

大鼠骨髓间充质干细胞体外培养可自发分化为内皮细胞

王露露¹, 胡 亮¹, 刘 超¹, 周 露¹, 李庆平^{1,2*}

(¹南京医科大学药理学系,²江苏省心血管病分子干预重点实验室,江苏 南京,210029)

[摘 要] 目的:探讨大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)在体外正常培养条件下能否自发分化为内皮细胞。方法:分离原代大鼠 BMSCs,传代后正常培养至第 7 代,选用第 3 代和第 7 代用于本次实验。用 Real-time PCR 方法检测第 3 代和第 7 代 BMSCs 内皮细胞标志物 CD31、血管生成素受体 2(tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, Tie-2)及血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)的表达;体外血管生成试剂盒(Matrigel)检测血管生成能力;免疫荧光染色检测细胞内 vWF 蛋白的表达。结果:在培养至第 7 代后,部分 BMSCs 在形态上呈椭圆形;Real-time PCR 和免疫荧光的结果显示第 7 代 BMSCs 的内皮细胞标志物表达水平明显高于第 3 代 BMSCs;体外血管生成实验表明第 7 代 BMSCs 在 Matrigel 胶上能形成网状结构。结论:BMSCs 在体外正常培养条件下细胞表型会发生一定的变化,并可部分自发分化为内皮细胞。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;自发分化;内皮细胞

[中图分类号] Q254

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)08-1039-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130803

Spontaneous endothelial cells differentiation from rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*

Wang Lulu¹, Hu Liang¹, Liu Chao¹, Zhou Lu¹, Li Qingping^{1,2*}

(¹Department of Pharmacology, ²Laboratory of Cardiovascular Disease and Molecular Intervention, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) could spontaneously differentiate into endothelial cells in normal culture condition. **Methods:** Primary rat BMSCs were separated and cultured to passage 7. The passage 3 and passage 7 BMSCs were prepared for this experiment. The expression of endothelial cell markers CD31, tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2 (Tie-2) and von Willebrand factor (vWF) in passage 3 and passage 7 BMSCs were determined by Real-time PCR, and the ability of angiogenesis were determined by an *in vitro* angiogenesis kit (Matrigel). Furthermore, the expression of vWF protein in BMSCs were detected using immunofluorescence staining. **Results:** After normal cultured to passage 7, BMSCs partly formed an oval shape. Real-time PCR and immunofluorescence showed that the expression of endothelial cell markers were significantly higher in passage 7 BMSCs than in passage 3 BMSCs. *In vitro* angiogenesis experiments showed that passage 7 BMSCs could form a mesh structure in matrigel. **Conclusion:** BMSCs in normal culture condition changed their phenotypes, and could partially differentiate into endothelial cells spontaneously.

[Key words] bone marrow-derived mesenchymal stem cells; spontaneous differentiation; endothelial cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8): 1039-1043]

心肌梗死的特征是不可逆的心肌细胞凋亡,细胞移植近年来被认为是一种有效治疗方法。间充质

干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种来源于发育早期中胚层和外胚层的干细胞,具有多向分化潜能,在特定的诱导条件下可以分化为心肌、脂肪、骨、内皮等细胞^[1-3]。众多的研究报道 MSCs 移植可以降低缺血心脏的梗死面积、增加血管密度、提高射血分数等^[4-5]。MSCs 在治疗心肌梗死的主要机制

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30973534, 81173052)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: qingpingli@yahoo.com.cn

包括向心肌细胞分化、向内皮细胞分化、旁分泌效应等。向心肌细胞定向分化的方法包括与心肌细胞共培养、5-氮杂胞苷、辛二酰苯胺异羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid)等化学试剂诱导^[6-8]。向内皮细胞定向分化的方法主要包括与内皮细胞共培养、辛伐他汀、血管内皮生长因子(VEGF)诱导等^[3,9-10],其中又以用添加了 VEGF 和(或)碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的内皮细胞生长培养基进行定向诱导较为常用^[11-12]。

