

人外周血单个核细胞向内皮祖细胞及内皮细胞分化的实验研究

李珊珊¹⁾, 杨 镛¹⁾, 李从华²⁾, 高 健²⁾

(1) 云南省第二人民医院, 昆明医学院第四附属医院血管外科, 云南省血管外科中心, 云南昆明 650021; 2) 勐海县人民医院普外二科, 云南 勐海 666200)

[摘要] **目的** 探讨体外分离、培养成人外周血单个核细胞, 并将其定向诱导分化为内皮祖细胞及成熟血管内皮细胞的方法. **方法** 密度梯度离心法提取人外周血单个核细胞, 用含有生长因子的内皮培养基将其体外培养、定向诱导分化为内皮祖细胞及成熟血管内皮细胞; 分别用流式细胞技术及 RT-PCR 通过对内皮祖细胞及内皮细胞表面特异性抗原的检测进行细胞鉴定. **结果** 分离获得的单个核细胞培养 7 d 后形成梭状的内皮样细胞, 部分细胞积聚成团形成克隆集落, 流式细胞仪鉴定该细胞表达内皮祖细胞特异性抗原 CD34、CD133 及 VEGFR. 继续培养 4 周后细胞形成典型铺路石样改变, RT-PCR 检测有成熟血管内皮细胞特异性基因 vWF、eNOS 表达. **结论** 可成功分离人外周血单个核细胞, 并可将其定向诱导分化为内皮祖细胞及成熟内皮细胞.

[关键词] 内皮祖细胞; 内皮细胞; 细胞培养

[中图分类号] R654.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 01 - 0033 - 04

Isolation and Culture of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells for Differentiating into Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Cells

LI Shan - shan¹⁾, YANG Yong¹⁾, LI Cong - hua²⁾, GAO Jian²⁾

(1) Dept. of Vascular Surgery, The 2nd People's Hospital of Yunnan Province, The Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650021; 2) Dept. of General Surgery, The People's Hospital of Menghai, Menghai Yunnan 666200, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the methods of isolation and culture of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for differentiating into endothelial progenitor cells (EPCs) and endothelial cell (ECs). **Method** Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density-gradient centrifugation and incubated in endothelial medium in the presence of vascular endothelial growth factor. Peripheral blood mononuclear cells were differentiated into endothelial progenitor cells and endothelial cell. Flow cytometry and RT-PCR were used to identify the endothelial progenitor cells and endothelial cell. **Results** After 7 days, most of the cultured cells displayed a fibroblast-like morphology adhering to the culture plate. They expressed CD34, CD133 and VEGFR. After 4 weeks, most of the cultured cells expressed vWF and eNOS. **Conclusion** The endothelial progenitor cells and endothelial cell were successfully cultured from peripheral blood mononuclear cells

[Key words] Endothelial progenitor cells; Endothelial cells; Cell culture

近年来外周血干细胞移植已成为治疗慢性下肢缺血性疾病的一种新方法^[1-3]. 笔者通过体外分离

培养人外周血单个核细胞, 并将其定向诱导分化为内皮祖细胞及成熟血管内皮细胞, 为内皮祖细胞促

[基金项目] 云南省科技计划基金资助项目 (2011FB150)

[作者简介] 李珊珊 (1986~), 女, 云南西双版纳州人, 在读硕士研究生, 主要从事干细胞与血管疾病治疗研究工作.

[通讯作者] 杨镛. E-mail: yncvs@yahoo.com.cn

血管形成机制及外周血干细胞治疗慢性下肢缺血性疾病的临床研究提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 浓缩的外周血单个核细胞标本

血栓闭塞性脉管炎患者, 51岁, 重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF), 皮下注射, 1次/d, 连用4d后血细胞分离仪采集浓缩外周血单个核细胞用于进行外周血干细胞移植。经患者同意, 无菌条件下取该浓缩的外周血单个核细胞5mL。

1.2 主要试剂

EGM-2-MV基础培养液(购自Lonza公司); EGM-2-MV SingQuate(购自Lonza公司); 淋巴细胞分离液(购自Solarbio公司); 人纤维连接蛋白(购自R&D公司); 胰蛋白酶(购自Gibco公司), 小鼠抗人CD34单克隆抗体、小鼠抗人CD133单克隆抗体、小鼠抗人VEGFR单克隆抗体(购自Beckman Coulter公司); vWF/eNOS引物(上海生工公司合成); Trizol细胞裂解液(Invitrogen公司); TaqDNA聚合酶(购自Invitrogen公司); MMLV逆转录试剂盒(Invitrogen公司)。

