论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0814-03

观察大鼠血管平滑肌细胞与间充质干细胞直接接触培养对细胞的诱导分化

苗 莉,何国祥,景 涛,蒋清安,江明宏,刘建平 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆 400038)

提 要:目的 观察血管平滑肌细胞与骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)直接接触对MSCs向血管成分细胞的诱导分化。**方法** 分别将MSCs(DAPI标记)与血管平滑肌细胞按一定的比例混合直接接触培养;MSCs加血管平滑肌细胞条件培养液或单独常规培养后,用平滑肌细胞抗体SM-α-actin、Calponin及内皮细胞抗体CD31免疫荧光染色,并观察MSCs的细胞形态变化,检测MSCs的分化情况。**结果** MSCs与血管平滑肌细胞混合培养3 d后免疫荧光染色,可见胞核蓝染的MSCs与抗SM-α-actin(绿色),抗Calponin、CD31(红色)的双标细胞出现;5 d后阳性表达率增加。而加血管平滑肌细胞条件培养液或常规单独培养的MSCs抗SM-α-actin阳性,抗Calponin、CD31均为阴性。**结论** 与血管平滑肌细胞直接接触可以诱导MSCs向血管成分细胞分化。

关键词:骨髓间充质干细胞;血管平滑肌细胞;共培养;分化

中图法分类号:R322.12;R322.81;R329.21 **文献标识码**:A

Effect of direct contact with vascular smooth muscle cells on transdifferentiation of rat mesenchymal stem cells

MIAO Li, HE Guo-xiang, JING Tao, JIANG Qing-an, JIANG Ming-hong, LIU Jian-ping (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of direct contact with vascular smooth muscle cells on transdifferentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** Rat MSCs and vascular smooth muscle cells were cultured and identified, respectively. MSCs were labeled with DAPI firstly, and then co-cultivated with vascular smooth muscle cells for 3 or 5 d, or cultured with conditioned medium in which the vascular smooth muscle cells were in exponential phase of growth, or cultured alone as a control. The morphology of co-cultured cells were observed under light microscopy. Immunofluorescence was performed by using monoclonal antibodies against smooth muscle α-actin, calponin and CD31. **Results** The MSCs co-cultured with vascular smooth muscle cells expressed smooth muscle α-actin, calponin and CD31 at the third day of cultivation, and the positive cells increased at the fifth day. No cells positive for calponin and CD31 were detected when MSCs were cultured in conditioned medium or alone. **Conclusion** Cell-to-cell contact can induce rat MSCs to differentiate into vascular smooth muscle-like cells and endotheliocyte-like cells.

Key words: mesenchymal stem cells; vascular smooth muscle cells; co-culture; differentiation

近来研究显示,血管损伤后骨髓中的前体细胞黏附于损伤的血管局部,并进一步分化为血管平滑肌细胞和内皮细胞,这些骨髓前体细胞来源的血管成分细胞与血管中膜迁移而来的血管平滑肌细胞一起,共同参与血管损伤后再狭窄的形成[1,2],而这些骨髓中的前体细胞就是间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。骨髓MSCs是存在于骨髓中,除了造血干细胞以外的另一类具有多向分化潜能的干细胞。本实验旨在体外模拟血管内皮损伤后,研究血管平滑肌细胞在与MSCs直接接触的微环境下对干细胞的诱导分化。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

SD大鼠体质量80~100 g及120~150 g,雄性,由第三军医大学实验动物中心提供。倒置相差显微镜(OLYMPOS CK40,日本);激光共聚焦显微镜(ZEISS LSM510 META,德国),低糖DMEM(美国Gibco公司),克隆胎牛血清(澳大利亚PAA公司),淋巴细胞分离液(1.073 g/L,澳大利亚PAA公司),DAPI(美国Roche公司),兔抗CD105、CD44、CD34、鼠抗平滑肌肌动蛋白(SM-α-actin)、鼠抗Calponin、兔抗CD31(以上一

基金项目:国家自然科学基金(30400180)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400180)

