

人脐带和脂肪来源间充质干细胞培养上清对内皮细胞血管新生作用

刘小春 吴素慧 王文珍 魏凌云 郝倩 郭卓丹 温亚玲 康瑾

山西医科大学附属山西白求恩医院妇产科,太原 030032

通信作者:刘小春,Email:tyxchliu@163.com

【摘要】 目的 比较人脐带 Wharton's Jelly 来源间充质干细胞(WJ-MSC)与脂肪来源间充质干细胞(AD-MSC)培养上清对内皮细胞血管新生的促进作用。方法 酶消化法分离获得 WJ-MSC 及 AD-MSC,分别收集其培养上清并与内皮细胞共培养。实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测内皮细胞中促进血管新生相关基因和抑制血管新生基因的表达;Matrigel 体外成管实验检测其对内皮细胞管网状结构形成的作用。结果 WJ-MSC 和 AD-MSC 培养上清分别与内皮细胞共培养后,内皮细胞促血管新生相关基因的表达水平显著升高,抑制血管新生相关基因表达降低($P<0.01$),与对照组相比,WJ-MSC 组及 AD-MSC 组内皮细胞体外管网状结构的形成均显著高于对照组($43.2\text{ mm}\pm 9.2\text{ mm}$ 和 $94.3\text{ mm}\pm 13.2\text{ mm}$, $86.1\text{ mm}\pm 7.2\text{ mm}$, $P<0.01$)。结论 WJ-MSC 与 AD-MSC 培养上清对内皮细胞血管新生均具有促进作用,且二者的促进作用相当。

【关键词】 间充质干细胞; 内皮细胞; 共培养; 血管新生

基金项目:国家自然科学基金(81971365,81401188)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.06.012

Effect of human Wharton's Jelly or adipose derived mesenchymal stem cells culture supernatant on endothelial cells angiogenesis

Liu Xiaochun, Wu Suhui, Wang Wenzhen, Wei Lingyun, Hao Qian, Guo Zhuodan, Wen Yaling, Kang Jin
Department of Obstetrics/Gynecology, Shanxi Bethune Hospital Affiliated to Shanxi Medical University,
Taiyuan 030032, China

Corresponding author:Liu Xiaochun,Email:tyxchliu@163.com

【Abstract】 Objective To compare the curative effect of mesenchymal stem cells derived from human Wharton's Jelly(WJ-MSC)or adipose(AD-MSC)culture supernatant on endothelial cells angiogenesis. **Methods** WJ-MSC and AD-MSC were isolated, identified, and the culture supernatant of stem cells was collected.The WJ-MSC or AD-MSC supernatant co-cultured with the endothelial cells. The expression levels of pro-angiogenic and anti-angiogenic genes of endothelial cells were assessed using qRT-PCR analysis, and the effects of stem cell culture supernatant on angiogenesis were evaluated by performing a tube formation assay in vitro. **Results** After adding WJ-MSC and AD-MSC culture supernatant, the expression levels of pro-angiogenic genes in endothelial cells were upregulated, and the expression levels of anti-angiogenic genes were downregulated significantly in both experimental groups compared to the control group ($P<0.01$), and tube formation of endothelial cells was also significantly increased in both experimental groups as determined by the increase of the tube length ($43.2\pm 9.2\text{ mm}$ vs $94.3\pm 13.2\text{ mm}$, $86.1\pm 7.2\text{ mm}$, $P<0.01$). **Conclusion** The results showed that AD-MSC culture supernatant can promote endothelial cells angiogenesis and its curative effect is similar to that of WJ-MSC.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Endothelial cells; Co-culture; Angiogenesis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81971365, 81401188)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.06.012

间充质干细胞(MSC)是一种具有自我复制和多向分化潜能的成体干细胞,不仅具有强大的造血和免疫调节功能,而且由于其机体内分布广泛、易分离培养,成为干细胞再生医学的研究热点^[1-3]。

MSC具有促进血管生成的作用^[4-5],使其在脑梗、心梗等多种缺血性疾病及组织损伤疾病的治疗中具有较高的应用前景^[6-9]。MSC除了可以分化为血管内皮细胞,直接植入血管内皮层修复受损血管