1.3 外周血单个核细胞的分离、定向诱导分化为内皮祖细胞及成熟血管内皮细胞

无菌条件下取浓缩外周血单个核细胞采集液新鲜标本5mL, 采用Ficoll密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞, 将得到的单个核细胞重悬于含有EGM-2-MV SingQuate(主要包括5% FBS、HYDROCORTISONE、hFGF-B、VEGF、R3-IGF-1、ASCORBIC ACID、hEGF、GA-1000)的EGM-2-MV培养基中, 调整细胞密度为 $(2\sim3)\times 10^6$ 个/mL, 并将其接种在预先包被有人纤维连接蛋白的培养瓶中培养。每日于倒置相差显微镜下观察细胞的生长形态, 每隔3~4d换一次液。

1.4 内皮祖细胞及成熟血管内皮细胞的鉴定

流式细胞仪鉴定培养7d后的内皮祖细胞分化抗原: CD34-PE、CD133-FITC、VEGFR-FITC, 抗体加样, 上机检测, 激发光波长488nm, 标记PE、FITC荧光素的检测波长分别为576nm, 520nm。以不加任何抗体作为荧光表达阴性对照。利用CELLQuest功能软件进行参数的获取及数据分析, 记录各样本阳性细胞表达率。

细胞继续培养4周后, 荧光定量PCR反应体系定性定量检测血管内皮细胞vWF、eNOS基因的表达水平。引物合成: 内参GAPDH正义(GCAT-GGCCTT CCGTGTCCCC 20, 反义: GGCTGGTGG-

TCC AGGGGTCT 20)、eNOS(正义: TTTGCAGC-TGCCCTGATGGAGATGT 25, 反义: AGCAAAGG-CGCAGAAGTGGGG 21)、vWF(正义: CCCTGCA-CCTGACTGCAGCC 20, 反义: CCGGGACCACGT-TCCATGGC 20)。通过RNA的提取、逆转合成cDNA及荧光定量PCR反应体系进行血管内皮细胞vWF、eNOS基因表达检测, PCR结束后采用溶解曲线确定产物特异性。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

外周血分离得到的单个核细胞培养1d部分贴壁, 主要为小圆并且透亮的细胞(见图1); 培养4d后细胞贴壁完全, 并出现部分梭形细胞, 部分视野可见集落形成, 集落中心为圆形细胞, 周围为放射性生长的梭形细胞(见图2); 培养7d后培养瓶内主要为梭形内皮祖细胞, 逐渐变大并相互连接形成血管腔样结构(见图3); 培养第4周后细胞呈鹅卵石样内皮细胞形态(见图4)。

2.2 内皮祖细胞的鉴定

经体外诱导培养后7d表达CD34、CD133、VEGFR的细胞分别为 $(68.9\pm 2.34)\%$ 、 $(81.7\pm 1.50)\%$ 、 $(97.1\pm 2.01)\%$, 见图5。

2.3 成熟血管内皮细胞特异性基因eNOS、vWF的表达情况

经培养4周后的贴壁细胞胰酶消化后RT-PCR定性定量检测成熟血管内皮细胞特异性基因NOS、vWF表达情况的扩增曲线图、溶解曲线图及电泳图(见图6~8)。NOS和vWF的Ct值分别为 20.6979 ± 2.64 、 26.9673 ± 3.32 , 相对基因表达量NOS/GAPDH: 2.89×10^{-3} , vWF/GAPDH: 3.75×10^{-5} 。

3 讨论

血管系统的形成主要包括血管发生(Vasculogenesis)与血管形成(Angiogenesis)两种方式。血管发生是指内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)或成血管细胞在原位形成血管, 即定位于胚胎卵黄囊胚外中胚层的血岛外周部的细胞分化为成熟内皮细胞并组织成血管的过程, 这一过程主要存在于胚胎时期。血管形成是指在已有的血管基础上, 内皮细胞以出芽的方式扩增、迁移并相互连接形成血管内膜腔, 进而塑形成为新的血管。伤口愈合及梗死时心肌周边毛细血管增生都属于此类。这一过程曾被认为是出生后血