另外,有研究指出大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)可自发分化为神经前体细胞,脂肪来源的间充质干细胞可自发分化为心肌细胞^[13-14],而大鼠 BMSCs 能否自发分化为内皮细胞还未见报道,因此本研究探讨大鼠 BMSCs 在正常培养条件下(不添加任何生长因子)能否自发分化为内皮细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级幼年雄性 SD(Sprague-Dauley)大鼠(80 ± 10)g[南京医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(苏)2002-0031]。低糖 DMEM (L-DMEM)、胰蛋白酶(1:250, Gibco 公司,美国);胎牛血清(Hyclone 公司,美国);Percoll 淋巴细胞分离液(GE Pharmacia 公司,美国);FastStart Universal SYBR Green Master (ROX, Roche 公司,瑞士);Matrigel (Growth Factor Reduced, BD 公司,美国);vWF 抗体(Abcam 公司,美国);FITC 标记的羊抗兔荧光二抗(Bioworld 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 原代分离和培养

麻醉 SD 大鼠,在无菌条件下取股骨、胫骨骨干,用 L-DMEM 冲洗骨髓腔,将冲出的骨髓液移入预先置有等体积 1.131 g/ml Percoll 细胞分离液的离心管中,以 2 000 r/min 离心 25 min。收集中间层的单个核细胞,用 L-DMEM 洗涤 2 次,之后以 1.0×10^5 个/ml 的浓度接种于培养瓶内,用含体积分数 10% FBS 的 L-DMEM 在 37℃、5% CO₂ 的条件下进行培养;36 h 后除去非贴壁细胞,更换新鲜培养液。根据细胞生长情况,每 3 d 半量换液 1 次。倒置相差显微镜逐日观察细胞形态和生长情况,待细胞生长至铺满瓶底的 80%~90%时,用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化,将此细胞悬液等体积分为 3 份,分别转接于 3 个培养瓶中进行传代培养,每 3 d 半量换液 1 次,直至贴壁细胞彼此融合、铺满瓶底,再重复上述操作进

行传代。经流式细胞仪检测,培养细胞 MSCs 高表达的表面抗原 CD29 阳性率大于 97%。本实验所用细胞为第 3 代和第 7 代 MSCs,从第 3 代传至第 7 代约为 14 d。

1.2.2 测定体外血管生成能力

用 0.25%胰酶消化细胞,离心,弃上清后用 DMEM 重悬,调整浓度后按 2×10^4 个/cm² 接种于预先铺好 Matrigel 凝胶的 96 孔板内,放置细胞培养箱内。12 h 后观察第 3 代和第 7 代 MSCs 能否在凝胶上形成网状结构。

1.2.3 Real-time PCR 反应

按 TRIzol 试剂盒(Invitrogen Life Technologies 公司,美国)说明所示方法提取细胞总 RNA,于 -80℃ 保存。SYBR Green Master 按说明书使用。引物序列:CD31:上游 5'-CTCCTAAGAGCAAAGAGCAACTTC-3',下游 5'-TACACTGGTATTCATGTCTCTGG-3';Tie-2:上游 5'-GCTGAGAACAACATAGGAT-3',下游 5'-CTGAGTTGAACTGAACAGC-3';vWF:上游 5'-CC-CACCGGATGGCTAGGTATT-3',下游 5'-GAGGCG-GATCTGTTTGAGGTT-3';β-actin:上游 5'-CTATCG-GCAATGAGCGGTTC-3',下游 5'-TGTGTTGGCAT-AGAGGTCTTTACG-3'。

