

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01225

冻存骨髓来源单个核细胞分化成内皮祖细胞的功能特性

吴建国¹, 罗天航¹, 周虹², 薛绪潮¹, 毕建威¹, 方国恩^{1*}

1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院血液科实验中心, 上海 200433

[摘要] **目的:**对新鲜和超低温保存的骨髓来源单个核细胞(MNC)体外扩增的内皮祖细胞(EPC)进行功能比较。**方法:**从猪髂骨抽取骨髓,对分离后的MNC进行培养或-80℃冻存3个月后再培养;冻存后培养的P1代细胞利用免疫组化及流式细胞技术进行EPC表面标志抗原鉴定。同时分别对新鲜和冻存培养的EPC获得率、细胞迁徙、黏附和增殖功能进行比较。**结果:**冻存组细胞免疫组化鉴定:CD133(+),CD34(+),CD31(++),KDR(++),流式细胞技术鉴定:CD133的阳性率(17.24±3.12)%,CD34的阳性率(37.21±10.85)%,CD31的阳性率(72.07±13.34)%,KDR的阳性率(89.09±16.40)%。新鲜和冻存的MNC经诱导培养后EPC获得率分别为(1.1±0.078)%、(1.03±0.061)%, $P=0.054$;细胞迁徙率分别为(15±0.71)%、(14.2±0.63)%, $P=0.17$;贴壁率分别为(42.7±2.1)%、(39.5±1.7)%, $P=0.11$;增殖功能分别为(25.06±2.82)×10⁴、(21.64±2.34)×10⁴, $P=0.089$ 。**结论:**超低温保存骨髓来源的MNC经诱导培养得到的EPC其数量和功能均无明显影响,该方法可在短时间得到大量的同质EPC,为EPC移植提供了来源保障。

[关键词] 内皮祖细胞;冻存;单个核细胞;细胞分化

[中图分类号] R 329.29

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2009)11-1225-05

Differentiation of cryopreserved bone marrow-derived mononuclear cells into endothelial progenitor cells

WU Jian-guo¹, LUO Tian-hang¹, ZHOU Hong², XUE Xu-chao¹, BI Jian-wei¹, FANG Guo-en^{1*}

1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Experimental Center of Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To compare the functions of endothelial progenitor cells (EPCs) differentiated from cryopreserved and fresh bone marrow-derived mononuclear cells (MNCs). **Methods:** The bone marrow samples were taken from swine iliac bones. The isolated MNCs were cultured or cryopreserved at -80℃ for 3 months and then cultured again. The P1-EPCs were identified by Dil-ac-LDL and FITC-UEA-1 double staining, immunohistochemistry and flow cytometry. The EPC pick-up rate, migration, adhesion, and proliferation abilities were compared between the cryopreserved group and the fresh group. **Results:** Immunohistochemistry showed that the P1-EPCs of the cryopreserved group were positive for CD133 (+), CD34 (+), CD31 (++) and KDR (++); flow cytometry also showed they were positive for CD133 ([17.24±3.12]%), CD34 ([37.21±10.85]%), CD31 ([72.07±13.34]%) and KDR ([89.09±16.40]%). There were no significant differences in the pick-up rates ([1.1±0.078]% vs [1.03±0.061]%, $P=0.054$), migration rates ([15±0.71]% vs [14.2±0.63]%, $P=0.17$), adherence rates ([42.7±2.1]% vs [39.5±1.7]%, $P=0.11$), and proliferation abilities ([25.06±2.82]×10⁴ vs [21.64±2.34]×10⁴, $P=0.089$) between EPCs of the fresh and cryopreserved groups. **Conclusion:** Cryopreservation has no measurable influence on the numbers and functions of EPCs differentiated from bone marrow-derived MNCs, so cryopreservation can be used to obtain sufficient homogeneous EPCs in a short period for therapy using EPCs transplantation.