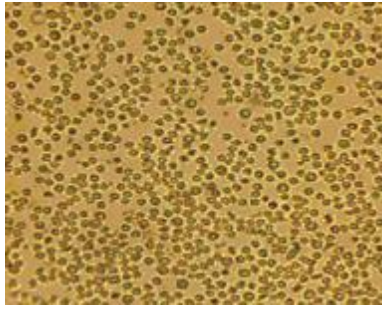


图 1 培养 1 d 小而圆的外周血单个核细胞 (×200)
Fig. 1 PBMCs cultured for 1 day, small and round cells were found (×200)

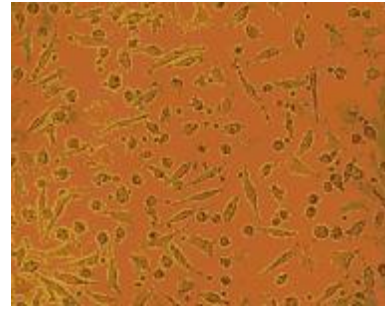


图 3 培养 7 d 大部分细胞呈梭形的内皮祖细胞 (×200)
Fig. 3 PBMCs cultured for 7 days, most cells differentiated to fusiform endothelial progenitor cells (×200)

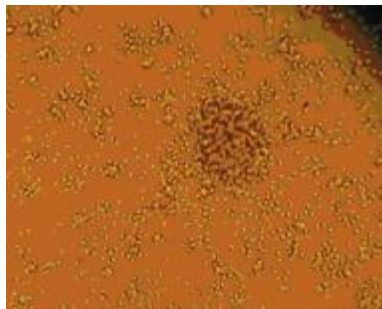


图 2 培养 4 d 洗去未贴壁细胞, 可见部分视野形成集落, 中心细胞呈圆形, 周边为向四周放射生长的梭形细胞 (×200)
Fig. 2 PBMCs cultured for 4 days, the suspensive cells were removed and the adherent cells clone formed, some fusiform cells appeared surrounding the cell clone (×200)

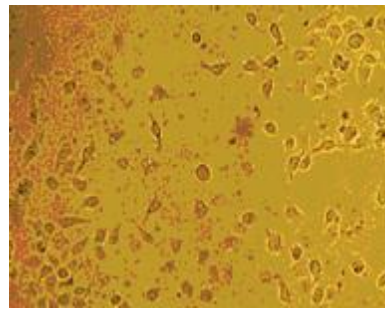


图 4 培养 4 周后形成鹅卵石样形态的内皮细胞 (×200)
Fig. 4 PBMCs cultured for 4 weeks, cobble-stone liked endothelial cells formed (×200)

