文章编号:1000-5404(2013)02-0119-04

论著

小鼠 EPCs 和 RAW264.7 细胞株体外联合培养体系的建立

付生龙,庞 浩,吴雪晖,许建中 (400038 重庆,第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心)

[摘要] **目的** 体外建立小鼠血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)和破骨细胞前体细胞 RAW264.7 细胞株共培养体系。**方法** EPCs 和 RAW264.7 细胞株共培养为实验组,加了等量细胞培养液但没有加入 EPCs 的细胞作为对照组。利用分离式培养小室进行细胞联合培养,Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒检测细胞的增殖,通过检测光密度值绘制共培养过程中 RAW264.7 细胞生长曲线;逆转录 PCR 检测共培养 1、3、5、7 d 后 RAW264.7 细胞 VEGFR-2 和 CXCR4 mRNA 的表达;TRAP 染色检测破骨细胞活性。**结果** 和 EPCs 细胞联合培养能加快 RAW264.7 细胞的增殖速率,和 RAW264.7 单独生长比较,共培养 3、5、7 d 后,2 组的光密度值差异有显著性($P<0.01$);共培养促进 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞。**结论** 在体外联合培养体系中,EPCs 具有促进宿主破骨细胞前体细胞增殖与分化的作用。

[关键词] 小鼠血管内皮祖细胞;RAW264.7;联合培养
[中图法分类号] R329-33;R329.24 [文献标志码] A

Establishment of co-culture system of mouse endothelial progenitor cells and RAW264.7 cells

Fu Shenglong, Pang Hao, Wu Xuehui, Xu Jianzhong (Center of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To establish a co-culture system containing mouse endothelial progenitor cells (EPCs) and mouse osteoclast precursor RAW264.7. Methods Co-cultured endothelial progenitor cells (EPCs) and RAW264.7 cells in Transwell chamber served as the experimental group, and the equivalent cells nutrient solution but without EPCs cells served as control group. Cell Counting Kit-8 was used to measure cell proliferation. Absorption values were detected to depicter cellular growth curve. Reverse transcript PCR was applied to detect VEGFR-2 and CXCR4 expression at mRNA level. TRAP staining was used to detect osteoclast activity. Results Co-culture system of mouse endothelial progenitor cells (EPCs) and RAW264.7 cells in Transwell chamber facilitated RAW264.7 cells growth. In comparison with the growth of RAW264.7 cells in control group, the cell growth in co-culturing system was significantly increased after culture for 3, 5 and 7 d ($P<0.01$). Co-culture also increased the expression of vWF and VEGFR-2 and the activity of osteoclast. Conclusion In our co-culture system of EPCs and RAW264.7 cells, EPCs facilitate the proliferation and differentiation of RAW264.7 cells.

[**Key words**] mouse endothelial progenitor cells; RAW264.7; co-culture

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071465). Corresponding author: Wu Xuehui, Tel: 86-23-68765782, E-mail: fatbear7217@yahoo.com.cn; Xu Jianzhong, Tel: 86-23-68754164, E-mail: xjzslw@163.com

近年来,骨组织工程技术成为骨缺损修复的研究重点,尤其是解决组织工程骨(tissue engineering bone, TEB)的血管化问题。血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)因其在血管新生中的促血管生成作用,逐渐被用于促进组织工程骨的血管化[1-2]。以 EPCs 为中心的促进组织工程骨血管化的优化和应用方案,受限于对组织工程骨的修复机制的认识,尤其是对种子细胞在生物支架材料中与宿主自身细胞的具体作用和转归并不清楚。因而,开展组织工程骨内 EPCs 参与血管生成过程中,对宿主细胞特别是破骨相关细胞的相互作用的研究,有助于探索骨缺损修复机制,并为提高组织工程骨的构筑技术,促进骨组织工程的进一步发展提供可能。在 EPCs 对宿主自身的破骨

[基金项目] 国家自然科学基金(81071465)
[通信作者] 吴雪晖,电话:(023)68765782, E-mail: fatbear7217@yahoo.com.cn
许建中,电话:(023)68754164, E-mail: xjzslw@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121123.0942.003.html(2012-11-23)

