

骨髓基质细胞对血管内皮细胞生长及微血管形成的影响

张鹏飞, 张亚卓, 李庆国, 孙梅珍, 王红云, 何乐

[摘要] 目的 研究骨髓基质细胞(BMSCs)在体外对血管内皮细胞生长及对微血管形成的影响。方法 体外分离培养成人 BMSCs 和脑血管内皮细胞,分为共培养组、培养液组和对对照组,观察 BMSCs 对脑血管内皮细胞增殖及微血管网状结构形成的影响。结果 培养液组和共培养组对内皮细胞的增殖和微血管形成均有促进作用,共培养组的作用更为明显。结论 BMSCs 在体外促进内皮细胞的生长及微血管的形成。

[关键词] 骨髓基质细胞;内皮细胞;微血管

Effects of bone marrow stromal cells on endothelial cells proliferation and microvessel formation in vitro ZHANG Peng-fei, ZHANG Ya-zhuo, LI Qing-guo, et al. Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China

[Abstract] Objective To observe the effects of bone marrow stromal cells (BMSCs) on vessel endothelial cells proliferation and microvessel formation in vitro. Methods BMSCs and brain vessel endothelial cells were separated from adult and divided into co-culture group of BMSCs and endothelial cells, medium group of BMSCs, comparison group. Endothelial cells proliferation and microvessel formation were observed. Results Endothelial cells were promoted to proliferate and formate the microvessel in medium group and co-culture group. And the effect was prominence in co-culture group. Conclusion BMSCs can promote the proliferation and microvessel formation of endothelial cells.

[Key words] bone marrow stromal cells; endothelial cells; microvessel

中图分类号: R743 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)01-00014-02

[本文著录格式] 张鹏飞, 张亚卓, 李庆国, 等. 骨髓基质细胞对血管内皮细胞生长及微血管形成的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(1): 14-15.

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)移植修复中枢神经系统损伤是目前神经科学研究的热点之一^[1-2]。中枢神经系统损伤在神经元损伤的同时,也存在着血管损伤和局部微循环的障碍。如果在 BMSCs 移植的同时,能够促进血管修复,改善局部微循环,无疑将极大地促进神经元的修复,进而改善神经功能。为此我们应用 BMSCs 与内皮细胞共培养,观察 BMSCs 在体外对血管内皮细胞的增殖及微血管形成的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、胎牛血清:美国 HyClone 公司;0.1%胶原酶-0.5%牛血清白蛋白消化液、兔抗人 FⅧ多克隆抗体、荧光标记羊抗兔 Ig 抗体:Promega 公司;通用型二步法免疫组化试剂盒:北京中山生物技术有限公司;人 VEGF ELISA 试剂盒:晶美生物工程有限公司;6孔 Matrigel 板:BD 公司;培养箱、倒置相差显微镜、荧光显微镜、LDZ5-2 低速自动平衡离心机、酶标仪、玻璃匀浆器、尼龙网(80 μm、170 μm)。

1.2 方法

1.2.1 成人骨髓基质细胞的分离和培养 于无菌状态下取健康成人胸外伤患者肋骨 1 根(由解放军 307 医院胸外科提供),剪成 2 cm 长数段。吸取 DMEM 培养液 10 ml 放入平皿中,用 23 G 针头 10 ml 注射器,每

次吸取培养液 1~2 ml 从一端冲洗骨髓腔到平皿中。用吸管吹打,后用 150 目尼龙网过滤去除碎骨片。常温下 600 g 离心 5 min(LDZ5-2 低速自动平衡离心机,1600 r/min),去除上清。加入 DMEM/10%FBS 培养液 10 ml,并计数,将细胞稀释后接种于 25 cm² 培养瓶中(8000 细胞/cm²)。放入含 5% CO₂ 37℃培养箱中培养,于倒置相差显微镜下观察细胞生长状况,每 3~4 d 更换培养液,去除未贴壁细胞,2 周后收得到骨髓基质细胞。