外^[10],还作为微环境的重要成分之一,通过旁分泌的方式释放多种生物活性分子如血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等到周围组织液中,在局部微环境的作用下刺激周围成熟内皮细胞增殖和迁移,进而促使血管新生^[11-12]。我们前期研究表明,女性压力性尿失禁发病过程中,内皮细胞血管新生受到抑制^[13]。因此改善压力性尿失禁患者阴道壁组织血管新生状况,可能有利于损伤组织的修复。本研究分离人脐带 Wharton's Jelly 来源间充质干细胞(WJ-MSC)与脂肪来源间充质干细胞(AD-MSC),分别收集其培养上清与内皮细胞共培养,比较两者对内皮细胞血管新生的作用。

材料与方法

1. 材料:(1)脂肪组织:成人脂肪样品取自整形医院,所有样品均与供者签订知情同意书。吸脂术采集的脂肪放入含青霉素、链霉素的 D-Hanks' 保存运输。(2)脐带组织:脐带组织来自山西白求恩医院妇产科。取 5 例足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带约 15 cm。(3)产妇无家族遗传性疾病及传染性疾病。本研究经本院伦理委员会批准并由产妇及家属签署知情同意。(4)主要试剂及仪器:细胞培养基:DMEM/F12, M200 (Gibco); 胎牛血清 (FBS) (Gibco); 青霉素及链霉素 (华北制药股份有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma); matrigel (BD); 胶原酶 P (Roche)、胰蛋白酶 (Amresco); 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂及材料: 2× SYBR PCR mixture (Takara)、引物 (Sangon)。

2. 方法:(1)AD-MSC 分离培养:吸脂术采集的脂肪组织使用含青霉素、链霉素的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次去除血细胞及麻药, 800 r/min 离心 3 min, 取上层脂肪组织加入 0.2% 胶原酶 P (脂肪: 胶原酶 P 体积比 2:1) 消化, 37℃ 恒温振荡器消化 20 min 后加入适量 D-Hanks' 液, 将消化后的脂肪组织通过 100 μm 无菌滤网过滤去除未消化的组织, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 12 ml 含适量青霉素的 MSC 工作液重悬 2×10^6 细胞接种于 T75 培养瓶内, 于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养。(2)脐静脉内皮细胞分离培养: 无菌条件下取长度约 15 cm 新生儿脐带, 注射器轻轻插入静脉腔内, PBS 反复清洗静脉腔至流出的液体无色透明。注射器将 0.1% 的胶原 P 注入静脉腔内, 两端止血钳夹紧, 37℃ 消化 12 min。取下止血钳并用含有 10% FBS

的培养基冲洗并收集培养基, 300 r/min 离心 5 min 后弃上清, 细胞加入 M200 培养基重悬, 将细胞接种于 10 cm 培养皿中, 于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 24 h 后换液, 之后每隔 3~4 d 换液, 直至细胞生长至 80% 融合状态。(3)培养上清的收集和共培养: 第 3 代 WJ-MSC 和 AD-MSC 培养至 80% 汇合时, 弃原培养基, 加入新培养基培养 48 h, 收集培养基并用 0.4 μm 滤膜过滤去除其中细胞碎片, 获得 WJ-MSC 培养上清和 AD-MSC 培养上清, 将 WJ-MSC 与 AD-MSC 培养上清分别与内皮细胞共培养, 建立对照组、WJ-MSC 组和 AD-MSC 组。对照组加入内皮细胞培养基。WJ-MSC 组和 AD-MSC 组按照 1:1 比例将培养上清与内皮细胞培养液混合后, 与内皮细胞共培养 48 h 进行检测。(4)MSC 免疫表型的鉴定: 第 3 代 MSC 生长至 70%~80% 融合时, 加入 0.25% 的胰酶 (含 0.01% EDTA) 消化收集细胞, 按照 2×10^5 /ml 的浓度分装于 1.5 ml 微量离心管内 (1 ml/管), 1 200 r/min 离心 5 min 弃上清, 重悬细胞, 每管加入 50 μl 1:50 稀释小鼠抗人第一抗体 (CD29、CD31、CD34、CD44、CD105, HLA-DR), 混合均匀, 4℃ 孵育 30 min, 加入 1 ml PBS 洗涤 2 次, 待测管及对照管加入 50 μl 1:50 FITC-山羊抗小鼠 IgG 第二抗体标记, 4℃ 孵育 30 min 后, PBS 洗涤 2 次, BD Accuri C6 流式细胞仪上机检测。(5)内皮细胞免疫荧光检测: 当内皮细胞生长至 80% 融合状态时, 用 PBS 洗涤细胞 2 次。预冷的 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min。10% 正常羊血清室温封闭 30 min, 加入 CD31 抗体 (稀释度 1:100), 对照组以 PBS 代替 CD31 抗体, 置于室温孵育 2 h。PBS 洗涤 2 次。加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (稀释度 1:100), 37℃ 避光孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次, 每次 10 min。荧光倒置显微镜下观察并拍照。(6)观察各组内皮细胞网状结构及计数: 随机在倒置显微镜下 (100 倍) 取上、下、左、右及中心 5 个视野摄像记录并使用 Image J 软件计数管状结构的总长度, 取每个视野的均值。重复实验 3 次。(7)Matrigel 体外成管实验: 将 matrigel 胶按每孔 200 μl 加至预冷 24 孔板, 避免产生气泡, 37℃ 将 24 孔板孵育 15 min, 每孔接种约 1×10^5 个内皮细胞, 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 8~10 h, 倒置显微镜观察并拍照。

