论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0610-04

缺氧条件下大鼠脑微血管内皮细胞对共培养的人间充质干细胞分化的影响

刘恺鸣,迟路湘,鲁向辉 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

摘 要:**目的** 探讨缺氧条件下大鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)对人间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化的影响。**方法** 分离、培养并鉴定人骨髓MSCs和大鼠BMECs,在正常和缺氧两种条件下,分别以间接和直接共培养两种方式对MSCs进行诱导分化,用流式细胞术和免疫荧光细胞化学法观察和分析诱导后MSCs的胎肝激酶-1(fetal liver kinase-1, Flk-1)和血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)的表达。**结果** 正常间接共培养未能诱导MSCs表达vWF和Flk-1蛋白,缺氧间接共培养和正常条件下的直接共培养均能诱导MSCs开始表达Flk-1蛋白,而vWF染色仍为阴性,缺氧条件下直接共培养表达Flk-1蛋白的MSCs比正常条件增多,而且部分Flk-1阳性细胞开始同时表达vWF蛋白。**结论** BMECs能够通过细胞直接接触诱导共培养的MSCs开始向内皮分化,缺氧条件下的直接共培养BMECs能诱导更多的MSCs更彻底地向内皮分化。

关键词:间充质干细胞;缺氧;共培养;分化;脑微血管内皮细胞

中图法分类号:R322.13;R329.21;R364.4 **文献标识码**:A

Effect of brain microvascular endothelial cells on differentiation of co-cultured mesenchymal stem cells under hypoxic conditions

LIU Kai-ming, CHI Lu-xiang, LU Xiang-hui (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of brain microvascular endothelial cells (BMECs) on mesenchymal stem cells (MSCs) expressing fetal liver kinase-1 (Flk-1) and von Willebrand factor (vWF) under normal and hypoxic conditions. **Methods** Human bone marrow MSCs and rat BMECs were isolated, cultured and identified. We used direct and indirect co-culture to induce the differentiation of MSCs. The expression of Flk-1 and vWF after induction was observed and analyzed by flow cytometry and immunofluorescence staining. **Results** Undifferentiated MSCs did not express Flk-1 or vWF. In indirect co-culture group, indirect co-culture under hypoxic conditions induced (7.58±0.58)% ($n=6$, $P=0.034$) MSCs to express Flk-1 but not vWF, while in normoxic indirect co-culture, MSCs expressed neither. In direct co-culture group, after 5-day direct co-culture with BMECs under normoxia or hypoxia, MSCs expressing Flk-1 accounted for (13.76±1.67)% ($n=6$, $P<0.01$) and (23.64±2.50)% ($n=6$, $P<0.01$) of the total co-cultured mixed cells, and the vWF staining was still negative in the normoxic co-culture system, while some Flk-1 positive cells began to co-express vWF simultaneously in the hypoxic co-culture system. **Conclusion** BMECs induce MSCs to differentiate into endothelial cells through direct cell contact. By direct co-culture in hypoxic conditions, BMECs induce more MSCs to differentiate into endothelial cells.

Key words: mesenchymal stem cells; hypoxia; co-culture; differentiation; brain microvascular endothelial cells

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)以其强大的自我更新能力和分化潜能成为神经系统疾病细胞替代治疗研究的热点。缺血性脑血管疾病中,脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)的损伤是导致血脑屏障开放、脑水肿发生,从而加重神经元细胞损伤的重要因素。同时缺血半暗区血管的修复与新生也是挽救缺血受损神经元的关键。目前在干细胞治疗缺血性脑血管病的研究方面,多数研究聚焦于干细胞修复受损的神经组织,然而利用干

作者简介 刘恺鸣,男,河南省信阳市人,硕士研究生,主要从事缺血性心脑血管病方面的研究。电话:(023)68754118,E-mail:liu2005061@yahoo.com.cn

