

## 短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)19-2108-03

# 低氧对大鼠骨髓间充质干细胞粘附能力的影响

文飞<sup>1</sup>,王立维<sup>2</sup>,黄文<sup>2</sup> (401320 重庆,重庆市巴南区人民医院血管外科<sup>1</sup>;400015 重庆,重庆医科大学附属第一医院血管外科<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 探讨低氧对大鼠骨髓间充质干细胞粘附能力的影响。方法 采用SD大鼠20只,年龄6~8周,雌雄不限、体质量100~120 g,获取骨髓间充质干细胞。流式细胞鉴定实验细胞CD54、CD29、CD90、CD45表达。根据细胞培养及冲刷实验时的细胞氧环境,实验分组为4组:A组(20% O<sub>2</sub>培养20% O<sub>2</sub>冲刷组);B组(1% O<sub>2</sub>培养1% O<sub>2</sub>冲刷组);C组(20% O<sub>2</sub>培养1% O<sub>2</sub>冲刷组)和D组(1% O<sub>2</sub>培养20% O<sub>2</sub>粘附冲刷组),比较不同组下剪切力冲刷细胞的残留率。研究不同氧浓度变化对骨髓间充质干细胞表达缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor, HIF-1 $\alpha$ )和血管细胞粘附分子(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)的影响。结果 骨髓间充质干细胞在1% O<sub>2</sub>环境下(B、C组)粘附能力增强,在20% O<sub>2</sub>环境下(A、D组)粘附能力减弱( $P < 0.05$ );HIF-1 $\alpha$ 表达水平在1% O<sub>2</sub>环境下(B、C组)增强( $P < 0.05$ )。结论 骨髓间充质干细胞随着粘附时间越长,细胞粘附能力也逐渐增强,经过低氧处理细胞的粘附力提高时间快于常氧环境。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞;低氧;粘附能力

**[中图分类号]** R331.22; R364.4

**[文献标志码]** A

动脉硬化性闭塞、Buerger's病和糖尿病足等缺血性疾病为血管外科常见病,其主要治疗方式之一是血管搭桥手术,自体静脉来源有限,合成材料血管远期通畅率不高<sup>[1]</sup>。临床需要一种新的血管替代物,组织工程血管采用天然材料如胶原蛋白和弹性蛋白,以及异体血管脱细胞基质材料和表面修饰后的合成材料作为支架,种子细胞种植于支架材料上,组成有生物活性的血管。骨髓间充质干细胞因其可分化为内皮细胞而成为常用的种子细胞<sup>[2-3]</sup>。其中种子细胞之间、种子细胞与支架的细胞外基质之间的粘附强度是保持在血流剪切力作用下种子细胞层完整的关键,但是目前研究发现种子细胞的粘附能力很差<sup>[4]</sup>。而氧浓度可以改变其他类型细胞的粘附能力,本实验拟研究骨髓间充质干细胞在低氧下的粘附能力。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及主要试剂、仪器

健康成年SD大鼠20只,年龄6~8周,体质量100~120 g。DMEM细胞培养液(Gibco-BRL公司);小鼠抗大鼠CD45、CD54抗体(BD公司);小鼠抗大鼠CD29、CD100抗体(eBioscience公司);高级旋转流变仪 Gemini HR Nano(Malvern公司);超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天公司)。

### 1.2 实验分组及方法

1.2.1 原代细胞提取及培养 用颈脱臼断颈法处死SD大

鼠。收获骨髓细胞悬液,离心(1 000 r/min, 5 min),用DMEM/F12培养液(含10%胎牛血清)重悬沉淀细胞。

将骨髓有核细胞( $6 \times 10^7$ 个)接种于T25塑料培养瓶中分别放入37℃,5% CO<sub>2</sub>,20% O<sub>2</sub>浓度饱和湿度培养箱和37℃,5% CO<sub>2</sub>,1% O<sub>2</sub>浓度饱和湿度三七培养箱中培养。原代接种后24 h,除去未贴壁的造血细胞,半量换液。以后每隔3~4 d换液1次,细胞传达3~6代用于实验。

1.2.2 流式细胞术鉴定细胞 收集消化待检骨髓间充质干细胞,上流式细胞仪检测CD54、CD29、CD90、CD45的表达。此次检测由重庆医科大学儿童医院基础研究实验室完成。