作者简介:苗 莉(1973-),女,河南省郑州市人,博士研究生,主治医师,主要从事血管成形术后再狭窄的基础方面的研究。电话:13228686202

通讯作者:何国祥,电话:(023)68765168

收稿日期:2006-07-13;**修回日期**:2006-09-19

抗均购至博士德公司），荧光标记羊抗兔 IgGCy3、羊抗小鼠 IgG-FITC（美国 Sigma 公司）。

1.2　实验方法

1.2.1　大鼠 MSCs 及血管平滑肌细胞的分离、培养[3,4]　取体质量 80～100 g 大鼠双下肢骨髓，用淋巴细胞分离液密度梯度离心和细胞贴壁的方法培养 MSCs；取 120～150 g 大鼠胸主动脉，组织贴块法培养血管平滑肌细胞。细胞生长达 70%～80% 融合时，用 0.25% 胰蛋白酶消化传代，继续培养。

1.2.2　大鼠 MSCs 与血管平滑肌细胞共培养

1.2.2.1　DAPI 标记 MSCs　实验前于培养液内加入 0.002% 的荧光染料 4，6-二乙酰基-2-苯基吲哚（DAPI）过夜标记细胞，PBS 液漂洗 8 次，洗去未结合的 DAPI，消化后用血细胞计数板计数并算出细胞密度。

1.2.2.2　血管平滑肌细胞条件培养液的制备　留取对数生长期的血管平滑肌细胞培养液，20 μm 微孔滤膜过滤后，作为血管平滑肌细胞条件培养液保存于 4 ℃冰箱备用。

1.2.2.3　MSCs 与血管平滑肌细胞共培养　取生长融合 70%～80% 的 2 代 MSCs（DAPI 标记）及血管平滑肌细胞，常规消化，计数后分别以 5×10^4/ml 的密度共同传入 6 孔板内，混合均匀后常规培养；同时 MSCs 单独以 1×10^5/ml 的密度传代培养，其培养液为低糖 DMEM 与血管平滑肌细胞条件培养液各半。作为对照，MSCs 单独以 1×10^5/ml 的密度常规培养。分别于 3、5 d 后结束培养，用 4% 多聚甲醛固定。

1.2.3　免疫荧光化学染色

1.2.3.1　MSCs 及血管平滑肌细胞的鉴定　同期细胞单独培养 3～4 d 后，用 4% 多聚甲醛固定，免疫荧光化学鉴定。MSCs（DAPI 标记）鉴定分别用一抗 CD105、CD34、CD44（1∶100），二抗为荧光标记羊抗兔 IgG Cy3（1∶200）；血管平滑肌细胞鉴定用一抗 SM-α-actin（1∶100），二抗为羊抗小鼠 IgG FITC（1∶200）。一抗工作液分别加于细胞爬片上于 4 ℃孵育过夜，加入相应的二抗工作液，37 ℃避光孵育 30 min，PBS 液冲洗 3 次。同时以 PBS 液代替一抗作为对照。激光共聚焦显微镜检测结果。选取不同的 10 个视野，计算阳性细胞率。

1.2.3.2　共培养细胞及同期单独培养 MSCs 免疫荧光化学染色　一抗分别为 SM-α-actin、Calponin、CD31（1∶100），二抗分别为荧光标记羊抗兔 IgG Cy3（1∶200）及羊抗小鼠 IgG FITC（1∶200）。同时以 PBS 液代替一抗作为对照。激光共聚焦显微镜检测结果。以上培养重复 3 次。计算阳性细胞转化率：随机选取不同的 10 个视野，分别计算视野内的细胞核蓝染的干细胞总数及阳性细胞数，计算各个视野内阳性细胞数与总细胞数之比，取其均值。

2　结果

2.1　细胞的形态及免疫荧光鉴定结果

镜下观察见原代 MSCs 贴壁后形态多样，呈短棒状、多角形等，随着 MSCs 的传代培养，细胞形态逐渐均一，呈长梭形旋涡状生长，细胞核浆比较大，传代细胞生长旺盛，6～7 d 即可传代。原代血管平滑肌细胞亦呈贴壁生长，细胞生长至中、低密度时为单层状贴壁，对数生长期则可见部分区域细胞呈重叠方式生长，细胞为梭形，密集与稀疏处相互交错，形成其特有的“峰-谷”生长形态。

