

· 实验研究 ·

脐带间充质干细胞分化为内皮细胞促进血管新生

武开宏 莫绪明 孙剑 卢士红 韩忠朝

【摘要】 目的 探讨脐带间充质干细胞能否在体内外分化为内皮细胞,参与血管新生。方法 体外实验采用内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子对脐带间充质干细胞进行诱导,观察其形态变化。体内实验将脐带间充质干细胞移植到小鼠后肢缺血模型中,采用免疫组织化学鉴定细胞在体内的迁移和分化,激光多普勒血流成像仪鉴定缺血局部血流恢复情况。结果 在体外脐带间充质干细胞能够形成血管网样结构。在体内脐带间充质干细胞能够分化为内皮细胞,表达 CD31 抗体,参与实验组的动物血管重建。与小鼠的血管网络发生整合,实验组的动物后肢血流灌注明显好于对照组。结论 脐带间充质干细胞能够分化为内皮细胞,参与血管新生,为治疗性血管新生提供新的细胞选择。

【关键词】 内皮,血管 细胞分化 干细胞 新生血管化,生理性

Experimental study on endothelia differentiation and angiogenesis of umbilical cord derived mesenchymal stem cells
WU Kai-hong, MO Xu-ming, SUN Jian, LU Shi-hong, and HAN Zhong-chao. Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing Children's Hospital, Nanjing Medical University; Chinese Academy of Medical Sciences, National Key Laboratory of Experimental Hematology, Nanjing 210008, China

【Abstract】 Objective Myocardial infarction and subsequent heart failure remain the most dominant health challenges worldwide. Therapeutic angiogenesis has emerged as a potential novel treatment for severe ischemic heart disease and there is increasing evidence that cell transplantation may improve the perfusion and contractility of myocardium in animal models. This study was designed to examine the endothelial growth potential and whether transplantation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells can improve local blood flow in a mouse ischemic hindlimb model. **Methods** The mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord of passage 5 were differentiated in an endothelial differentiation medium containing vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in vitro. Samples were observed for 2 weeks. The human umbilical cord derived mesenchymal stem cells were transplanted into a hindlimb ischemia mouse model in vivo. Four weeks later, immunofluorescence was used to identify the migration and differentiation of the transplanted cells towards endothelial lineage. Laser Doppler perfusion image was used to evaluate the local blood flow of the hindlimb. **Results** Results After incubation with VEGF and bFGF, the human umbilical cord derived mesenchymal stem cells started to form interconnected clusters and a network was formed. Four weeks after transplantation, the transplanted cells were sprouting from the local injection and differentiated into endothelial cells, contributed to the recovery of local blood flow obviously as compared with control group. **Conclusion** Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells have the ability to differentiate into endothelial cells, contribute to the local angiogenesis in a hindlimb ischemia mouse model and represent a new source for therapeutic angiogenesis for clinical applications.

【Key words】 Endothelium, vascular Cell differentiation Stem cells Neovascularization, physiologic

缺血性心血管疾病的发病率和病死率高,对弥漫性冠状动脉狭窄,目前还缺乏有效的治疗手段。在缺血组织局部促进新生血管形成、恢复缺血组织的血液供应,或许能成为治疗缺血性疾病的有效手段^[1]。有研究表明,骨髓干细胞移植能够促进局部血管新生,改善缺血组织的血流灌注^[2]。我们采用酶消化法,成功从脐带组织中分离出干细胞^[3-4],该细胞具有骨髓间充质干细胞相似的生物学特性,且

增殖分化能力更加旺盛。本实验探讨脐带间充质干细胞能否向内皮细胞分化,促进局部血管新生,提高缺血组织的血流灌注。

材料和方法

体外诱导 采用胶原酶消化法^[3]分离脐带间充质干细胞。取第 5 代脐带间充质干细胞接种于 24 孔培养板,培养板用 Matrigel 包被,每孔接种脐带间充质干细胞 5×10^3 个。内皮诱导分化液为 M199 培养剂,2% 胎牛血清,50 ng/ml 血管内皮生长因子 (VEGF),10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)。置 37℃,5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。每 2 天更换一次培养基,持续诱导 2 周。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-4497.2011.09.013

本课题受江苏省自然科学基金资助(BK2008076)。

作者单位:210008 南京医科大学附属南京儿童医院心胸外科(武开宏、莫绪明、孙剑);中国医学科学院实验血液学国家重点实验室(卢士红、韩忠朝)

