论著

文章编号:1000-5404(2010)21-2286-04

细胞间直接接触对骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的作用

彭 锦,迟路湘 (400038 重庆,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)

【摘要】 目的 探讨骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)与人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)直接接触共培养诱导MSCs向血管内皮细胞分化的作用。方法 将MSCs和HUVECs按一定比例混合直接共培养,48 h后用ELISA检测其共培养细胞培养液(实验组)及MSCs与HUVECs各自单独培养48 h后再混合的培养液(对照组)中VEGF含量;5 d后用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)的表达以及其Dil-ac-LDL吞噬能力;并用透射电镜观察MSCs超微结构改变。结果 VEGF在实验组中的含量显著高于对照组;直接接触共培养诱导MSCs表达Flk-1蛋白,且部分Flk-1阳性MSCs同时表达vWF蛋白;部分MSCs具有吞噬Dil-ac-LDL功能;电镜下见MSCs出现分化特征,核质比缩小,细胞器较为丰富,并可见细胞融合现象。结论 HUVECs可以通过细胞间直接接触诱导共培养的MSCs开始向内皮分化;其机制可能与细胞间直接接触促进细胞分泌VEGF以及细胞融合密切相关。

【关键词】 间充质干细胞;脐静脉内皮细胞;共培养;分化;VEGF;超微结构
【中图法分类号】 R322.12;R329.21;R329.24 【文献标志码】 A

Effect of direct cell-cell contact on differentiation of mesenchymal stem cells into vascular endothelial cells

Peng Jin, Chi Luxiang (Department of Cardiovasology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of direct cell-cell contact on differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) into vascular endothelial cells (VEC) when MSC were co-cultured with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. Methods MSC and HUVEC were cultured and identified respectively, and then co-cultured. VEGF levels were measured in experimental group and control group by ELISA assays 48 h after culture. Expression of fetal liver kinase-1 (FLK-1) and von Willebrand factor (vWF) in MSC and HUVEC 5 d after co-cultured, as well as phagocytic power of Dil-ac-LDL, were detected and analyzed by immunofluorescence cytology. Changes in ultra-microstructure of MSC were observed under a transmission electron microscope. Results The VEGF level was significantly higher in experimental group than in control group. FLK-1 protein and vWF protein were expressed in MSC. Some MSC could phagocytize Dil-ac-LDL. Characteristic differentiation of MSC was observed under transmission electron microscope with a lower karyoplasmic ratio, rich organelle, and cell fusion. Conclusion HUVEC can induce differentiation of directly co-culture-induced MSC into endothelial cells through direct cell-cell contact, which may be closely related to VEGF secretion due to direct cell-cell contact and cell fusion.

【Key words】 mesenchymal stem cell; human umbilical vein endothelial cell; co-culture; differentiation; VEGF; ultra-microstructure

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30971227). Corresponding author: Chi Luxiang, Tel: 86-23-68754118, E-mail: chi68754118@126.com

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多潜能分化性,已证明MSCs修复和分化为多种组织的能力,尤其在修复和重建血管方面成为缺血性血管疾病治疗研究的热点[1]。血管成形及支架植入术是治疗冠状动脉及外周动脉狭窄的有效手段,但术后再狭窄问题严重,内皮细胞损伤、修复及功能改变在其中扮演极其重要角色[2]。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30971227)
【通信作者】 迟路湘,电话:(023)68754118,E-mail:chi68754118@126.com

与人动脉内皮细胞生物学特征相似，在血管功能研究上得到越来广泛的应用[3]。利用干细胞可向内皮细胞分化的特性[4]，以修复血管成形及支架植入术后血管内皮细胞，在治疗缺血性心血管疾病中同样具有十分重要的意义。本实验以 HUVECs 与 MSCs 直接接触共培养的方法模拟血管内环境，研究细胞间直接接触对骨髓间充质干细胞分化为血管内皮作用，为 MSCs 应用于血管内皮修复和缺血性心血管疾病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

