

骨髓间充质干细胞的分离鉴定及向血管内皮细胞诱导分化过程中 microRNA126 的表达

吴 弘^{1△*}, 徐晓晶^{2,3△}, 吴 峰¹, 储国俊¹, 赵仙先¹, 秦永文¹

1. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433
2. 生物芯片上海国家工程研究中心, 上海 201203
3. 上海伯豪生物技术有限公司, 上海 201203

[摘要] **目的** 建立分离大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)及其定向诱导分化为血管内皮细胞(endothelial cells, EDCs)的方法,并通过观察 microRNA126 的表达规律初步探索其在定向分化中的调控作用。**方法** 通过反复贴壁及人工分选方法进行大鼠骨髓 MSCs 的体外分离纯化及扩增,运用免疫荧光法检测 MSCs 中 CD34、CD105 和 CD73 的表达。应用 MEF 诱导分化培养液将 MSCs 定向诱导分化为 EDCs,采用 qRT-PCR 法检测细胞诱导分化过程不同时间点 EDCs 特征基因 CD34、血管内皮钙黏蛋白(*VE-cadherin*)及调控小 RNA 分子 microRNA126 的表达。**结果** 经分离纯化的骨髓 MSCs CD34 呈阴性表达,CD105 呈强阳性表达,CD73 呈阳性表达,证实骨髓 MSCs 分离成功,且细胞均一性较好,占细胞总数的 90%以上。MSCs 定向诱导为 EDCs 早期分化过程中,在诱导前期第 1~4 天,*VE-cadherin* 和 CD34 基因呈阴性表达;第 5~6 天 *VE-cadherin* 和 CD34 表达显著;第 7~9 天,*VE-cadherin* 呈持续阳性表达,而 CD34 于第 7 天下降,第 8~9 天又呈阳性表达。microRNA126 在分化过程中的表达趋势与 CD34 一致。**结论** 成功建立了骨髓 MSCs 的分离方法及定向诱导分化为 EDCs 的方法;microRNA126 在 MSCs 向 EDCs 的定向分化过程中可能起一定的调控作用。

[关键词] 骨髓;间充质干细胞;内皮细胞;细胞分化;microRNA126

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1350-05

Purification and identification of bone marrow mesenchymal stem cells and microRNA126 expression during their differentiation into vascular endothelial cells

WU Hong^{1△*}, XU Xiao-jing^{2,3△}, WU Feng¹, CHU Guo-jun¹, ZHAO Xian-xian¹, QIN Yong-wen¹

1. Department of Cardiovasology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. National Engineering Center for Biochip at Shanghai, Shanghai 201203, China
3. Shanghai Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 201203, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for isolation, purification of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) and for their differentiation into vascular endothelial cells, and to observe the regulatory role of microRNA126 expression during the differentiation. **Methods** MSCs were isolated from normal rat bone marrow using gradient density centrifugation and repeated attachment method. CD34, CD105 and CD73 expressions in MSCs were detected with immunofluorescent staining. MSCs were cultured with MEF medium for differentiating into endothelial cells; CD34, *VE-cadherin* and microRNA126 expressions were examined by qRT-PCR at different time points. **Results** Immunofluorescent detection demonstrated that MSCs have been isolated and purified successfully, with MSCs negative for CD34, strongly positive for CD105 and positive for CD73. The purified MSCs had a good uniformity and a purity above 90%. qRT-PCR examination revealed that CD34 and *VE-cadherin* expressions were not detected on day 1-4 of induction, strongly positive on day 5-6, and on day 7-9, *VE-cadherin* was still positive, CD34 decreased on day 7, and increased again on day 8-9. Interestingly, the expression of CD34 and microRNA126 mRNA was consistent during the differentiation. **Conclusion** We have successfully established a method for MSCs isolation and differentiation into endothelial cells; microRNA126 may play a regulatory role in MSCs differentiation into endothelial cells.