通信作者 迟路湘,电话:(023)68754118, E-mail:chi68754271@126.com

收稿日期 2007-08-31 修回日期 2007-10-15

细胞向内皮细胞分化的特性[1]，以修复脑缺血部位受损的血脑屏障和血管内皮细胞，在治疗缺血性脑血管疾病中同样具有十分重要的意义。本实验以缺氧条件下培养 BMECs 模拟缺血性脑血管疾病中 BMECs 所处的病理生理环境，观察 BMECs 对共培养的 MSCs 分化的影响，为 MSCs 应用于缺血性脑血管疾病的血脑屏障和血管内皮修复治疗提供基础实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）、胶原酶/分散酶、纤连蛋白（Roche，德国），4′6′-二乙酰基-2-苯基吲哚（4′6′-Diamidino-2-phenylindole，DAPI）、Ⅳ型胶原（Sigma，美国），FITC 标记的小鼠抗人 CD34 多克隆抗体、PE 标记的小鼠抗人 CD105 多克隆抗体、PE/Cy5 标记的小鼠抗人 CD44 多克隆抗体、同型对照（晶美），兔抗人/大鼠血管性血友病因子（von Willebrand factor，vWF）多克隆抗体、小鼠抗人胎肝激酶-1（fetal liver kinase-1，Flk-1）单克隆抗体（Chemicon，美国），PE 标记驴抗小鼠 IgG，FITC 标记驴抗兔 IgG（三鹰生物），Millicell Culture Plate Inserts（Millipore，美国），FACSAria 流式细胞仪（Becton Dickinson，美国），DMI 6000 激光共聚焦显微镜（Leica，德国）。

1.2　方法

1.2.1　人 MSCs 的分离纯化及培养[1]　　无菌条件下采集排除重大疾病的 40 岁以下成人志愿者骨髓，用密度梯度离心法（1.073 g/ml）分离 MSCs，然后用含 10% 胎牛血清的 DMEM（DMEM-10）培养基接种于塑料培养瓶，置 37℃、5% CO_2、95% 空气培养箱内培养。以 3～5 代细胞用于实验。缺氧实验在 37℃、93% N_2、5% CO_2、2% O_2 的缺氧培养箱内进行。

1.2.2　大鼠脑微血管段的分离与 BMECs 原代培养　　大鼠脑微血管段的分离与 BMECs 原代培养方法见文献[2]，使用 3～5 代 BMECs 用于实验。细胞缺氧实验在 37 ℃、93% N_2、5% CO_2、2% O_2 的缺氧培养箱内进行。

1.2.3　共培养诱导 MSCs 分化　　间接共培养使用 Millicell Culture Plate Inserts（孔径 0.4 μm）：BMECs 以 5×10^3/孔接种于上层的孔径 0.4 μm 的 Millicell Culture Plate Inserts 内，将 MSCs 以 5×10^3/孔接种于下层的 24 孔板内。直接共培养[3]：将两种细胞以 5 000∶5 000 密度混合后以 DMEM-10 接种于培养瓶或盖玻片上。

样本分别在正常和缺氧条件下培养 5 d 时用于流式细胞仪和激光共聚焦显微镜检测。

1.2.4　流式细胞术　　鉴定 MSCs 的 CD34、Flk-1、CD105 和 CD44 蛋白表达率。分析间接和直接共培养组 MSCs 的 Flk-1 蛋白表达率。为确定小鼠抗人 Flk-1 单克隆抗体是否与共培养细胞中的大鼠 BMECs 交叉，用小鼠抗人 Flk-1 单克隆抗体对大鼠 BMECs 上的 Flk-1 抗原进行单独对照检测。

1.2.5　免疫荧光细胞化学法　　鉴定 BMECs 的 vWF 蛋白表达。鉴定分析间接和直接共培养组中 MSCs 的 Flk-1 和 vWF 蛋白表达：滴加一抗（兔抗人/大鼠 vWF 多克隆抗体 1∶100，小鼠抗人 Flk-1 单克隆抗体 1∶50）4 ℃孵育过夜，滴加荧光标记二抗（PE 标记驴抗小鼠 IgG，FITC 标记驴抗兔 IgG）37 ℃孵育 30 min，然后以 DAPI（5 mg/L）衬染细胞核，清洗后在激光共聚焦显微镜下观察 Flk-1 和 vWF 蛋白表达。为确定小鼠抗人 Flk-1 单克隆抗体的是否与直接共培养的大鼠 BMECs 有无交叉反应，用小鼠抗人 Flk-1 单克隆抗体对大鼠 BMECs 进行单独对照检测。

1.3　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，以 SPSS 12.0 软件行统计学处理，对各组数据进行方差齐性检验，两组间比较采用独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　MSCs 的形态和分子表型特征

