

不同培养基对鸡血管内皮祖细胞增殖能力的影响

白春雨^{1,2} 侯玲玲³ 官雪莲² 马月辉² 关伟军^{2*} 庞全海^{1*}

(¹山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; ²中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;

³北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

摘要 采用密度梯度离心法分离鸡血管内皮祖细胞, 通过 Dil-acLDL 和 FITC-UAEI 双阳性鉴定血管内皮祖细胞。在三种不同的培养基即培养基 A、培养基 B、培养基 C 中进行体外扩增培养, 经生长曲线、扩增能力和克隆形成数量三方面评价这三种培养基, 结果表明培养基 A 在体外最适合鸡血管内皮祖细胞的体外扩增。细胞生长曲线呈现明显的“S”形, 细胞群体倍增时间约为 23.4 h, 体外扩增可至 9 代, 细胞克隆形成总数为 38。该研究为血管内皮祖细胞体外增值与临床应用奠定了实验依据。

关键词 鸡; 血管内皮祖细胞; 干细胞; 分离培养; 体外扩增; 鉴定

血管内皮祖细胞(vascular endothelial progenitor cells, VEPCs)是血管内皮的前体细胞, 1997年, Asahara 等人使用免疫磁珠的方法从外周血分离到 CD34⁺ 阳性细胞并证实其具有分化为成熟内皮细胞和体内成血管的能力^[1]。随后, 在骨髓、脂肪、脐血及胎肝中相继证实了内皮祖细胞的存在^[2-7]。内皮祖细胞的发现不仅为研究血管再生机制提供了重要线索, 也为缺血性疾病的治疗和抑制癌症的转移提供了新的方法^[8]。但是, 血管内皮祖细胞对体外培养的要求非常苛刻, 体外培养时极易分化为成熟的内皮细胞, 本研究选用几种不同培养基, 以鸡血管内皮祖细胞为研究对象, 摸索适宜鸡血管内皮祖细胞体外扩增的培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料

培养基 DMEM/F12、DMEM 和 M199 均为 GIBCO 公司产品; bFGF、VEGF 和 IGF-1 为 PeproTech 公司产品。培养基 A: DMEM/F12+10% 血清 +10 ng/ml bFGF+10 ng/ml VEGF +10 ng/ml IGF-1+100 U/ml 青霉素 +100 g/ml 链霉素 +2mmol/L L- 谷氨酰胺; 培养基 B: DMEM+10% 血清 +10 ng/ml bFGF+10 ng/ml VEGF+10 ng/ml IGF-1+100 U/ml 青霉素 +100g/ml 链霉素 +2mmol/L L- 谷氨酰胺; 培养基 C: M199+10% 血清+10 ng/ml bFGF+10 ng/ml VEGF+10 ng/ml IGF-1+100 U/ml 青霉素 +100 g/ml 链霉素 +2mmol/L L- 谷氨酰胺。

1.2 方法

1.2.1 鸡内皮祖细胞的分离培养与鉴定 出壳 1

日龄北京鸡, 取其股骨, 剔掉股骨上的肌肉及其他组织, 无菌条件下使用基础培养基冲出骨髓, 收集至离心管中, 以 800 r/min 离心 10 min。收集离心后的细胞, 重新悬浮细胞, 按照 1:1 的比例加到密度为 1.077 的 percoll 分离液上方, 注意避免与分离液混和。以 2 000 r/min 离心 30 min, 吸取单个核细胞层, 用 5 倍体积的培养液洗两次, 依次以 2 000r/min 和 1 500 r/min 在室温下离心 8 min, 去除混杂的 percoll 分离液和血小板。将细胞重悬于培养液中, 再接种到铺有 0.1% 明胶的培养板中, EPCs 培养基培养, 每隔 3 d 换一次新鲜培养基。相差显微镜下观察细胞形态。取贴壁传代后的 P1 代细胞, 根据 Vasa M 的方法^[9], 通过检测血管内皮祖细胞对 Dil-acLDL 和 FITC-UAEI 的吞噬能力以鉴定鸡内皮祖细胞。用培养的 P1 代细胞爬片, 在含 10 mg/L 的 DiI-acLDL (Invitrogen) 的培养液中孵育 24 h, 然后用 4% 的多聚甲醛固定, PBS 漂洗后再与 10 mg/L 的 FITC-UAEI (Sigma) 作用 1 h, 标本在激光共聚焦显微镜下观察, 红色和绿色双荧光叠加后的黄色细胞为阳性细胞。

