

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00460

人循环成纤维细胞的体外培养和初步鉴定

Culture and identification of human circulating fibrocytes

彭欢¹, 胡志前^{1*}, 姚厚山¹, 孙红玉², 项洪刚¹

1. 第二军医大学长征医院普通外科, 上海 200003

2. 第二军医大学基础部组织学与胚胎学教研室, 上海 200433

[关键词] 成纤维细胞; 外周血; 体外培养

[中图分类号] R 331.125

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2009)04-0460-03

自1994年 Bucala 等^[1]首次确认了外周血中循环成纤维细胞这一白细胞亚群的存在后, 其便逐渐成为了创伤及纤维化病变领域的研究热点。循环成纤维细胞以同时表达部分造血来源细胞(CD34、CD45RO、CD11 等)和间质细胞分子(Collagen I、III 等)标记为特征, 可继续分化为肌成纤维细胞。此外, 循环成纤维细胞还能够提呈抗原, 启动炎症反应; 分泌转化生长因子(TGF)- β 等纤维形成因子, 促进定植于组织中的成纤维细胞增殖、转化及迁移^[2-3]; 分泌基质金属蛋白酶(MMPs)和血管内皮生长因子(VEGF)等血管形成因子, 促进内皮细胞增殖、迁移, 加快新生血管的形成^[4]。通过以上多种作用参与创伤修复、脏器纤维化及血栓形成等病理过程。目前国内尚鲜有此方面研究。

本实验从人外周血中分离单个核细胞进行培养, 观察其生长及形态变化。经免疫组化和流式细胞仪分析鉴定, 发现人外周血中可分离培养出循环成纤维细胞, 并可经 IL-1 刺激增殖, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 淋巴细胞分离液(Lympholyte-H)购自加拿大 CEDARLANE 公司; 人纤维连接蛋白购自加拿大 Biowen 公司; 兔抗人 I 型胶原蛋白(COL I)抗体购自武汉博士德公司; 小鼠抗人 CD34 抗体购自北京中杉生物技术有限公司; PE 标记羊抗兔及 FITC 标记羊抗小鼠 IgG 二抗均购自美国 Santa Cruz 公司; FITC 标记小鼠抗人 CD34 购自美国 eBioscience 公司; 人 IL-1 购自美国 Rapidbio 公司; DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 青霉素购自 Sigma 公司。

1.2 人外周血单个核细胞的体外分离和培养 取肝素抗凝健康志愿者外周血 60 ml, PBS 液对倍稀释, 经 Lympholyte-H 密度梯度离心(800 \times g, 20 min), 弃上清后取中间白膜层, PBS 洗涤 2 次(400 \times g, 10 min/次), 细胞悬浮于 DMEM 培养基(含 20% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素), 种植于预先涂布纤维连接蛋白的 6 孔板(每孔 1.2 \times 10⁷ 个细胞)中, 其中 1 孔放入无菌盖玻片, 于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培

养, 5 d 后换液, 除去未贴壁细胞, 继续培养至 10 d。

1.3 形态学观察 相差显微镜下每天观察细胞的生长状态情况并拍照。

1.4 免疫荧光双标法检测循环成纤维细胞 COL I 和 CD34 的表达 培养 10 d 后, 取出盖玻片, 乙醇固定 10 min, PBS 洗涤, 血清封闭 30 min, 加入兔抗人 COL I (抗体浓度 1:50), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加入 PE 结合的羊抗兔 IgG 二抗(抗体浓度 1:100), 4 $^{\circ}$ C 过夜后再加入 FITC 结合的小鼠抗人 CD34(抗体浓度 1:100), 第 2 天于荧光显微镜下观察细胞染色情况。

1.5 流式细胞术分析 培养 10 d 的单个核细胞经 PBS 洗涤后制成细胞悬液, 加入兔抗人 COL I 抗体(抗体浓度 1:50)及小鼠抗人 CD34 抗体(抗体浓度 1:100), 低温孵育 1 h, 再次洗涤后加入 PE 结合的羊抗兔 IgG 二抗及 FITC 结合的羊抗小鼠 IgG 二抗(抗体浓度 1:100), 低温避光孵育 30 min 后上流式细胞仪分析。以分离后未经培养的单个核细胞样本及仅加入二抗的样本作为对照。