1.2.3 低氧下细胞倍增时间检测 于培养板种入细胞数 $5 \times 10^5$ 个,加入4 mL培养液在20% O<sub>2</sub>和1% O<sub>2</sub>下培养7 d后消化并计数。计算公式:倍增时间 =  $7 \text{ d} \times \lg 2 / (\lg 7 \text{ d} - \lg 0 \text{ d}) \times 24 \text{ h}$ 。

### 1.2.4 氧浓度变化下高级旋转流变仪测细胞粘附能力实验

根据细胞培养时的氧浓度和粘附实验时的氧浓度,实验分4组:A组,20% O<sub>2</sub>培养20% O<sub>2</sub>粘附冲刷组;B组,1% O<sub>2</sub>培养1% O<sub>2</sub>粘附冲刷组;C组,20% O<sub>2</sub>培养1% O<sub>2</sub>粘附冲刷组;D组,1% O<sub>2</sub>培养20% O<sub>2</sub>粘附冲刷组。将各组细胞在高级旋转流变仪模拟血流对血管壁的冲刷作用,冲刷5 min,冲刷前后将同一视野在Leica AF6000活细胞工作站进行图像采集。计数比较不同氧浓度变化条件下细胞残留率。

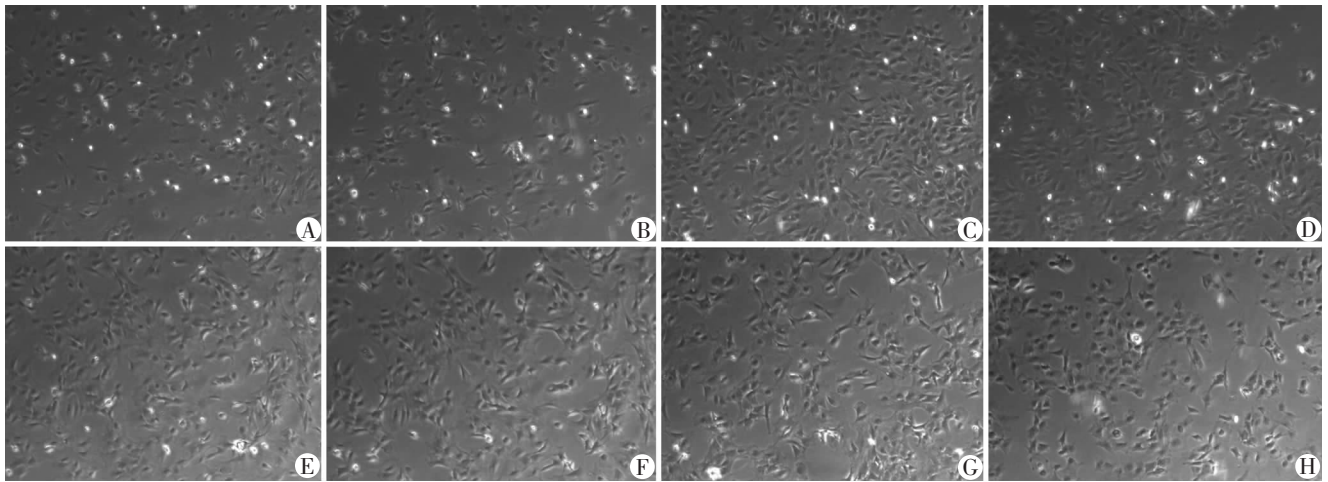
### 1.2.5 Western blot检测不同氧浓度变化对间充质干细胞表达缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor, HIF-1 $\alpha$ )和血管细胞粘附分子(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)的影响

实验分为4组:A组,恒定20% O<sub>2</sub>培养;B组,恒定1% O<sub>2</sub>培养;C组,20% O<sub>2</sub>培养后放入1% O<sub>2</sub>继续培养2 h;D组,1% O<sub>2</sub>培养后放入20% O<sub>2</sub>继续培养2 h。细胞处理后进行电泳,转膜、复温,洗膜后,用HRP-羊抗鼠IgG二抗(1:5 000)37℃孵育1.5 h,洗膜后,加入ECL试剂显色,X胶片曝光。胶片扫描后用Quantity One软件对各目的蛋白条带进行光密度分析。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81070255);重庆市教育委员会科学项目(KJ090320)

