局解手术学杂志 2008年第17卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2008, Vol. 17, No. 5

切应力诱导间充质干细胞分化成内皮细胞的研究

李 立,朱楚洪,糜建红,宋 林,应大君 (第三军医大学基础医学部人体解剖学教研室,重庆生物力学实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究绿色荧光蛋白(GFP)小鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)体外分离培养及扩增及其在流体剪切力条件下向内皮细胞(EC)定向分化能力。**方法** 选用GFP小鼠作为研究对象,分离培养骨髓间充质干细胞,并在体外进行细胞的扩增和传代。应用流体剪切力刺激方法对骨髓间充质干细胞进行诱导,并观测其对GFP小鼠骨髓间充质干细胞分化为内皮细胞的积极作用,对其结果进行免疫荧光检测,计算阳性细胞比例,统计分析。**结果** GFP小鼠骨髓间充质干细胞每扩增一代,细胞数量增加5~8倍。检测诱导后MSCs,结果显示在诱导3 d时出现vWF表达阳性细胞。**结论** GFP小鼠MSCs在体外的培养扩增能力强,MSCs在流体剪切应力的作用下可以转化成内皮细胞。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;内皮细胞;流体剪切力;鼠
[中图分类号] R318.11; Q813.11; Q254 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2008)05-0306-03

Differentiation into endothelial cells of mesenchymal stem cells induced by shear stress in vitro

LI Li, ZHU Chu-hong, MI Jian-hong, SONG Lin, YING Da-jun (Department of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the isolation, multiplication and differentiation into endothelial cells induced by shear stress of green fluorescent protein (GFP)-expressing mouse bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. **Methods** GFP mouse bone marrow was aspirate from thighbone by aseptic technique. MSCs were obtained and cultured in DMEM. Then, cells were induced by shear stress to differentiate into endothelial cells, and were detected by immumofluorescence method. **Results** The numbers of MSCs increased five to eight-fold with each multiplication passage. The multiplied cells exhibited typical vWF staining. **Conclusion** MSCs of the GFP mouse bone marrow can multiply vigorously and be induced by shear stress to differentiate into endothelial cells in vitro.

Keywords: mesenchymal stem cells; endothelial cells; shear stress; mouse

内皮细胞(endothelial cell,EC)作为种子细胞在血管组织工程研究中具有重要作用,如何获取足量的内皮细胞是目前有待解决的问题。已有研究表明高表达的内皮细胞生长因子和血流剪切力在骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)向内皮细胞的定向分化中均有明显作用[1-4],这些诱导发挥作用的机制、诱导剂间的相互作用、最佳效量比和序贯应用的方法等问题目前尚无明确答案。为此,本实验以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)转基因小鼠的MSCs为研究对象,探讨MSCs在流体剪切力刺激条件下的转化效率,寻找较为优化的诱导方案。旨在为MSCs将来的应用做基础性的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

绿色荧光蛋白转基因小鼠(C57系,新加坡馈赠,本教研室饲养),DMEM/F12培养基(Hyclone公司),胎牛血清(Hyclone公司),SABC-Cy3免疫组化试剂盒及Ⅷ因子(武汉博士德生物工程公司)。

1.2 方法

选用GFP小鼠作为研究对象,分离培养GFP小鼠的骨髓间充质干细胞,并在体外进行细胞的扩增和传代[4]。诱导方法是将MSCs置于平行板流动腔内,在切应力条件下(8 dyn/cm^2)诱导24 h。之后将各组细胞分别置于培养板培养,免疫荧光检测vWF表达情况,计算表达阳性细胞比例,检测其分化效果。

1.3 统计学处理

实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用1210统计软件进行处理,采用自身配对t检验。

2 结果

2.1 细胞生长及形态观察

GFP小鼠原代MSCs接种6~12 h后,部分细胞开始贴壁,

[基金项目] 国家"863"专题课题资助项目(2006AA03Z438);国家自然科学基金项目(30770575)