[收稿日期] 2013-07-28 **[接受日期]** 2013-09-23

[作者简介] 吴 弘, 博士, 副教授、副主任医师; 徐晓晶, 博士, 副研究员. E-mail: xiaojing_xu@shbiochip.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161248, E-mail: doctorwh666@126.com

[Key words] bone marrow; mesenchymal stem cells; endothelial cells; cell differentiation; microRNA126

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12): 1350-1354]

间充质干细胞是来源于早期中胚层的一类多能干细胞,理论上可分化为所有中胚层来源的细胞。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)不仅可分泌多种促进血管生长因子,且由于内皮细胞(endothelial cells, EDCs)属于中胚层,是胚胎发育过程中第 1 个分化的组织,因此具有分化为 EDCs 的可能性。利用干细胞具有自我更新和多向分化潜能特性,在体外定向诱导分化成血管内皮(前体)细胞、心肌细胞,是临床细胞移植治疗和修复损伤血管内膜、促使缺血损伤器官血管再生或构建组织工程血管及复杂脏器组织工程血管化的关键环节^[1]。在 MSCs 诱导分化过程中,涉及多种因子协调有序、相互作用的复杂过程,其中 microRNA126 为血管内皮细胞特异性表达的调控型小 RNA 分子,研究显示 microRNA126 在 MSCs 诱导分化过程中可能具有重要的调控作用^[2-4]。本研究采用梯度密度离心和反复贴壁筛选相结合的方法,获得细胞形态均一、增殖速度快、生长性状稳定的骨髓 MSCs,将其定向诱导分化为 EDCs,并观察 microRNA126 在分化过程中的表达变化,对 microRNA126 在定向诱导分化过程中的调控作用进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂及仪器 SD 大鼠,5~6 周龄,体重 80~100 g,雌雄不限,由上海斯莱克实验动物有限公司提供[许可证号:SCXK(沪)2012-0002]。牛胰蛋白酶、DMEM-LG 培养基、10% 胎牛血清(FBS)、上皮生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子(Long-R3-IGF)、氢化可的松、抗坏血酸、2% FBS、L-谷氨酸(2 mmol/L)均购自 Invitrogen 公司;兔抗大鼠 CD34、CD105、CD73 多克隆抗体,荧光二抗、DAPI 购自 Sigma 公司;反转录酶及 SYB Green 荧光定量试剂盒购自 Qiagen 公司。CO₂ 恒温培养箱购自 Thermo Fisher Scientific 公司,倒置相差显微镜购自 Olympus 公司。

1.2 骨髓 MSCs 的分离及纯化培养 将 SD 大鼠脱颈椎处死后于 75% 乙醇中浸泡 5 min。无菌条件下分离四肢股骨和胫骨,用 PBS 清洗干净。打开骨髓

腔,用 DMEM-LG 培养液将骨髓冲出,反复抽吸吹成细胞悬液。300×g 离心 5 min,弃上清,用适量 DMEM-LG 培养液重悬后,300×g 离心 30 min,收集中间层细胞,PBS 洗涤 2 次,加 DMEM-LG 完全培养液培养。待原代培养细胞增殖近满培养皿,非酶细胞裂解液共孵育 5 min。当细胞开始从皿壁游离时,选取较纯的 MSCs 细胞簇,用微量吸管轻轻吸取,转移至 35 mm 培养皿中,培养 7~10 d,一旦细胞呈克隆性生长(可见 50~100 个 MSCs 呈漩涡状聚集),即可再吸取并传代,按 1:3 进行传代培养,以后每天观察细胞的生长情况,直至贴壁细胞彼此融合铺满瓶底时,重复上述操作。

1.3 骨髓 MSCs 的鉴定 将细胞以 3×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔板(内置经多聚赖氨酸包被的盖玻片),培养至细胞接近融合时,取出爬片。用多聚甲醛固定,Triton X-100 处理 3~5 min,BSA 封闭 30 min。加入一抗(抗 CD34、CD105、CD73 的抗体),4℃ 放置过夜后,加入荧光二抗,室温避光放置 2 h。加入 DAPI 染核,封片后荧光显微镜下观察拍照。每孔随机选 4 个视野,统计细胞核数目及表面抗原阳性细胞数,以表面抗原与细胞核两种荧光染色数目的比值计算 MSCs 的纯度。