MSCs 免疫荧光染色示，细胞核 DAPI 蓝色荧光染色达 100%，抗 CD105、CD44 染色阳性率均达到 90% 以上，抗 CD34 阴性；血管平滑肌细胞抗 SM-α-actin 染色均为阳性。

2.2　共培养细胞的形态学及免疫荧光鉴定

2.2.1　共培养细胞的形态学　倒置显微镜下观察可见共培养的两种细胞逐渐生长融合，细胞形态接近，不易分辨，待培养至第 5 天时，与同期单独培养的 MSCs 及血管平滑肌细胞相比，都已接近细胞 70% 的融合，但失去典型的旋涡状及“峰-谷”生长形态，细胞界限与形态不清。而使用血管平滑肌细胞条件培养液的 MSCs 生长形态与单独常规培养时无明显不同。

2.2.2　免疫荧光鉴定　激光共聚焦显微镜下不同光源激发下 DAPI 标记的 MSCs 细胞核发出蓝色荧光，同期单独培养的 MSCs 细胞核 100% 染色，抗 SM-α-actin 阳性，细胞质发绿色荧光；而抗 Calponin、CD31 为阴性。共培养的胞核发蓝色荧光的 MSCs 与血管平滑肌细胞相比，细胞较小，部分细胞失去单独培养时的长梭形态，呈椭圆形。抗 SM-α-actin 阳性，并且部分细胞出现抗 Calponin、CD31 阳性，其中抗 Calponin 阳性细胞细胞质发绿色荧光，CD31 细胞质发红色荧光（图 1～3）。

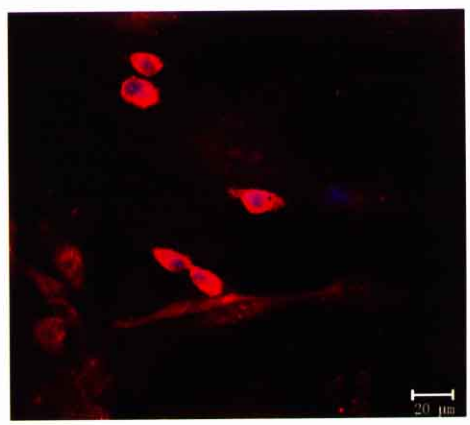


图 1　共培养细胞抗 CD31 免疫荧光染色　MSCs 的细胞核 DAPI 标记，发蓝色荧光，可见细胞质发红色荧光的 MSCs 阳性细胞（激光共聚焦显微镜）

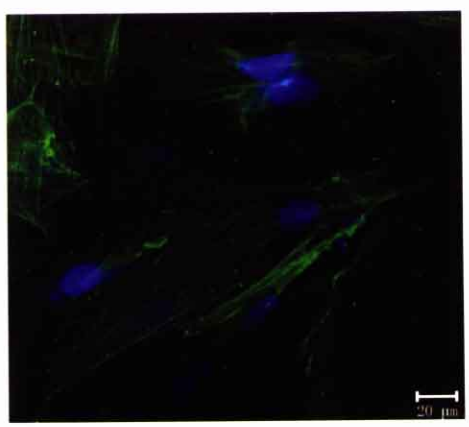


图 2　共培养细胞抗 Calponin 免疫荧光染色　MSCs 的细胞核 DAPI 标记，发蓝色荧光，可见细胞质发绿色荧光的 MSCs 阳性细胞（激光共聚焦显微镜）

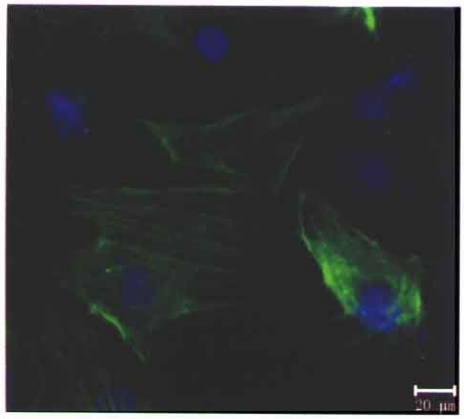


图3 共培养细胞抗 SM-α-actin 免疫荧光染色 MSCs 的细胞核 DAPI 标记，发蓝色荧光，可见细胞质发绿色荧光的 MSCs 阳性细胞 （激光共聚焦显微镜）