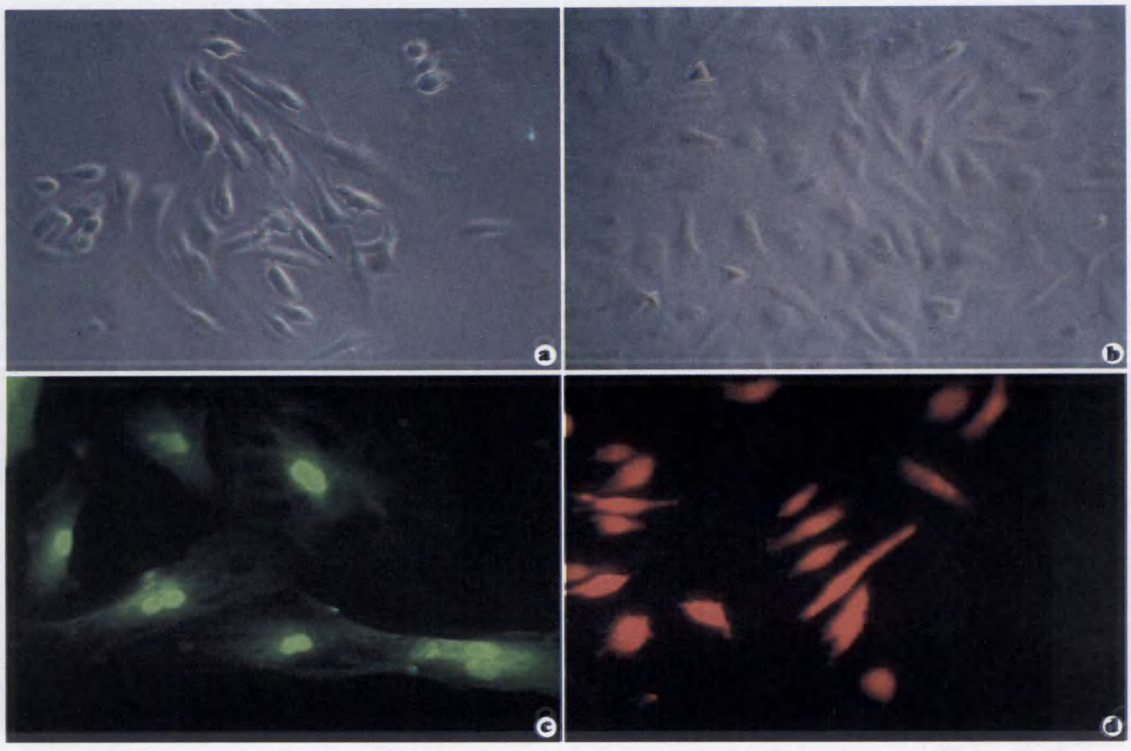
[作者简介] 李 立(1976-),男,福建省莆田市人,助教,硕士,主要从事血管组织工程方面的研究。电话:(023)68752225-108
[通迅作者] 朱楚洪,第三军医大学基础医学部人体解剖学教研室。

[收稿日期] 2008-02-23 [修回日期] 2008-04-10

贴壁后细胞出现形态改变,由圆形逐渐改变为纺锤形,胞体较大。6 d左右成纤维细胞集落间开始成条索状融合,约6~8 d即可接近融合(图1a)。若不传代,可继续增殖,细胞可互相重叠形成复层。传代GFP小鼠MSCs 2~4 h即开始贴壁,细胞突起逐渐伸展,约24 h完成贴壁,约4 d可均匀地长满瓶底。每扩增一代,细胞数量增加4~8倍。镜下观察,传代MSCs形态主要呈纺锤形,有少量的多角形细胞,胞核较大,核仁明显。传至3~4代后贴壁细胞基本纯化(图1b、c)。

2.2 切应力诱导GFP小鼠MSCs向内皮细胞分化

将MSCs移入平行板流动腔,以8 dyn/cm^{2}的流体剪切力诱导24 h,而后继续静止培养。3 d后镜下观察发现,在流体剪切力作用下诱导的细胞,其长轴方向趋向于一致。对细胞进行免疫荧光检测,可见vWF表达阳性细胞(图1d)。表明流体剪切力对骨髓间充质干细胞向内皮细胞转化有明显促进作用。



a:原代培养的MSCs以克隆集落方式生长,倒置显微镜×200;b:MSCs传代培养4 d,贴壁细胞呈纺锤形,倒置显微镜×200;c:MSCs表达GFP,以胞核荧光最强,荧光显微镜×200;d:MSCs在流体剪切力诱导后vWF表达阳性,荧光显微镜×200

图1 MSCs培养及诱导分化

3 讨论

随着组织工程的兴起,干细胞因其具有高度的自我更新能力和多向分化潜能,成为组织工程中首选的种子细胞。骨髓间充质干细胞是存在于骨髓环境中造血干细胞外的一类干细胞,具有分化为骨、软骨、腱、肌肉及内皮等组织的多分化潜能[5-7]。因取材方便、自体移植不存在免疫排斥问题以及分化类型广泛,故目前在血管组织工程及细胞治疗的研究中多以骨髓间充质干细胞作为种子细胞。本实验所用的绿色荧光蛋白转基因小鼠的MSCs每扩增一代,细胞数量增加4~8倍,7.0×10^{3}个原代MSCs体外扩增3代即获得1.4×10^{8}个细胞。在70%~80%融合时呈现"铺路石"样形态[8],说明GFP小鼠MSCs在体外的培养扩增条件适用于组织工程种子细胞方面的研究。

