

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.003

人脐带血中内皮克隆形成细胞的分离和培养*

贾 静 余 俊 王少帅 张婧怡 冯 玲[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科 优生产前诊断研究室 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:脐带血来源的内皮克隆形成细胞具有高度增殖、自我更新和血管生成的能力,是再生医学和母胎医学领域研究的热点。本研究旨在提出一种有效的、可靠的人脐带血中内皮克隆形成细胞分离和培养方法。**方法:**取抗凝脐血,采用密度梯度离心法分离单核细胞并进行贴壁培养,在细胞克隆形成但未融合成片时,进行单克隆的挑取再培养,最后对所得细胞进行表型和功能的鉴定。**结果:**所获细胞增殖能力强,形态单一,呈鹅卵石样,连续传代8次,未见细胞性状改变。接种到基质胶上,细胞可连接为管状、网状结构。能摄取培养液中的低密度脂蛋白并结合荆豆凝集素,细胞免疫荧光显示其表达典型的内皮细胞标志性分子 CD31、eNOS、VE-Cadherin、vWF。**结论:**通过本研究的方法,我们从脐带血中获得足够数量和高纯度的内皮克隆形成细胞,这为进一步的实验研究提供了可靠的基础。

关键词:内皮克隆形成细胞;脐带血;细胞分离和培养

中图分类号:R-33;Q78;Q813;R329.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)10-1812-04

Isolation and Primary Culture of Endothelial Colony Forming Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood*

JIA Jing, YU Jun, WANG Shao-shuai, ZHANG Jing-yi, FENG Ling[△]

(Laboratory of Prenatal Diagnosis of Department of Gynaecology and Obstetrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

ABSTRACT Objective: Umbilical cord blood-derived endothelial colony forming cells (ECFCs) have high proliferation potential, self-renewal and vessel forming capacity. It is well studied in the field of regenerative and maternal-fetal medicine. This study aims to propose an effective and reliable method for ECFCs isolation and culture from umbilical cord blood. **Methods:** Heparin is used as anticoagulant, density gradient centrifugation and adherent culture is used for ECFCs isolation. When clones are formed but not fused, monoclonal is selected and passaged. Finally, the obtained cells are subjected to phenotypic and functional characterization. **Results:** The obtained cells exhibit high proliferation ability, presented as cobblestone-like appearance and can form tubular structure. They can intake ac-LDL, combine Ulex-lectin and express the typical molecular markers of endothelial cells (namely CD31, eNOS, VE-Cadherin, vWF). **Conclusions:** By this efficient isolation method, sufficient and high-quality of ECFCs from cord blood can be obtained, providing a reliable basis for further experimental research.

Key words: Endothelial colony-forming cells (ECFCs); Cord blood; Cell isolation and culture

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; Q813; R329.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1812-04

前言

脐带血中除富含造血干细胞以外,还含有丰富的内皮祖细胞(Endothelial progenitor cells, EPCs)^[1]。EPCs 来源于骨髓,循环于外周血,具有高度增殖、自我更新和血管生成的能力^[2]。有研究报道,妊娠期糖尿病^[3,4]、妊娠期高血压疾病^[5]等多种妊娠并发症会减少新生儿脐血中 EPCs 的数量并损害其功能,这可能会使后代罹患心血管疾病和代谢性疾病的风险增高^[6,7]。因此,研究何种不良妊娠状况会对脐血中 EPCs 的数量和功能产生影响以及寻找挽救的方法对后代健康具有重要的意义。

内皮克隆形成细胞 (Endothelial colony-forming cells,

ECFCs)是一种内皮祖细胞的亚群,其能直接整合入血管壁,参与新生血管的生成^[8],因此常被应用于基础和临床研究。ECFCs 的分离、纯化、鉴定以及扩增是进行研究的前提,但很多文献对此报道不一致^[9,10],在此,我们提出一种有效的、可靠的分离培养方案。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

实验所用脐带血均经产妇本人和家属同意,并签署知情同意书,EGM-2 BulletKit 培养基套装 (产品编号 cc-3162) 购自 Lonza 公司,鼠抗人 CD31 单克隆抗体、兔抗人 VE-Cadherin 单

