

糖尿病大鼠骨髓内皮祖细胞的培养与鉴定

黄启荣 闫醒军 刘 勇 何延政 施 森 石镁虹

摘 要 **目的** 探讨糖尿病大鼠骨髓来源的内皮祖细胞体外诱导、培养和扩增的方法。**方法** 用密度梯度离心法采集糖尿病大鼠骨髓单个核细胞,在含有血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的 M199 培养基中进行体外培养。应用免疫组织化学和免疫荧光法鉴定内皮祖细胞的 CD34 和 CD133,并通过检测其对 FITC 标记的 UEA - 1 的吸附和 DiI - acLDL 的吞噬来进行细胞功能的鉴定。**结果** 在培养 2 天后部分细胞开始贴壁、变大,并逐渐伸展呈梭形。第 7 天时贴壁细胞增生明显,“集落”样生长。培养第 7 天细胞 CD34 和 CD133 均呈阳性,激光共聚焦显微镜观察显示 EPC 可以同时吞噬 ac - LDL 并结合 UEA - 1。**结论** 糖尿病大鼠骨髓可以分离培养出内皮祖细胞,并能体外扩增,为糖尿病内皮祖细胞的移植研究奠定了基础。

关键词 糖尿病 骨髓 内皮祖细胞

Culture and Identification of Endothelial Progenitor Cells from Bone Marrow of Diabetic Rat. Huang Qirong, Yan Xingjun, Liu Yong, He Yanzheng, Shi Sen, Shi Meihong. Department of General Surgery, The People's Hospital of Qionglai City, Sichuan 611530, China

Abstract **Objective** To explore the induction, training and expansion in vitro of endothelial progenitor cells from bone marrow of diabetic rat. **Methods** Mononuclear cells were harvested from bone marrow of diabetic rat by density gradient centrifugation and were induced in M199 medium containing VEGF and bFGF. The specific protein expression of endothelial progenitor cells for CD34 and CD133 were observed by immunohistochemistry and immunofluorescence. The biological functions of endothelial progenitor cells were examined by the adsorption of Ulex Europaeus Agglutinin (UEA) labeled by fluorescein isothiocyanate (FITC) and DiI labeled by acetylated low density lipoprotein internalization. **Results** Cultured cells showed the characteristic of adherence and were gradually extended spindle in the second days after the culture. In the 7th day, the adherent cells proliferated faster and exhibited the clone - like morphology and were positive for CD34 and CD133. The cells could take up DiI - acLDL and bind to FITC - UEA - 1, which showed double positive fluorescence under LSCM. **Conclusion** The mononuclear cells from bone marrow of diabetic can be differentiated into EPCs under certain condition, which provides the basic for clinical application of endothelial progenitor cells transplantations.

Key words Diabetes mellitus; Bone marrow; Endothelial progenitor cells

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 是一种能直接分化为血管内皮细胞的前体细胞,在某些生理或病理状态下,可归巢到相应部位,分化为血管内皮细胞,参与血管新生。EPC 在糖尿病血管病变中的作用正日益受到人们的重视。本实验的目的是要探讨糖尿病大鼠骨髓来源 EPC 的提取、体外培养及生物学特性,为糖尿病时进行 EPC 移植研究提供实验基础。

材料与方法

1. 主要试剂:链脲佐菌素, Sigma 公司;大鼠淋巴细胞分离液,天津灏洋生物制品有限公司;M199, Sigma 公司;重组鼠碱性成纤维细胞生长因子和重组鼠血管内皮生长因子, Prospec

公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料研究所;兔抗大鼠 CD34 单克隆抗体,美国 Sant - Cruz 公司;FITC 标记 CD133 抗体, BioLegend 公司;FITC 标记 UEA - 1, Sigma 公司;DiI 标记的 acLDL, Molecular Probe 公司。

