

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)14-1276-03

外周血内皮祖细胞改善肢体缺血的研究

王 辉¹, 王 岭¹, 李开宗², 凌 瑞¹, 孙宝华¹, 李晓军¹, 易 军¹(第四军医大学西京医院: ¹ 血管内分泌外科, ² 肝胆外科 陕西 西安 710033)

Role of human peripheral blood derived-endothelial progenitor cells in improvement of limb ischemia

WANG Hui¹, WANG Ling¹, LI Kai-Zong², LING Rui¹, SUN Bao-Hua¹, LI Xiao-Jun¹, YI Jun¹¹Department of Vascular and Endocrine Surgery, ²Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To estimate the effect of human peripheral blood derived-endothelial progenitor cell(EPC) transplantation on the repairment of limb ischemia. **METHODS:** The mononuclear cells from human peripheral blood were cultured in M199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 20 ng/mL VEGF and 4ng/mL bFGF *in vitro*. The specific markers of EPC were analyzed by FCS at day 6 and 14 during culture respectively. The bilateral femoral artery, great saphenous artery, iliac circumflex artery, and muscular branch of 15 Balb/c nude mice were ligated to cause limb ischemia. The 6-day adherence cells marked by CM-Dil were multipoint injected into the left local muscles of ischemic limbs(EPC group) and M199 was multipoint injected into the right local muscles of ischemic limbs(M199 group) in order to evaluate the therapeutic effect. Seven days after operation, 60 μ g FITC-UEA was injected via tail vein. One hour later, the mice were killed. The heart liver lung spleen kidney and limb gastrocnemius were taken and examined with fluorescence microscopy. The number of capillaries of ischemic limbs was measured by factor VIII related antigen immunohistochemical staining. **RESULTS:** The cultured cells at day 6 expressed KDR, CD133, CD34 and vWF, and the positive rates of KDR, CD133, CD34 and vWF were (46.4 \pm 9.3)% , (33.8 \pm 11.7)% (73.5 \pm 6.3)% and (38.9 \pm 8.2)% , respectively. At the 14th day during culture, the cells expressed KDR, CD34 and vWF and the positive rates of KDR, CD34 and vWF were (81.5 \pm 7.6)% (88.9 \pm 5.4)%

收稿日期 2006-01-16 ; 接受日期 2006-04-20

基金项目 第四军医大学西京医院 2004 年临床高新技术资助项目 (XJGX04031M26)

通讯作者: 王 岭. Tel : (029)84775267 Email : vascular@fmmu.edu.cn

作者简介: 王 辉. 博士生(导师李开宗). Tel : (029)84775271

Email : plawh@fmmu.edu.cn

and (78.3 \pm 13.6)% , respectively ; the positive rate of CD133 dropped to (3.8 \pm 8.7)% . The necrosis and density of capillary of the ischemic limbs of nude mice were improved more obviously in the EPC group than that in the M199 group ($P < 0.05$). Red and green fluorescence were observed in the paraffin section of ischemic limbs of nude mice in the EPC group. **CONCLUSION:** We can culture and obtain EPC from mononuclear cells of human peripheral blood *in vitro* under a certain condition. The transplanted EPC can incorporate into the local capillary networks and repair the ischemia of posterior limbs of nude mice.

【Keywords】 endothelium ; stem cells ; transplantation peripheral blood

【摘 要】目的: 研究人外周血来源内皮祖细胞(EPC)移植对改善肢体缺血的作用. 方法: 人外周血单个核细胞在体外诱导扩增 6 d 和 14 d 后, 分别检测其 EPC 特异性标志的表达, 并将荧光染料标记后的培养第 6 日的贴壁细胞通过缺血局部多点注射移植到后肢缺血的裸鼠动物模型体内, 以评价其治疗效果. 结果: 人外周血单个核细胞经体外诱导分化, 培养第 6 日的贴壁细胞表达 KDR, CD133, CD34 和 vWF, 流式细胞仪检测其阳性率分别为(46.4 \pm 9.3)% , (33.8 \pm 11.7)% , (73.5 \pm 6.3)% 和(38.9 \pm 8.2)% ; 培养第 14 日的贴壁细胞 KDR, CD34 和 vWF 的表达阳性率均增高, 而 CD133 表达阳性率明显降低, 流式细胞仪检测其阳性率分别为(81.5 \pm 7.6)% , (88.9 \pm 5.4)% , (78.3 \pm 13.6)% 和(3.8 \pm 8.7)% ; 移植 EPC 后裸鼠缺血后肢的坏死情况和毛细血管密度均较对照组明显改善($P < 0.05$). 移植 EPC 后缺血后肢肌肉石蜡切片中可见分散不均的红色和黄绿色双色荧光的细胞掺入. 结论: 从人外周血单个核细胞中可诱导出 EPC, 而且移植的 EPC 可以定向整合到后肢缺血局部, 明显改善裸鼠后肢缺血.