细胞或者是其前体细胞(RAW264.7)的募集中,可能存在着EPCs为募集破骨细胞前体提供细胞或者细胞因子的微环境,激发破骨细胞迁移至修复区,参与骨塑形[3]。然而,体内实验的复杂性限制了该问题的阐明,建立有效的体外研究体系对于该问题的解答起着关键性的作用。本研究通过建立小鼠EPCs和RAW264.7细胞株体外联合培养体系,通过绘制RAW264.7细胞的生长曲线、检测VEGFR-2和CXCR4的表达以及对破骨活动的TRAP染色等判定体外联合培养中EPCs对RAW264.7破骨分化的影响,旨在为研究EPCs生理功能的调控机制及EPCs在骨血管损伤修复中的作用提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠破骨前体细胞RAW264.7(ATCC公司),DMEM培养基(Gibco公司),胎牛血清(公司),培养箱(上海一恒公司),倒置相差显微镜(Leica公司),超净工作台(哈东联公司),Transwell小室(Corning公司),Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(Dojindo公司)。

1.2 EPCs培养与鉴定

EPCs的分离培养参照文献[4],基本步骤主要包括:CO_2窒息处死RosA26雄性小鼠,70%酒精浸泡灭菌后移入层流室通风橱内。将两侧股骨取出,用注射器吸PBS缓冲液缓慢冲洗骨髓细胞,加入到1.077 g/mL淋巴细胞分离液中,经密度梯度离心吸取白细胞层。多次离心后可以得到骨髓的单个核细胞(BMNC)。在预先包被有5 μg/mL纤维连接素的培养瓶中培养,培养液为含有血管内皮生长因子(VEGF)等EBM-2完全培养液,20%特级胎牛血清,37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。于第4天用PBS洗掉非贴壁细胞,全量换液后继续培养。按前述方法在24孔培养板中放置10 mm×10 mm盖玻片进行EPCs培养爬片,在第6天时进行细胞鉴定。免疫双荧光激光共聚焦分析(显示红色荧光为DiI-acLDL阳性,显示绿色荧光为FITC-UEA-1阳性,同时显示红绿色阳性细胞重叠后即显示橙黄色的为免疫双荧光阳性,被确认为正在分化的EPCs)。

1.3 建立共培养体系

将Transwell小室放入12孔细胞培养板中,小室内称上室,培养板内称下室,上室内盛上层培养液,下室内盛下层培养液,上下层培养液以聚碳酸酯膜相隔(孔径0.4 μm)。将RAW264.7细胞株种于上室,小鼠EPCs细胞种于下室。上室:将RAW264.7细胞从培养瓶中消化下来后离心收集细胞,每个孔板平均接种5×10^2~1×10^3个RAW264.7细胞,含有DMEM培养基1 000 μL。联合培养3、5、7 d后描绘细胞的生长曲线以及对破骨活动进行TRAP染色。下室:将小鼠EPCs从培养瓶中用细胞刮子刮下后离心,收集细胞,每个小室平均接种1×10^3个EPCs细胞,含有培养基200 μL。用加了等量细胞培养液但没有加入EPCs的细胞作为对照组。

1.4 细胞增殖实验

CCK-8试剂盒用于检测细胞增殖,每孔加入400 μL 1×10^4/ml细胞。每孔加入40 μL CCK-8溶液。在细胞培养箱内继续孵育2 h,多功能酶标仪(美国MD公司)检测RAW264.7细胞在450 nm波长下的光密度值[D(450)]。重复试验3次,求平均值。并绘制细胞的生长曲线。

1.5 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色

RAW264.7细胞与内皮祖细胞共培养至第7天,将12孔培养板从孵箱取出Transwell小室,上层的RAW264.7细胞用PBS洗3遍,每次5 min。细胞固定30 s后,去离子水彻底漂洗。取2个小瓶加入0.5 mL石榴红GBC溶液和0.5 mL亚硝酸盐溶液,轻轻翻转混匀30 s,静置2 min。A液:预热的去离子水45 mL,0.5 mL石榴红GBC溶液和0.5 mL亚硝酸盐溶液,萘酚AS-BI磷酸溶液0.5 mL,醋酸溶液2.0 mL。B液:预热的去离子水45 mL,0.5 mL石榴红GBC溶液和0.5 mL亚硝酸盐溶液,萘酚AS-BI磷酸溶液0.5 mL,醋酸溶液2.0 mL,酒石酸溶液1 mL,37 ℃水浴锅中预热。将A或B液加入培养板中37 ℃孵育1 h。去离子水彻底冲洗,然后在苏木精中复染2 min。自来水中漂洗直到出现蓝色核。空气干燥,显微镜下观察。