光学显微镜下记录细胞形态的变化过程。

建立后肢缺血模型 BALB/c 无胸腺裸鼠, 雌性, 8~9 周, 16.5~21.0 g (中国医学科学院实验动物研究所), 饲养于 SPF 级层流架中。无菌超净台中用 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉。沿左侧腹股沟中点至膝内侧作约 2.5 cm 长的切口, 钝性分离皮下组织, 暴露股神经血管鞘及其分支, 解剖显微镜下用玻璃分针分离出股动脉及大隐动脉、旋髂外动、静脉及股动、静脉肌支, 分别用 5/0 号线结扎两点于中间切断。用 7/0 号线缝合切口。术后注意护理, 防止因舌、咽部肌肉松弛而引起窒息。

标记及移植细胞 取第 5 代脐带间充质干细胞, 用 CM-DiI 标记。标记方法: 磷酸缓冲盐 (PBS) 冲洗 2 遍细胞, 加入 1 ml CM-DiI 液 (50 μ g/ml), 37℃ 孵育 8 min, 期间震荡 2 次, 防止细胞成团。建立动物模型术后第 2 天, 将 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠, 固定在解剖台上。CM-DiI 标记的约 10^7 脐带间充质干细胞重悬于 DMEM-F12 中, 密度为 2×10^7 /ml, 每只小鼠约注射 1×10^6 细胞, 在大腿内收肌局部, 分 4~6 个点注射, 共注射 10 只小鼠。对照组注射等量的 DMEM-F12 培养基约 200 μ l, 注射 10 只。术后注意护理, 同等条件下饲养 4 周后进行检测。

肌肉标本免疫组织化学染色 移植标记脐带间充质干细胞 4 周, 完成相关检查后, 断颈处死小鼠。处死前 30 min, 从尾静脉注入 60 μ g FITC 标记的 BS-1 lectin (能与人源内皮细胞特异结合的凝集素)。取双后肢小腿肌肉, 包埋于 OCT 中, 液氮固定后作 5 μ m 冰冻切片, 粘于涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 在共聚焦显微镜下观察存活细胞。切片用 PBS 轻轻洗涤 2 次后, 2% 多聚甲醛固定细胞 20 min。血清封闭 30 min, 加入小鼠抗人 CD31 单克隆抗体 (1:100 稀释), 4℃ 孵育过夜, PBS 轻轻浸洗 3 次, 加入 FITC 二抗 (1:100 稀释), 37℃ 孵育 30 min, PBS 浸洗后, 共聚焦显微镜下观察。鉴定内皮特异性抗体 CD31 的表达。

监测小鼠缺血后肢血流恢复和缺血情况 手术后 4 周, 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠, 用激光多普勒血流成像仪 (北京解放军总医院病理生理教研室) 检测两组小鼠双后肢血流恢复情况。

结 果

1. 细胞形态变化 脐带间充质干细胞在诱导前

呈典型成纤维样结构 (图 1A); VEGF 和 bFGF 细胞诱导 3 天后, 可见细胞簇与簇之间连接, 初步形成网格状 (图 1B); 1 周后, 网格间连线变细, 由节点互相连接, 形成网格样结构 (图 1C)。

2. 内皮细胞分化鉴定 右后肢肌肉组织切片 CD31 免疫组织化学显示, 移植的脐带间充质干细胞 CD31 染色阳性, 分化为内皮细胞 (图 2)。

3. 缺血后肢血管新生 脐带间充质干细胞移植后 4 周, 能够在缺血局部存活, 并发生迁移, 参与小鼠的微血管重建, 与小鼠的血管网络发生整合 (图 3)。后肢缺血情况改善。多普勒仪检测后肢的血流。干细胞移植 4 周后, 后肢缺血的实验组小鼠外观上毛色鲜亮, 后肢完好率较对照组明显好。多普勒成像结果显示, 实验组的小鼠后肢活动良好, 血流灌注明显好于对照组。

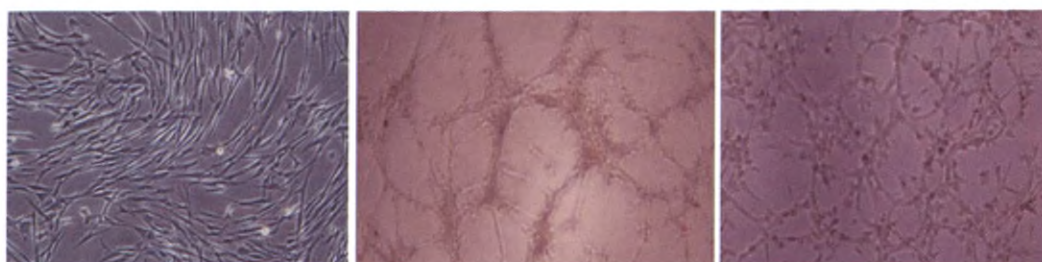
讨 论

研究发现, 干细胞移植能够通过血管新生, 促进侧支循环的形成, 改善缺血组织的局部血供, 进而改善心功能, 为治疗心肌梗死等缺血性疾病开辟了一条新的途径, 治疗性血管新生已经成为心血管领域研究的热点之一^[5-6]。