胎牛血清（FBS，Gibco），L-DMEM（Gibco），M199 培养液（Gibco），碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF），Ⅱ型胶原酶（Sigma），DAPI（碧云天），FITC 标记山羊兔 IgG、罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG、兔抗人Ⅷ因子相关抗原（Ⅷ-R Ag）多克隆抗体（中山金桥），Flk-1（A-3）：sc-6251（Santa Cruz），人 VEGF-ELISA 试剂盒（西唐生物），Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白（Dil-ac-LDL，molecular probes 公司），DMI6000 激光共聚焦显微镜（Leica），Pro V5.0.1 酶标仪，PHILIPS TECNAI 10 透射电镜。

1.2 方法

1.2.1 人 MSCs 的分离纯化及培养[5] 无菌条件下采集健康 40 岁以下成年志愿者骨髓 10 ml，用密度梯度离心法（1.077 g/ml）分离 MSCs，然后用 L-DMEM 培养基（含 10% FBS，2 mmol/L L-谷氨酰胺）接种于塑料培养瓶，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。48 h 后弃去未贴壁细胞并更换新鲜培养基。待原代细胞生长至 80% 融合后进行传代培养。以 3 代细胞用于实验。

1.2.2 HUVECS 的分离与培养[6] 无菌条件下取健康产妇分娩后 4 h 内脐带，长约 30 cm，用 1 g/L Ⅱ型胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶（1∶1，体积分数）15 ml 消化分离 HUVECs，然后用 M199 完全培养基（含 20% FBS，100 mg/L 肝素钠，2 mmol/L L-谷氨酰胺，1 ng/ml bFGF，青霉素 100 U/ml，链霉素 0.1 mg/ml）接种于塑料培养瓶，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。48 h 后更换新鲜培养基，待原代细胞生长至 80% ~90% 融合后进行传代培养（传代后的 M199 完全培养基不含 bFGF），以 2 代细胞用于实验。

1.2.3 直接接触共培养[7] 将 3 代 MSCS 用终浓度为 20 μg/ml 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 10 次后常规消化，与 HUVECs 分别以 5×10^5/ml 的密度共同传入 24 孔板内，混合均匀后常规培养，备免疫荧光化学染色；另取同样密度的 MSCS（无 DAPI 标记）与 HUVECs 混合均匀后传入培养瓶内备作透射电镜观察。均于 5 d 后结束培养。

1.2.4 共培养及单独培养的培养基收集和 VEGF 的含量检测[8] 将 MSCS 与 HUVECs 制悬，均调整为 5×10^5/ml 的密度。实验组：将 2 种细胞等体积混合共培养 48 h 后收集培养基（$n=3$）；对照组：将 2 种细胞等体积单独培养 48 h 后收集两者培养基再混合（$n=3$）。将培养基 1 000 r/min 离心 10 min，0.22 μm 滤膜过滤得到实验组及对照组培养基。ELISA 检测两者培养基中 VEGF 浓度。

1.2.5 免疫荧光细胞化学法鉴定分析直接共培养组中 MSCs 的 Flk-1 和 vWF 白表达 一抗分别为兔抗人Ⅷ因子相关抗原（Ⅷ-R Ag）多克隆抗体工作液、小鼠抗人 Flk-1 单克隆抗体（1∶50）；二抗分别为 FITC 标记山羊兔 IgG、罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG。激光共聚焦显微镜下观察 Flk-1 和 vWF 蛋白表达。

1.2.6 Dil-ac-LDL 吞噬实验 将共培养 5 d 后的细胞，弃原培养液，加入含 10 μg/ml Dil-ac-LDL 的 M199 培养基，于 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养 4 h；吸弃上清，PBS 洗 2 遍，加 4% 多聚甲醛固定 5 min，PBS 洗 3 遍，于荧光显微镜下观察。

1.2.7 透射电镜观察 将培养 5 d 的共培养细胞消化离心沉淀，弃上清液后，4 ℃预冷 2% 戊二醛固定 2 h，PBS 洗涤 3 次，1% 四氧化锇固定 30 min，PBS 漂洗 3 次，丙酮梯度脱水，环氧丙烷 + 包埋剂（1∶1）包埋细胞团块，修块，超薄切片，铜网捞起，铅铀双染色，PHILIPS TECNAI 10 透射电镜观察拍照。