1.4 骨髓 MSCs 定向诱导生成 EDCs MSCs 复苏后,在 MEF 培养液(DMEM-LG 培养液,10% FBS)中正常培养 1 周左右,胰酶消化收集细胞。取 1 只 15 mL 离心管,向 MEF 培养液中加入 MSCs 分化培养成分至终浓度分别为:EGF 5 ng/mL、VEGF 0.5 ng/mL、bFGF 10 ng/mL、Long-R3-IGF 20 ng/mL、氢化可的松 0.2 μg/mL、抗坏血酸 1 μg/mL、2% FBS,制成定向诱导分化培养液。加入 3 mL 分化培养液和细胞悬液,培养 9 d。继续在铺有纤连蛋白的培养皿上传代,每隔 3~4 d 换培养液。

1.5 qRT-PCR 检测定向分化的细胞标记基因 分别收集未诱导细胞(对照)及诱导分化过程中不同时间点(第 1、2、3、4、5、6、7、8、9 天)的细胞,离心沉淀细胞后,弃上清,以 4℃ PBS 漂洗 2 次。用移液管加 TRIzol 试剂(每 5×10^6 个细胞加入 1 mL TRIzol)反复吹打破碎细胞,至细胞裂解液均一透亮后,室温静置 5 min,使核蛋白体完全分解,提取细胞总 RNA。

在 0.5 mL 微量离心管中加入总RNA 1~5 μg , 补充适量的 DEPC 水使总体积达 11 μL , 然后加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Oligo(dT) 12~18 μL , 轻轻混匀、离心。然后加入反转录试剂混合物进行反转录。*CD34* 引物序列: Fw-5'-TCC CGA AAG ACT CTG ATT GC-3', Rev-5'-CCC TGG CCT CCA CCA TT-3'; 血管内皮钙黏蛋白(*VE-cadherin*)引物序列: Fw-5'-TCC AGC GAC GCT TCT ACC-3', Rev-5'-CCA CCA CAG TGC CAA TCA GT-3'。按照试剂说明书配制反应体系, 上机进行 qRT-PCR 扩增和检测, 采用 *GAPDH* 基因作为内参照。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 扩增反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 循环 40 次, 收集荧光信号; 扩增反应结束后, 按 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 反应 1 次, 60 $^{\circ}\text{C}$ 至 95 $^{\circ}\text{C}$ 升温, 全程收集荧光信号。结果以各基因对内参基因 *GAPDH* 循环数差值的 ΔCt 值表示。

1.6 qRT-PCR 检测 microRNA126 表达 在 MSCs 定向诱导分化为 EDCs 过程中对 microRNA126 表达进行 qRT-PCR 检测。设计 microRNA126 引物: 5'-GTC GTA TCC AGT GCG TGT

CGT GGA GTC GGC AAT TGC ACT GGA TAC GAC CGC GTA-3'。采用 *U6snRNA* 作为内参照, 通过 ABI 7900 型高通量实时定量 PCR 系统(ABI 公司)进行反应, 反应体系 25 μL , 扩增反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 循环 40 次, 收集荧光; 扩增反应结束后, 按 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 反应 1 次; 从 60 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢加热至 99 $^{\circ}\text{C}$, 全程收集荧光信号。结果采用 ΔCt ($\text{Ct}_{\text{microRNA126}} - \text{Ct}_{\text{U6snRNA}}$) 表示。

2 结果

2.1 骨髓 MSCs 分离鉴定结果 应用免疫荧光方法检测 MSCs 细胞表面抗原 *CD34*、*CD105* 和 *CD73* 的表达, 结果(图 1)显示: *CD34* 在 MSCs 中表达为阴性, *CD105* 表达为强阳性, *CD73* 表达为阳性; 说明骨髓 MSCs 分离成功。 *CD34* 阳性表达率为 (8.00 \pm 7.50)%, *CD105* 阳性表达率为 (92.00 \pm 6.10)%, *CD73* 阳性表达率为 (90.00 \pm 9.30)%, 说明经反复贴壁分离纯化的 MSCs 细胞均一性较好, 约占总细胞数的 90% 以上。