1.6 逆转录PCR检测VEGFR-2和CXCR4的表达

Trizol试剂盒分别提取共培养1、3、5、7 d后RAW 264.7细胞的RNA,琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的纯度。经逆转录酶制备cDNA后,进行PCR反应,引物:VEGFR-2正义链:5′-GAAAGAGCCGGCCAGTGAGTG-3′,反义链:5′-CGGTGGTGTCTGTGTCATCTGAG-3′, CXCR4正义链:5′-TCAGTGGCTGACCTCCTCTT-3′,反义链:5′-CCTTTTCAGCCAGCAGTTTC-3′。内参引物β-actin正义链:5′-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′,反义链:5′-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3′。反应条件:94 ℃,3 min;94 ℃, 30 s;62 ℃, 30 s;72 ℃,1 min,30个循环;72 ℃,5 min。最后,对PCR产物进行电泳检测。

1.7 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件,组间数据比较采用独立样本t检验。

2 结果

2.1 EPCs的培养与鉴定

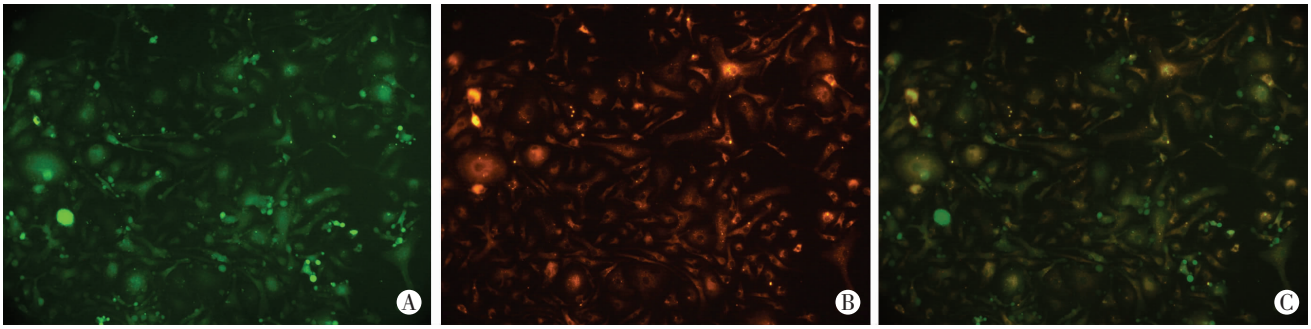
培养第6天,EPCs细胞与FITC-UEA-1结合显示绿色荧光(图1A),同时内吞DiI-acLDL显示红色荧光(图1B),重合后为黄色免疫双荧光阳性细胞(图1C)。

2.2 体外联合培养体系中EPCs对RAW264.7细胞增殖的影响

2种细胞共培养后,分别检测EPCs对RAW264.7细胞增殖的影响(图2)。RAW264.7细胞在单独培养的情况下,1、3、5、7 d后细胞数逐渐增加,而EPCs和RAW264.7细胞共培养能加快后者的增殖速率,共培养3 d后RAW264.7细胞较单独培养的细胞数即具有显著性的差异($P<0.01$)。

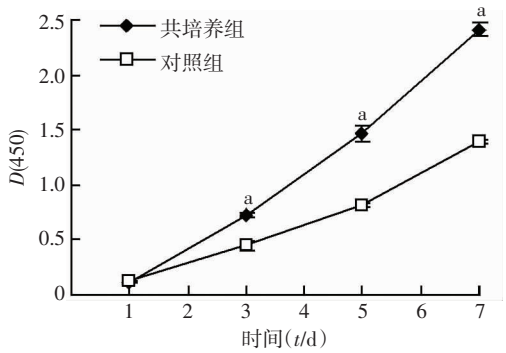
2.3 体外联合培养体系中EPCs对RAW264.7细胞分化的影响

TRAP染色是一种特异性较强染色法用于鉴定破骨细胞的分化。共培养至7 d时,RAW 264.7细胞株有向破骨细胞转化的趋势。TRAP阳性细胞为多核细胞(核≥3个),细胞体积增大,细胞质成空泡状,细胞膜边界不整,周边可见伪足伸展(图3)。



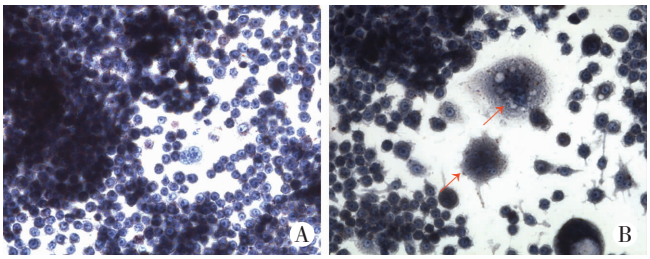
A:EPCs 细胞与 FITC-UEA-1 结合;B:同时内吞 DiI-acLDL;C:重合图