1.3 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 SPSS 13.0 统计软件，两组间比较行单因素方差分析。

2 结果

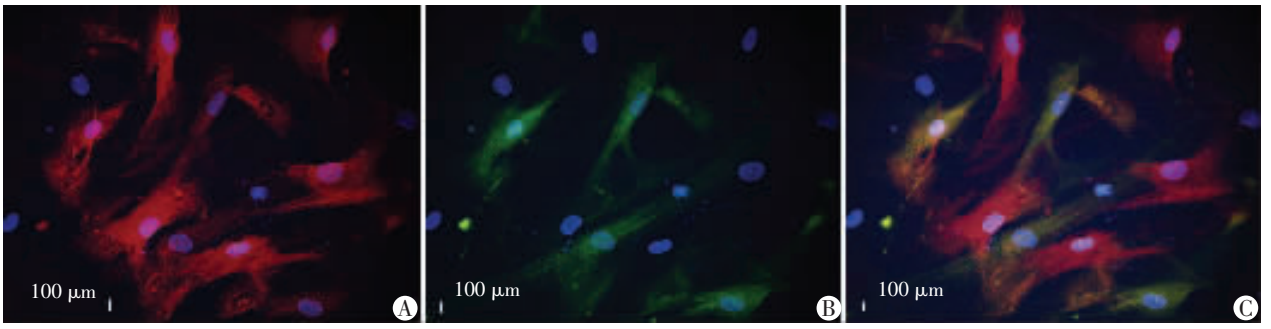
2.1 细胞形态及免疫荧光鉴定结果

MSCs 呈较均一的长梭形生长（图 1A）。HUVECs 呈小多角形、椭圆形、短梭形生长（图 1B）。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，HUVECs 的 Flk-1 和 vWF 蛋白均为阳性表达。



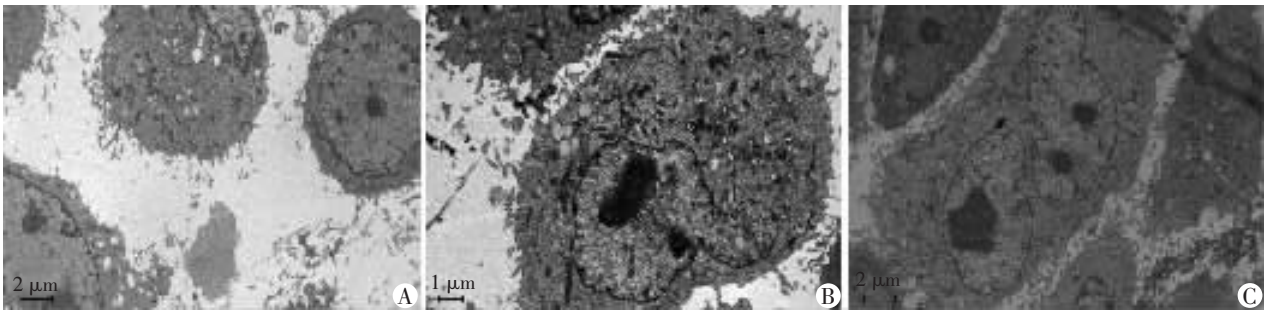
A：第 3 代 MSCs（×100）；B：第 2 代 HUVECs（×100）；C：共培养细胞（×200）

图 1 培养的第 3 代的人 MSCS 细胞和第 2 代 HUVECs 细胞及两者共培养细胞的形态学观察（倒置相差显微镜）



A:部分细胞核发蓝色荧光的 MSCs;B:部分 Flk-1 阳性 MSCs 同时表达 vWF(FITC 标记);C:图 A 与图 B 叠加图 表达 Flk-1(罗丹明标记)

图2 共培养细胞免疫荧光化学鉴定 (免疫荧光)



A:MSCs 与 HUVECs 的超微结构;B:分化中的 MSCs;C:MSCs 与 HUVECs 发生细胞融合

图4 共培养 MSCs 的超微结构观察 (TEM)