【关键词】 内皮; 干细胞; 移植; 外周血

【中图分类号】 R61 ; R36

【文献标识码】 A

0 引言

1997 年 Asahara 等^[1]在 Science 杂志发表论文报道内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)分离成功, 并在体内证明其血管生成的能力. 从此 EPC 受到了研究者的普遍关注, 国内外关于 EPC 的研究方兴未艾^[2-3]. 骨髓、外周血和脐血来源的 EPC 能在体外扩增并分化成功能性内皮细胞, 在修复心肌梗死患

者的心脏,治疗临床肢体缺血、冠状动脉疾病、脑中风,改善糖尿病患者的血管形成能力,抑制肿瘤血管生成,以及作为基因治疗导向载体和靶细胞等方面,具有广阔的应用前景^[4-7]。我们拟将人外周血单个核细胞在体外特定生长因子的调控下诱导分化为EPC,并且通过注射荧光染料标记后的EPC于动物体内,观察其对改善肢体缺血的作用,以期指导临床实践。

1 材料和方法

1.1 材料 100 mL/L 胎牛血清(四季青,杭州) 20 μ g/L 的 VEGF 和 4 μ g/L 的 bFGF(PEPROTECH,英国), Balb/c 无胸腺裸鼠(7~8 wk, 18.5~22 g, 第四军医大学实验动物研究中心), 碳花青荧光染料(CM-DiI, Molecular Probes, 美国), 荆豆凝集素(UEA, VECTOR LABORATORIES, 美国), γ WF(博士德, 武汉)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和鉴定 采用 Ficoll 密度梯度离心法获取人外周血单个核细胞, 洗涤后以 M199 培养液重悬细胞, 培养液含 100 mL/L 胎牛血清, 20 μ g/L 的 VEGF 和 4 μ g/L 的 bFGF, 以 5×10^8 /L 的密度接种于铺有 10 g/L 明胶的培养瓶中, 细胞培养箱培养 48 h 后弃去贴壁细胞, 悬浮细胞离心后用 M199 培养液重悬, 以 2×10^8 /L 的密度接种于一次性培养瓶中。每 3 d 换液, 用 Hank's 液洗掉未贴壁的细胞后加入 M199 培养液继续培养。在培养的第 6 日和第 14 日分别对细胞计数, 并制作流式细胞仪检测标本, 共 12 份, 分别做 KDR, CD133, CD34 和 γ WF 的流式细胞仪检测, 无荧光抗体的培养细胞做为阴性对照。

1.2.2 双后肢缺血模型的建立 Balb/c 无胸腺裸鼠饲养于 SPF 级层流架中。超净台中用 20 mg/L 的戊巴比妥钠按照 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 沿腹股沟中点至膝内侧作约 2 cm 长的切口, 分离、显露股神经血管鞘及其分支, 显微镜下分离出双侧的股动脉及大隐动脉、旋髂外动静脉及股动静脉肌支共四处, 分别结扎后缝合切口。

1.2.3 细胞的示踪和移植 在培养第 6 日的准备移植的贴壁细胞培养瓶中加入碳花青荧光染料, 使 CM-DiI 浓度为 2 mg/L, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 4 $^{\circ}$ C 15 min, PBS 洗 2 次后, 2.5 g/L 胰酶/EDTA 消化, 离心后重悬于 M199 培养液中。后肢缺血裸鼠共 15 只, 左后肢局部多点注射扩增后的贴壁细胞, 共 5 mL, 细胞总量 5×10^5 , 为 EPC 治疗组; 右后肢局部多点注射 M199 培养液, 共 5 mL, 为 M199 对照组。移植标记细胞后的第 8 日, 脱臼处死裸鼠。处死前 1 h, 从尾静脉注入

