期: 2004-12-21

国家自然科学基金资助项目(No.30270543)

* 通讯作者。Tel: 021-65790000-7061, Fax: 021-65291068, E-mail:

shuyanchencn@yahoo.com.cn

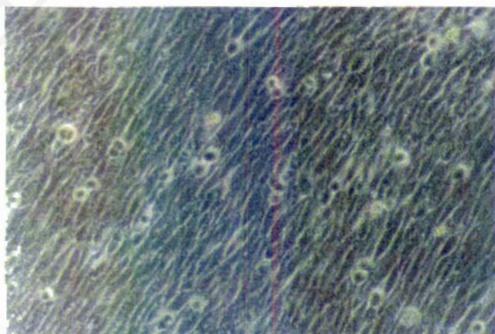


图1 光镜下内皮祖细胞形态($\times 10$)

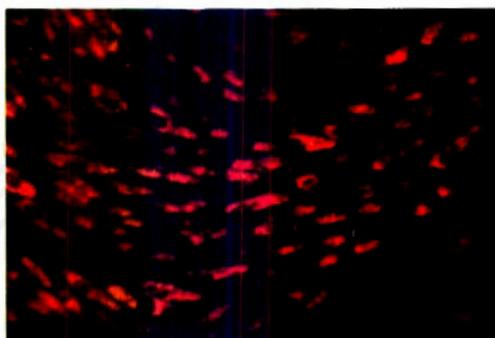


图2 吞噬了 ac-LDL 的内皮祖细胞, 呈现红色荧光($\times 10$)

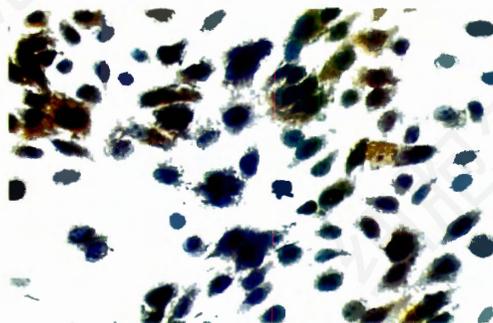


图3 VIII 因子免疫组化染色($\times 20$)
棕色为 VIII 因子阳性细胞。

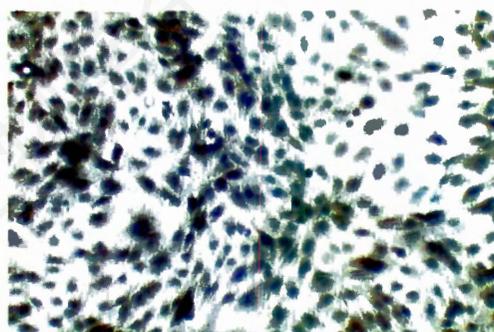


图4 flk-1 免疫组化染色($\times 10$)
棕色为 flk-1 阳性细胞。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的形态

猪外周血分离的单个核细胞在培养第4天时可见多数细胞贴壁生长, 呈椭圆形聚集成团, 在培养第10~14天时, 内皮祖细胞呈长梭形或纺锤形(图1)。

2.2 内皮祖细胞的特性

内皮祖细胞培养至10~14天时, 具有内皮细胞的功能特性, 将 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白和贴壁的细胞在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 24 h 后, 这些细胞能够摄取 ac-LDL, 呈现红色荧光(图2)。同时能够结合凝集素 BS-1, 呈现绿色荧光。

2.3 内皮祖细胞的标志

对培养10~14天的细胞进行免疫组织化学检查, 结果显示这些细胞对内皮细胞标志 CD31、flk-1 和 vWF 的抗体都呈现了阳性染色反应(图3, 图4)。

3 讨论

先前的研究显示在各种成年动物和人的骨髓、脐带和外周血中能分离出内皮祖细胞^[1-3]。内皮祖细

胞是内皮细胞的前体细胞, 在生理和病理条件下能够替代修复损伤的内皮细胞, 并能促进缺血组织的血管新生, 对维持内皮细胞的完整性极其重要。

内皮祖细胞是直接产生血管内皮细胞的前体细胞。近年来, 应用内皮祖细胞移植治疗缺血性疾病是研究的一个热点, 并取得了鼓舞人心的结果。Kalka 等^[4]通过体外扩增的内皮祖细胞移植, 成功地促进了下肢缺血裸鼠模型的血管新生并减少了下肢的致残率。之后在心肌缺血模型的实验中也取得了同样的结果^[5]。本研究的结果显示: 从猪外周血取得的单个核细胞在 EGM-2 培养液中培养10~14天后, 能够获得梭形的内皮细胞样形态。它们能吞噬 ac-LDL, 并结合凝集素 BS-1。同时它们对内皮细胞标志 vWF、CD31 和 flk-1 的抗体免疫组化染色也呈阳性反应。从猪的外周血中培养的内皮祖细胞, 由于种属的特异性, 与从人类的外周血中培养的内皮祖细胞相比具有差异性。人的内皮祖细胞增殖能力有限, 而本研究显示猪的内皮祖细胞能够多次传代并保持良好的分裂增殖能力。最近有研究显示人的内皮祖细胞可分为早期内皮祖细胞和晚期内皮祖细胞, 其中晚期内皮祖细胞具有较强的增殖能力^[6],