图 1　免疫双荧光鉴定 EPCs（激光共聚焦显微镜 ×200）



a:$P<0.01$,与对照组比较

图 2　EPCs 和 RAW264.7 细胞共培养对 RAW264.7 细胞增殖的影响

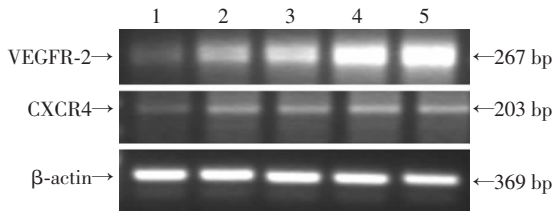


A:对照组;B:共培养组　↑:TRAP 染色阳性的多核细胞

图 3　EPCs 和 RAW264.7 细胞共培养后 TRAP 染色观察（×400）

2.4　EPCs 对 RAW264.7 细胞 VEGFR-2、CXCR4 表达的影响

由图 4 可见,随着共培养时间的延长,VEGFR-2 和 CXCR4 的表达量不断增加。



1:对照组;2~5:共培养 1、3、5、7 d

图 4　EPCs 和 RAW264.7 共培养对 RAW264.7 细胞 VEGFR-2、CXCR4 mRNA 表达的影响

3　讨论

破骨细胞是人体生理性骨重建和病理性骨破坏过程中高度特异性的多核巨细胞。破骨细胞来源于骨髓单核巨噬细胞系,高表达的抗酒石酸酸性磷酸酶和组织蛋白酶 K 是破骨细胞主要标志。在骨发育、骨形成、骨吸收和骨量的调节方面发挥着关键作用。近年来,随着对破骨细胞分化调控机制的深入研究,发现核因子 κB 受体激活物配体(receptor activator of nuclear kappa B ligand, RANKL)等能够诱导破骨前体细胞分化[5-7]。基质细胞和成骨细胞可以分泌破骨细胞分化的关键因子 RANKL 和巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)。很多研究开始将基质细胞或成骨细胞与骨髓或脾细胞混合共培养或分层共培养来诱导破骨前体细胞分化,获取破骨细胞[8-9]。但共培养的培养过程也存在很多缺点,如需要成骨或基质系细胞的支持,同时需要活性维生素 D、地塞米松的促分化作用;由于成骨细胞的生长优势作用,破骨细胞会大量消失;另外,成骨细胞含有其他细胞成分,不适合基因转染研究。

RAW264.7 细胞是小鼠源性破骨细胞前体细胞,来自 Abelson 小鼠白血病病毒所致的肿瘤,代表破骨细胞分化的早期阶段,可以诱导分化为成熟的破骨细胞[10]。Huber 等[11]用 RANKL 和 M-CSF 诱导 RAW264.7 细胞,第 5 天即可出现 TRAP 染色阳性的多核细胞。这种方法所得的破骨样细胞稳定,纯度和数量都较高,为破骨细胞形态和功能的研究提供了细胞来源。破骨前体细胞的分化需要 RANKL 和 M-CSF 共同作用,而到了融合阶段只需 RANKL 即能完成破骨细胞的分化[12]。也有研究[13]证实无论 M-CSF 存在与否,RANKL 都能诱导脾细胞向破骨细胞分化。EPCs 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参与损伤血管的修复。EPCs普遍的鉴定方法是根据其细胞表面表达的标记VEGFR-2、CD34等来鉴定。但细胞表面标志物不明确,利用其功能特征来对其进行鉴定很重要。免疫双荧光染色正是利用EPCs既能吞噬AcLDL又能结合UEA的特征,证实所培养的细胞大部分是正在分化中的EPCs。EPCs在心脑血管疾病、外周血管疾病、肿瘤血管形成及创伤愈合等方面均发挥重要作用。近年来,EPCs生物学特性和治疗作用的研究成为这一领域新的热点。