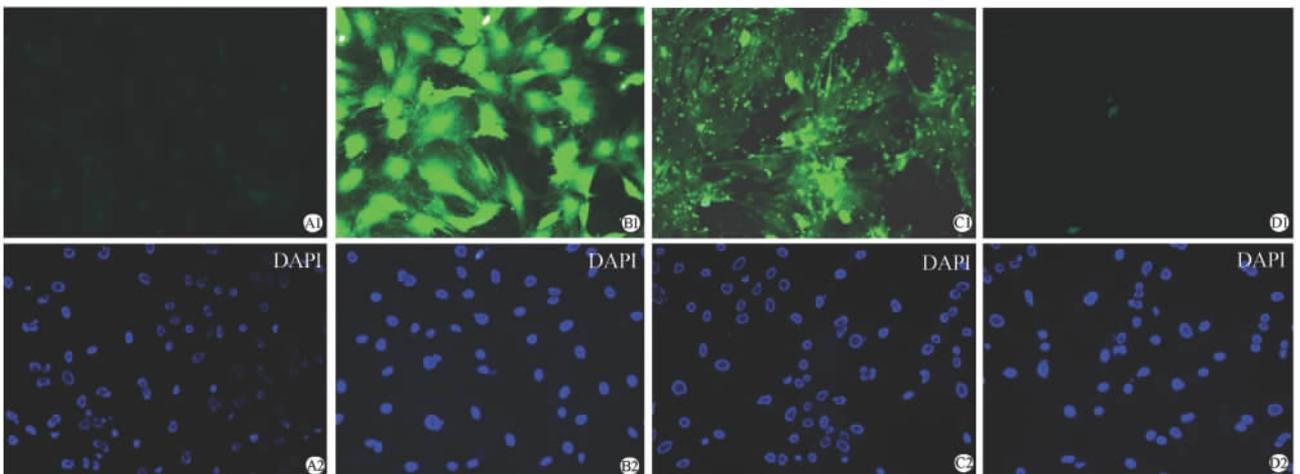


图 1 *CD34*、*CD105* 和 *CD73* 免疫荧光检测

Fig 1 Immunofluorescent detection of *CD34*, *CD105* and *CD73*

A1, A2: *CD34*; B1, B2: *CD105*; C1, C2: *CD73*; D1, D2: Negative control. Original magnification: $\times 200$

2.2 骨髓 MSCs 诱导分化为 EDCs MSCs 细胞原代分离后, 经过 5~6 代人工分选的纯化培养, MSCs 形态逐渐单一, 呈鹅卵石样, MSCs 原代培养 24 h 后大部分 MSCs 均已贴壁, 培养 72 h 可见细胞体积较原代细胞增大, 大部分呈纺锤状或纤维状等多种形态, 胞质透明, 胞核明显。MSCs 用 MEF 诱导分化

培养液培养 9 d 后, 可发现成熟的短梭形 EDCs 样细胞呈铺路石状聚集。见图 2。

2.3 骨髓 MSCs 向 EDCs 分化过程中 *CD34*、*VE-cadherin* 基因的表达 收集定向诱导分化不同时间点的细胞, 用 qRT-PCR 检测 EDCs 特异性基因 *CD34* 及 *VE-cadherin* 的动态变化, 以鉴定分化程

度。结果发现 MSCs 定向诱导 EDCs 过程中, *VE-cadherin* 基因表达水平在诱导前期(第 1~4 天)呈阴性表达, 第 5~6 天表达强度显著升高, 呈阳性表达, 第 7~9 天仍持续呈阳性表达(图 3A)。

诱导前期(第 1~4 天)也基本呈阴性表达, 第 5~6 天表达强度显著升高, 呈阳性表达, 第 7 天有所下降, 第 8~9 天又呈阳性表达(图 3B)。

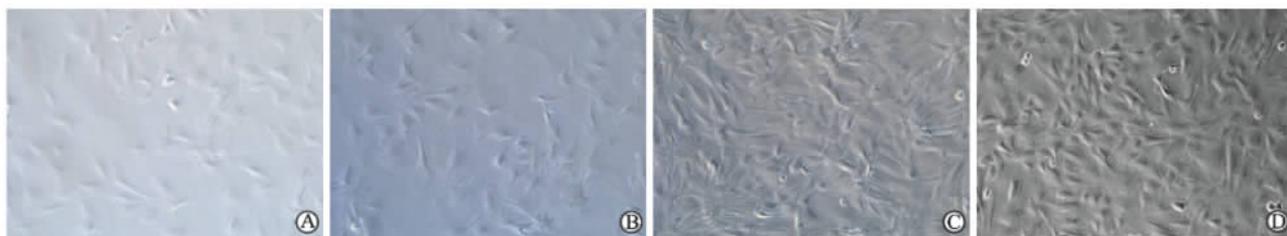


图 2 骨髓 MSCs 诱导分化为 EDCs

Fig 2 EDCs differentiated from bone marrow MSCs

MSCs: Mesenchymal stem cells; EDCs: Endothelial cells. A: 1 day after induction; B: 2 days after induction; C: 5 days after induction; D: 8 days after induction. Original magnification: $\times 200$