因此本研究也可能获得的是晚期内皮祖细胞。凝集素 UEA-1 是人类所特有的, 不能与猪的内皮祖细胞结合, 因此我们用猪的特异性凝集素 BS-1 来进行检测。但成熟的内皮细胞也具有上述特征, 而 AC133 被认为是区分内皮祖细胞和成熟内皮细胞的标志, 其在成熟的内皮细胞中不表达, 虽然本研究未做 AC133 的鉴定, 但由于循环中的成熟内皮细胞极其稀少^[7], 且分裂增殖能力有限, 而我们所得的细胞增殖能力较强, 可以排除成熟内皮细胞的污染, 因此通过上述的鉴定, 证明从猪的外周血中培养得到了内皮祖细胞。

治疗性血管新生为那些失去用传统方法如经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)或冠脉搭桥术治疗的患者提供了新的希望。冠心病多见于老年患者, 且大都与高血压、高血脂和糖尿病等并存。而这些因素都能损害内皮祖细胞的功能。并且外周血中的内皮祖细胞数量有限, 通过体外扩增, 每 100 ml 外周血大约能获得 5×10^6 个内皮祖细胞。要获得满意的治疗性血管新生效果, 大约每克体重需要移植 2×10^4 个内皮祖细胞。据此估算, 一个成人大约需要 20 L 外周血才能达到满意的治疗性血管新生的效

果^[4]。因此, 能够获得有效的、大量的内皮祖细胞将成为治疗性血管新生的关键。内皮祖细胞移植后能够植入到缺血组织的局部, 一方面它所分泌的细胞因子能够在局部发挥促血管新生作用, 另一方面它提供了内皮细胞的来源。如果在体外将促血管生长因子基因导入内皮祖细胞, 既能增强内皮祖细胞的增殖、黏附和迁移能力^[8], 改善内皮祖细胞的功能, 又能在移植后增强局部促血管生长因子基因的表达, 更加有效的促进血管新生。因此, 内皮祖细胞是转基因的理想靶细胞。本研究从猪的外周血中培养得到内皮祖细胞, 为自体内皮祖细胞移植及转基因的自体内皮祖细胞移植打下细胞学基础, 为将来治疗性血管新生用于临床提供实验依据。

参考文献 (References)

- [1] Asahara T *et al. Science*, 1997, **275**: 964
- [2] Asahara T *et al. Circ Res*, 1999, **85**: 221
- [3] Murohara T *et al. J Clin Invest*, 2000, **105**: 1527
- [4] Kalka C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 3422
- [5] Kawamoto A *et al. Circulation*, 2001, **103**: 634
- [6] Hur J *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 288
- [7] Solovey A *et al. N Engl J Med*, 1997, **337**: 1584
- [8] Iwaguro H *et al. Circulation*, 2002, **105**: 732

Isolation and Culture of Endothelial Progenitor Cells from Pig Peripheral Blood

Shu-Yan Chen*, Fei Wang, Qin Zhou, Xue-Yun Yan, Qin Xu, Hong Shu, Ye-Zhi Rong

(Department of Cardiology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China)

Abstract Mononuclear cells were isolated from pig peripheral blood by density-gradient centrifugation and cultured in EGM-2. After 10 to 14 days of culture, adherent cells forming colony were selected. Immunohistochemistry and fluorescent staining was performed to identify the expressing of EC-specific antigens and functions. Results show that after 10 days of culture, the adherent cells resulted in a spindle-shaped, EC-like morphology. These cells have the ability to endocytose ac-LDL and bind BS-1 lectin. They also could be shown to have EC specific markers such as CD31, flk-1 and vWF. These results demonstrate that endothelial progenitor cells (EPCs) can be isolated and cultured from pig peripheral blood and provide a cell source for the further investigation of autologous EPCs transplantation contributing to promote angiogenesis in pig chronic cardiac ischemia.

Key words pig peripheral blood; endothelial progenitor cells; angiogenesis

Received: September 29, 2004 Accepted: December 21, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270543)

*Corresponding author. Tel: 86-21-65790000-7061, Fax: 86-21-65291068, E-mail: shuyanchencn@yahoo.com.cn