1.2.4 细胞免疫荧光

培养细胞吸去培养基,PBS 洗 2 次,每次 5 min,4%的多聚甲醛室温原位固定 15 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;0.1%Triton 透膜 10 min;PBS 冲洗浸泡 5 min;免疫染色封闭液(杭州碧云天公司)封闭 60 min;倾去封闭液加 vWF 一抗(1:100),置于湿盒中 4℃过夜,阴性对照用 PBS 代替一抗;4℃过夜后,滴加 FITC 荧光标记的二抗(1:100)37℃孵育 60 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;DAPI(杭州碧云天公司)染核后置于荧光显微镜下观察拍照。

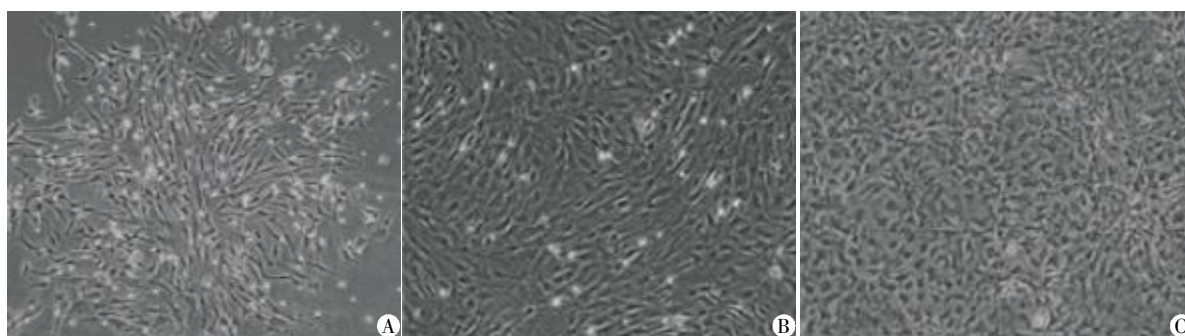
1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行资料分析,各组计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。ANOVA 方法进行组间变异度分析,两两比较采用 *q* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验重复 3 次。

2 结果

2.1 BMSCs 形态学的变化

BMSCs 原代提取接种后,3 d 左右即可在显微镜下看到有贴壁的细胞,6 d 左右呈集落状生长(图 1A)。铺满后传代,细胞呈梭形旋涡状生长(图 1B)。传至第 7 代时细胞形态有所改变,部分细胞呈椭圆



A: 6 d 时的原代 BMSCs; B: 第 3 代 BMSCs; C: 第 7 代 BMSCs。随着代数的增加, BMSCs 的形态由梭形逐渐转变为不规则形和椭圆形。

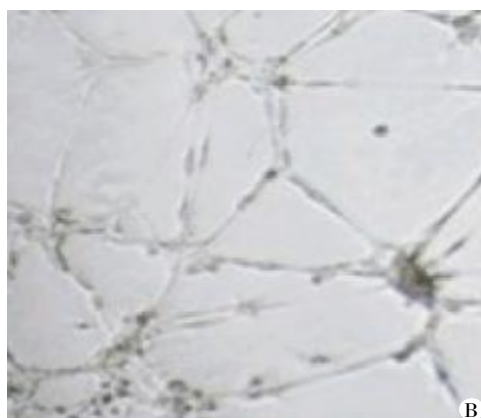
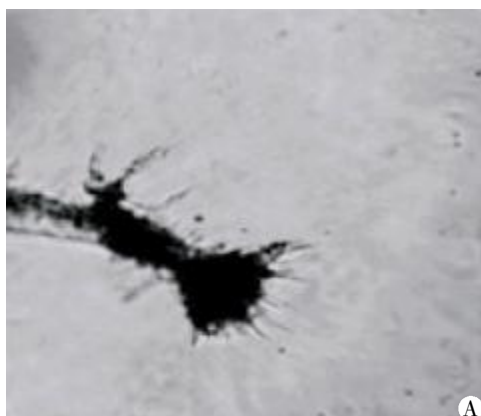
图 1 原代 BMSCs 的分离培养及传代后形态学的变化($\times 40$)

Figure 1 Morphological changes after the primary BMSCs were isolated and passed ($\times 40$)