3. 统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数的比较采用方差分析, 数据分析采用 SPSS19.0 统计软件, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)分离培养: 光镜下可见 HUVEC 呈鹅卵石样均匀生长(图 1A)。收集第二代 HUVEC, 将 Dil 标记的 ac-LDL 与内皮细胞共培养, 荧光显微镜下 HUVEC 胞质可见红色荧光, 内皮细胞具有良好的吞噬功能(图 1B), 免疫荧光及流式检测结果显示 HUVEC 表达内皮细胞特异标志 CD31(图 1C, D)。

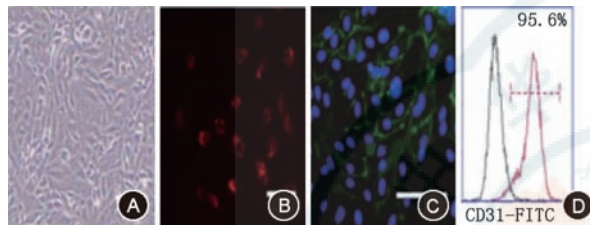


图 1 脐静脉内皮细胞(HUVEC)分离鉴定。A. HUVEC 呈鹅卵石样贴壁生长($\times 100$); B. 吞噬实验检测 HUVEC 吞噬 Dil-ac-LDL 功能, 红色为 Dil-ac-LDL 标记($\times 100$); C. 免疫荧光检测 HUVEC 表达 CD31, 绿色荧光为 FITC-CD31 标记 HUVEC 膜, 蓝色荧光为 Hoechst 标记细胞核($\times 400$); D. 流式检测 HUVEC 表达 CD31

2. WJ-MSC 与 AD-MSC 表型鉴定: 光镜下观察可见 MSC 形态均一, 呈梭形, 与成纤维样细胞形态相似。收集第三代体外培养的 MSC, 流式检测细胞表面抗原, 结果显示 WJ-MSC 与 AD-MSC 表型相似, 均高表达 CD29、CD44 和 CD105, 不表达造血系统及内皮标志 CD34、CD31 及 MHC-II 类分子 HLA-DR(图 2)。

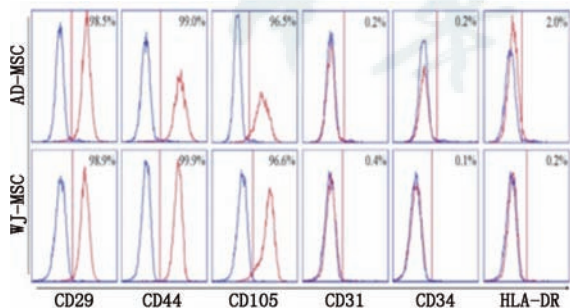


图 2 流式检测 WJ-MSC 与 AD-MSC 表型

3. WJ-MSC 与 AD-MSC 对内皮细胞血管新生相关基因表达的影响: WJ-MSC 培养上清、AD-MSC 培养上清分别与内皮细胞共培养 48 h。qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比 WJ-MSC 组和 AD-MSC 组内