**[通信作者]** 黄文, E-mail: dhuangwen@hotmail.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130905.1007.001.html> (2013-09-05)



A、B:20% O<sub>2</sub>培养 20% O<sub>2</sub>冲刷组;C、D:1% O<sub>2</sub>培养 1% O<sub>2</sub>冲刷组;E、F:20% O<sub>2</sub>培养 1% O<sub>2</sub>冲刷组;G、H:1% O<sub>2</sub>培养 20% O<sub>2</sub>冲刷组;  
A、C、E、G:冲刷前;B、D、F、H:冲刷后

图1 在不同培养氧浓度和粘附冲刷氧浓度条件下骨髓间充质干细胞残留情况 (LM ×400)

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行 $t$ 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

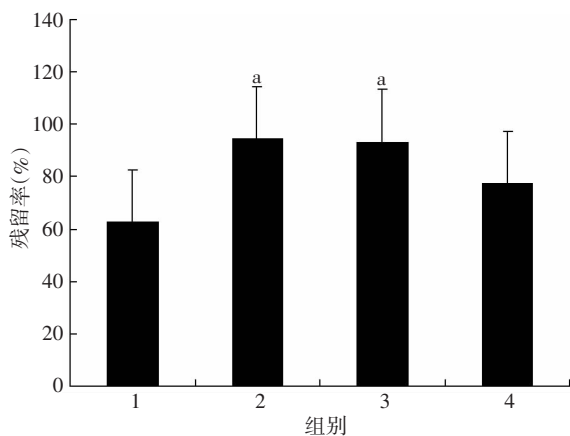
### 2.1 流式细胞仪检测 CD54、CD29、CD90、CD45 的表达

结果显示实验细胞为骨髓间充质干细胞<sup>[5]</sup>。

### 2.2 骨髓间充质干细胞粘附实验

20% O<sub>2</sub>培养条件下,当粘附时间大于3 h,细胞已基本变为梭形,残留率 >95%,仅有 <5% 细胞脱落。

将粘附2 h的骨髓间充质干细胞实验细胞分为4组,结果显示:骨髓间充质干细胞1% O<sub>2</sub>氧浓度粘附冲刷条件下细胞残留率大于在20% O<sub>2</sub>氧浓度粘附冲刷条件下的细胞残留率( $P < 0.05$ ),骨髓间充质干细胞培养时的氧浓度和细胞粘附能力没有明显关系(图1、2)。

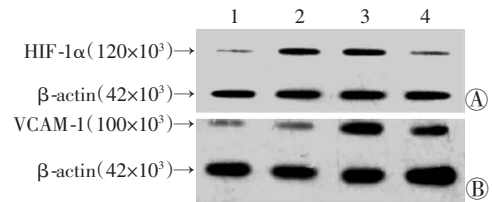


1:20% O<sub>2</sub>培养 20% O<sub>2</sub>冲刷组;2:1% O<sub>2</sub>培养 1% O<sub>2</sub>冲刷组;3:20% O<sub>2</sub>培养 1% O<sub>2</sub>冲刷组;4:1% O<sub>2</sub>培养 20% O<sub>2</sub>冲刷组 a: $P < 0.05$ ,与20% O<sub>2</sub>培养 20% O<sub>2</sub>冲刷组、1% O<sub>2</sub>培养 20% O<sub>2</sub>冲刷组比较

图2 不同氧浓度培养下冲刷骨髓间充质干细胞的残留率比较

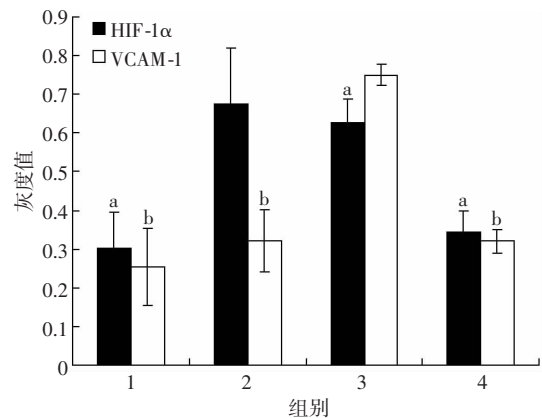
### 2.3 不同氧浓度变化对骨髓间充质干细胞表达 HIF-1 $\alpha$ 、VCAM-1 的影响