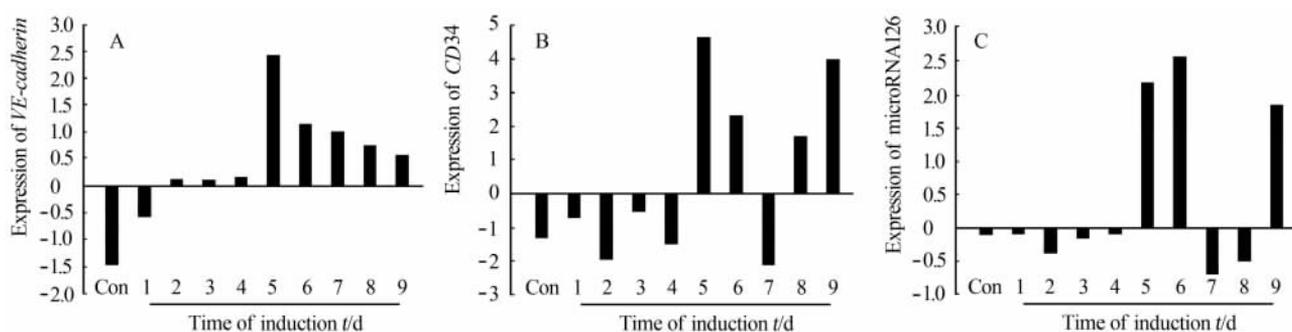


图 3 骨髓 MSCs 定向诱导分化为 EDCs 过程中 *VE-cadherin* (A)、*CD34* (B) 和 *microRNA126* 的表达变化

Fig 3 Expression of *VE-cadherin* (A), *CD34* (B) and *microRNA126* (C) during bone marrow MSCs differentiation into EDCs

Con: Control; MSCs: Mesenchymal stem cells; EDCs: Endothelial cells

2.4 骨髓 MSCs 向 EDCs 定向诱导分化过程中 *microRNA126* 的表达 qRT-PCR 检测发现, 在 MSCs 诱导培养的第 1~4 天, *microRNA126* 基本呈阴性表达, 第 5~6 天呈强阳性表达, 表达量升高 2~2.5 倍, 第 7~8 天表达量下降, 第 9 天又呈阳性表达(图 3C)。其在第 5~6 天的表达规律与 *VE-cadherin* 及 *CD34* 一致, 后期的表达变化与 *CD34* 更相似。

3 讨论

骨髓 MSCs 起源于胚胎发育中胚层, 存在骨髓基质中, 形态呈纤维状, 可聚集成均匀集落, 体外培养呈漩涡状排列。MSCs 具有自我复制、多系分化的干细胞生物学特性, 有高度增殖潜力, 可分化为多种间叶组织细胞, 是理想的组织工程的种子细胞。本研究成功建立了大鼠骨髓 MSCs 分离纯化的方法, 并对 MSCs 特征表达的蛋白抗原进行鉴定。一

般认为 *CD34* 表达于骨髓造血干细胞, 不表达于 MSCs, 而 *CD105* 和 *CD73* 则是 MSCs 独特的标记蛋白^[1,5], 我们分离的 MSCs 经免疫荧光检测显示 *CD34* 表达阴性, *CD105* 和 *CD73* 表达阳性, 并且纯度大于 90%, 表明用该法得到的细胞为均一的细胞群。

已有研究表明, 骨髓 MSCs 具有多种分化潜能, 而且在 VEGF、内皮细胞生长添加剂 (ECGS)、bFGF、胰岛素样生长因子 21 (IGF21) 等的诱导下可以向血管内皮祖细胞、血管 EDCs 表型分化^[6-7]。这有望解决血管内皮来源上的不足。本研究通过在 MEF 培养液中添加诱导因子的方法, 对 MSCs 进行了 EDCs 的定向诱导分化培养。对 EDCs 特有的 *CD34* 和 *VE-cadherin*^[8-10] 进行 qRT-PCR 检测后发现, MSCs 经定向分化培养液诱导后表达 *CD34* 及 *VE-cadherin*, 而未诱导的 MSCs 则不表达。