皮细胞促血管新生基因 Ang1、Flk1 表达水平显著升高($P < 0.01$), 图 3A, B; 而抑制血管新生相关基因 Vash1、Spry1 的表达水平显著降低, $P < 0.01$, 图 3C, D; 但 WJ-MSC 组与 AD-MSC 组差异无统计学意义。

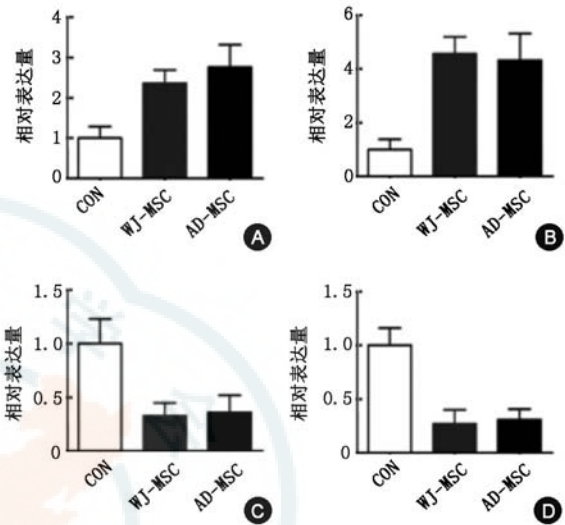


图 3 WJ-MSC 与 AD-MSC 培养上清调节血管新生相关基因表达。A, B. 促血管新生相关基因(Ang1 及 FLK1)的表达水平; C, D. 抑制血管新生相关基因(Vash1、Spry1)的表达水平。Con 为对照组; WJ-MSC 组为 WJ-MSC 培养上清与内皮细胞共培养组; AD-MSC 组为 AD-MSC 培养上清与内皮细胞共培养组

4. WJ-MSC 与 AD-MSC 对内皮细胞体外管网状结构形成的影响: 为了研究 WJ-MSC 与 AD-MSC 培养上清对内皮细胞血管新生的作用, 分别将 WJ-MSC 培养上清、AD-MSC 培养上清与内皮细胞共培养 48 h, matrigel 成管实验显示, WJ-MSC 组和 AD-MSC 组内皮细胞体外形成管网状结构的长度分别为 (94.3 ± 13.2) mm 和 (86.1 ± 7.2) mm, 而对照组为 (43.2 ± 9.2) mm。表明 WJ-MSC 与 AD-MSC 培养上清作用于内皮细胞后, 其管网状结构形成能力均明显增加 ($P < 0.01$), 图 4A, B; 而 WJ-MSC 组与 AD-MSC 组之间差异无统计学意义。

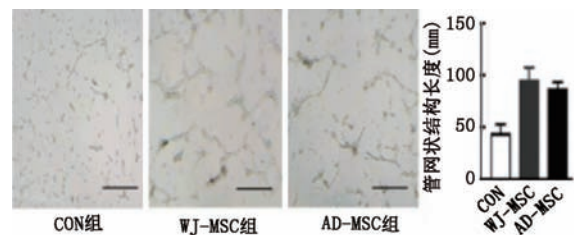


图 4 WJ-MSC 与 AD-MSC 培养上清调节内皮细胞血管新生。细胞形态 $\times 40$

讨 论

血管新生是内皮细胞以出芽方式在原有血管的基础上通过增殖、迁移及重塑等过程形成新生血管^[14],血管新生与炎症、组织损伤修复、组织缺血及肿瘤生长等多种生理和病理过程的发生密切相关^[15]。血管新生是复杂而有序的过程,主要包括内皮细胞活化、增殖、内皮细胞迁移侵袭、内皮细胞出芽、基底膜形成和新生血管成熟等多个步骤。在这一过程中,多种细胞因子、信号通路以及基质细胞构成的微环境通过调控众多的正性与负性血管新生调节因子的平衡,使血管新生维持在生理范围。针对肿瘤生长、糖尿病视网膜病变等疾病,抑制血管新生可减缓疾病的发展。然而,当某些原因导致器官或组织出现缺血,以及组织损伤修复过程中,通过外源手段促进血管新生,改善局部血供情况,可有效改善组织缺血、促进组织修复。