1.2.2 内皮祖细胞生长曲线的绘制 分别用培养基 A、培养基 B 和培养基 C 培养 EPCs 细胞。以 1.0×10^4 /ml 将细胞接种于包被明胶的 24 孔板培养孔内, 每

收稿日期: 2010-02-03 接受日期: 2010-05-25

国家科技支撑项目(No.2006BAD13B08, No.2008BADB2B01)、“863”课题基金(No.2006AA10Z198, No.2007AA10Z170)和转基因生物新品种培育科技重大专项(No.2008ZX08009-003)资助项目

* 通讯作者。Tel:0354-6285989, E-mail:panguanhai@126.com; Tel:010-62815992, E-mail:wjguan86@iascaas.net.cn

天各取 3 孔细胞进行消化、用台盼蓝鉴定细胞活率并计数。每孔计数 3 次, 计算平均值, 连续进行 8 d。以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴, 绘制生长曲线, 计算细胞群体倍增时间(population doubling time, PDT), 其计算公式为: $PDT=(t-t_0) \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$

其中, t_0 : 培养起始时间; t : 培养终止时间; N_0 : 培养初始细胞数; N_t : 培养终止细胞数。

1.2.3 不同培养基培养的内皮祖细胞传代数比较
原代细胞按上述方法分离后, 分别采用培养基 A、培养基 B、培养基 C 培养原代细胞各 5 孔, 待细胞生长到 80% 融合时, 用 0.125% 胰酶 + 0.01% EDTA 消化, 按照 1:2 比例传代, 计算平均代数。

1.2.4 不同培养基培养的内皮祖细胞形成克隆数比较
原代细胞按上述方法分离后, 分别采用培养基 A、培养基 B、培养基 C 培养原代细胞, 每种培养

基培养细胞 8 孔, 5 d 后计算每种培养基所培养细胞形成的“血岛”数。

2 结果

2.1 内皮祖细胞形态学观察

新分离的内皮祖细胞呈圆形, 大小不一, 48 h 后开始贴壁, 细胞变大, 渐伸展, 贴壁后的细胞呈梭形。4~8 d 细胞生长迅速, 核分裂相明显, 形态有梭形、三角形、纺锤形或不规则形, 并出现细胞集落, 中间的为圆形细胞, 边缘细胞出芽长出, 呈单层生长, 表现为“血岛”样结构, 见图 1。

2.2 血管内皮祖细胞的鉴定

采用 DiI-acLDL 和 FITC-UEAI 对细胞染色, 然后用激光共聚焦显微镜作初步鉴定, DiI-acLDL 和 FITC-UEAI 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EPC, 如