2. 糖尿病动物模型的建立:选取体重在 190 ~ 210g 的雄性 SD 大鼠,水和食物均自由摄取,室温维持在 18 ~ 20℃。适应性喂养 1 周,造模前动物过夜禁食不禁水 12h 以上。按 50mg/kg 一次性腹腔快速注射 1% 的链脲佐菌素液,使用代谢笼单只喂养。在注射链脲佐菌素 14 天后,空腹采集动物的尾静脉血,用快速血糖测定仪测定血糖,血糖浓度 > 16.65 mmol/L 判定为糖尿病动物模型。

3. 糖尿病大鼠骨髓单个核细胞的分离培养:无菌解剖分离出四肢长骨,放入含有 PBS 的培养皿中,剪去长骨两端,暴露骨髓腔,用 5ml 注射器抽取含有肝素的 PBS 液冲洗骨髓腔至冲洗液清澈为止。收集骨髓腔冲洗液至 15ml 离心管内, 1000r/min 离心 5min, 弃去上清和脂肪,在试管内加入 PBS 5ml 充分吹打混匀细胞。另取 15ml 离心管,加入分离液 5ml, 将细胞悬液沿管壁小心加至分离液面上层,使两层间形成明

作者单位:611530 四川省邛崃市人民医院普外科(黄启荣);河北省唐山市工人医院心脏血管外科(闫醒军);四川省泸州医学院附属医院血管外科(刘勇、何延政、施森、石镁虹)

通讯作者:何延政,电子邮箱:heyangzheng@163.com

显界面,2000r/min 离心 20min。吸取中间白色云雾状层细胞,以 PBS 洗涤,1500r/min 离心 5min,重复 2 次,细胞计数。用含有 20% 优质胎牛血清、VEGF 20ng/ml、bFGF 5ng/ml 的 M199 培养液调整细胞密度,以 1×10^6 /ml 接种于纤粘蛋白包被的培养板中。在 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 2~3 天后更换培养液,PBS 洗掉非贴壁细胞。倒置相差显微镜连续观察体外培养的 EPC 的形态、生长及增生情况。取培养 7 天的贴壁细胞试验。

4. EPC 的鉴定:(1) EPC 的免疫组织化学 CD34 检测:取培养第 7 天原代 EPC,用 4% 多聚甲醛固定,5% BSA 封闭,滴加 1:100 倍稀释的大鼠 CD34 抗体,4℃ 过夜。滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG,37℃ 孵育 20min。滴加试剂 SABC,37℃ 孵育 20min,PBS 清洗后 DAB 显色,中性树胶封片后观察。(2) EPC 的 CD133 免疫荧光检测:取原代 EPC,以 4% 多聚甲醛固定后加入 FITC 标记的 CD133 抗体 100μl,37℃,孵育 60min。甘油封片,荧光显微镜下观察,显示绿色荧光的细胞为 CD133 阳性。(3) DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1 双染法 EPC 鉴定:在培养液中加入 DiI-acLDL (2.4μg/ml),37℃ 孵育 1h,以 PBS 洗涤后用冰冷的 4% 多聚甲醛固定 10min。加入 FITC 标记的 UEA-1 (10μg/ml),室温暗处孵育 1h。以抗荧光淬灭剂封片,标本在激光共聚焦显微镜下观察。

结 果

1. 培养细胞的形态学特征:刚分离的单个核细胞最初为圆形。约在培养 2 天后出现贴壁,渐渐伸出伪足样突起,呈小杆状或梭形(封三彩图 11)。至第 4 天起,圆形细胞逐渐拉长,呈梭形贴壁生长。第 7 天时贴壁细胞增生明显,“集落”样生长,呈漩涡样或放射状(封三彩图 12)。细胞生长迅速,集落边缘细胞呈纺锤形,近似单层生长,集落中心则细胞密集呈复层生长。