形, 似“铺路石”状(图 1C)。

2.2 体外血管生成实验

将第 3 代、第 7 代 BMSCs 分别种植于 Matrigel 凝胶上, 12 h 后观察结果显示第 3 代 BMSCs 不能在凝胶上形成网状结构(图 2A), 而是聚集成团状; 第 7 代 BMSCs 则形成了交叉的网状结构(图 2B)。结果表明第 7 代 BMSCs 已经具备了内皮细胞的特性。



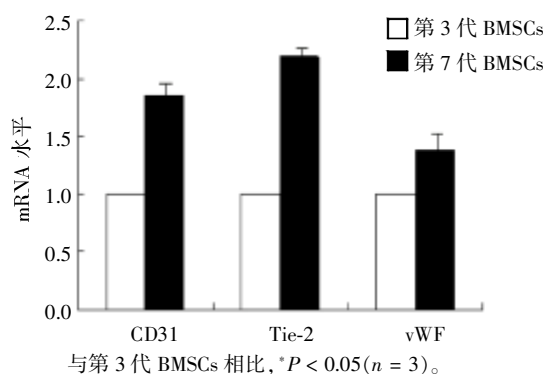
A: 第 3 代 BMSCs; B: 第 7 代 BMSCs。

图 2 第 3 代和第 7 代 BMSCs 的体外血管生成能力($\times 100$)

Figure 2 *In vitro* angiogenesis of passage 3 and passage 7 BMSCs ($\times 100$)

2.3 Real-time PCR 检测 CD31、Tie-2 及 vWF 的表达

为了观察正常培养条件下细胞表型及内皮细胞特异性标识物的变化, 分别将第 3 代和第 7 代 BMSCs 提 RNA 处理。Real-time PCR 检测结果表明第 7 代 BMSCs 的 CD31、Tie-2 及 vWF mRNA 的表达水平较第 3 代 BMSCs 显著增高($P < 0.05$, 图 3)。



与第 3 代 BMSCs 相比, $*P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 3 第 3 代和第 7 代 BMSCs 的内皮细胞特异性标识物 mRNA 的表达水平

Figure 3 mRNA expression levels of endothelial cell specific markers in passage 3 and passage 7 BMSCs