* 基金项目:国家重点研究发展计划项目(2016YFC1000405)

作者简介:贾静(1990-),女,博士研究生,研究方向:妊娠期糖尿病,电话:15872376993, E-mail:157532240@qq.com

[△] 通讯作者:冯玲(1963-),女,主任医师,博士生导师,研究方向:围产医学,电话:13871402429, E-mail:fltj007@163.com

(收稿日期:2018-01-03 接受日期:2018-01-27)

克隆抗体以及鼠抗人 vWF 单克隆抗体购自 abcam 公司, 兔抗人 eNOS 多克隆抗体购自 GeneTex 公司, Dylight 488 羊抗兔抗体和 Dylight 594 羊抗鼠抗体购自 Abbkine 公司, Dil-ac-LDL 购自 Biomedical Technologies Inc, FITC-Ulex-lectin 购自美国 Sigma 公司, matrigel 胶购自美国 corning 公司, DAPI 购自上海碧云天生物技术有限公司, 细胞分离液购自美德太平洋生物科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

拍照系统为 OLYMPUS 荧光显微镜。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的分离和培养 实验前一天, 用浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 I 型鼠尾胶包被 6 孔板, 并将 6 孔板置于细胞培养箱中过夜, 次日在细胞操作台内移除鼠尾胶, 并用 PBS 清洗孔板 2 遍。在手术室, 用 50 mL 注射器收集脐血约 30 mL, 拔掉针头, 将脐血转入装有 300U 肝素钠的 50 mL 离心管中 (肝素钠的抗凝浓度为 10 U/mL 脐血) 并使之混匀, 2 h 之内常温转运至实验室。细胞操作台内, 将 15 mL 脐血和 15 mL PBS 缓冲液加入到 1 支 50 mL 离心管中, 并用移液管吹打混匀, 将 15 mL 细胞分离液加入到另 1 支 50 mL 离心管中。将上述 30 mL 稀释的脐血, 沿着离心管管壁, 缓慢加到细胞分离液层面之上。按照相同的方法处理另外 15 mL 脐血。1500 转常温去闸离心 30 min。小心取出离心管, 可见最上层为淡红色透明血浆, 其次为薄薄的致密白色环状层, 然后为细胞分离液层, 最后为红细胞沉淀层。用移液管小心吸取白色环状层液体, 加入到含 15 mL EGM-2 培养液的 50 mL 离心管中, 1500 转常温离心 15 min。吸弃上层液体, 用 EGM-2 完全培养基重悬细胞沉淀, 以 $1.25 \times 10^7/\text{mL}$ 的细胞密度接种于包被好的 6 孔板中, 置于细胞培养箱中。每 24 h 换液 1 次, 培养 7 天后, 每 48 h 换液 1 次。培养 5 天左右, 即可看到散在的形态饱满的鹅卵石样细胞。培养 12 天左右, 细胞增殖呈团状, 在显微镜下用记号笔标记细胞克隆所在位置 (ECFC 明显区别于长梭形的成纤维细胞), 在细胞台中用大号枪头在标记的位置挑取细胞团并吹散于 EGM-2 细胞培养液中, 接种于新 6 孔板中继续培养, 后续 3-5 代细胞用于实验 (见图 1A)。

1.3.2 细胞的成管实验 Matrigel 胶置于 4℃ 冰箱中过夜融化, 中枪头和 96 孔板置于 -20℃ 冰箱中过夜预冷, 次日, 96 孔板中每孔加入 50 μL 的 matrigel 胶, 避免产生气泡, 37℃ 孵育 2 h。用胰酶消化细胞, 调整接种密度约为 3×10^4 个 / 孔, 37℃ 孵育 6 h 后观察拍照 (见图 1B)。

1.3.3 细胞对 Dil-ac-LDL 的摄取和与 FITC-Ulex-lectin 的结合 移除 6 孔板中的旧培养基并用 PBS 洗 2 遍, 每孔加入 1 mL 含 Dil-ac-LDL 的新培养基 (Dil-ac-LDL 工作浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$), 置