[KEY WORDS] endothelial progenitor cells; cryopreservation; mononuclear cells; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(11):1225-1229]

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是血管内皮细胞的前体细胞,1997年,Asahara等^[1]

首次证明循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞,并将其命名为血管内皮祖细胞。它参

[收稿日期] 2009-04-06

[接受日期] 2009-07-19

[基金项目] 国家自然科学基金(30672170)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30672170)。

[作者简介] 吴建国, 博士生。E-mail: wujianguo1030@126.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-81873339, E-mail: fanguoen@gmail.com

与出生后的血管生成(angiogenesis, AG),同时在生理或病理因素刺激下,可从骨髓动员到外周血,参与机体、器官损伤后的血管再生与修复。近年来的研究显示^[2],EPC在心脑血管疾病、肿瘤血管形成及创伤愈合等方面也发挥重要作用,具有广阔的应用前景。但是从骨髓、脐血、胚胎肝和外周血中分离培养出的EPC数量都非常有限,不能满足实验研究及临床应用的需要,成为限制EPC广泛应用的一个主要原因。本研究利用超低温保存的单个核细胞(mononuclear cell, MNC)体外扩增获得EPC,并对新鲜和超低温保存的体外扩增所得的EPC进行功能比较,发现两组无统计学差异,为大量扩增EPC,回输治疗创伤性或缺血性疾病奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 健康实验用猪(第二军医大学实验动物中心提供),体质量22~30(25.22±3.17) kg,共7头,实验前动物适应实验环境12~14 h,室温保持在20~25℃,术前常规禁食。肝素钠、2%多聚甲醛购于上海第二化学试剂厂,淋巴细胞分离液(Ficoll 1.077 g/ml)购于美国Sigma公司,胰酶原液购于德国Berlin公司, M199、10% FBS均购于美国Gibco BRL公司, VEGF、bFGF、IGF、EGF均购于英国Peprotech公司,改良的Boyden小室、冻存小管和冻存盒购于江苏海门麒麟医用仪器厂, Giemsa染色液购于美国Sigma公司,冻存原液(二甲基亚砜, dimethylsulphoxide, DMSO)购于美国Sigma公司, PBS自配。

1.2 MNC的分离、冻存 无菌条件下在健康猪髂后上棘取骨髓,肝素钠1 ml抗凝处理,通过密度梯度离心法获得MNC,将分离得到的MNC计数后按 1.0×10^7 /ml密度加入培养液0.5 ml。然后按培养液:胎牛血清:冻存液=5:3:2,按比例加入胎牛血清0.3 ml后混匀,再加入0.2 ml冻存液-10% DMSO(此步一定要慢,每加一滴都要充分混匀),然后将配好的液体放入消毒好的冻存小管(1 ml/管),最后将冻存小管装入冻存盒放入-80℃冰箱冻存3个月。

1.3 EPC培养 取出冻存的MNC用PBS洗3遍后离心,将得到的细胞用0.4%锥虫蓝进行活细胞数计数(双目光学显微镜)测定细胞活力;以 1×10^6 /cm²接种入普通培养皿,将新分离的MNC按同等条件接种,均加入培养液5 ml(M199+10% FBS+10 ng/ml VEGF+50 ng/ml bFGF+50 ng/ml IGF+20 ng/ml EGF)。

1.4 免疫组化鉴定 P1代细胞铺满玻璃切片后,取出玻璃切片;用PBS洗涤3 min×3次;用10%中性甲醛固定10 min,再用PBS洗涤3 min×3次;

在盖玻片表面滴加Tryting-100各100 μl,避光保存30 min,将玻片去酯化;再用PBS洗涤3 min×3次;滴加CD133、CD34、CD31、KDR的一抗各50 μl,避光保存30 min;再用PBS洗涤3 min×3次;滴加相应的二抗,避光保存30 min;再用PBS洗涤3 min×3次;经梯度乙醇脱水干燥,用中性树脂胶封片。

1.5 流式细胞技术鉴定 将P1代细胞悬液以 1×10^5 个细胞/管;预先设定空白对照管、CD133、CD34、CD31、KDR各1管;用PBS洗涤后离心(4℃, 300×g, 6 min)2次,完全去血清;再次离心后去上清液,每管加入300 μl的PBS,并加入相应1 μl的CD133、CD34、CD31、KDR一抗,混匀;避光保存30 min;再加入1 ml的PBS行离心去上清液后,每管加入300 μl的PBS,加入相应的二抗,混匀,避光保存30 min;每管加入1 ml的PBS,混匀,离心去上清液后,每管加入150 μl的PBS,混匀,行细胞计数。