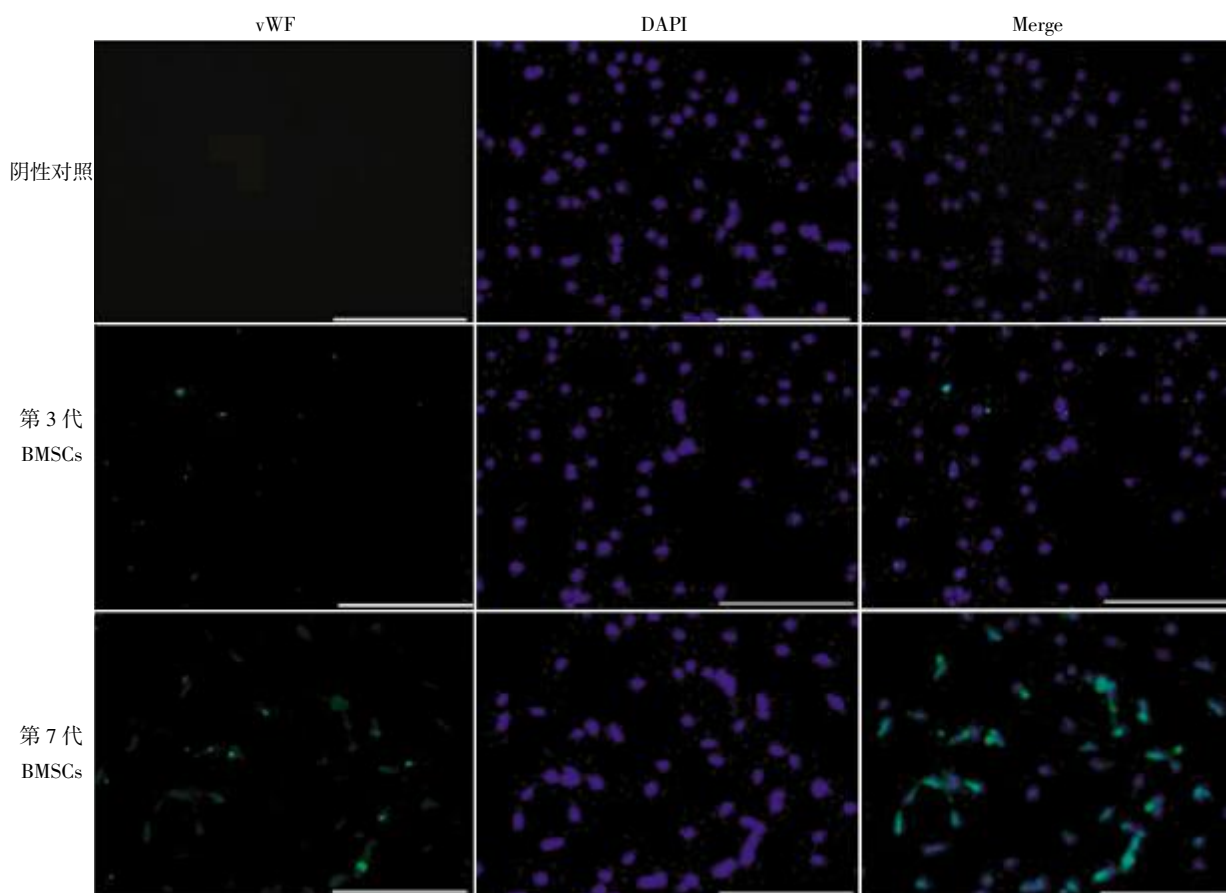
2.4 免疫荧光检测 vWF 蛋白的表达

免疫荧光结果显示第 3 代 BMSCs 几乎无 vWF 的表达, 而第 7 代 BMSCs 则有较明显的 vWF 蛋白表达(图 4)。

3 讨论

本研究首次发现大鼠 BMSCs 在不使用任何诱导剂或内皮生长培养基, 仅在正常培养条件下细胞形态和表型会发生变化, 并能部分自发分化为内皮细胞。

MSCs 为一种多潜能分化细胞, 在治疗缺血性心肌病方面越来越受到重视。众多研究表明将 MSCs 在体外进行一系列处理, 包括诱导、共培养、



第3代 BMSCs 几乎无 vWF 蛋白的表达,而第7代 BMSCs 则有较明显的 vWF 蛋白表达。

图4 第3代和第7代 BMSCs 内 vWF 蛋白的表达($\times 200$)

Figure 4 vWF protein expression in passage 3 and passage 7 BMSCs ($\times 200$)

转染特异性基因等,再将其注入心脏的梗死部位可显著改善心脏的心输出量、提高射血分数及增加梗死部位血管密度等。另外一些研究发现脂肪来源的 MSCs 在正常培养的情况下可自发分化为心肌细胞,大鼠的 BMSCs 在长期培养时会自发分化为神经前体细胞。同时, MSCs 和内皮细胞都来源于胚胎发育早期的中胚层,故我们推测 BMSCs 也有可能自发分化为内皮细胞。

与其他诱导实验不同的是,本次研究的培养基中未使用内皮生长培养基或添加诱导 MSCs 向内皮细胞分化的 VEGF,而仅是在低糖 DMEM 和 10% 胎牛血清的条件下进行培养。结果发现 BMSCs 随着代数的增加,其形态也有所变化。原代 BMSCs 呈梭形,集落状生长,传代后 BMSCs 即呈漩涡状生长,形态上第3代 BMSCs 仍呈梭形。继续传代后, BMSCs 的形态逐渐发生变化,由梭形转变为不规则形,至第7代时, BMSCs 已不呈漩涡状生长,且在形态上呈类似“铺路石”状。Real-time PCR 结果显示第7代的 BMSCs 与第3代相比,内皮细胞标识物 CD31、Tie-2