于细胞培养箱中孵育 4 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加入 1 mL 4% 的多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 注意避光。每孔中加入 1 mL 含 FITC-Ulex-lectin 的 PBS (FITC-Ulex-lectin 工作浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$), 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加入 DAPI, 避光孵育 1 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 荧光显微镜下观察拍照 (见图 2)。

1.3.4 内皮细胞标志性分子的鉴定 胰酶消化、EGM-2 完全培养基重悬细胞后, 以适当的细胞密度接种于放有细胞爬片的 24 孔培养板内。次日, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。0.1 % Triton X-100 和 5 % BSA (PBS 配制) 室温通透、封闭 30 min 后, 用眼科镊小心夹出细胞爬片, 将细胞面朝下覆于载有 40 μL 一抗溶液的载玻片上 (一抗按照说明书稀释 100 倍), 4℃ 湿盒内孵育过夜。次日, 将细胞爬片夹入 6 孔板内, 细胞面朝上, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用镊子夹出细胞爬片, 将细胞面朝下覆于载有 40 μL 荧光二抗溶液的载玻片上 (荧光二抗按照说明书稀释 500 倍), 室温湿盒内孵育 1 h。将细胞爬片夹入 6 孔板内, 细胞面朝上, PBS 洗 3 次, 每次 5 min (后续操作步骤都需避光)。滴加 DAPI 覆盖细胞, 孵育 1 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用镊子夹出细胞爬片, 将细胞面朝下覆于滴有抗荧光淬灭剂的载玻片上, 稳定后观察拍照 (见图 3)。

2 结果

2.1 形态学观察

培养第 12 天, 可见单个细胞已增殖为细胞克隆。细胞形态饱满, 呈鹅卵石样, 可见少数散在的长梭形成纤维样细胞。挑取单个克隆再接种于 6 孔板中, 细胞长满后用胰酶消化并接种于 96 孔板 Matrigel 胶上, 培养 6 h 后显微镜下观察, 可见细胞连接成网状、管状结构。

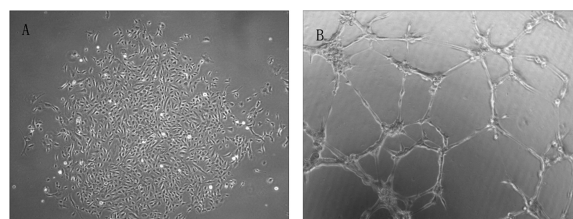


图 1 细胞克隆(A)和体外成管(B)

Fig.1 Cell colony and in vitro angiogenesis

2.2 Dil-ac-LDL 摄取和 FITC-Ulex-lectin 结合

细胞能分别摄取和结合培养液中的 ac-LDL (乙酰化低密度脂蛋白) 和 Ulex-lectin (荆豆凝集素), 呈现红绿双色荧光, 这是目前来说最成功的最普遍的从功能学角度来鉴定内皮细胞的方法。

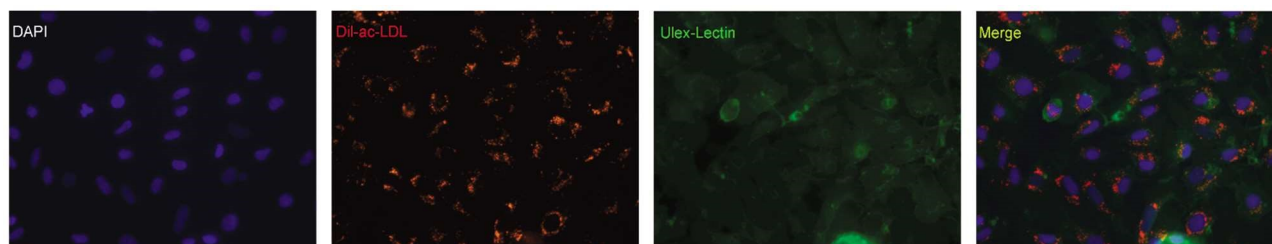


图 2 乙酰化低密度脂蛋白的摄取和荆豆凝集素的结合 (荧光双染)