1.6 迁徙功能检测 将25 μl M19-9培养液和VEGF 50 ng加入改良的Boyden Chamber小室的下室,盖上滤膜(滤膜光泽面朝下),再盖上趋化小室的上室,将 1×10^5 EPC加入100 μl培养液制成细胞悬液注入上室,在37℃、5% CO₂培养箱孵育24 h,将穿过滤膜迁移到Boyden Chamber下层的细胞(刮去滤膜上面的未移动细胞)用甲醇固定后Giemsa染色,随机选择3个显微镜视野(×200)行细胞计数。

1.7 黏附功能检测 按照 1×10^5 个EPC/孔接种于24孔培养皿,种3孔,每孔加入1 ml的培养液,放入常规细胞培养箱。培养过夜后(超过12 h),弃上清液并用PBS轻柔洗2次,随机选择3个显微镜视野(×400)计数贴壁的细胞,计算3孔的均值,得出EPC黏附能力。

1.8 增殖功能检测 将两组培养至P1的细胞按 1×10^4 /孔的密度接种于标准24孔培养皿(1 ml培养液/孔)内进行培养。接种后的第1~8天每天取3孔细胞消化,进行细胞计数后取平均值,绘制生长曲线。

1.9 统计学处理 所有指标的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 10.0统计软件行t检验,两组均数比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPC的分离、培养 抽取无菌骨髓(20±1.1) ml,经密度梯度离心法获得单个核细胞(8.29±0.57)×10⁷;3个月冻存后复苏,经活细胞计数为(7.4±0.31)×10⁷,活细胞数量稍有下降($P=0.047$)。培养2 d后,细胞开始贴壁(图1A);5 d后,细胞贴壁明显增多,可见有集落形成(图1B);7 d后梭形细胞继续增多,放射状生长

呈特异性索条状结构; 9 d 左右细胞基本铺满皿底即可消化。新鲜和冻存 MNC 分别可获得 P1 代 EPC $[(1.1 \pm 0.078) \times 10^4 / \text{ml}, (1.03 \pm 0.061) \times 10^4 / \text{ml}]$; EPC 获得率为 $(1.1 \pm 0.078)\%$ 、 $(1.03 \pm 0.061)\%$, $P = 0.054$, 两组间无统计学差异。

2.2 免疫组化鉴定 胞质棕褐色, 内有大量的颗粒状阳性表达, 细胞核呈蓝色。免疫组化结果显示 CD133(+), CD34(+), CD31(+), KDR(+), 见图 2。

2.3 流式细胞仪技术鉴定 冻存组细胞流式细胞术结果显示: CD133 的阳性率 $(17.24 \pm 3.12)\%$, CD34 的阳性率 $(37.21 \pm 10.85)\%$, CD31 的阳性率 $(72.07 \pm 13.34)\%$, KDR 的阳性率 $(89.09 \pm 16.40)\%$, 见图 3。

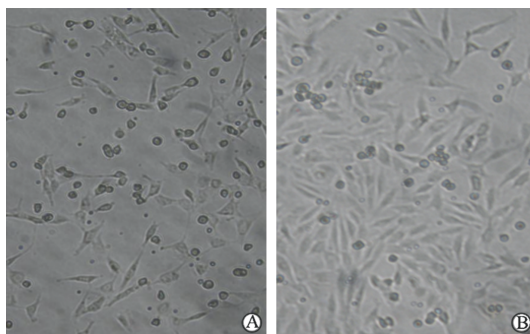


图 1 培养 2 d 后出现少量贴壁细胞和
培养 5 d 后细胞集落形成

Fig 1 Attached cells appeared 2 days after culture (A) and colonies were formed 5 days after culture (B)
Original magnification: $\times 100$