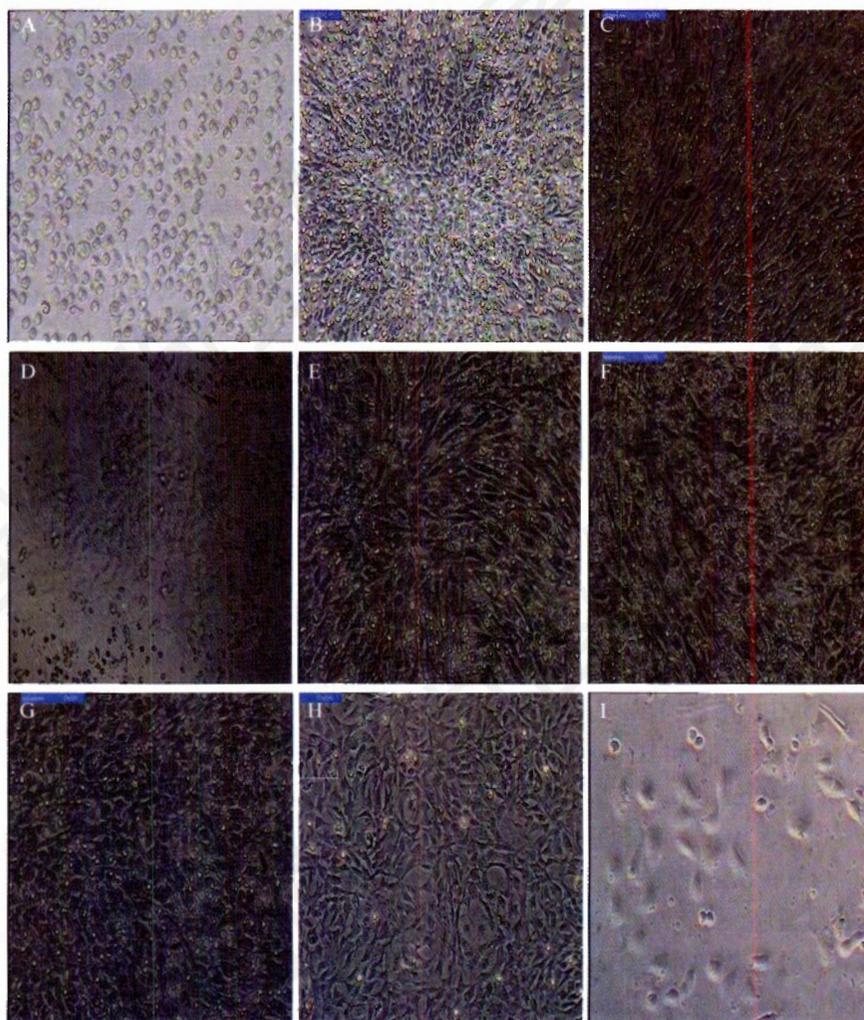


Fig.1 Morphology of chicken VEPCs *in vitro*

A: cells plated onto microplates after 0 hours; B: blood island structure of the VEPCs; C: linear growth of the VEPCs; D: slabstone-like appearances of the VEPCs; E: P1 VEPCs before passage; F: P3 VEPCs before passage; G: P5 VEPCs before passage; H: P7 VEPCs before passage; I: P9 VEPCs.