Fig.2 Dil-ac-LDL uptaken and Ulex-lectin binding (double-positive fluorescence)

2.3 细胞免疫荧光

CD31、eNOS、VE-Cadherin、vWF 是常用的鉴定内皮细胞的标志性分子。eNOS 能催化精氨酸合成 NO，维持血管的功能；VE-Cadherin 表达于细胞膜，对维持细胞间的连接不可或缺，免疫荧光明显勾勒出了细胞膜的形态；vWF 由内皮表达和

分泌，参与止血、炎症和血管生成等生理过程，免疫荧光勾勒出了短棒状的 Weibel-Palade 小体^[14]（血管内皮细胞中一种特殊的分泌性杆状细胞器，含有多生物活性分子，主要是 vWF）。此 4 种细胞分子的共表达证明了培养细胞的内皮属性。

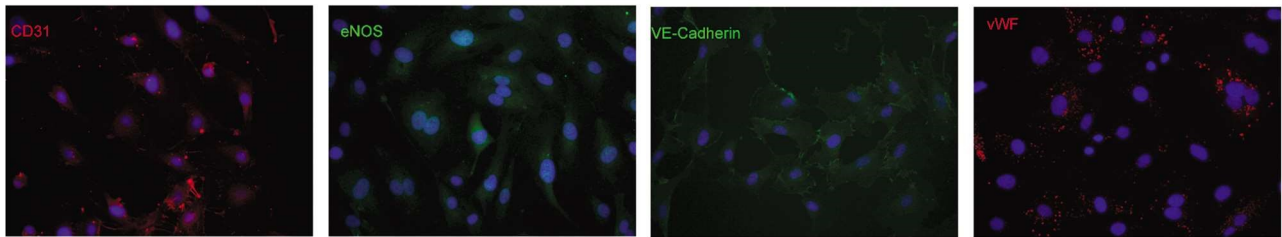


图 3 CD31、eNOS、VE-Cadherin 和 vWF 分子的免疫荧光染色

Fig.3 Immunofluorescence staining for CD31, eNOS, VE-Cadherin and vWF

3 讨论

应用上述实验方法，我们从脐带血中获得了足够数量和高纯度的 ECFCs，在体外连续传代（8 代左右）培养时，细胞性状保持稳定。结合已有文献的分离、培养方法，我们提出以下几点建议：细胞培养液应首选 EGM-2 套装，其添加了促进内皮细胞生长的多种细胞因子，是培养原代 ECFCs 的最佳选择；10 U/mL 脐血的肝素钠足以抗凝，且对细胞活性影响较小；I 型鼠尾胶包被细胞培养板能极大地促进细胞的贴壁生长；不同实验室的离心机型号可能不同，因此要根据具体情况对最佳转速进行摸索；细胞接种一周之内，每天都需更换培养液，以去除大量未贴壁的髓系细胞，大约 12 天左右，在克隆形成但尚未融合成片时，将单个克隆挑出再接种，这极大地减少了成纤维样细胞等杂细胞的污染；进行实验研究时，优选第 3-5 代的细胞，以防体外培养时间过长，细胞发生变异。ECFCs 的培养周期相对较长，体外培养条件的优化不仅能提高培养成功率，而且能更好地模拟细胞的在体情况^[12]。体外培养 ECFCs 所用的胎牛血清，是扩增 ECFCs 应用到临床的一大阻碍（存在免疫排斥和动物源性传染病的可能），有研究者提出无动物血清的培养条件^[13-15]，包括直接用脐带血清、血小板裂解物以及各种生长因子的鸡尾酒培养法，目前仍处在探索阶段。