20 mg/L FITC 标记的的荆豆凝集素 3 mL。取心、肝、肺、脾、肾及双后肢小腿肌肉 40 g/L 甲醛固定后作石蜡切片, 脱蜡后荧光显微镜下观察。

1.2.4 裸鼠后肢情况的检测 手术后每日观察裸鼠后肢色泽、温度的变化和活动情况。双后肢小腿肌肉石蜡切片做 γ WF 免疫组化染色, 在光学显微镜下, 每张切片随机计数 5 个 $\times 200$ 倍视野内的棕黄色染色管状数取其平均数, 表示新生的毛细血管数。

统计学处理: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间统计处理采用配对 t 检验, 计数资料采用 Fisher 确切概率检验分析($n=30$)。所有统计分析采用 SPSS11.0 软件完成。

2 结果

2.1 人外周血单个核细胞的体外培养和鉴定 人外周血单个核细胞在培养 48 h 后出现贴壁, 从第 4 日开始出现细胞形态的改变, 由圆形细胞逐渐向两端伸展呈纺锤形, 数量增多(图 1), 在培养第 5 日出现大量的梭形细胞, 可见部分梭形细胞以细胞团为中心呈放射状生长。培养第 7~10 日, 细胞继续增多, 可见内皮细胞特异性索条状结构。到第 14 日铺满瓶底的 80%, 第 6 日和第 14 日细胞计数分别为 $(3.75 \pm 0.36) \times 10^8$ /L 和 $(1.52 \pm 0.28) \times 10^8$ /L。培养第 6 日的贴壁细胞表达 KDR, CD133, CD34 和 γ WF, 流式细胞仪检测其阳性率分别为 $(46.4 \pm 9.3)\%$, $(33.8 \pm 11.7)\%$, $(73.5 \pm 6.3)\%$ 和 $(38.9 \pm 8.2)\%$; 培养第 14 日的贴壁细胞 KDR, CD34 和 γ WF 的表达阳性率均增高, 而 CD133 表达阳性率显著降低, 流式细胞仪检测其阳性率分别为 $(81.5 \pm 7.6)\%$, $(88.9 \pm 5.4)\%$, $(78.3 \pm 13.6)\%$ 和 $(3.8 \pm 8.7)\%$ 。