1.6 IL-1 刺激 6 孔板中单个核细胞培养 10 d 后, 其中 3 孔加入 IL-1(100 ng/ml), 其余 3 孔加入等量 PBS 作为阴性对照, 24 h 后镜下观察增殖情况, 每孔计数 6 个视野(\times 100)下循环成纤维细胞数。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 循环成纤维细胞体外培养形态及 COL I 和 CD34 表达 初分离的单个核细胞为圆形, 散在悬浮于培养液中。24 h 后, 大量细胞贴壁生长。3~4 d 后, 可见明显纺锤形细胞出现, 但增殖缓慢。经 CD34 及 COL I 标记后, 可见梭形细胞同时显示 CD34 及 COL I 阳性信号, 其中 COL I 阳性信号(红色荧光)主要位于胞质, CD34 阳性信号(绿色荧光)主要分布于胞膜(图 1)。培养 10 d 后的单个核细胞经抗 CD34 (FITC)、抗 COL I (PE) 共同标记, 流式细胞仪分析双标细胞约占单个核细胞总量的 0.2%, 阴性对照组及未经培养的单个核细胞中均未发现共同标记细胞(图 2)。

[收稿日期] 2008-12-28

[接受日期] 2009-03-18

[作者简介] 彭欢, 博士生. E-mail: truemw@yahoo. cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81886999-885592, E-mail: huzq62@163. com

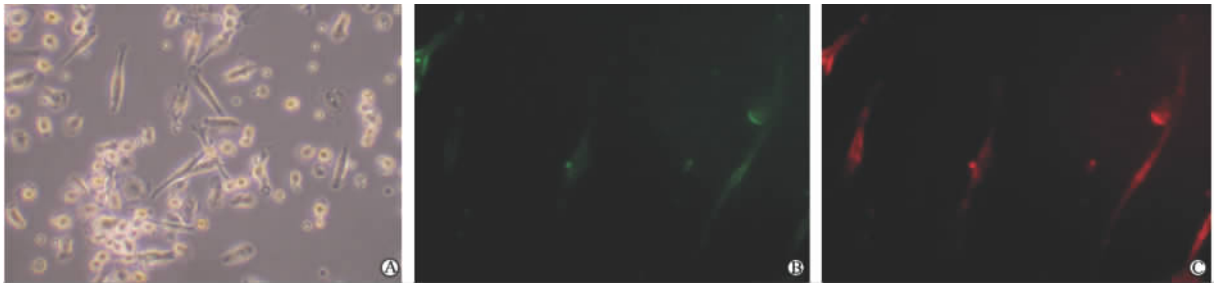


图1 培养 10 d 后的循环成纤维细胞形态及 CD34 和 COL I 表达

A: 可见明显的纺锤形细胞;B:CD34 阳性表达,免疫荧光染色显示为绿色;C:COL I 阳性表达,免疫荧光染色显示为红色. Original magnification: $\times 100$ (A); $\times 200$ (B,C)

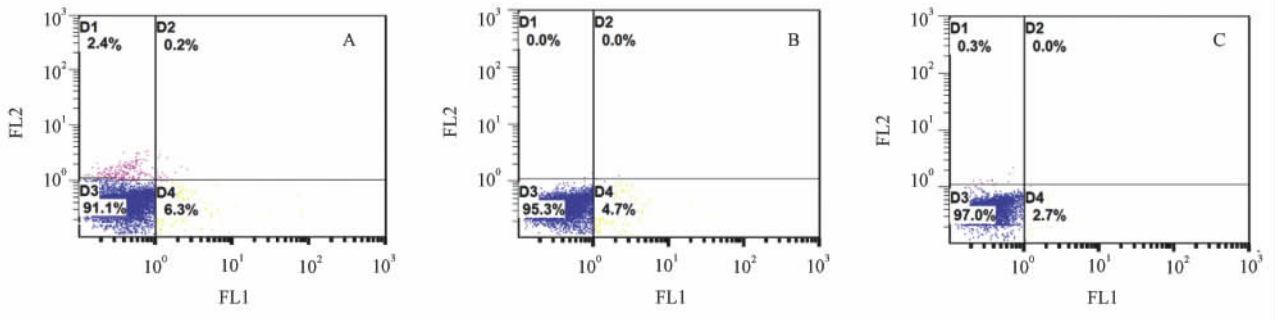


图2 流式细胞术分析培养 10 d 的单个核细胞

CD34(FITC)、COL I (PE)双标细胞约占单个核细胞总量的 0.2% (A);阴性对照组(B)及未经培养的单个核细胞(C)中均未发现双标细胞

2.2 IL-1 刺激循环成纤维细胞增殖 人外周血单个核细胞经培养 10 d 后加入 IL-1(100 ng/ml),刺激 24 h 后镜下观察,梭形细胞数明显较未刺激组增多(图 3)。计数每视野($\times 100$)梭形细胞为 31.2 ± 6.3 ,阴性对照组为 20.2 ± 4.1 ($P < 0.05$)。