研究表明不良妊娠状况会影响新生儿脐血中 ECFCs 的数量和功能^[16,17]，继而可能会使后代患代谢综合征和心脑血管疾病等的风险增高。因此，我们有必要研究何种不良妊娠状况会以何种程度何种方式影响 ECFCs，从而寻找有效的挽救措施。有研究表明^[4,18]孕期补充维生素 D 或许可在一定程度上挽救妊娠期糖尿病、妊娠期高血压疾病导致的新生儿 ECFCs 功能障碍，尽管这还需要更多的随机对照研究进行佐证，但为未来的研究提供了方向。ECFCs 在再生医学领域的研究仍处在临床前阶段^[19-21]，目前所报道的应用剂量、途径、疗效观察指标等不尽相同。ECFCs 移植后的存活和增殖是发挥治疗作用的前提，然而宿主的免疫排斥、移植环境的炎症反应（比如肢体缺血损伤、心肌梗死）等都会导致其凋亡和衰老，有研究者提出 ECFCs 与间充质干细胞共移植^[22]、移植 ECFC 来源的外泌体^[23,24]或者对 ECFCs 在移植前进行预处理^[25-27]等措施都能在一定程度上解决

上述问题。随着对 ECFCs 研究的不断深入，相信其终将在母胎医学和再生医学领域大放异彩。

参考文献 (References)

- [1] Javed MJ M L P D. Endothelial Colony Forming Cells and Mesenchymal Stem Cells are Enriched at Different Gestational Ages in Human Umbilical Cord Blood[J]. *Pediatr Res*, 2008, 1(64): 68-73
- [2] Zwaginga JJ D P. Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: possible therapies for tissue repair and tissue engineering[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 11(30): 900-908
- [3] Dincer U D. Fetal exposure to a diabetic intrauterine environment resulted in a failure of cord blood endothelial progenitor cell adaptation against chronic hypoxia [J]. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 2015, (8): 1-14
- [4] Gui J, Rohrbach A, Borns K, et al. Vitamin D rescues dysfunction of fetal endothelial colony forming cells from individuals with gestational diabetes[J]. *Placenta*, 2015, 36(4): 410-418
- [5] Munoz-Hernandez R, Miranda M L, Stiefel P, et al. Decreased Level of Cord Blood Circulating Endothelial Colony-Forming Cells in Preeclampsia[J]. *Hypertension*, 2014, 64(1): 165-171
- [6] Wing Hung Tam, Ronald Ching Wan Ma, Xilin Yang, et al. Glucose Intolerance and Cardiometabolic Risk in Adolescents Exposed to Maternal Gestational Diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2010, 6(33): 1382-1384
- [7] Vaarasmäki M, Pouta A, Elliot P, et al. Adolescent Manifestations of Metabolic Syndrome Among Children Born to Women With Gestational Diabetes in a General-Population Birth Cohort [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2009, 169(10): 1209-1215
- [8] Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000, 11(105): 1527-1536
- [9] Zhang Mei-hua Z Y G L. The number and functional analysis of endothelial progenitor cells in maternal peripheral blood and umbilical cord blood[J]. *Chinese Journal of Family Planning & Gynecotokology*, 2012, (04): 31-34
- [10] Zhao Meng-die. Study on the separation, culturation and identification of human umbilical cord blood progenitor cells [J]. *Journal of Bengbu Medical College*, 2016, (09): 1121-1124
- [11] Takehiro Torisu K T I H. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor[J]. *Nature*

