

抑瘤实验中 NGR/LPD 与 PEI/ASODN 和 LPD 及对照组比较,对裸鼠移植瘤有很好的抑制作用。体内分布实验显示,NGR/LPD 可有效到达瘤体,而 PEI/ASODN 和 LPD 则不能有效地运送 ASODN 至瘤体。各组 hTERT mRNA 及蛋白表达水平说明 NGR/LPD 能有效抑制端粒酶 hTERT mRNA 及蛋白的表达。TUNEL 法原位检测细胞凋亡显示 NGR/LPD 可明显促使肿瘤细胞产生凋亡。低剂量使用 NGR/LPD 对 hTERT 抑制作用相对较弱,说明制剂对肿瘤的抑制作用具有明显的剂量依赖性。虽然体外转染已证实 LPD 和 PEI/ASODN 缩合体对细胞的抑制作用较 ASODN 显著提高,但高剂量的 LPD、PEI/ASODN 缩合体在体内应用时作用不明显,不能有效地诱导细胞凋亡,结合体内分布实验结果分析,提示载体的肿瘤靶向性修饰在体内应用中的重要性。体内分布试验显示 NGR/LPD 在进入体内后有相当一部分药物还滞留于肝、肺、肾等器官,这也是小剂量 NGR/LPD 效果不佳的原因。

参考文献

- 1 Wang X, Xiao J, Zhao S, *et al.* Expression of telomerase subunits and its relationship with telomerase activity in nasopharyngeal carcinoma [J]. Natl Med J China, 2001, 81(9): 553 - 556
- 2 Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, *et al.* Natural and pharmacological regulation of telomerase [J]. Nucleic Acid Res, 2002, 30 (4): 839 - 865
- 3 Kirkpatrick KL, Mokbel LK. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer [J]. Eur J Surg Onco, 2001, 27(8): 754 - 760
- 4 Shamas MA, Koley H, Batchu RB, *et al.* Telomerase inhibition by siRNA causes senescence and apoptosis in Barretts adenocarcinoma cells mechanism and therapeutic potential [J]. Mol Cancer, 2005, 4: 24
- 5 Curnis F, *et al.* Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. Cancer Res, 2002, 62(3): 867 - 874
- 6 Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, *et al.* bel - 2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. Cancer Res, 1995, 15; 55(2): 237 - 241
- 7 Zhang RG, Wang XW, Yuan JH, *et al.* Human hepatoma cell telomerase activity inhibition and cell cycle modulation by its RNA component antisense oligodeoxynucleotides [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 742 - 746
- 8 Wang J, Zhang ZZ, Zhou TY, *et al.* Effect of nanosize delivery system for ASODN against hTERT on the expression of telomerase in the esophageal cancer EC9706 cells [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2008, 30(8): 566 - 572
- 9 邹琳, 罗春丽, 涂植光. 膀胱肿瘤中端粒酶逆转录酶和 c - myc 的表达研究 [J]. 临床检验杂志, 2003, 21, Suppl: 51 - 53
- 10 A. Ho S R Schwarze, S J Mermelstein, G. Waksman, S. F. Dowdy, Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo [J]. Cancer Res, 2001, 61: 474 - 477
- 11 李经忠, 王青青, 曹雪涛. 新型非病毒载体聚乙烯亚胺体内应用的研究进展 [J]. 国外医学(药学分册), 2004, 31(1): 34 - 37
- 12 M Ogris, P Steinlein, M Kursal, *et al.* Wagner, The size of DNA / transferrin - PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. Gene Ther, 1998, 5: 1425 - 1433
- 13 Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with non - viral gene delivery systems [J]. Drug Discov Today, 2002, 7(8): 479 - 485
- 14 Harada - Shiba M, Yamauchi K, Harada A, *et al.* Polyion complex micelles as vectors in gene therapy - pharmacokinetics and in vivo gene transfer [J]. Gene Ther, 2002, 9(6): 407 - 414
- 15 Corti A, Ponzoni M. Tumor vascular targeting with tumor necrosis factor alpha and chemotherapeutic drugs. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1028: 104 - 112

(收稿: 2010 - 03 - 15)