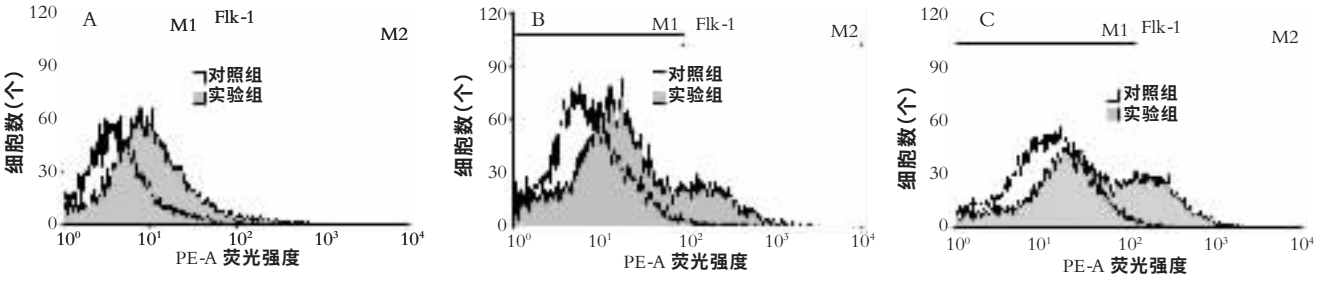
MSCs 呈较均一的长梭形生长（图 1）。流式细胞仪检测结果表明 CD34、Flk-1 表达率分别为（1.51 ± 0.16）%、（2.10 ± 0.12）%，与阴性对照无显著差异（$n=3$，$P>0.05$）；CD105 表达率为（89.21 ± 2.97）%，CD44 表达率为与阴性对照有显著差异（$n=3$，$P<0.01$），故可确定培养的细胞为骨髓骨髓间充质细胞。经免疫荧光细胞化学法鉴定，MSCs 的 Flk-1 和 vWF 蛋白均为阴性表达。



图 1　MSCs 的形态观察　（LM × 200）

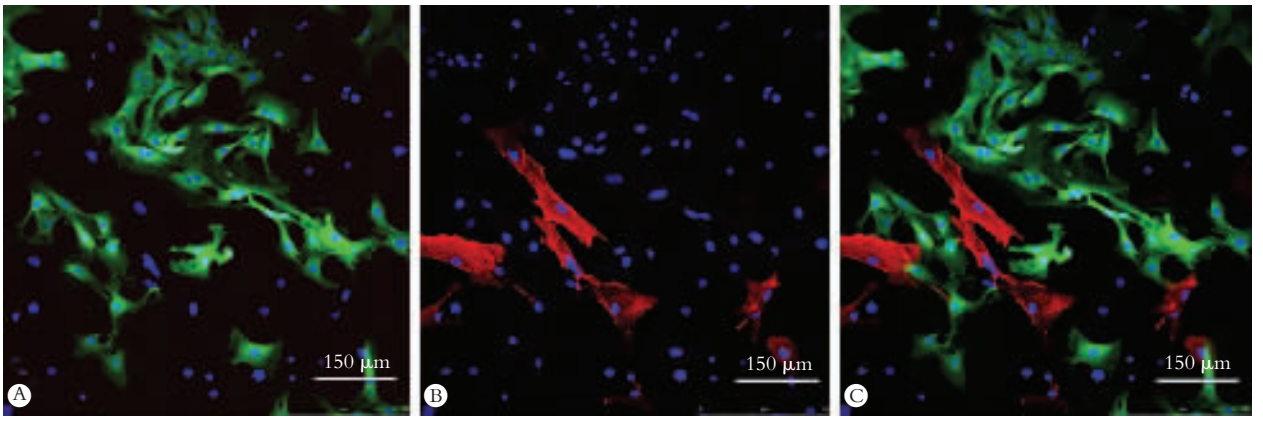
2.2　共培养对 MSCs 分化的影响

结果显示，新分离的 MSCs 不表达 Flk-1 和 vWF。常氧条件下间接共培养 MSCs 的 Flk-1 和 vWF 蛋白均为阴性表达。缺氧条件下间接共培养的（7.58 ± 0.58）%（$n=6$，$P=0.034$）MSCs 开始表达 Flk-1 蛋白（图 2A），激光共聚焦显微镜也显示少量细胞开始出现红色荧光，但未见绿色荧光的 vWF 蛋白表达。正常和缺氧条件下直接共培养 5 d 时，开始表达 Flk-1 蛋白的 MSCs 分别占共培养混合细胞数的（13.76 ± 1.67）%（$n=6$，$P<0.01$）（图 2B）和（23.64 ± 2.50）%（$n=6$，$P<0.01$）（图 2C），二者相比有显著性差异（$n=6$，$P<0.01$）激光共聚焦也显示部分 MSCs 开始表达 Flk-1（图 3），而在常氧共培养细胞中未发现 Flk-1 阳性的细胞同时表达 vWF，值得关注的是，缺氧直接共培养的混合细胞中，部分 Flk-1 阳性细胞开始同时表达 vWF 的绿色荧光（图 4）。