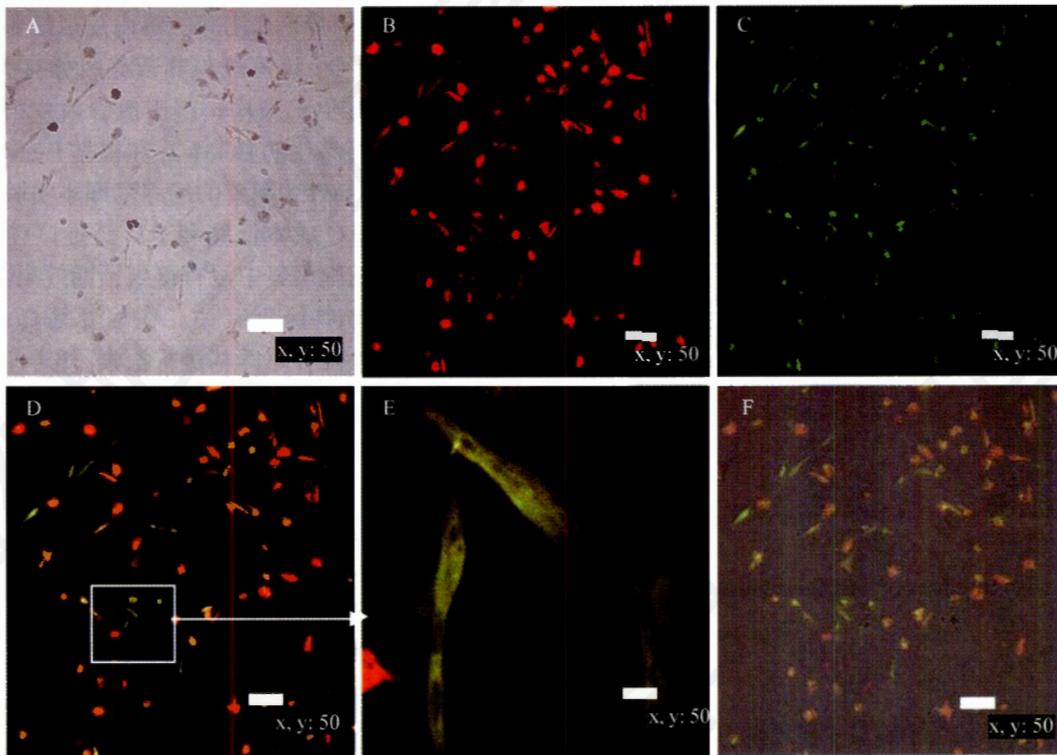


Fig.2 Chickens VEGCs that engulfed DiI-acLDL and FITC-UAEI

A: phase contrast; B: DiI-acLDL; C: FITC-UAEI; D: DiI-acLDL & FITC-UAEI; E: view field that zooms in from figure D; F: merged.

图2所示。

2.3 内皮祖细胞在不同培养基中的生长曲线绘制

如图2所示, 在培养基A条件下细胞生长速度最快, 倍增时间约为 23.4 h; 在培养基B条件下细胞生长速度较培养基A慢, 倍增时间约为 96.7 h; 在培养基C条件下细胞生长速度最慢, 倍增时间约为 120.2 h。