微环境诱导骨髓间充质干细胞分化为内皮样细胞

何 威 杨旭辉 林秋雄 余伟华 吴伟康

摘 要 目的 通过观察人骨髓间充质干细胞(hMSCs)与成熟内皮细胞非接触共培养表达特异性内皮细胞标志物的情况,探讨微环境依赖性的、体外非接触共培养方法对 MSCs 向内皮样细胞分化的影响。**方法** 密度梯度离心法分离纯化培养的 hMSCs 与人脐静脉内皮细胞(HUVECs)在 Transwell 内共培养,通过流式细胞术检测 hMSCs 表型,RT - PCR 鉴定诱导后 hMSCs 的

基金项目:“973”中医专项课题(2005CB523305)、广东省科技计划立项资助课题(0711222700104)、广东省中医药局立项课题(2007380)

作者单位:510080 广州,广东省人民医院、广东省医学科学院(何威、林秋雄);中山大学中山医学院(何威);中山大学干细胞与组织工程中心(杨旭辉、余伟华);中山大学中西医结合研究所(吴伟康)

CD31、VWF、VE - Cadherin mRNA 的表达,免疫组化鉴定诱导后 hMSCs 特异性内皮细胞标志物 VCAM1 和 CD31 的表达,透射电镜观察诱导后 hMSCs 的超微结构。**结果** 细胞培养第 2 周,开始出现形态学改变,胞体回缩,呈多角形改变。细胞培养第 3 周,细胞增生速度明显加快,形态学上呈卵圆形或“铺路石”样改变;在基因水平上,RT - PCR 显示经典内皮细胞标志物 CD31、VWF、VE - cadherin mRNA 的高表达;在蛋白水平上,免疫荧光染色 CD31、和 VCAM1 表达阳性;透射电镜下诱导后细胞显示内皮细胞特有的 Weibel - Palade 小体。**结论** hMSCs 在共培养的微环境中,可以分化成内皮细胞表型,其机制是通过内皮细胞的旁分泌作用,而不需要 hMSCs 与内皮细胞的直接接触。转化的内皮细胞在形态上、基因、蛋白表达、超微结构等方面均显示了内皮细胞的特征。

关键词 骨髓间充质干细胞 分化 内皮细胞 Transwell

Microenvironment - dependent Endothelial Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells *in vitro*. He Wei, Yang Xuhui, Lin Qiuxiong, Yu Weihua, Wu Weikang. Guangdong People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangdong 510080, China

Abstract Objective To investigate the microenvironment - dependent endothelial differentiation of hMSCs *in vitro*. **Methods** hMSCs were isolated from bone marrow undergoing by density gradient centrifugation. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were harvested from fresh umbilical cords by collagenase treatment. We established the endothelial differentiation environment by co - culturing hMSCs with mature endothelial cells (HUVECs) indirectly *in vitro*. CD31, VWF, VE - Cadherin mRNA expression were detected after induction by RT - PCR analysis and VCAM1 and CD31 expression by fluorescence immunocytochemistry. The endothelial characteristic Weibel - Palade bodies of the differentiated hMSCs were observed by electron microscopy. **Results** In Transwell co - culture system, the induced hMSCs showed little change after 1 week, but their bodies contracted and showed polygonal - shaped morphology after 2 weeks. The differentiated hMSCs showed positive expression of CD31, VWF, and VE - cadherin mRNA by RT - PCR analysis and showed positive CD31 and VCAM1 expression by fluorescence immunocytochemistry. Electron microscopy analysis of the differentiated hMSCs showed the typical endothelial Weibel - Palade body. **Conclusion** The expression of mature endothelial cell - specific markers both at mRNA and protein levels, and endothelial characteristic Weibel - Palade body from electron microscopy confirm that hMSCs has the milieu - dependent differentiation potential along endothelial lineage.