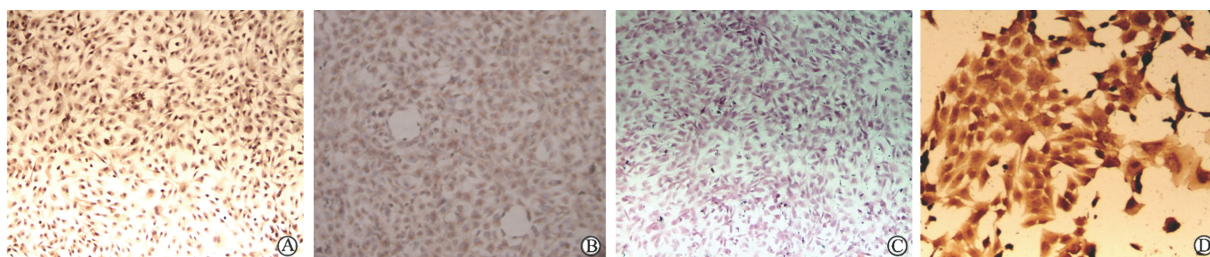


图 2 冻存后 P1 代 EPC 的 CD133、CD34、CD31、KDR 的免疫组化表达
Fig 2 Immunohistochemistry examination of CD133 (A), CD34 (B), CD31 (C), and KDR (D)-positive P1-EPCs of cryopreservation group

Original magnification: $\times 100$

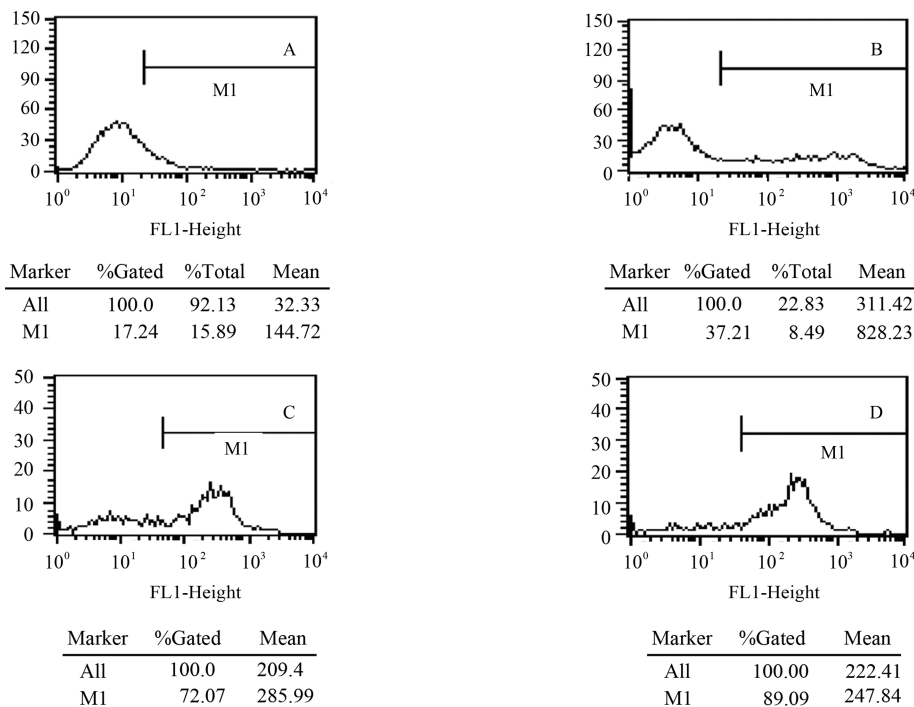


图 3 冻存后 P1 代 EPC 的 CD133 (A)、CD34 (B)、CD31 (C)、KDR (D) 的流式细胞术结果

Fig 3 Flow cytometry results of CD133 (A), CD34 (B), CD31 (C) and KDR (D)-positive P1-EPCs of cryopreservation group

2.4 迁徙功能 将新鲜和冻存的细胞培养至 P1 代,将 P1 代细胞培养 24 h 后,穿过滤膜迁移到 Boyden Chamber 下层细胞计数得 $(1.50 \pm 0.071) \times 10^4$ 、 $(1.42 \pm 0.063) \times 10^4$;迁徙率为 $(15 \pm 0.71)\%$ 、 $(14.2 \pm 0.63)\%$, $P=0.17$,两组间差异无统计学意义。

2.5 黏附功能 将新鲜和冻存的细胞培养至 P1 代,将 P1 代细胞培养 12 h 后分别对贴壁细胞进行计数为 $(4.27 \pm 0.21) \times 10^4$ 、 $(3.95 \pm 0.17) \times 10^4$;贴壁率为 $(42.7 \pm 2.1)\%$ 、 $(39.5 \pm 1.7)\%$, $P=0.11$,组间差异无统计学意义。