在以往的胚胎干细胞研究中, 成熟内皮标记

VE-cadherin 在胚胎干细胞分化体系中呈现一定的转录时序性,在分化的第5天开始出现,并可以作为血管 EDCs 的终末端分化标记基因^[8]。本研究的 qRT-PCR 结果显示,在骨髓 MSCs 向 EDCs 分化过程中,*VE-cadherin* 显示出和胚胎干细胞分化时同样的趋势,在诱导前期表达阴性,第5~6天表达量明显升高,且后期一直保持阳性表达,提示不同来源干细胞向 EDCs 分化过程中呈现出相似的表达规律。

CD34 糖蛋白是 EDCs 抗原,在毛细血管和小血管内皮中呈强表达,作为 EDCs 分化的一种标记已经得到公认。*CD34* 在未诱导的 MSCs 中呈阴性表达,在 MSCs 定向诱导为 EDCs 的过程中,在诱导前期 *CD34* 表达阴性,第5~6天明显升高,呈阳性表达,第7天有所下降,第8~9天又呈阳性表达。

microRNA126 为血管 EDCs 特异性表达的调控型小 RNA 分子^[2,11],在干细胞水平应呈阴性表达。本研究发现,microRNA126 在 MSCs 向 EDCs 诱导分化过程中,也存在第5~6天高表达的趋势,在第7天有所下降,第8~9天又呈阳性表达,这与 *CD34* 的表达变化相似。上述结果提示 microRNA126 在干细胞向内皮细胞分化过程中可能起到重要的调控作用,具体机制需要进一步深入研究。

本研究证实通过外加因子的方法可将骨髓来源的 MSCs 向 EDCs 方向诱导分化,但分化后的细胞仍需从超微结构、细胞的生物学功能、体内实验等方面进一步证实,并检测分化后的 EDCs 是否具有生理功能。因此,骨髓 MSCs 定向分化为 EDCs 的内在分子调控机制研究显得尤为重要。本研究发现,microRNA126 的表达在细胞分化过程中有明显变化,且与分化标记因子的变化趋势一致,提示将来可以加强 microRNA126 调控机制的研究,并进一步观察其调控因子在蛋白水平的变化,以期运用分子生物学方法通过干预 microRNA126 的表达来调控 MSCs 向 EDCs 的定向分化过程。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Bagley R G, Weber W, Rouleau C, Yao M, Honma N, Kataoka S, et al. Human mesenchymal stem cells from bone marrow express tumor endothelial and stromal markers[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34: 619-627.
- [2] Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 259-269.
- [3] Wang S, Aurora A B, Johnson B A, Qi X, McAnally J, Hill J A, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. *Dev Cell*, 2008, 15: 261-271.
- [4] Fish J E, Santoro M M, Morton S U, Yu S, Yeh R F, Wythe J D, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity[J]. *Dev Cell*, 2008, 15: 272-284.
- [5] Cleaver O, Melton D A. Endothelial signaling during development[J]. *Nat Med*, 2003, 9: 661-668.
- [6] Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development[J]. *Nature*, 2005, 438: 937-945.
- [7] Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, et al. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e46842.
- [8] Nikolova-Krstevski V, Bhasin M, Otu H H, Libermann T, Oettgen P. Gene expression analysis of embryonic stem cells expressing VE-cadherin (CD144) during endothelial differentiation[J]. *BMC Genomics*, 2008, 22: 240.
- [9] Fukuhra S, Sakurai A, Yamagishi A, Sako K, Mochizuki N. Vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by a small GTPase, Rap1 [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39: 132-139.
- [10] Siemerink M J, Klaassen I, Vogels I M. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. [J]. *Angiogenesis*. 2012, 15: 151-163.
- [11] van Solingen C, de Boer H C, Bijkerk R, Monge M, van Oeveren-Rietdijk A M, Seghers L, et al. MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1(+)/Lin(-) progenitor cells in ischaemia [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92: 449-455.

[本文编辑] 孙岩