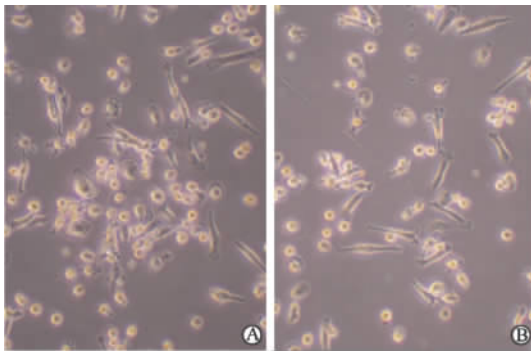


图3 IL-1 刺激循环成纤维细胞增殖

A:IL-1 刺激 24 h 后;B:阴性对照组. Original magnification: $\times 100$

3 讨论

已有研究表明循环成纤维细胞由外周血 CD14 阳性的单个核细胞分化而来,而分化的过程需要 T 细胞的参与^[5],在本实验过程中,经过反复试验,我们发现如果经外周血分离出来的单个核细胞数目过少,或培养过程中过早(< 48 h)过频地更换培养液,则单个核细胞中难以分化出循环成纤维细胞。这一现象说明单个核细胞之间彼此的接触可能是循

环成纤维细胞分化的必要条件,但其具体作用机制目前还缺少研究。

CD34 是一种膜整合糖蛋白(110 000),主要存在于骨髓细胞、淋巴细胞前体、胚胎成纤维细胞、血管内皮细胞和骨髓基质细胞^[6]。而分泌胶原则是成纤维细胞的特点。目前鉴定循环成纤维细胞的标准便是同时表达血源细胞标记和胶原。本实验中培养 10 d 后的梭形细胞 CD34、COL I 荧光染色均呈阳性,流式细胞术也证实出现双标细胞。国外研究还发现在循环成纤维细胞的培养过程中,CD34、CD45、CD14 等造血来源细胞的标记表达逐渐减少,而胶原表达明显增强^[7-8],原本的单个核细胞越来越表现出成纤维细胞的特征。

目前虽然已经明确 TGF- β 经 Smad2/3 和 SAPK/JNK MAPK 信号通路促进循环成纤维细胞表达 α -SMA 向肌成纤维细胞转化,SAP(血清神经肽 P)、多聚 IgG 和 IFN- α 2b 能够抑制外周血 CD14 阳性单个核细胞向循环成纤维细胞转化^[9-10],但对循环成纤维细胞分化、增殖、迁移及功能变化的调控机制仍然知之甚少。本实验中通过镜下观察及细胞计数发现 IL-1 能够刺激循环成纤维细胞增殖,且另外有研究表明 IL-1 还可促进循环成纤维细胞分泌各种致炎因子、血管形成因子及纤维形成因子,促进其迁移^[11]。因此我们推测 IL-1 可能与循环成纤维细胞功能和表型的转换相关,而 IL-1 受体的胞内段与 Toll 样受体的胞内段同源,被称之为 Toll/IL-1R(TIR),是细胞内信号转导的起始部位。那么 Toll 样受体作为沟通天然免疫和获得性免疫的桥梁,是否构

成了循环成纤维细胞胞内信号传递通路,从而参与或是控制了循环成纤维细胞的的的分化、增殖及功能改变,需要进一步研究。这将有助于了解循环成纤维细胞与其他细胞、胞外蛋白相互作用、相互影响的途径,揭示其分化、迁移、增殖、激活及功能转换的机制,进一步完善创伤修复及纤维化过程中复杂的细胞和细胞因子网络,为临床干预提供理论基础及新的方向。

[参考文献]

- [1] Bucala R, Spiegel L A, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair[J]. *Mol Med*, 1994, 1:71-81.
- [2] Hartlapp I, Abe R, Saeed R W, Peng T, Voelter W, Bucala R, et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis *in vivo* [J]. *FASEB J*, 2001, 15:2215-2224.
- [3] Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala A. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells *in situ* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:6307-6312.
- [4] Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses[J]. *Lab Invest*, 2007, 87:858-870.
- [5] Schmidt M, Sun G, Stacey M A, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma[J]. *J Immunol*, 2003, 171:380-389.
- [6] Abe R, Donnelly S C, Peng T, Bucala R, Metz C N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites[J]. *J Immunol*, 2001, 166:7556-7562.
- [7] Mori L, Bellini A, Stacey M A, Schmidt M, Scabrina M. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 304: 81-90.
- [8] Strieter R M, Gomperts B N, Keane M P. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117:549-556.
- [9] Hong K M, Belperi J A, Keane M P, Burdick M D, Strieter R M. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor- β and peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 22910-22920.
- [10] Pilling D, Buckley C D, Salmon M, Gomer R H. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P[J]. *J Immunol*, 2003, 171:5537-5546.
- [11] Chesney J, Metz C, Stavitsky A B, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes [J]. *J Immunol*, 1998, 160:419-425.

[本文编辑] 孙岩