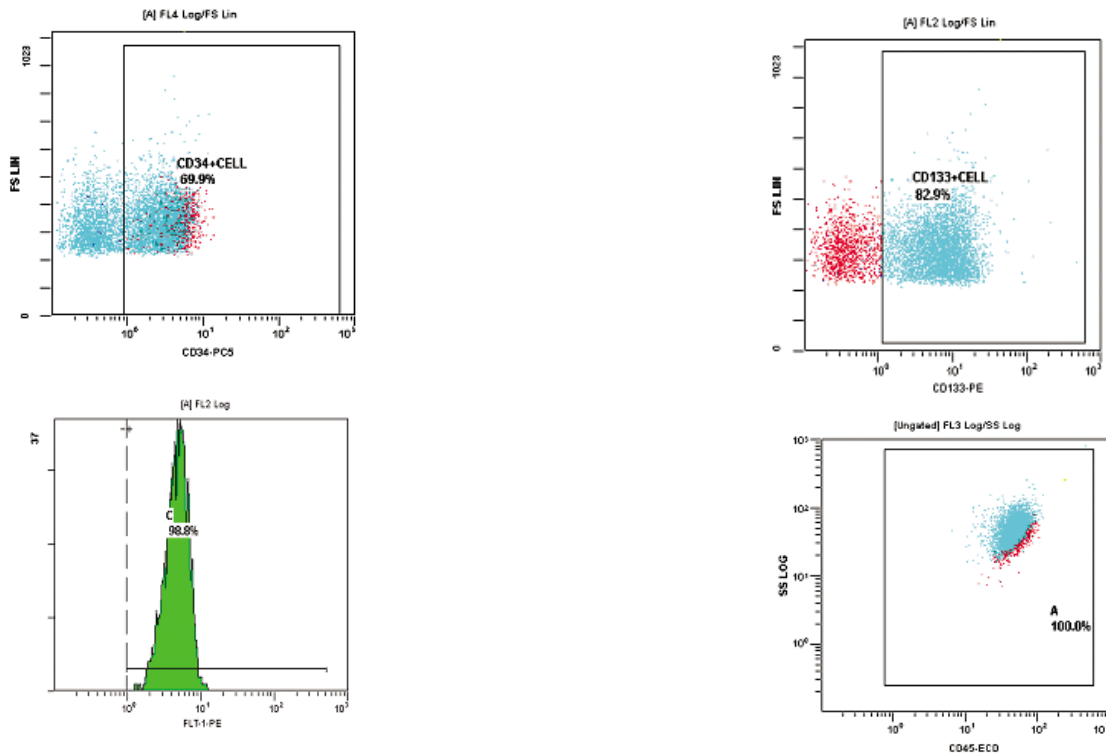


图 5 经体外诱导培养 7 d 后的外周血单个核细胞表达内皮祖细胞特异性表面抗原 CD34、CD133、KDR 的细胞分别为 69.9%、82.9%、98.8%
Fig. 5 PBMCs cultured for 7 days, the endothelial progenitor cells surface specific antigens CD34+, CD133+ and KDR+ cells accounted for 69.9%, 82.9% and 98.8%, respectively

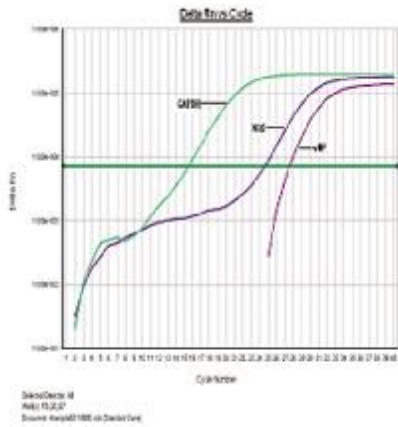


图 6 NOS 和 vWF 的扩增曲线

Fig. 6 The amplification curves of NOS and vWF

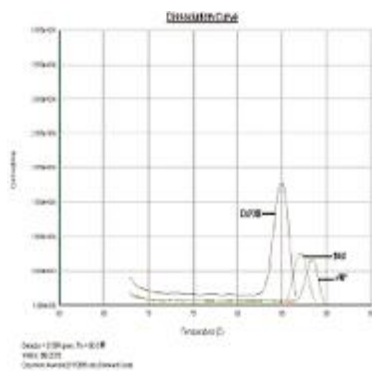


图 7 NOS 和 vWF 的溶解曲线

Fig. 7 The dissolved curves of NOS and vWF

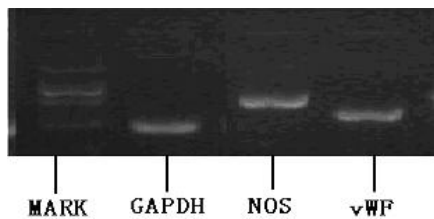


图 8 NOS 和 vWF 的电泳图

Fig. 8 The electrophotogram of NOS and vWF

管生长的唯一机制。但自 Asahar 等证明出生后在外周血中也存在内皮祖细胞，并可能分化为血管，越来越多的证据证明血管发生也可发生在成人体内，例如从骨髓迁出的外周血内皮祖细胞可对受损血管进行修复等。

EPCs^[4]是血管内皮细胞的前体细胞，在生理或病理因素刺激下，可从骨髓动员到外周血，进一步增殖分化并参与损伤血管的修复的幼稚内皮细胞。外周血内皮祖细胞取材方便，在血管再生和血管疾病的细胞治疗和基因治疗中具有广阔的应用前景^[5,6]。目前将 CD34、CD133 和 VEGFR2 等作

为内皮祖细胞主要的细胞表面标志^[7]。本实验鉴于流式细胞仪具有快速、简便、高效、高灵敏度的优点，选择对培养 7 d 的细胞进行 CD34⁺、CD133⁺ 和 VEGFR⁺ 3 种标志物的联合检测以完成内皮祖细胞的鉴定。

血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VEC) 是衬在血管内壁作为半透膜，维持血管内避光滑及通透性，并能分泌多种物质参与血管舒缩、血栓调节及炎症等生理病理活动的细胞。研究表明内皮祖细胞经诱导分化后，CD133 表达逐渐减弱，而其他标志物仍为阳性，并开始表达成熟血管内皮细胞表面特有的分子标志如 CD31、CD144、一氧化氮合酶 (eNOS) 和血管性假血友病因子 von Willebrand 因子 (vWF) 等^[8]。本实验通过 RT-PCR 实验技术对培养 4 周的细胞进行成熟内皮细胞特有 eNOS、vWF 因子的基因检测以完成外周血内皮祖细胞源性内皮细胞的鉴定。