2. EPC 的鉴定:培养第 7 天的 EPC 免疫组化染色结果表明,CD34 阳性细胞呈棕黄色(封三彩图 13),占 85% 以上;免疫荧光染色显示 CD133 阳性细胞显示绿色荧光(封三彩图 14);acLDL 摄取和 UEA-1 结合双荧光染色鉴定时显示红色荧光为 ac-LDL 阳性,显示绿色荧光为 UEA-1 阳性,显示双荧光阳性(橙黄色)的细胞被认为是 EPC,其比例占贴壁细胞总数的 95% 以上,证实绝大多数贴壁细胞为 EPC。

讨 论

1997 年,Asahara 等^[1]首次报道,成人血中可分离得到 CD34 造血干细胞,因其在体外可向内皮表型细胞分化,表达内皮细胞标志物并参与血管形成,故将其命名为 EPC。糖尿病是一种常见的内分泌代谢疾病,它所引起的慢性血管并发症,特别是大血管病

变,引起肢体不同程度的缺血,严重影响着患者的生存质量。由于 EPC 不仅参与胚胎的血管发生,而且在成人机体的血管新生中也起到重要作用^[2]。因此,EPC 在糖尿病缺血性血管疾病中的作用正成为人们的研究热点。目前 EPC 在糖尿病中的研究主要集中在外周血上,我们主要探讨了糖尿病骨髓 EPC 的分离,培养和生物学特性的鉴定。

目前,对 EPC 的鉴定尚无统一标准,主要是因为:EPC 缺少定义该独特细胞群的功能分析方法;缺乏特异性的细胞表面标记^[3]。但为了实际应用,一些学者将 EPC 定义为来源于骨髓或外周血单个核细胞,能黏附到基质分子如纤维连接蛋白且 ac-LDL 和 UEA-1 双阳性的细胞^[1]。也有学者根据细胞表面抗原的表达来定义。CD34 曾被认为是最重要的造血干细胞的标志物。进一步研究表明,CD34 不仅表达在 HSC 上,也在成熟的内皮细胞上有低水平的表达。故研究追溯到代表更早期的造血干细胞表面标志 CD133。CD133 是标记 EPC 的选择性表面抗原,因为它在成熟内皮细胞的表面不表达,而 CD34 和 VEGFR-2 在成熟的内皮细胞也表达。据此可以推测 CD133 可能是标记 EPC 最可靠的表面抗原。然而也有学者认为 CD34 和 VEGFR-2 是鉴定 EPC 最合适的表型,因为这些细胞和心血管损害密切相关,至少在糖尿病是这样^[4]。一般地,EPC 以表达 3 个标志物为特征:CD133,CD34 和 VEGFR-2^[5]。本实验结果显示:从糖尿病大鼠骨髓中得到的单个核细胞在有血管内皮生长因子、碱性成纤维生长因子的 M199 培养基中培养 7 天后能够获得 EPC,它们能吞噬 ac-LDL,并结合 UEA-1,同时表达内皮细胞标志 CD34 和祖细胞标志 CD133。在获得 EPC 的方法上,虽然可通过免疫磁珠分离骨髓内的 CD34 单个核细胞,再进行培养扩增,从而得到较高纯度的 EPC,但操作复杂而且费用昂贵,实用性较差,不利于 EPC 的分离培养的广泛开展。为了获得数量较多的 EPC,我们以骨髓为细胞源,利用不同细胞的密度差异的特性,采取密度梯度离心法直接分离骨髓中的单个核细胞,然后通过体外贴壁培养的方法,除去非贴壁细胞,从而得到较多的 EPC。

最近糖尿病动物模型研究显示其外周血 EPC 数目比非糖尿病对照组减少约 39%~50%,而骨髓中含有丰富的干细胞,是多种祖细胞的来源,加之取材容易,损伤较小,是进行细胞移植研究的良好材料^[6-8]。本研究所采用的培养方法能够在体外成功培养,扩增

具有典型特征的 EPC, 实现了骨髓 EPC 的定向诱导分化, 且操作简便, 具有较好的可重复性, 同时以骨髓作为细胞来源又可实现自体移植, 为细胞移植及 EPC 的进一步研究打下了基础。