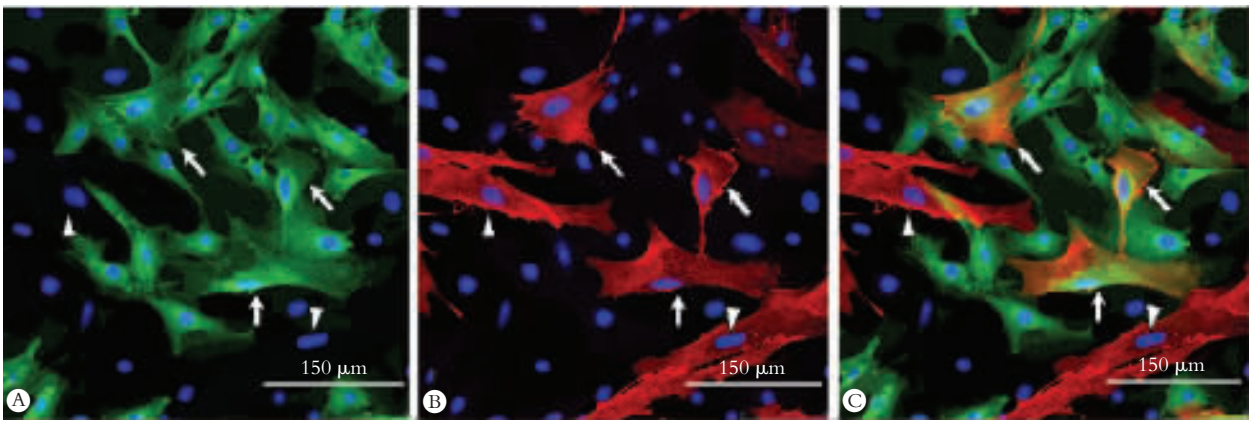
A 缺氧间接共培养，B 常氧直接共培养，C 缺氧直接共培养

图2 MSCs 的 Flk-1 表达



A：vWF 阳性的 BMECs（FITC 标记）；B：部分 MSCs 开始表达 Flk-1（PE 标记）；C：A 和 B 的叠加图

图3 同一视野常氧下 BMECs 与 MSCs 直接共培养的免疫荧光细胞化学染色



A：vWF 阳性的细胞（FITC 标记）；B：部分 MSCs 开始表达 Flk-1（PE 标记）；C：A 和 B 的叠加图；▲：MSCs 来源的、仅表达 Flk-1 不表达 vWF 的细胞；↑：MSCs 来源的、同时表达 Flk-1 和 vWF 的细胞

图4 同一视野缺氧下 BMECs 与 MSCs 直接共培养的免疫荧光细胞化学染色

3 讨论

BMECs 不仅在基因和蛋白质组水平上与其他内皮细胞有显著差异[4]，而且具有其独有的生理特点。目前，在干细胞与脑缺血部位受损的血脑屏障和微血管内皮细胞相互影响的研究尚未深入，为此我们在缺氧条件下将 MSCs 与 BMECs 共培养，观察 BMECs 对干细胞分化的影响。

为将分化的 MSCs 与直接共培养的 BMECs 区分开，我们选择将大鼠 BMECs 与人 MSCs 两种不同种属的细胞实施共培养，一方面是由于 MSCs 缺乏组织相容性复合物Ⅱ类抗原，免疫原性弱[5]；另一方面，经对照实验证实，小鼠抗人 Flk-1 单克隆抗体仅能与人种属的 Flk-1 抗原结合，而不能与大鼠来源的 Flk-1 蛋白结合，因此共培养组中的 PE 荧光阳性细胞均来自分化了的 MSCs，兔抗人/大鼠 vWF 多克隆抗体却同时可与共培养细胞中的人和大鼠种属的 vWF 蛋白结合，故 FITC 荧光不仅显示了大鼠 BMECs，也同时显示出分化更彻底的、开始表达 vWF 蛋白的人骨髓细胞。