近年来，下肢动脉缺血性疾病的发病率日益增高，虽然治疗方法较多，但疗效却不是令人很满意。近 50 a 来，内皮祖细胞的发现为治疗下肢动脉缺血性疾病带来新的思路，但仍有许多问题有待解决，比如干细胞的多向分化潜能远期是否会引起肿瘤的发生；如何分离出较纯的 EPC，提高 EPC 的数量以提高治疗效果；通过何种移植途径才能达到较好的疗效；如何制定统一的疗效评价标准等。解决外周血内皮祖细胞是如何分化为成熟血管内皮细胞，成熟的内皮细胞又是如何保持其活性并快速增殖等问题是确保内皮修复、血管新生及提高临床治疗疗效的前提。本实验成功建立了外周血单个核细胞向内皮祖细胞及成熟血管内皮细胞的定向诱导模型，期待能为临床外周血干细胞移植治疗慢性下肢缺血性疾病提供更多的理论依据。

[参考文献]

[1] TATEISHI-YUYAMA E, MATSUBARA H, MUROHARA T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2002, 360(9331): 427 - 435.

[2] 杨镛, 陆平, 何晓明, 等. 人自体干细胞移植在重症肢体缺血血流重建中的疗效与评价[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2009, 16(2): 115 - 118.

[3] 杨国凯, 杨镛, 何晓明, 等. 外周血干细胞移植治疗血栓闭塞性脉管炎[J]. 中国微创外科杂志, 2009, 9(9):

(下转第 53 页)

- 中国矫形外科杂志, 2007, 15(22): 1 718 - 1 720.
- [2] SPANGEL M J, MASRI B A, OCONNELL J X, et al. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasty [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1999, 81(6): 672 - 683.
- [3] FROMMELT L. Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection [J]. *Injury*, 2006, 37(5S): 87 - 94.
- [4] 郝立波, 周勇刚, 王岩, 等. 37例人工关节感染的细菌学分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2004, 14(12): 1 358.
- [5] BAUER T W, BROOKS E J, SAKAI H, et al. A diagnostic algorithm for detecting an infected hip arthroplasty [J]. *Orthopedics*, 2003, 26: 929 - 930.
- [6] MORREY B F. *Joint replacement arthroplasty* [M]. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2003: 857 - 858.
- [7] SHIH L Y, WU J J, YANG D J. Erythrocyte sedimentation rate and C reactive protein values in patients with total hip arthroplasty [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1987, 225: 238 - 246.

(2011 - 10 - 12 收稿)

(上接第 36 页)

- 851 - 852.
- [4] YODER M C. Defining human endothelial progenitor cells [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(1): 49 - 52.
- [5] GEORGE A L, BANGALORE-PRAKASH P, RAJORIA S, et al. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration [J]. *J Hematol Oncol*, 2011, 24(4): 24.
- [6] FORESTA C, DE TONI L, FERLIN A, et al. Clinical implication of endothelial progenitor cells [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(1): 89 - 105.
- [7] POVSIC T J, ZAVODNI K L, VAINORIUS E, et al. Common endothelial progenitor cell assays identify discrete endothelial progenitor cell populations [J]. *Am Heart J*, 2009, 157(2): 335 - 344.
- [8] SALYEN P, MUSTJOKI S, ALITALO R, et al. VEGFR3 and CD133 identify a population of CD34⁺ lymphatic /vascular endothelial precursor cells [J]. *Blood*, 2003, 101(1): 168 - 172.

(2011 - 12 - 01 收稿)

征稿启事

为进一步支持和推动昆明医学院学科建设的发展, 使《昆明医学院学报》的学术质量得到进一步的提升, 《昆明医学院学报》编辑部决定自 2012 年 1 月 1 日起, 国家自然科学基金资助课题的综述可以在学报正刊发表, 另外对国家自然科学基金资助课题、云南省自然科学基金资助课题及昆明医学院“十二五”省级、校级重点学科立项建设的论著, 给予快审快发及优稿优酬的奖励机制. 欢迎广大科研教学人员、硕士及博士研究生踊跃投稿. 投稿邮箱: kmyxyxb@126.com, 电话: 0871 - 5936489, 0871 - 5933621, 0871 - 5333437.

昆明医学院学报编辑部

2012 年 1 月 1 日