2.4 不同培养基培养的内皮祖细胞传至代数比较

如图4所示, 在培养基A条件下, 内皮祖细胞最高可传至9代; 在培养基B条件下, 内皮祖细胞最高可传至5代; 在培养基C条件下, 内皮祖细胞最高只能传至3代。

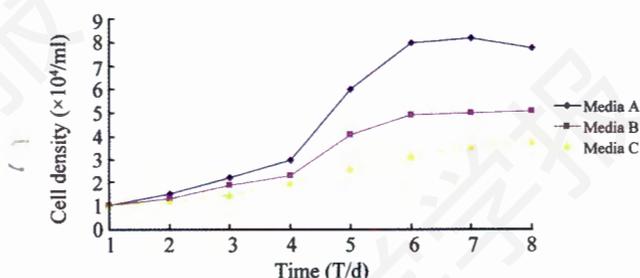


Fig.3 Growth curves of primary VEGCs cultured with different media

2.5 不同培养基培养的内皮祖细胞形成克隆数的比较

内皮祖细胞在接种培养后 5 d 计算克隆形成数, 结果如图4所示, 内皮祖细胞在培养基A条件下形成数量最多, 为 38 个克隆; 在培养基B条件下相对培养

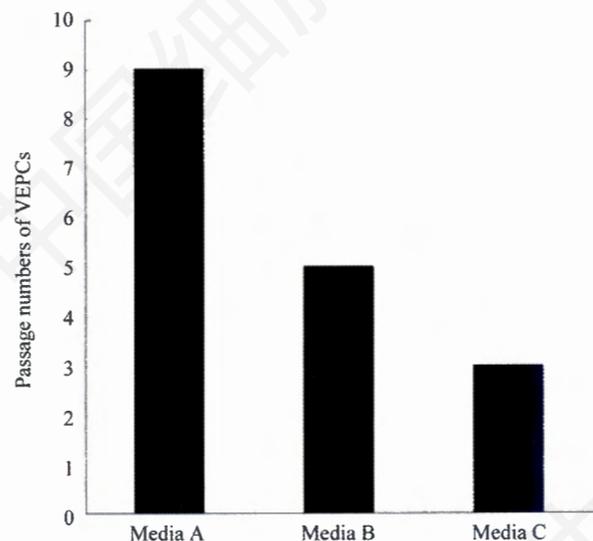


Fig.4 Maximal passage numbers of VEGCs cultured with different media

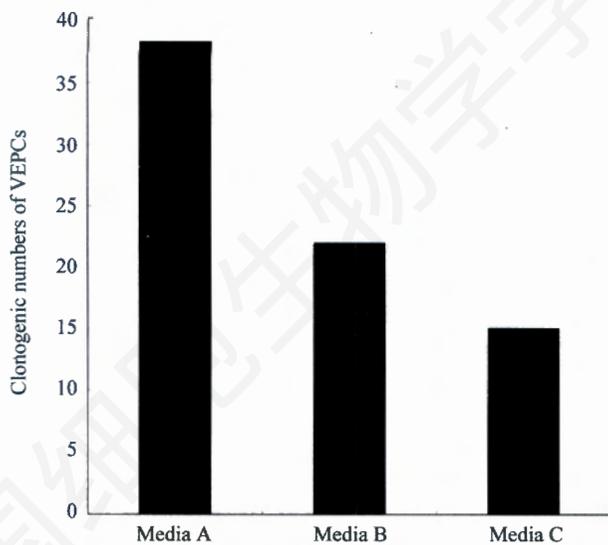


Fig.5 Clonogenic numbers of VEPCs cultured with different media

基 A 数量较少, 为 22 个克隆; 在培养基 C 条件下数量最少, 仅为 15 个克隆。

3 讨论

血管内皮祖细胞参与出生后血管形成和血管损伤后的再生与修复, 成为未来组织工程的种子细胞, 对细胞学治疗有重大意义。血管内皮祖细胞存在于骨髓、脐血、外周血、脂肪中, 以骨髓中数量最多。但是, 血管内皮祖细胞在体外不易培养、数量有限, 在培养体系稍有不妥, 即可分化为成熟的内皮细胞, 使之在组织修复上功能受到限制。血管内皮祖细胞可分为早期血管内皮祖细胞(Early EPCs)和晚期血管内皮祖细胞(Late EPCs)。在体外培养时, 早期血管内皮祖细胞以“长梭样”的线性生长结构为主, 而晚期血管内皮祖细胞以圆形的铺路石样生长结构为主^[10,11]。血管内皮祖细胞的分离方法有免疫磁珠分离法和密度梯度离心法。由于免疫磁珠分离法操作复杂, 价格昂贵, 故目前分离获得EPC的途径主要是通过密度梯度离心联合贴壁培养的方法来进行。本试验中, 采用了三种不同的培养基对鸡内皮祖细胞进行培养, 培养基 A 可使鸡内皮祖细胞体外培养平均传至 8 代, 培养基 B 可使其传至 4.5 代, 培养基 C 能使其传至 1.7 代, 形态学观察发现, 培养基 A 培养的鸡内皮祖细胞并未出现铺路石样结构, 并使其保持在早期血管内皮祖细胞状态; 培养基 B 培养的鸡内皮祖细胞在传代后易出现铺路石样结构, 表明其在传代过程中易分化为晚期