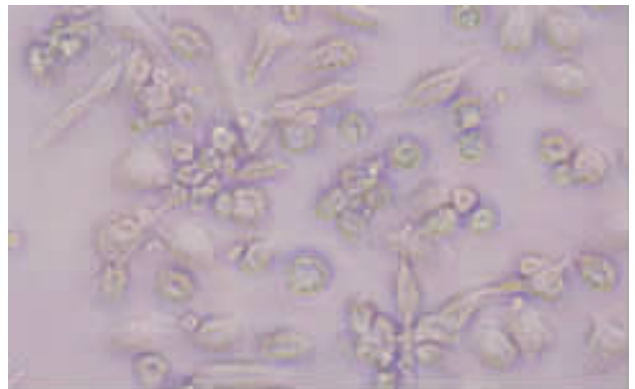


图 1 培养第 4 日细胞开始伸展, 部分呈梭形

2.2 EPC 移植后的组织分析 EPC 组缺血后肢肌肉中有分散不均的能激发出红色(代表 CM-DiI)和黄色

绿色(代表 FITC-UEA)双色荧光的细胞掺入(图2),说明移植的 EPC 定向整合到了缺血局部。其他脏器以及 M199 对照组后肢,则未见双色荧光。

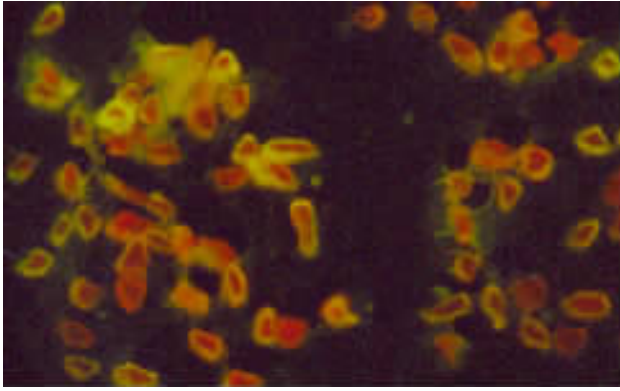


图2 EPC 组后肢肌肉中可见红色和黄绿色双色荧光

2.3 肢体缺血情况的检测 EPC 组缺血后肢肌肉中的毛细血管密度高于 M199 组[(6.8 ± 1.5) vs (3.8 ± 1.6) , $P < 0.05$],说明 EPC 组的血管重建过程增强。EPC 的移植极大地改善了缺血肢体的恢复。M199 对照组中仅有 2 条后肢未出现明显坏死,3 条后肢趾端坏死,10 只出现小腿的自动脱落,而在 EPC 组,有 10 条后肢未见明显坏死,4 条后肢有趾端坏死,仅 1 条后肢出现肢体脱落。资料统计中趾端坏死和肢体脱落均视为无效,两组间有效率比较[(13.33%) vs (66.67%)]差异有显著意义($P < 0.01$)。

3 讨论

近年来,出生后血液循环中存在能分化为内皮细胞的 EPC 的概念逐渐得到关注,这种具有高增殖潜能的细胞以出生后血管生成的方式参与缺血局部的血管重建过程^[8-9]。目前关于 EPC 的研究取得了很大的进展,但是仍有许多不清楚的地方。EPC 和单个核细胞在发育上有何关系?如何确定 EPC 在循环中的量及其富集、分离方法?EPC 在体外不同细胞因子调控下具有可塑性的诱导分化机制如何?如何进一步明确 EPC 的增殖潜能,并寻求最佳扩增体系以提供足量的有活力的细胞源,以便更好地应用?这些都是值得研究的问题。我们研究了人外周血单个核细胞分化为 EPC 并应用于缺血性疾病治疗的可行性。在我们的培养体系中,人外周血单个核细胞贴壁呈梭形生长,并表达 EPC 特异性抗原标志,数量也明显扩增。这说明人外周血单个核细胞在体外一定条件

下可以分化为 EPC,且较成熟内皮细胞有明显的增殖优势。双色荧光标记证实通过局部多点注射的方法,EPC 可以整合到了缺血后肢的新生血管内,这种整合促进了缺血部位血管重建过程,表现为毛细血管密度较对照组高,并且治疗组的缺血肢体大多得以挽救,而对照组则以后肢坏死或脱落为主。我们采用人外周血单个核细胞,而没有采用单纯的 CD133 或者 CD34 阳性细胞来进行 EPC 的诱导和培养,是考虑到细胞的诱导、分化是一个复杂的过程,是多种细胞间相互调控作用的结果,细胞太单一反而不利于细胞的分化,在培养过程中弃去培养 48 h 内的贴壁细胞,可以避免外周血中成熟内皮细胞等对实验的干扰。我们采用目前大家比较公认的 EPC 表面标记来对培养的细胞进行鉴定,保证了细胞的性质和纯度。M199 对照组有 2 条后肢未出现明显坏死,3 条后肢趾端坏死,考虑与 M199 培养液中的 VEGF 和 bFGF 的促进血管新生有关。

【参考文献】

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [2] 杨晨, 张志华, 卢士红, 等. 脐血内皮祖细胞移植改善肢体缺血的研究 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(16): 1437-1441.
- [3] Xu QB. Endothelial progenitor cells in angiogenesis [J]. *Shengli Xuebao*, 2005, 57(1): 1-6.
- [4] Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells [J]. *Annu Rev Med*, 2005, 56: 79-101.
- [5] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization [J]. *Circ Res*, 1999, 85(3): 221-228.
- [6] Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2005, 64(1): 1-8.
- [7] Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(6): 994-1002.
- [8] Ji M, Nishimura H, Iwakura A, et al. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity [J]. *Circulation*, 2005, 111(9): 1114-1120.
- [9] Kong D, Melo LG, Gneocchi M, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries [J]. *Circulation*, 2004, 110(14): 2039-2046.