本实验通过Transwell小室共培养EPCs和RAW264.7细胞发现:共培养的过程能够提高RAW264.7细胞的增殖速率,同时能够诱导RAW264.7细胞出现许多TRAP(破骨细胞特征性标志物)染色阳性的多核细胞,证实了EPCs所分泌的生长因子等,能形成破骨前体细胞分化所需要的微环境,促进破骨细胞前体细胞分化形成成熟破骨细胞。研究[14]发现VEGF可直接以破骨细胞前体为靶点来调节其分化和增强其骨吸收的活性,吸收骨折端坏死的骨质。在骨修复过程中EPCs刺激破骨细胞活化所起的作用总体来说是积极有利的:早期破骨细胞的活化有利于骨折端坏死骨质的吸收,在其后过程中则有利于骨骼的改造塑形。因此,在EPCs对宿主自身的破骨细胞或者是其前体细胞的募集中,可能存在着EPCs为募集破骨细胞前体提供细胞或者细胞因子的微环境,激发破骨细胞迁移至修复区,参与骨塑形。在本研究中,Transwell小室共培养EPCs细胞和RAW264.7细胞,共培养7 d后,有TRAP阳性细胞的形成,体外实验进一步证实了上述现象。同时,逆转录PCR的结果也显示随着共培养时间的延长能促进CXCR4和VEGFR-2的表达,该结果指出EPCs细胞所分泌的VEGF能够调节VEGF相应的受体,激活RAW264.7的分化。Cho等[15]在研究低氧对造血干细胞微环境的影响时,进一步发现SDF-1募集破骨细胞前体是通过SDF-1- CXCR4轴,上调MMP9和组织蛋白酶K(CTK)表达,并增进破骨细胞的体外分化能力。因为CXCR4是SDF-1的特异性受体,表明SDF-1也参与了RAW264.7细胞生物学行为的调控。SDF-1/CXCR4轴在干细胞的动员、归巢、黏附、血管形成调节和在靶器官内的增殖、存活的整个过程中都发挥着重要作用[16]。

综上所述,本研究证实EPCs具有促进RAW264.7细胞增殖、分化的作用,其可能性的机制是EPCs通过VEGF/VEGFR-2、SDF-1/CXCR4两大信号轴和RAW264.7细胞之间的关联,提示EPCs可能在体内具有调节宿主破骨细胞前体的作用。

参考文献:

[1] Rouwkema J, Westerweel P E, de-Boer J, *et al*. The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(8): 2015-2027.

[2] Yu H, VandeVord P J, Mao L, *et al*. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization[J]. Biomaterials, 2009, 30(4): 508-517.

[3] Del-Fattore A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling [J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2): 147-160.

[4] Zhang Z, Qun J, Cao C, *et al*. Apolipoprotein A-I mimetic peptide D-4F promotes human endothelial progenitor cell proliferation, migration, adhesion though eNOS/NO pathway[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(4): 4445-4454.

[5] Teitelbaum S L. Bone resorption by osteoclasts[J]. Science, 2000, 289(5484): 1504-1508.

[6] Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation[J]. Bone, 2007, 40(2): 251-264.

[7] Orlandini S Z, Formigli L, Benvenuti S, *et al*. Functional and structural interactions between osteoblastic and preosteoclastic cells *in vitro* [J]. Cell Tissue Res, 1995, 281(1): 33-42.

[8] Kieslinger M, Folberth S, Dobreva G, *et al*. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts[J]. Dev Cell, 2005, 9(6): 757-767.

[9] Loomer P M, Ellen R P, Tenenbaum H C. Osteogenic and osteoclastic cell interaction: development of a co-culture system[J]. Cell Tissue Res, 1998, 294(1): 99-108.

[10] Battaglino R, Kim D, Fu J, *et al*. c-myc is required for osteoclast differentiation[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(5): 763-773.

[11] Huber D M, Bendixen A C, Pathrose P, *et al*. Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor[J]. Endocrinology, 2001, 142(9): 3800-3808.

[12] Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423(6937): 337-342.

[13] Kong Y Y, Yoshida H, Sarosi I, *et al*. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis[J]. Nature, 1999, 397(6717): 315-323.

[14] Xu G, Zhang Y, Zhang L, *et al*. C/EBPbeta mediates synergistic up-regulation of gene expression by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2009, 27(4): 942-948.

[15] Cho K A, Ju S Y, Ryu K H, *et al*. Hypoxia affected SDF-1alpha-CXCR4 interaction between bone marrow stem cells and osteoblasts *via* osteoclast modulation[J]. Acta Haematol, 2010, 123(1): 43-47.

[16] Miller R J, Banisadr G, Bhattacharyya B J. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development[J]. J Neuroimmunol, 2008, 198(1/2): 31-38.

(**收稿**:2012-08-15;**修回**:2012-10-08)

(编辑 龙 亮)