1.2.2 成人脑血管内皮细胞的分离培养 于无菌状态下取行颞叶切除手术的癫痫患者的脑组织(由北京天坛医院神经外科提供)。在玻璃匀浆器中上下抽动 30 次,经孔径 170 μm 的尼龙网过滤,收集滤液,再经孔径 80 μm 的尼龙网过滤,350 g 离心,弃上清。将沉淀移入 0.1%胶原酶-0.5%牛血清白蛋白消化液中 37℃15 min 后,350 g 离心 10 min, Hanks 液冲洗,镜下观察,接种于 25 cm² 培养瓶中,DMEM 培养基中加入 0.02 μg/ml bFGF,于 37℃ 5% CO₂ 95%湿度培养箱中培养,每 3 d 换培养液 1 次。

1.2.3 骨髓基质细胞及培养液促进内皮细胞增殖作用

1.2.3.1 分组 对照组(a):用 DMEM 培养基(20% FBS)培养内皮细胞;培养液组(b):用 1/2 DMEM 培养基(20% FBS)和 1/2 第 4 天收集的骨髓基质细胞培养液培养内皮细胞;共培养组(c):正常生长的骨髓基质细胞和内皮细胞直接接触培养于 DMEM 培养基(20% FBS);固定组(d):将固定的骨髓基质细胞和内皮细胞接触共培养于 DMEM 培养基(20% FBS)。其

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271323)。

作者单位:北京市神经外科研究所,北京天坛医院,北京市 100050。
作者简介:张鹏飞(1973-),男,山东沂水市人,博士,主治医师,主要研究方向:中枢神经系统损伤的修复。通讯作者:张亚卓。

中 a、b 组将第 3 代内皮细胞以 2×10^5 细胞/ cm^2 接种于预先包被多聚赖氨酸的培养皿中, c 组将内皮细胞以 2×10^5 细胞/ cm^2 接种于正常生长的骨髓基质细胞表面, d 组将骨髓基质细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中 (8000 细胞/ cm^2), 4 %多聚甲醛固定 48 h, 再将内皮细胞以 2×10^5 细胞/ cm^2 接种于骨髓基质细胞表面。每组各接种 10 瓶。

1.2.3.2 免疫组织化学染色和细胞计数 兔抗人 VIII Ag 抗体二步法免疫组化染色(VIII 抗体工作液浓度 1 : 300), 荧光标记羊抗兔 Ig 抗体检测。按常规进行细胞的免疫组织化学染色, 在倒置荧光显微镜下随机选择 5 个不同视野, 每个视野计数 200 个细胞, 计数阳性细胞。

1.2.3.3 统计学处理 将 3 次独立实验结果经 SPSS 统计软件处理, 组间采用 student *t* 检验进行显著性分析。

1.2.4 骨髓基质细胞及培养液对血管内皮细胞体外微血管样结构形成的影响

1.2.4.1 水化 Matrigel 板 室温下 DMEM 培养基加入 6 孔 Matrigel 板, 每孔 10 ml, 37 °C 培养箱中孵育 2 h 后弃去培养液。

1.2.4.2 实验分组 培养液组(a): 取 1/2 骨髓基质细胞培养液(第 4 天), 1/2 20 % FBS 的 DMEM 培养基培养内皮细胞; 共培养组(b): 20 % FBS 的 DMEM 培养基培养骨髓基质细胞和内皮细胞; 对照组(c): 取同量 20 % FBS 的 DMEM 培养基培养内皮细胞。其中 a、c 组是将第 3 代内皮细胞以 2×10^5 细胞/ cm^2 接种, b 组将内皮细胞和骨髓基质细胞分别以 1×10^5 细胞/ cm^2 接种, 每组各接种 10 瓶。

于 1 d、3 d、5 d 观察记录体外微血管网的形成。计算体外形成微血管的总长度并进行统计学处理。公式:

$$APL_{(T)} = \Sigma i \times \pi/4 \times d$$

$APL_{(T)}$: 微血管长度; Σi : 微血管网与参考网格的交叉点数; d : 网格边长

2 结果

原代培养骨髓基质细胞及内皮细胞生长情况良好。见封三彩图 3.1 ~ 3.2。

内皮细胞 VIII 阳性数培养液组 (36.4 ± 3.68)/200 细胞与固定组 (31.8 ± 2.76)/200 细胞均优于对照组 (11.6 ± 5.73)/200 细胞(均 $P < 0.05$), 但前两组之间无显著性差异; 共培养组为 (61.3 ± 7.54)/200 细胞, 与培养液组和固定组之间有显著性差异(均 $P < 0.05$)。