骨髓干细胞在一定诱导环境下, 能分化为内皮细胞, 参与血管新生, 促进缺血局部组织的血流恢复^[7]。但骨髓来源的干细胞, 随年龄老化数量减少, 其增殖能力显著降低^[9]。如果患者出现病毒感染或合并其他疾病, 会影响骨髓来源的干细胞功能。因此, 寻找新的干细胞来源有重要意义。脐带组织来源比较原始, 脐带间充质干细胞体外扩增能力强, 是非常有希望的新干细胞来源^[9-10]。

我们发现, 脐带间充质干细胞在体外能够形成血管网样结构。为了证明脐带间充质干细胞能在体内分化为内皮细胞, 参与血管新生, 我们将 DiI 标记的脐带间充质干细胞移植到免疫缺陷小鼠的缺血后肢模型中, 结果显示, 脐带间充质干细胞在体内不仅存活并发生迁移、分化为内皮细胞, 参与小鼠的微血管重建, 与小鼠的血管网络整合; 实验组小鼠后肢活动良好, 血流灌注明显好于对照组。

本组结果证明, 脐带间充质干细胞能够在缺血微环境条件下分化为内皮细胞, 参与血管新生, 促进缺血局部的血流恢复。提示脐带间充质干细胞是有前途的临床治疗性血管新生研究的细胞来源。重要的是, 脐带干细胞分离方便, 对母婴无影响, 可以冻



A:诱导前

B:内皮诱导后 3 天

C:诱导后 1 周

图 1 诱导前、后脐带间充质干细胞形态学变化 HE × 100

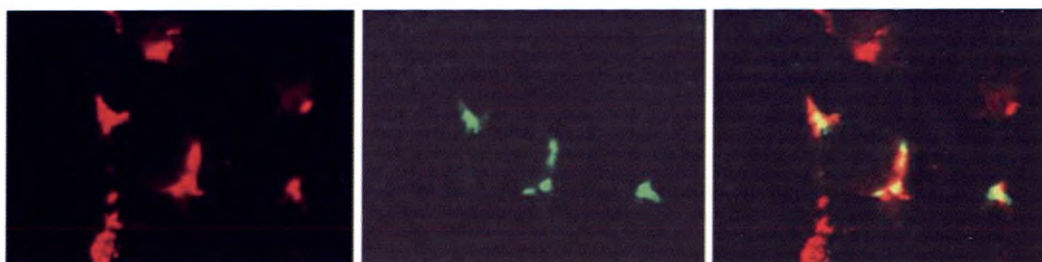


图 2 移植的 DiI 标记的脐带间充质干细胞(A),与同一切片被内皮特异性 CD31 抗体染成绿色、表达 CD31 抗体(B),两者重合(绿色与红色),即部分 DiI 标记的脐带间充质干细胞表达 CD31 抗体,分化为内皮细胞 免疫荧光染色 × 100



图 3 移植的脐带间充质干细胞(A)与同一切片 BS-I lectin 标记的微血管(B),两者重合移植的脐带间充质干细胞(C),与小鼠血管网络发生整合 免疫荧光染色 × 100

存使用。

目前世界各地已经建立各种脐带血及脐带细胞库。相信随着对干细胞分化迁移机制的深入研究,脐带间充质干细胞将在治疗性血管新生领域发挥重要的作用。

参考文献

- [1] 武开宏,刘迎龙,韩忠朝. 成体干细胞与细胞心肌形成术. 中华胸心血管外科杂志,2007,23:430-432.
- [2] Tang YL, Zhao Q, Qin X, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. Ann Thorac Surg,2005,80:229-236.
- [3] 武开宏,莫绪明,刘迎龙,等. 酶消化法分离脐带干细胞. 中华小儿外科杂志,2008,29:159-162.
- [4] Wu KH, Mo XM, Zhou B, et al. Cardiac potential of stem cells from whole human umbilical cord tissue. J Cell Biochem, 2009, 107: 926-932.
- [5] Chien KR, Domian IJ, Parker KK. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. Science,2008,322: 1494-1497.
- [6] McSweeney SJ, Hadoke PW, Kozak AM, et al. Improved heart function follows enhanced inflammatory cell recruitment and angiogenesis in 11betaHSD1-deficient mice post-MI. Cardiovasc Res,2010,88: 159-167.
- [7] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells,2004, 22:377-384.
- [8] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. Ageing Res Rev,2006,5:91-116.
- [9] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells, 2003, 21: 105-110.
- [10] Wu KH, Zhou B, Yu CT, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord derived stem cells in a rat myocardial infarction model. Ann Thorac Surg,2007,83:1491-1498.

(收稿日期:2010-10-10)