及 vWF 的表达显著增高。第7代 BMSCs 能在 Matrigel 凝胶上形成类似血管的网状结构,而第3代 BMSCs 只能聚集成团,无血管生成能力;同时,第7代 BMSCs 已有 vWF 蛋白的表达。

BMSCs 的自我更新和分化的平衡,是由外部因素和细胞内部因素综合决定的。影响其分化的外部因素很多,除了一些诱导剂外,机械力及血清对 BMSCs 的分化也有很大的影响。Shi 等^[15]报道连续周期性拉应力刺激通过 RhoA-ERK1/2-Runx2 通路可以明显抑制 MSCs 的成骨分化。血清剥夺的 MSCs 在长期培养后可表达内皮细胞特异性标识物 VEGFR2、Tie-2、CD31,具有显著的血管生成能力^[16];同样,相比含 10% 胎牛血清的诱导介质,无血清诱导介质能显著提高 MSCs 的心肌细胞分化率^[17]。Song 等^[18]发现细胞内 VEGF 在脂肪 MSCs 的心肌细胞自发分化中起重要作用。我们首次报道了 BMSCs 在体外正常培养条件下可以自发分化为内皮细胞,而且还发现血管紧张素受体1(AT1)阻断剂 losartan 可以降低 BMSCs 自发分化率(数据未列出),提示 BMSCs

内的肾素-血管紧张素系统(RAS)可能在自发分化过程中起一定的作用,具体的作用机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(2): 295-303
- [2] Valorani MG, Montelatici E, Germani A, et al. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials[J]. Cell Prolif, 2012, 45(3): 225-238
- [3] Xu J, Liu X, Chen J, et al. Simvastatin enhances bone marrow stromal cell differentiation into endothelial cells via notch signaling pathway[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(3): C535-543
- [4] Kim SW, Lee DW, Yu LH, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing GCP-2 improve heart function through enhanced angiogenic properties in a myocardial infarction model[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(4): 495-506
- [5] Cerrada I, Ruiz-Saurí A, Carrero R, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha contributes to cardiac healing in mesenchymal stem cells-mediated cardiac repair[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(3): 501-511
- [6] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(2): 295-303
- [7] Qian Q, Qian H, Zhang X, et al. 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase[J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(1): 67-75
- [8] Feng C, Zhu J, Zhao L, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(17): 3044-3051
- [9] Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*[J]. Stem Cells, 2004, 22(3): 377-384
- [10] Xu J, Liu X, Chen J, et al. Cell-cell interaction promotes rat marrow stromal cell differentiation into endothelial cell via activation of TACE/TNF-alpha signaling [J]. Cell Transplant, 2010, 19(1): 43-53
- [11] Pankajakshan D, Kansal V, Agrawal DK. *In vitro* differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, [Epub ahead of print]
- [12] 张金池, 王敬瀚, 王中心, 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
- [13] Planat-Bénard V, Menard C, André M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells[J]. Circ Res, 2004, 94(2): 223-229
- [14] Tseng PY, Chen CJ, Sheu CC, et al. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture[J]. J Vet Med Sci, 2007, 69(2): 95-102
- [15] Shi Y, Li H, Zhang X, et al. Continuous cyclic mechanical tension inhibited Runx2 expression in mesenchymal stem cells through RhoA-ERK1/2 pathway[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(8): 2159-2169
- [16] Oskowitz A, McFerrin H, Gutschow M, et al. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic[J]. Stem Cell Res, 2011, 6(3): 215-225
- [17] Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, et al. Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells[J]. Artif Organs, 2010, 34(4): 280-288
- [18] Song YH, Gehmert S, Sadat S, et al. VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(4): 999-1003

[收稿日期] 2013-04-17