2.2 共培养细胞的形态学及免疫荧光鉴定结果

共培养生长细胞在倒置相差显微镜下观察可见 2 种细胞逐渐生长融合,细胞形态接近,不易分辨(图 1C)。免疫荧光化学鉴定: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,部分细胞核发蓝色荧光的 MSCs 表达 Flk-1 蛋白,激光共聚焦显微镜显示呈红色荧光,且部分 Flk-1 阳性 MSCs 开始同时表达 vWF 绿色荧光(图 2)。

2.3 Dil-ac-LDL 吞噬实验

部分 DAPI 标记的 MSCs 吞噬 Dil-Ac-LDL 后发出的红色荧光(图 3),显示此部分 MSCs 具有吞噬 Dil-ac-LDL 能力。

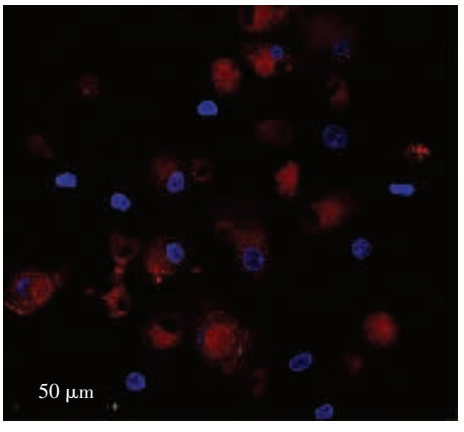


图3 部分 DAPI 标记的 MSCs 吞噬 Dil-Ac-LDL 后发出红色荧光 (免疫荧光)

2.4 共培养细胞(实验组)与对照组细胞 VEGF 含量

实验组 VEGF 含量(559.55 ± 66.19) pg/ml 高于对照组(373.98 ± 57.28) pg/ml($P < 0.05$, $n = 3$)。

2.5 透射电镜观察共培养 MSCs 超微结构

可见原始未分化的 MSCs 核质比例大(大多数核质比 > 1.5),核不规则,形态多样,有切迹,部分细胞可见 2 ~ 3 个核仁,细胞质细胞器稀少或不甚发达;成熟的 HUVECs 核质比例小(大多数核质比 < 0.5),核形态较规则,核仁明显,细胞质细胞器丰富(图 4A)。分化过程的 MSCs 核质比缩小,核不规则,形态多样,细胞器较为丰富(图 4B)。可见 MSCs 与 HUVECs 见细胞膜局部电子增高的缝隙连接,并可见细胞融合现象(图 4C)。

3 讨论

本研究采用密度梯度离心法结合 MSC 贴壁生长的特性,是目前常用且公认的的得到较为纯化的 MSCs 的方法之一;并且随着传代和换液细胞逐渐得到纯化,第 3 代 MSCs 形态均一,纯度达 95% 以上[9]。但 4 代以后细胞逐渐呈老化现象,故选用第 3 代细胞进行实验。

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、Tie22、VE2cadherin、Tie21、CD34 和 vWF[10],表达 Flk-1 蛋白表明 MSCs 开始向内皮分化,部分 Flk-1 阳性 MSCs 同时开始表达 vWF 说明这些 MSCs 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[11]。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间直接接触[7]、细胞因子调控[4]、细胞融合[11]等因素有关。在本实验共培养细胞中,HUVECs 通过直接接触能诱导部分 MSCs