内皮祖细胞; 培养基 C 培养的鸡内皮祖细胞生长速度慢, 传代次数少, 这可能与营养成分有关, 但并未出现铺路石样生长结构。用于血管内皮祖细胞培养的培养基有商品化的 EGM-2, 和根据 EGM-2 培养基组成成分使用 M199 配置的培养基即本实验所用培养基 C, 培养基 C 成本低廉利于广泛推广使用。但在家禽内皮祖细胞培养中没有得到预期效果, 可能与家禽与哺乳类动物区别有关。在培养基 C 的基础上, 我们使用另外两种培养基进行探索, 培养基 A 明显高于培养基 B 的效果, DMEM 培养基适合于细胞快速生长并停泊与一个生长期, 而 F12 中在其基础上又加入了微量元素和无机离子, 更利于单细胞的分离培养。目前, 血管内皮祖细胞的鉴定方法有细胞表面表型鉴定和功能鉴定。细胞表面表型鉴定即 CD34⁺、VEGFR-2⁺ 和 CD133⁺ 即可认为是血管内皮祖细胞^[12]; 功能鉴定即血管内皮祖细胞具有吞噬 DiI-acLDL 和 FITC-UEAI 的特征^[9]。吞噬 acLDL 是内皮细胞的特征之一, 但是吞噬细胞也具有此特征。为进一步区分两者, 在此基础上, 再进行凝集素鉴定, 其原理是荆豆凝集素 I (UEA-I) 能与内皮系细胞表面糖基特异性结合。DiI-acLDL 和 FITC-UEA I 双染色阳性细胞能够充分鉴定正在分化的血管内皮祖细胞。从生长动力学分析三种培养基, 培养基 A 培养的鸡血管内皮祖细胞在生长曲线上呈现明显的 S 型, 倍增时间为 23.4 h。而培养基 B 和 C 所培养的血管内皮祖细胞其生长曲线均未呈现明显的 S 型, 倍增时间分别为 96.7 h 和 120.2 h。细胞克隆数能反应细胞的增殖能力, 血管内皮祖细胞的克隆形式生长称之为“血岛”样结构, 在外周长梭形的血管内皮祖细胞呈放射性生长, 克隆中心则是以圆形的再造干细胞为主。本实验中血管内皮祖细胞在三种不同的培养基培养中发现, 培养基 A 所形成的克隆数最多, 表明血管内皮祖细胞在其中的生长活力最强, 最适宜用于培养鸡血管内皮祖细胞。综上所述, 根据鸡血管内皮祖细胞的生长动力学, 扩增能力, 维持干性等方面对三种培养基进行比较, 发现培养基 A 最适宜鸡血管内皮祖细胞体外扩增。该结果为血管内皮祖细胞在组织工程修复和癌症治疗中的应用提供了实验依据。

参考文献(References)

- 1 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial progenitor endothelial cells of angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302): 964-7.

- 2 Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts *in vivo*. *Circulation* 2003; 108(14): 1729-34.
- 3 Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002; 106(10): 1199-204.
- 4 Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Robert P. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; 105(1):71-7.
- 5 Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, *et al*. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 326-38.
- 6 Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, *et al*. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; 408(6808): 92-6.
- 7 Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue derived stem cells. *Circulation* 2004; 110(3): 349-55.
- 8 Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008; 319(5860): 195-8.
- 9 Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, *et al*. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Cir Res* 2001;89(1): E1-7.
- 10 Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, *et al*. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscl Throm Vas* 2004;24(2): 288-93.
- 11 Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, *et al*. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Cir Res* 2003;93(11): 1023-5.
- 12 Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, *et al*. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95(10): 3016-22.

The Influences of Media on *in vitro* Culture of Chicken Vascular Endothelial Progenitor Cells

Chun-Yu Bai^{1,2}, Ling-Ling Hou³, Xue-Lian Gong², Yue-Hui Ma²,
Wei-Jun Guan^{2*}, Quan-Hai Pang^{1*}

(¹ College of Animal Sciences and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; ² Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100193, China; ³ College of Life Sciences and Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

Abstract Chicken vascular endothelial progenitor cells (VEPCs) were isolated with density gradient centrifugation and identified with Dil-acLDL and FITC-UEA1 fluorescences. Media A, B and C were compared in terms of growth kinetics, expansion capacity and clonogenic numbers of the cultured VEPCs. The results suggested that medium A is optimal for the *in vitro* culture, in which the cells living exhibited an apparent "S" shaped growth curve and a population doubling time of 23.4 h, could be subcultured to passage 9 at most and formed 38 colonies. This study laid an experimental foundation for *in vitro* expansion and clinical application of vascular endothelial progenitor cells.

Key words chicken; VEPCs; stem cells; isolation; culture; expansion; identification

Received: February 3, 2010 Accepted: May 25, 2010

This research was supported by the "863" National Major Research Program (No.2006AA10Z198, No.2007AA10Z170), National Key Technology R&D Program (No.2006BAD13B08, No.2008BADB2B01) and Project (No.2008ZX08009-003) from the Ministry of Agriculture of China for Transgenic Research

*Corresponding author. Tel:86-354-6285989, E-mail:pangquanhai@126.com; Tel:86-10-62815992, E-mail:wjguan86@iascaas.net.cn