干细胞向内皮分化过程中，按时间顺序其分化标

志依次是 Flk-1，Tie-2，VE-cadherin，Tie-1，CD34 和 vWF[6]，表达 Flk-1 蛋白说明 MSCs 已开始向内皮分化，而 Flk-1 阳性细胞同时开始表达 vWF 说明这些细胞的分化更为成熟和彻底。MSCs 能在局部微环境中重新编程，分化成与其周围细胞生物学特性相似的细胞[7]。干细胞的分化包括失稳态以及定向分化两个过程，但具体机制推测与细胞直接接触[3]、细胞因子调控[1]、细胞融合[7]等因素有关。正常条件下的间接共培养仅通过旁分泌细胞因子影响 MSCs 的分化，本实验结果表明单纯通过 BMECs 旁分泌细胞因子未能诱导 MSCs 向内皮分化；但是缺氧等应激条件下细胞能分泌更多的促血管生成作用细胞因子例如 VEGF、bFGF 等[8,9]，而它们正是诱导干细胞向内皮分化过程中起关键作用的细胞因子，这极有可能是本实验中缺氧条件下的间接共培养 BMECs 诱导少量 MSCs 表达 Flk-1 的原因，这一结果也与其他学者的缺氧条件 MSCs 发生迁移分化并形成毛细血管管腔样结构的结论一致[10]。在直接共培养组中，BMECs 通过细胞直接接触能诱导部分 MSCs 表达 Flk-1；而缺氧损伤条件下，细胞直接接触和缺氧诱导的细胞因子两种因素共同作用，促使了更多共培养的 MSCs 表达 Flk-1，而且更彻底地分化表达出较为成熟的内皮细胞标志 vWF。另外，实验中并未发现呈融合状态的多核细胞，同时鉴于本实验所用两种细胞来源于不同种属，故由于细胞融合所致的干细胞向内皮分化可能性很小[11]。

总之，BMECs 仅通过旁分泌细胞因子不足以诱导 MSCs 分化，BMECs 能够通过细胞直接接触诱导共培养的 MSCs 向内皮分化，缺氧在诱导 MSCs 向内皮分化的过程中起重要作用，缺氧条件下，直接共培养 BMECs 能诱导更多的 MSCs 更彻底地向内皮分化。本研究为 MSCs 应用于修复缺血性脑血管病中受损的血脑屏障和血管内皮提供了基础实验依据，但仍有待于动物实验和临床研究的进一步深入。

参考文献：

[1] Wu X，Huang L，Zhou Q，*et al*. Effect of paclitaxel and mesenchymal stem cells seeding on ex vivo vascular endothelial repair and smooth muscle cells growth[J]. J Cardiovasc Pharmacol，2005，46(6)：779－786.

[2] 刘恺鸣，迟路湘，鲁向辉，等. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养[J]. 第三军医大学学报，2007，29(20)：2011－2013.

[3] Ball S G，Shuttleworth A C，Kielty C M. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate[J]. Int J Biochem Cell Biol，2004，36(4)：714－727.

[4] Lu L，Yang P Y，Rui Y Ch，*et al*. Comparative proteome analysis of rat brain and coronary microvascular endothelial cells[J]. Physiol Res，2007，56(2)：159－168.

[5] Fandrich F，Lin X，Chai G X，*et al*. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning[J]. Nat Med，2002，8(2)：171－178.

[6] Reyes M，Dudek A，Jahagirdar B，*et al*. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow[J]. J Clin Invest，2002，109(3)：337－346.

[7] Spees J L，Olson S D，Ylostalo J，*et al*. Differentiation，cell fusion，and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2003，100(5)：2397－2402.

[8] Kinnaird T，Stabile E，Burnett M S，*et al*. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms[J]. Circ Res，2004，94(5)：678－685.

[9] Wang M，Crisostomo P R，Herring C，*et al*. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF，HGF，and IGF-Ⅰ in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol，2006，291(4)：R880－R884.

[10] Annabi B，Lee Y T，Turcotte S，*et al*. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation[J]. Stem Cells，2003，21(3)：337－347.

[11] 常　静，雷　寒，陈建斌，等. 大鼠心肌细胞诱导人骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的研究[J]. 重庆医科大学学报，2007，32(9)：907－910.

（编辑　栾　嘉）

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的适用性，每篇文章或资料应标识 1 个文献标识码。一般设置以下 5 种标准。

A：理论与应用研究学术论文（包括综述报告）

B：实用性技术成果报告（科技）、理论学习与社会实践总结（社科）

C：业务指导与技术管理性文章（包括领导讲话、特约评论等）

D：一般动态性信息（通讯、报道、会议活动、专访等）

E：文件、资料（包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等）

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部