与对照组相比, 培养液组和共培养组均明显促进了内皮细胞在体外微血管样结构的形成(均 $P < 0.05$), 并具有时间相关性, 后两组之间也有显著性差异($P < 0.05$)。见表 2, 封三彩图 3.3。

表 1 各组微血管总长度比较(μm)

组别	1 d	3 d	5 d
对照组	1032.5 ± 107.1	1332.6 ± 79.4	1755.8 ± 68.8
培养液组	1967.3 ± 150.2 ^a	2273.6 ± 61.4 ^a	2768.1 ± 39.5 ^a
共培养组	3174.2 ± 54.3 ^{a,b}	3968.0 ± 77.3 ^{a,b}	5516.3 ± 82.5 ^{a,b}

注: a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与培养液组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

1867 年, 德国病理学家 Cohnhein 首次提出骨髓基质细胞这一概念^[3], 认为是骨髓内造血干细胞以外的非造血干细胞。骨髓基质细胞为造血细胞提供的微环境包括其分泌的可溶性物质(细胞因子、蛋白等)、细胞表面分子和细胞外基质。我们观察到, 骨髓基质细胞培养液与对照组相比明显促进了内皮细胞的增殖, 表明骨髓基质细胞分泌的可溶性分子(如我们检测到的培养液中存在血管内皮生长因子——VEGF)起重要作用。培养液中是否还有其他促进内皮细胞增殖的因子, 尚有待于进一步研究。

外源性生长因子对创伤修复的作用已成为当今创伤修复学研究的热点^[4-5]。由于骨髓基质细胞可以分泌 VEGF 等生长因子^[6-7], 移植骨髓基质细胞, 相当于引入了外源性生长因子, 这成为骨髓基质细胞移植修复损伤的理论基础之一。

Kawasaki 等的研究发现, 经固定的骨髓基质细胞仍然可以调节胚胎干细胞的分化, 因而推断骨髓基质细胞表面分子和细胞外基质具有一定功能^[8]。为验证这一点, 我们使用经固定的骨髓基质细胞与内皮细胞共培养, 排除了骨髓基质细胞分泌的生长因子和细胞因子的作用, 分析骨髓基质细胞表面分子和细胞外基质对内皮细胞的影响, 结果发现内皮细胞增殖较快, 提示骨髓基质细胞对内皮细胞的调节作用与细胞表面分子和细胞外基质有关。骨髓基质细胞与内皮细胞直接接触共培养, 内皮细胞的增殖速度较培养液组和固定组明显加快也说明骨髓基质细胞对内皮细胞的作用是其外分泌功能和其表面蛋白共同作用的结果。

[参考文献]

[1] Dezawa M, Hoshino M, Ide C, et al. Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons [J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5(4): 427 - 435.

[2] Brodhun M, Bauer R, Patt S. Potential stem cell therapy and application in neurotrauma [J]. Exp Toxicol Pathol, 2004, 56(1 - 2): 103 - 112.

[3] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. Science, 1997, 276(5309): 71 - 74.

[4] 王正国. 创伤修复与生长因子 [J]. 中国修复重建外科杂志, 1999, 13(5): 257.

[5] Chen Q, Long Y, Yuan X, et al. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors [J]. J Neurosci Res, 2005, 80(5): 611 - 619.

[6] Villars F, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: Role of VEGF [J]. J Cell Biochem, 2000, 79(4): 672 - 685.

[7] Kaigler D, Krebsbach PH, Poverini PJ. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells [J]. Tissue Eng, 2003, 9(1): 95 - 103.

[8] Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity [J]. Neuron, 2002, 28(1): 31 - 40.

(收稿日期: 2005-10-25 修回日期: 2005-12-19)

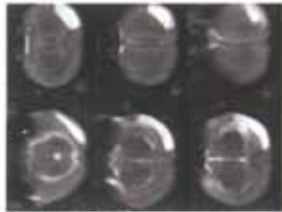


Fig. 2.5 MR T2-weighted imaging

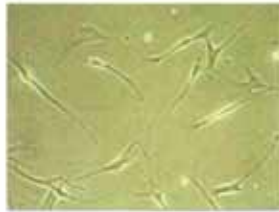


图3.1 原代培养13 d时骨髓基质细胞 (相差, 50 ×)



图3.2 原代培养3 d时脑血管内皮细胞 (相差, 50 ×)



图3.3 共培养组5 d时体外微血管网形成