表达 Flk-1,且部分 Flk-1 阳性的 MSCs 更彻底地分化表达出成熟的内皮细胞标志 vWF;Dil-ac-LDL 吞噬实验显示共培养诱导分化 5 d 后的部分 MSCs 具有吞噬 Dil-ac-LDL 能力,表明诱导分化后的部分 MSCs 可表达清道夫受体并发生内皮细胞所特有的 Ac-LDL 吞噬反应,这可作为一个指标反映 MSCs 分化为内皮,并可正常行使体内动脉壁的 Ac-LDL 吞噬功能。共培养细胞培养液中 VEGF 含量显著高于 2 种细胞单独培养再混合的培养液,表明细胞间直接接触本身可以促进细胞分泌 VEGF,且使用 VEGF 抗体能明显削弱骨髓间充质干细胞培养基对大鼠脑微血管内皮细胞的增殖和迁移作用[12],而 VEGF 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之一,且 MSCs 可通过自分泌和旁分泌生长因子可以作用于 MSCs 自身和其他组织细胞[13],这提示细胞间直接接触可能促进了 MSCs 通过自分泌和旁分泌 VEGF 作用于自身并诱导了自身的分化,但是细胞间直接接触是否也促进了 HUVECs 旁分泌 VEGF 以及是否也促进了参与 MSCs 分化的其他生长因子的分泌,有待于进一步研究。透射电镜显示 MSCs 显示出分化特征,分化过程的 MSCs 核质比缩小,核不很规则,形态多样,细胞器较为丰富,可见 MSCs 与 HUVECs 见细胞膜局部电子增高的缝隙连接以及细胞融合现象,表明细胞融合也可能是干细胞向内皮分化因素之一;但是 Rota 等[14]研究表明发生梗死的心脏进行间充质干细胞移植后,移植的干细胞与宿主心肌细胞可以通过缝隙连接蛋白 43 和 N-钙粘蛋白形成连接复合体而增殖生长、转分化获得具有心肌细胞和血管表型的新生细胞,新生细胞具有 2 倍体核型和 2 条性染色体,可排除非细胞融合所致;可能与细胞融合效率低有关[15]。故细胞融合是否影响干细胞定向分化尚有争议。

本研究为 MSCs 应用于修复血管内皮提供了基础实验依据,但是体外以 HUVECs 与 MSCs 直接接触共培养的方法模拟血管内环境相对比较单纯,体内血管内皮损伤后的血管内环境相当复杂,特别是体内血管内皮损伤后,可有平滑肌细胞暴露,MSCs 向内皮细胞分化的同时,也可向平滑肌细胞分化[16],而平滑肌细胞增生是参与血管再狭窄极为重要环节[17],故在体内 MSCs 修复血管内皮以防止血管再狭窄发生仍有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Mageed A S, Pietryga D W, DeHeer D H, *et al*. Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells [J]. Transplantation, 2007, 83(8): 1019 - 1026.

[2] Smith S C Jr, Milani R V, Arnett D K, *et al*. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group II: risk factors [J]. Circulation, 2004, 109(21): 2613 - 2616.

[3] Goon P K, Watson T, Shantsila E, *et al*. Standardization of circulating endothelial cell enumeration by the use of human umbilical vein endothelial cells [J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(4): 870 - 872.

[4] 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.

[5] 刘恺鸣,迟路湘,鲁向辉. 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 [J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 610 - 613.

[6] 李琴山,冯赞杰, 刘洋, 等. 一种改进的人脐静脉内皮细胞的培养方法 [J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(3): 276 - 278.

[7] 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.

[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] Liu K, Chi L, Guo L, *et al*. The interactions between brain microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells under hypoxic conditions [J]. Microvasc Res, 2008, 75(1): 59 - 67.

[10] 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.

[11] 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 U S A, 2003, 100(5): 2397 - 2402.

[12] 刘恺鸣,迟路湘,鲁向辉. 缺氧条件下间充质干细胞以旁分泌方式影响脑微血管内皮细胞的功能 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(7): 1356 - 1361.

[13] 刘秀华,唐朝枢. 干细胞的旁分泌和自分泌功能——基础与临床研究的新视角 [J]. 生理科学进展, 2008, 39(3): 196 - 202.

[14] Rota M, Kajstura J, Hosoda T, *et al*. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(45): 17783 - 17788.

[15] O'Malley K, Scott E W. Stem cell fusion confusion [J]. Exp Hematol, 2004, 32(2): 131 - 134.

[16] 苗莉,何国祥,景涛, 等. 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 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9): 814 - 816.

[17] 苗莉, 何国祥, 景涛, 等. 体外诱导骨髓间充质干细胞向血管平滑肌细胞分化的实验研究 [J]. 重庆医学, 2007, 36(13): 1278 - 1279, 1282, 封 2.

(收稿:2010-06-01 修回:2010-07-06)
(编辑 王小宴)