- medicine, 2013, 10(19): 1281-1287
- [12] Coldwell K E, Lee S J, Kean J, et al. Effects of obstetric factors and storage temperatures on the yield of endothelial colony forming cells from umbilical cord blood[J]. *Angiogenesis*, 2011, 14(3): 381-392
- [13] Denecke B, Horsch L D, Radtke S, et al. Human endothelial colony-forming cells expanded with an improved protocol are a useful endothelial cell source for scaffold-based tissue engineering [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015, 9 (11): E84-E97
- [14] Huang L, Critser P J, Grimes B R, et al. Human umbilical cord blood plasma can replace fetal bovine serum for in vitro expansion of functional human endothelial colony-forming cells[J]. *Cytotherapy*, 2011, 13(6): 712-721
- [15] Zeisberger S M, Zoller S, Riegel M, et al. Optimization of the culturing conditions of human umbilical cord blood-derived endothelial colony-forming cells under xeno-free conditions applying a transcriptional approach[J]. *Genes to Cells*, 2010, 15(7): 671-687
- [16] Vassallo P F, Simoncini S, Ligi I, et al. Accelerated senescence of cord blood endothelial progenitor cells in premature neonates is driven by SIRT1 decreased expression[J]. *Blood*, 2014, 123(13): 2116-2126
- [17] Rafael Moreno-Luna R M N R. Maternal Body-Mass Index and Cord Blood Circulating Endothelial Colony-Forming Cells[J]. *The Journal Of Pediatrics*, 2014, 3(164): 566-571
- [18] Frauke Von Versen-Hoynck L B R D. Vitamin D Antagonizes Negative Effects of Preeclampsia on Fetal Endothelial Colony Forming Cell Number and Function[J]. *Plos one*, 2014, 6(9): e98990
- [19] Reid E, Guduric-Fuchs J, O'Neill C L, et al. Preclinical Evaluation and Optimization of a Cell Therapy Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells for Ischemic Retinopathies [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(1): 59-67
- [20] Grandvilllemin I, Garrigue P, Ramdani A, et al. Long-Term Recovery After Endothelial Colony-Forming Cells or Human Umbilical Cord Blood Cells Administration in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(11): 1987-1996
- [21] Xin-tao Huang Y Z S L. Intracerebroventricular Transplantation of ex vivo Expanded Endothelial Colony-Forming Cells Restores Blood Brain Barrier Integrity and Promotes Angiogenesis of Mice with Traumatic Brain Injury[J]. *J Neurotrauma*, 2013, 24(30): 2080-2088
- [22] Naima Souidi M S J R. Stromal Cells Act as Guardians for Endothelial Progenitors by Reducing their Immunogenicity after Co-transplantation[J]. *StemCells*, 2016, 5(35): 1233-1245
- [23] Burger D, Viñas J L, Akbari S, et al. Human Endothelial Colony-Forming Cells Protect against Acute Kidney Injury [J]. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(8): 2309-2323
- [24] As J V, Burger D, Zimpelmann J, et al. Transfer of microRNA-486-5p from human endothelial colony forming cell-derived exosomes reduces ischemic kidney injury[J]. *Kidney International*, 2016, 6(90): 1238-1250
- [25] Lee J H, Lee S H, Choi S H, et al. The Sulfated Polysaccharide Fucoidan Rescues Senescence of Endothelial Colony-Forming Cells for Ischemic Repair[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1939-1951
- [26] Gremmels H, de Jong O G, Hazenbrink D H, et al. The Transcription Factor Nrf2 Protects Angiogenic Capacity of Endothelial Colony-Forming Cells in High-Oxygen Radical Stress Conditions[J]. *Stem Cells International*, 2017, 2017: 1-11
- [27] Mena H A, Lokajczyk A, Dizier B, et al. Acidic preconditioning improves the proangiogenic responses of endothelial colony forming cells[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(4): 867-879

(上接第 1827 页)

- [24] Ksiazek-Winiarek D, Szpakowski P, Turniak M, et al. IL-17 Exerts Anti-Apoptotic Effect via miR-155-5p Downregulation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2017, 63(3-4): 320-332
- [25] Saitoh K, Kon S, Nakatsuru T, et al. Anti-IL-17A blocking antibody reduces cyclosporin A-induced relapse in experimental autoimmune encephalomyelitis mice [J]. *Biochemical and Biophysical Report*, 2016, 8: 139-145
- [26] Gonçalves RSG, Pereira MC, Dantas AT, et al. IL-17 and related cytokines involved in systemic sclerosis: Perspectives[J]. *Autoimmunity*, 2017, 19: 1-9
- [27] Pidala J, Beato F, Kim J, Betts B, et al. In vivo IL-12/IL-23p40 neutralization blocks Th1/Th17 response after allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Haematologica*, 2017[Epub ahead of print]
- [28] Krasimirova E, Velikova T, Ivanova-Todorova E, et al. Treg/Th17 cell balance and phytohaemagglutinin activation of T lymphocytes in peripheral blood of systemic sclerosis patients [J]. *World Journal of Experiment Medicine*, 2017, 7(3): 84-96
- [29] Kumar P, Misra P, Thakur CP, et al. T cell suppression in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients: impact of parasite load[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2017[Epub ahead of print]