2.6 增殖功能 通过对新鲜和冻存的两组 P1 代 EPC 第 1 天至第 8 天细胞增殖情况比较,从图 4 中可见,2 组细胞增殖情况均良好,成逐步上升趋势,在第 4 天达增殖高峰后又逐渐下降。但比较发现冻存组细胞增殖高峰基本一致,除第 2、3 天冻存组细胞增殖数低于新鲜组($P < 0.05$),余 2 组增殖功能无变化($P > 0.05$)。细胞 8 d 的增殖总数 $(25.06 \pm 2.82) \times 10^4$ 、 $(21.64 \pm 2.34) \times 10^4$, $P=0.089$,组间差异无统计学意义。

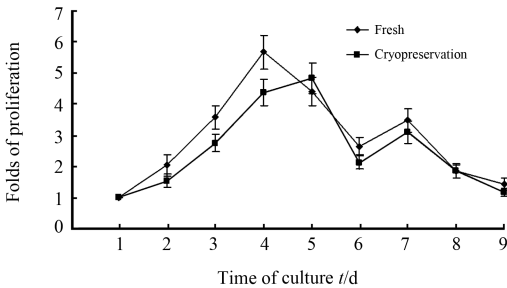


图 4 新鲜和冻存细胞增殖功能的比较

Fig 4 Comparison of EPC proliferation ability between cryopreservation and fresh groups
 $n=18, \bar{x} \pm s$

3 讨论

在正常情况下,自身循环系统中 EPC 大约仅占全部外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的 0.03%~0.06%,数量极少。大量的研究证实,回输 EPC 可达到生成血管及修复损伤的作用,但起到治疗作用所需的回输量较大。虽然成功从(人、猪、鼠、兔等)骨髓、脐血、胚胎肝和外周血中分离培养出 EPC,其中骨髓中所占比例最大(四者比例 15:10:2:1)^[3];但是无论何种来源其数量均十分有限。另外,在糖尿病、高胆固醇血症、吸烟等情况下血液循环中 EPC 的数量和功能会相应减少,这些患者回输 EPC 产生治疗作用可能需要的数量更多^[4]。这使冻存 MNC 后体外扩增获取大量 EPC 的方法有重要的临床应用价值。国内外报道均显示,通过回输 EPC 可以明显提高肝脏功能受损

鼠的存活率,对缺血性及心血管疾病有明显的治疗作用^[5]。本研究证明,超低温保存对 MNC 培养得到的 EPC 其黏附和迁徙功能无明显影响。因此,可以乐观预测回输超低温保存后 MNC 体外扩增得到的 EPC 同样能对损伤血管内皮的重建和缺血组织的血管新生起重要作用。

对单个核细胞冷冻保存的研究已有不少,但基本都局限于短时间的快速冷冻保存。最近的一项研究表明^[6],对人脐血分离得到 MNC 进行快速冻存,调节其冷冻的时间可明显提高细胞的复苏效率;研究显示:MNC 冷冻速度控制在 1℃/min、5℃/min 和 10℃/min,其解冻后的复苏效率为 45%、73% 及 92%。最新研究显示^[7],通过对人脐血来源的 MNC 冻存温度控制在 -196℃,解冻后可将细胞的复苏效率提高到 90% 以上。但关于猪骨髓来源的 MNC 冻存的报道较少,在本实验中没有对冷冻的速度进行控制,将其冻存至 -80℃,其细胞复苏率只有 71%。这表明控制冷冻速度和最终的冻存温度对 MNC 的复苏率影响很大。但是本研究的冻存方法对 P1 代 EPC 获得率及其功能特征基本无影响。这可能是由于对冷冻速度和最终的冻存温度要求太高,会导致 EPC、淋巴细胞、单个核细胞等损伤,一定程度改变其功能特征。虽然通过超低温保存 MNC 培养得到 EPC 有效率有待提高,但事实证明完全可以对冻存的 MNC 体外扩增得到大量的 EPC。

目前冻存细胞一般使用添加剂和冻存保护剂来增加超低温保存复苏后细胞的活力^[8]。此外,还有用生物抗氧化剂过氧化氢酶和膜稳定剂(海藻泥),除了传统的能改善复苏细胞的功能外,还可以增加细胞的活力^[9]。此外,研究显示,用 10% 的二甲基亚砜可使人脐血细胞来源的 MNC 解冻后复苏率达 90% 以上^[7];但二甲基亚砜等添加剂可损害部分细胞功能。在本研究中,用 10% 的二甲基亚砜使冻存后的 MNC 活性有所下降,但经复苏、分化培养后得到的 EPC 数量和功能特征无明显变化,这种方法可能更适用于获取大量功能稳定的 EPC。但是,超低温保存的很多因素有待进一步的研究,例如冻结的速度和其他添加剂应用等。