采用Western blot检测骨髓间充质干细胞在不同氧浓度变化影响下HIF-1 $\alpha$ 、VCAM-1的表达。结果表明HIF-1 $\alpha$ 表达水平在1% O<sub>2</sub>环境下增强( $P < 0.05$ ),VCAM-1表达水平仅常氧变为低氧时增强。见图3、4。



1:恒定20% O<sub>2</sub>培养组;2:恒定1% O<sub>2</sub>培养组;3:20% O<sub>2</sub>培养后放入1% O<sub>2</sub>继续培养2 h组;4:1% O<sub>2</sub>培养后放入20% O<sub>2</sub>继续培养2 h组

图3 Western blot检测骨髓间充质干细胞在不同氧浓度变化下HIF-1 $\alpha$ (A)、VCAM-1(B)蛋白的表达



1:恒定20% O<sub>2</sub>培养组;2:恒定1% O<sub>2</sub>培养组;3:20% O<sub>2</sub>培养后放入1% O<sub>2</sub>继续培养2 h组;4:1% O<sub>2</sub>培养后放入20% O<sub>2</sub>继续培养2 h组  
a: $P < 0.05$ ,与恒定1% O<sub>2</sub>培养组;b: $P < 0.05$ ,与20% O<sub>2</sub>培养后放入1% O<sub>2</sub>继续培养2 h组比较

图4 骨髓间充质干细胞在不同氧浓度变化下HIF-1 $\alpha$ 、VCAM-1表达的灰度值分析

### 3 讨论

种子细胞粘附分子表达水平的高低直接影响细胞粘附力<sup>[6]</sup>,目前很多研究用流体对组织工程血管进行剪切力预处理以提高种子细胞粘附力<sup>[7]</sup>,但矛盾在于多数细胞在细胞粘附蛋白表达增强以前已经从支架脱落。

Turner等<sup>[8]</sup>报道,内皮细胞在胶原蛋白基质上粘附24 h,剪切力作用于内皮细胞,残留率仅为53%。Feugier等<sup>[9]</sup>比较人脐静脉内皮细胞在各种材料上粘附3 h后,冲刷的残留率基本为30%~40%。本实验发现在骨髓间充质干细胞在1%氧下细胞生长旺盛,常氧和1%氧培养7 d后其倍增时间有显著差别,常氧和1%氧培养下骨髓间充质干细胞生长曲线亦有显著差异。骨髓是一典型的生理性低氧环境,但过度低氧则抑制了细胞生物学活性,Yun等<sup>[10]</sup>研究了生理性低氧(2% O<sub>2</sub>)、病理性低氧(0.5% O<sub>2</sub>)以及极端病理性低氧(0.01% O<sub>2</sub>)等缺氧梯度对小鼠肌母细胞系的C2C12细胞分化替代缺血受损的肌细胞的影响。结果表明,2% O<sub>2</sub>不抑制成肌分化,0.01% O<sub>2</sub>强烈抑制了成肌分化。本研究选择1%氧浓度处理骨髓间充质干细胞,为其提供合适的生理性低氧环境,故细胞处于增生旺盛状态。本实验结果显示常氧、恒定剪切力作用下,前2 h内,骨髓间充质干细胞的粘附力随着时间延长,也逐渐增强,2 h后,低氧环境和常氧条件下细胞粘附能力无明显差别,因为此时贴壁细胞已基本变为梭形,残留率大于95%,仅有小于5%细胞脱落。骨髓间充质干细胞细胞形态决定了其粘附性、伸展等行为<sup>[11]</sup>。细胞越扁平,细胞周边许多平行排列纤细的肌丝和大量的丝状伪足出现,粘附性越大<sup>[12]</sup>。故2 h后的粘附力可能主要是细胞变形后贴壁作用所致。如何提高前2 h骨髓间充质干细胞的粘附力显得尤其重要。