MSCs具有多向分化特征,具体向哪个方向分化是由周围微环境所调控的。虽然MSCs的分化机制和诱导条件目前尚未完全阐明,但是研究发现在培养基中加入一定的诱导剂,可以诱导MSCs向一定方向分化。近年来国内外对诱导剂进行了大量的研究,普遍认为应用SCF、LIF、IGF和bFGF[9]或联合应用VEGF、IGF1、bFGF[10-11]可诱导MSCs向EC分化。然而这些诱导剂发挥作用的机制、诱导剂间的相互作用、最佳效量比和序贯应用的方法等问题目前尚无明确答案。本实验研究结果表明,在流体剪切力的作用下,MSCs可以更为有效地转化为EC。并且可提高内皮细胞的分

化水平和能力,增加内皮细胞移植活性,有利于进一步的在体研究。

流体剪切力对EC的分化具有重要影响。正常EC在体内能抵抗高剪切力作用,与其在体内的高度分化分不开。近年研究发现,EC的多种功能是依赖剪切力。剪切力作为一种复杂的调节因子,调节EC的基因表达。自建立体外培养以来,EC的培养均置于静态培养液中培养,除各种细胞因子的不同外,于体内环境最大的区别在于体外静态培养的EC没有承受脉动血流的剪切力作用,培养EC的分化发生较大改变,离体培养时间越长分化能力越差。因此,去分化表型的EC可能因为多种粘附相关结构未成熟或丧失,使其难以耐受体内复杂的血流动力学环境而发生脱落。流体剪切力能否影响MSCs向EC分化,其对MSCs作用的机制又是如何,至今未见有明确报道。2003年Yamamoto K等[12]研究发现,血管内皮祖细胞在流体剪切力的作用下,可以增加两种血管内皮生长因子受体和血管内皮钙粘蛋白在蛋白和转录水平上的表达,进而促进其向EC的分化。本实验使用8 dny/cm^{2}大小的切应力作为诱导条件,对MSCs诱导24 h,之后再将细胞继续静置培养,并检测其分化效果。结果显示在免疫荧光染色下部分细胞出现vWF阳性表达,说明切应力可有效促进MSCs向EC分化[13]。

通过对绿色荧光蛋白转基因小鼠骨髓细胞在体外环境中的扩增及其向内皮细胞分化能力的研究表明,GFP小鼠MSCs在体外的培养扩增能力强,在流体剪切力作用下可以向EC转化。本实验为在体研究提供了实验基础。

[参考文献]

[1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999,284(5411):143-147.

[2] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. Science, 1997,276(5309):71-74.

[3] 方利君,付小兵,孙同柱,等.骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的实验研究[J].中华烧伤杂志,2003,9(1):22-24.

[4] 曲 哲,孙宏晨,郭 英,等.血管内皮细胞对骨髓间充质干细胞成骨能力影响的体外研究[J].口腔医学研究,2003,19(6):480-482.

[5] 何 旭,刘丹丹,王 阳,等.人骨髓间充质干细胞的分离培养及血管内皮生长因子对其体外诱导分化作用[J].中国免疫学杂志,2004,20(9):596-602.

[6] 陈 波,曾秋棠,郎明健,等.血管内皮生长因子基因转染骨髓间充质干细胞同种异体移植治疗大鼠急性心肌梗死[J].基础医学与临床,2005,25(6):529-533.

[7] 张少衡,葛均波,孙爱军,等.纯化人源骨髓单克隆间充质细胞移植更利于梗死心脏功能恢复[J].中国介入心脏病学杂志,2005,13(3):149-153.

[8] Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro[J]. Development,1992,116(2):435-439.

[9] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. Blood, 2001,98(9):2615-2625.

[10] 张金池,王敬瀚,郭平凡,等.体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化的研究[J].中国中西医结合外科杂志,2006,12(4):401-403.

[11] Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells[J]. Blood, 1998,92(2):362-367.

[12] Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress[J]. J Appl Physiol, 2003,95(5):2081-2088.

[13] 雷永红,付小兵,袁 方,等.骨髓间充质干细胞促进"创面"愈合的实验研究[J].感染、炎症、修复,2008,9(2):72-75.

(编辑:余汇洋)

关于单位符号的使用

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外,均应使用单位符合。单位符号都是正体拉丁和希腊字母,无复数形式,符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位,例如:Pa、Gy、W等和10^6以上的词头,例如:M、G、T等的首字母大写以外均为小写,"升"的符号可用大写(L)也可用小写(l),一般在单位使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如:化学元素符号)之间应留半个阿拉伯数字空隙,词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用,也不能重叠使用(例如:"mμm"应为"nm")。

(本刊编辑部)