共培养 3 d 时 Calponin、CD31 阳性率分别为 3.6%、4.8%；5 d 时分别为 5.2%、7.6%。而用血管平滑肌细胞条件培养液培养的 MSCs 未发现有 Calponin、CD31 阳性表达。

3 讨论

近年来，人们对 MSCs 进行了大量的研究，但目前进行阳性筛选所独有的表面抗原尚未发现。因此获取 MSCs 的一般方法是采取密度梯度离心方法，利用其体外贴壁生长的特性获得。本研究中分离、培养的大鼠骨髓 MSCs 免疫荧光检测显示 CD34 阴性，CD105 及 CD44 表达阳性，与以往研究中 MSCs 的表面抗原标志相符合[3]；采用组织块贴壁培养法是获取血管平滑肌细胞的常用方法，经传代后细胞形态及生长状况稳定，并经形态学及抗 SM-α-actin 免疫化学鉴定证实。

许多体内外实验已经证实了骨髓 MSCs 可以分化为多种间充质组织，如骨、软骨、肌肉、韧带、脂肪及其骨髓基质等[5]，并且认为 MSCs 具体向哪个方向分化是由周围微环境所调控的。MSCs 分化的鉴定目前多采用检测细胞特异性蛋白表达的方法。本研究中 MSCs 用 DAPI 标记以区别于血管平滑肌细胞，将 MSCs 与血管平滑肌细胞混合后共培养，或用血管平滑肌细胞条件培养液单独培养。结果显示，单独培养下的 MSCs 表达 SM-α-actin，但不表达平滑肌细胞分化标记物 Calponin 及内皮细胞标志物 CD31；待共培养 3 d 后有部分 MSCs 开始表达 Calponin 及 CD31，随着培养时间的延长，到第 5 天 Calponin 及 CD31 阳性表达率增高。而条件培养液中的 MSCs 未发现有 Calponin 及 CD 31 阳性细胞出现。该实验说明与血管平滑肌细胞的直接接触可以诱导 MSCs 向血管平滑肌细胞及内皮细胞的分化。

目前对 MSCs 在血管内皮损伤后修复过程中所起的作用有不同的看法。部分研究者认为血管内皮损伤后，来源于骨髓的 MSCs 转化为血管平滑肌细胞并在局部增生，从而参与了再狭窄的发生[6]；Fukuda 等[7]亦认为局部应用雷帕霉素是通过显著抑制了干细胞向血管平滑肌细胞的分化而达到防治再狭窄的目的。但亦有研究认为 MSCs 通过转化为内皮细胞，加速损伤内皮的修复，抑制血管平滑肌的增生，从而抑制内膜的过度增生[8,9]。本研究通过体外实验提示在与血管平滑肌细胞直接接触的情况下，MSCs 具有向血管平滑肌细胞及内皮细胞这两种不同的血管细胞分化的趋势，但具体会对内膜损伤后的作用还有待于进一步的在体研究。

参考文献：

[1] Espinosa-Heidmann D G, Caicedo A, Hernandez E P, *et al*. Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(11): 4914-4919.

[2] Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'Oka T, *et al*. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts *in vivo*[J]. Circulation, 2003, 108(14): 1729-1734.

[3] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[4] Hao H, Ropraz P, Verin V, *et al*. Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(7): 1093-1099.

[5] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6839): 41-49.

[6] Tanaka K, Sata M, Hirata Y, *et al*. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries[J]. Circ Res, 2003, 93(8): 783-790.

[7] Fukuda D, Sata M, Tanaka M, *et al*. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells[J]. Circulation, 2005, 111(7): 926-931.

[8] Kitamura T, Sata M, Motomura N, *et al*. Seeding of recipient bone marrow cells reduces neointimal hyperplasia of de-endothelialized rat aortic allograft[J]. Int Heart J, 2005, 46(2): 303-312.

[9] Wu X, Huang L, Zhou Q, *et al*. Mesenchymal stem cells participating in *ex vivo* endothelium repair and its effect on vascular smooth muscle cells growth[J]. Int J Cardiol, 2005, 105(3): 274-282.

（编辑 陈聪连）