氧浓度是影响细胞粘附能力的因素之一。Csete等<sup>[13]</sup>报道干细胞培养氧浓度改变可以调控干细胞的生物学行为,决定干细胞增生、分化、迁移。本实验比较常氧、低氧、常氧到低氧以及低氧到常氧4种不同氧浓度变化状态下骨髓间充质干细胞的粘附能力,将干细胞置于模拟血流冲击力的流体剪切力作用下,发现骨髓间充质干细胞在持续低氧状态下,以及常氧到低氧的变化过程中,细胞粘附力增加,抗冲刷能力明显增强;而处于常氧下和低氧到常氧后,细胞抗冲刷能力下降,提示骨髓间充质干细胞在低氧下粘附能力增强,且骨髓间充质干细胞对氧浓度的变化非常敏感,经过1%低氧培养后,如果回到常氧环境,其粘附能力很快降低。

细胞粘附力与细胞粘附分子表达有密切关系。骨髓间充质干细胞表达多种粘附分子,其中HIF-1 $\alpha$ 、VCAM-1与细胞的紧密粘附有关<sup>[14]</sup>。本研究及前期研究<sup>[5]</sup>结果表明,HIF-1 $\alpha$ 、integrin  $\beta$ 1表达水平在1% O<sub>2</sub>环境下增强,与细胞粘附现象一致。低氧状态可以维持HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达的稳定性而发挥作用。干细胞

如果处于常氧条件下,HIF-1 $\alpha$ 很快被降解,因此经过低氧预处理的细胞回到常氧条件下,细胞粘附能力仍然降低。VCAM-1表达水平仅常氧变为低氧时增强,其可能主要增强骨髓间充质干细胞粘附到缺氧组织,进一步发挥作用。本课题组前期研究表明,ICAM-1表达水平仅低氧变为常氧时增强,其余组无明显改变,考虑原因为ICAM-1由NF- $\kappa$ B信号通路产生<sup>[5]</sup>,与细胞粘附能力无关,可能与组织缺血再灌注现象有关,主要参与低氧环境变化为常氧环境的过程。

### 参考文献:

- [1] Murphy G J, Saunders R, Metcalfe M, et al. Elbow fistulas using atogenous vein: patency rates and results of revision [J]. Postgrad Med J, 2002, 78(922): 483-486.
- [2] Barry F P, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(4): 568-584.
- [3] Dennis J E, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma [J]. Stem Cells, 2002, 20(3): 205-214.
- [4] Sen C K, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract [J]. Mol Cell Biochem, 2001, 216(1/2): 1-7.
- [5] 王立维, 赵渝, 黄旭, 等. 氧体积分数变化与小鼠骨髓间充质干细胞的增殖与迁移 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(19): 3442-3446.
- [6] Zhang S, Shpall E, Willerson J T, et al. Fusion of human hematopoietic progenitor cells and murine cardiomyocytes is mediated by alpha 4 beta 1 integrin/vascular cell adhesion molecule-1 interaction [J]. Circ Res, 2007, 100(5): 693-702.
- [7] Park J S, Huang N F, Kurpinski K T, et al. Mechanobiology of mesenchymal stem cells and their use in cardiovascular repair [J]. Front Biosci, 2007, 12: 5098-5116.
- [8] Turner N J, Murphy M O, Kielty C M, et al. Alpha2(VIII) collagen substrata enhance endothelial cell retention under acute shear stress flow via an alpha2beta1 integrin-dependent mechanism: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. Circulation, 2006, 114(8): 820-829.
- [9] Feugier P, Black R A, Hunt J A, et al. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress [J]. Biomaterials, 2005, 26(13): 1457-1466.
- [10] Yun Z, Lin Q, Giaccia A J. Adaptive myogenesis under hypoxia [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(8): 3040-3055.
- [11] Kidoaki S, Matsuda T. Shape-engineered fibroblasts: cell elasticity and actin cytoskeletal features characterized by fluorescence and atomic force microscopy [J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 81(4): 803-810.
- [12] Docheva D, Padula D, Popov C, et al. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(2): 537-552.
- [13] Csete M. Oxygen in the cultivation of stem cells [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1049: 1-8.
- [14] Yoon C H, Hur J, Oh I Y, et al. Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(5): 1066-1072.

(收稿:2013-04-04;修回:2013-07-24)

(编辑 黄超)