本研究对新鲜和超低温保存骨髓来源的单个核细胞体外扩增所得内皮祖细胞的功能进行比较,其功能特征基本无变化。完全可以通过冻存 MNC 体外扩增的 EPC 来获取发挥治疗作用所需要的相当数量的 EPC,使其程序和步骤简化,还可以节约成本。虽然目前还没有报道对回输冻存后体外扩增获取 EPC 的治疗效果进行评估的研究,这可能是未来

的研究的一个方向。然而, 目前的结果支持, 超低温保存的 MNC 获取的内皮祖细胞并没有改变其功能特征, 为大量 EPC 回输治疗缺血性疾病奠定基础。

总之, 我们证实超低温保存骨髓来源的 MNC 体外扩增所得内皮祖细胞在功能上无变化, 保持增殖、黏附和迁移的能力。这些结果均表明, 从骨髓分离得到的 MNC 冷冻保存后体外扩增又为获取大量 EPC 提供了一种有效的方法。克服了体内 EPC 数量有限的局限性, 为 EPC 进一步实验研究及临床应用提供保障。为自体回输治疗创伤性或缺血性疾病提供合理的技术平台。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275:964-967.
- [2] He T, Smith L A, Harrington S, Nath K A, Caplice N M, Katusic Z S. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries [J]. *Stroke*, 2004, 35:2378-2384.
- [3] Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review[J]. *Leuk Res*, 2007, 31:439-444.
- [4] Wu Y, Zhang J, Gu Y, Li J, Chen B, Guo L, et al. Expansion of canine bone marrow-derived endothelial progenitor cells and dynamic observation[J]. *Ann Vasc Surg*, 2006, 20:387-394.
- [5] Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura H, Hanada S, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130:521-531.
- [6] Ketheesan N, Whiteman C, Malczewski A B, Hirst R G, La Brooy J T. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells[J]. *Transfus Apher Sci*, 2004, 30:47-54.
- [7] Jang J H, Kim S K, Choi J E, Kim Y J, Lee H W, Kang S Y, et al. Endothelial progenitor cell differentiation using cryopreserved, umbilical cord blood-derived mononuclear cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28:367-374.
- [8] Hunt C J, Armitage S E, Pegg D E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34⁺ cells to dimethyl sulphoxide[J]. *Cryobiology*, 2003, 46:61-75.
- [9] Sasnoor L M, Kale V P, Limaye L S. A combination of catalase and trehalose as additives to conventional freezing medium results in improved cryoprotection of human hematopoietic cells with reference to *in vitro* migration and adhesion properties [J]. *Transfusion*, 2005, 45:622-633.

[本文编辑] 陈波

· 消 息 ·

“中国热带病药物与诊断创新网络”在上海成立

2009年10月24~25日,“中国热带病药物与诊断创新网络”(以下简称为“创新网络”,<http://www.asiandi.org>)第一次会议在上海举行。

“创新网络”是由联合国儿童基金会、联合国计划开发署、世界银行、世界卫生组织热带病研究与培训特别规划署资助建立的一个全球“合作平台”,由我校与中国疾控中心寄生虫病所和国家新药筛选中心共同发起成立,是全球第二个热带病药物与诊断创新网络,未来将进一步发展成为“亚洲热带病药物与诊断创新网络”。

世界卫生组织热带病研究和培训特别规划处主任 Robert Ridley 博士、卫生部疾病控制局郝阳副局长、中国疾病预防控制中心杨维中副主任、国家科技部国际合作司和上海市卫生局领导等出席本次会议。国内有 20 多个省、市、自治区的研究所、高校、疾控机构和相关企业的代表及从事热带病研究的专家参加了此次会议。

会议除进行学术交流外,还制定了“创新网络”的发展规划,明确了“创新网络”涵盖的目标热带病(13种),并向我国从事热带病研究和防治科技工作者发出了倡议书。我校基础部病原生物教研室参与此次会议的承办,潘卫庆教授与有关专家共同主持了会议。