我们前期研究发现,女性压力性尿失禁发病过程中,阴道壁成纤维细胞可能通过旁分泌的作用抑制内皮细胞血管新生^[13],影响阴道壁组织养分和氧气的运输,进而不利于组织损伤修复。同时,本团队研究发现 WJ-MSC 脐带间充质干细胞具有促进内皮细胞血管新生的作用^[16]。但是 WJ-MSC 属于同种异体细胞,在临床应用过程中,存在伦理问题且临床监管较严格,因此目前国内干细胞相关临床应用研究多使用自体间充质干细胞,如自体 AD-MSC 或自体骨髓来源间充质干细胞,但与骨髓来源间充质干细胞相比,脂肪间充质干细胞具有取材容易、细胞量大等优势,因此本研究选用脂肪间充质干细胞,结果发现 AD-MSC 与 WJ-MSC 都具有促进血管新生的作用,且二者作用相当,说明未来临床应用方面,自体 AD-MSC 可以代替 WJ-MSC,在组织损伤修复过程中,促进血管新生,改善组织缺血,促进组织损伤修复。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(24):2277-2286. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.06.055.
- [2] Aldahmash A, Zaher W, Al-Nbaheen M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration[J]. *Ann Saudi Med*, 2012, 32(1): 68-77. DOI:10.5144/0256-4947.2012.68.
- [3] Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem Cells: an update[J]. *Cell Transplant*, 2016, 25(5):829-848. DOI:10.3727/096368915X689622.
- [4] Watt SM, Gullo F, van der Garde M, et al. The angiogenic properties of mesenchymal stem / stromal cells and their therapeutic potential[J]. *Br Med Bull*, 2013, 108:25-53. DOI: 10.1093/bmb/ldt031.
- [5] Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143(2): 181-196. DOI:10.1016/j.pharmthera.2014.02.013.
- [6] Chou SH, Lin SZ, Kuo WW, et al. Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy[J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(4-5): 513-529. DOI: 10.3727 / 096368914X678436.
- [7] De Freitas HT, Rebel MG, Coelho BP, et al. Effect of the treatment of focal brain ablation in rat with bone marrow mesenchymal stromal cells on sensorimotor recovery and cytokine production[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 348(1-2): 166-173. DOI: 10.1016/j.jns.2014.11.032.
- [8] Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, et al. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus[J]. *Front Endocrinol*, 2014, 5:86. DOI: 10.3389/fendo.2014.00086.
- [9] Colicchia M, Jones DA, Beirne AM, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in cardiovascular disease: review of preclinical and clinical data[J]. *Cytotherapy*, 2019,21(10):1007-1018. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.04.056.
- [10] Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, et al. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue derived mesenchymal stem cells in serum-free culture[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(4): 461-465. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.029.
- [11] Muhammad Suleiman A. Mesenchymal stromal cell secretome as a therapeutic strategy for traumatic brain injury[J]. *Biofactors*, 2019,45(6):880-891. DOI: 10.1002/biof.1563.
- [12] Mathew Suja Ann, Naik Charuta, Cahill Paul A, et al. Placental mesenchymal stromal cells as an alternative tool for therapeutic angiogenesis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019,29. DOI: 10.1007/s00018-019-03268-1.
- [13] 刘小春,吴素慧,王文艳,等. 压力性尿失禁患者阴道壁成纤维细胞外泌体对血管新生调节作用的研究[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(7): 510-514. DOI: 0.3760 / cma. j. issn.03762491.2019.07.007.
- [14] Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, et al. Vascular endothelial cell biology: an update[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 18. DOI: 10.3390/ijms20184411.
- [15] Li X, Sun X, Carmeliet P. Hallmarks of Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(3): 414-433. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.08.011.
- [16] Xiaochun Liu, Shiwei Wang, Suhui Wu, et al. Exosomes secreted by adipose-derived mesenchymal stem cells regulate type I collagen metabolism in fibroblasts from women with stress urinary incontinence[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9: 159. DOI:10.1186/s13287-018-0899-9.

(收稿日期:2019-11-07)

(本文编辑:刘小梅)