参考文献

- 1 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964 - 967
- 2 Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (7): 1185 - 1189
- 3 Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, *et al.* Expression of VEGFR - 2 and AC133 by circulating human CD34 - cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95: 952 - 958
- 4 Fadini GP, Sartore S, Albiero M, *et al.* Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26: 2140 - 2146
 - 5 Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 1185 - 1189
 - 6 Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse - Roussanne S, *et al.* Impairment in ischemia - induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol*, 2004, 164 (2): 457 - 466
 - 7 Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes*, 2007, 56 (3): 666 - 674
 - 8 Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, *et al.* Diabetic impairments in NO mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF - 1 alpha. *J Clin Invest*, 2007, 117: 1249 - 1259
- (收稿: 2009 - 12 - 18)

成人腹腔淋巴管瘤 101 例综合分析

张梦然 吴小丽 吴建胜 金 尹 黄智铭 陈民新

摘 要 **目的** 探讨成人腹腔淋巴管瘤的病因、临床表现、影像学特点及诊治方法。**方法** 综合分析 101 例成人腹腔淋巴管瘤患者的临床资料, 其中我院 11 例, 国内文献报道 90 例。**结果** 男性: 女性为 1.2: 1, 年龄 18 ~ 77 岁, 平均 54 岁。临床表现为腹部包块 54 例 (占 53.3%), 以腹胀不适或乏力等非特异性症状 38 例 (占 37.4%), 4 例表现为急腹症 (占 4%)。术前所有病例均行腹部 CT 平扫检查, 部分病例行腹部 B 超及 CT 增强及 MRI 检查, 2 例行肠镜检查, 1 例行保留灌肠的 CT 平扫。术前所有病例均未能确诊, 93 例临床诊断正确, 误诊 8 例, 误诊率为 7.9%。除 1 例行穿刺活检外, 其余 100 例均手术治疗。术后除 1 例合并恶性肿瘤患者预后不良外, 其余均无复发, 疗效满意。**结论** 腹腔淋巴管瘤是临床少见的良性肿瘤。术前诊断困难, 需借助 B 超、CT 及 MRI 等影像学技术综合进行诊断。手术治疗为首选的治疗方法, 术后多无复发, 预后良好。

关键词 腹腔淋巴管瘤 CT MRI

Comprehensive Analysis of 101 Cases with Abdominal Lymphangioma in Adults. Zhang Mengran, Wu Xiaoli, Wu Jiansheng, Jin Yin, Huang Zhiming, Chen Minxin. *Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China*

Abstract Objective To explore the etiology, clinical characteristics, imaging features, diagnosis and treatment of abdominal lymphangioma in adults. **Methods** Clinical data of 101 cases with abdominal lymphangioma in adults including 11 cases in our hospital and 90 cases reported in Chinese literature within five years were analyzed. **Results** The male to female ratio was approximately 1.2: 1. The mean age at diagnosis was 54 years old. The signs of abdominal lymphangioma included abdominal mass in 54 cases (53.3%), abdominal discomfort or fatigue and other non - specific symptoms in 38 cases (37.4%), and acute abdomen (4%) in 4 cases. All patients received abdominal CT scan examination. Of the 101 cases, abdominal B - ultrasound, CT enhancement and MRI examination were performed in some cases, routine colonoscopy test in two cases, routine CT scan of the retention enema in one case. The preoperative diagnose of abdominal lymphangioma were difficult, but the clinical diagnosis was correct in 93 cases, misdiagnosis in 8 cases, and the misdiagnosis rate was 7.9%. In addition to the routine biopsy, 100 cases received operations. The rest cases had no recurrence after operation and the effect of treatments were satisfactory, except for 1 case mergering with malignant tumor. **Conclusion** Abdominal lymphangioma is an rare benign tumor. Preoperative diagnosis is difficult, so it needs to rely on B - ultrasound, CT and MRI imaging technology for a comprehensive diagnosis. Surgery is the preferred treatment. Furthermore, most of the patients after operation have little chance to recurrence and the