Key words Mesenchymal stem cells; Cell differentiation; Endothelial cells; Transwell

新血管的生成对任何损伤组织的修复都很重要。心肌梗死、脑卒中等缺血性疾病需要大量内皮种子细胞参与血管新生改善缺血组织或器官的功能^[1,2]。感染、创伤常并发的急性肺损伤等内皮损伤和功能障碍靠自身的修复非常缓慢,且目前的药物治疗也并不理想,而自体移植内皮前体细胞(endothelial progenitor cell)可成为新的治疗方向^[3]。因此,寻找初期分化细胞来源的内皮种子细胞已成为血管组织构建和器官修复的关键所在。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的突出特点是具有自我更新和多向分化潜能,可以将其诱导分化成特异的组织类型,修复受损的组织或器官。因此, BMSCs 可成为内皮种子细胞的新的来源。本研究通过 RT - PCR、免疫荧光检测和透射电镜观察,从 mRNA、蛋白表达和超微结构 3 个层面探讨微环境依赖性的、体外非接触共培养方法对 hMSCs (human mesenchymal stem cells, hMSCs) 向内皮样细胞分化的影响。

资料与方法

1. 主要材料和试剂: DMEM (dubecco's modified eagle medium) 干粉培养基、胎牛血清 (Hyclone 公司); M199 培养基、

胰蛋白酶 (Gibco 公司); 内皮细胞生长补充因子 (endothelial cell growth supplement, ECGS) (Sigma 公司); 抗人 CD31 (Dako 公司)、CD34、CD105、CD166 单克隆抗体 (Pharmingen 公司); 抗人 vonWillebrand 因子 (因子 VIII 相关抗原) 抗体 (Santa 公司); 抗人 VCAM1、抗人 VE - cadherin (Santa 公司); Cy3 偶联的驴抗羊 IgG (H + L) (Jackson immuno research 公司); R - PE 偶联的山羊抗兔 IgG (H + L) (Southern biotech 公司); Trizol、Fermentas RT - PCR system、Taq 酶 (Invitrogen 公司); Ultra PURE 琼脂糖 (Gibco BRL 公司); PCR 引物 (上海生工合成); DNA Marker (北京天为时代); Ficoll 淋巴细胞分离液 (Pharmacia 公司); CO₂ 培养箱 (Forma 371, Thermo 公司)。超净工作台 (SPEG AIR TECH 公司); 荧光倒置显微镜 (IX70 型, Olympus 公司); 离心机 (德国 Hettich 公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司); Transwell 嵌入膜 (孔径 8.0 μm, Corning 公司)。

2. hMSCs 的分离培养: 经患者知情同意用作科学研究, 在无菌条件下, 取脊柱内固定术患者骨髓 3ml, 加入肝素, PBS 充分混匀, 置于离心管, 以 Ficoll 淋巴细胞分离液 (密度 1.077g/ml) 梯度离心, 界面云雾状白膜层即为单个核细胞。将单个核细胞以 1×10^5 /ml 细胞密度接种于培养瓶, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。培养基选用含 10% 胎牛血清的 DMEM - LG, 72h 后去除未贴壁细胞悬液, 隔天换液 1 次, 2 周后待贴壁细

胞达90%融合时,0.25%胰酶消化, $8 \times 10^3/\text{cm}^2$ 细胞密度传代;以后每6天传代1次。倒置相差显微镜观察细胞形态。取3~8代用做实验。

3. 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的原代培养:经产妇知情同意,取新生儿脐带,用0.125%胰蛋白酶灌注脐静脉消化内皮,以含20%胎牛血清、75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGS的M199培养基制成细胞悬液,置于37℃含5% CO_2 培养箱中培养,待细胞长至融合状态后用0.1%胰蛋白酶消化传代,取生长良好的2~3代内皮细胞用于实验。通过免疫荧光检测CD31和VCAM1的表达鉴定内皮细胞。

4. hMSCs与HUVECs共培养:hMSCs与HUVECs的共培养采用具有通透性膜的Transwell细胞培养池,两种细胞间不相互接触,但培养液中的生物大分子可透过培养池底部的膜自由交换。取P3 hMSCs接种在6孔板中,每一孔加2ml L-DMEM培养基,在37℃、5% CO_2 培养箱培养2天后,开始诱导。取P2~P5 HUVECs接种在6个Transwell(Transwell insert membrane,孔径0.4 μm , Corning)中,培养基用DMEM/F12+10%胎牛血清,在37℃、5% CO_2 培养箱培养2天后,开始和hMSCs共培养诱导。诱导体系中,hMSCs与HUVECs的比例为1:10,每孔加2.5ml条件培养基(M199+20%胎牛血清+100U/ml肝素钠+2mmol/L谷氨酰胺+50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGS),每3天换液1次。HUVECs每周传代保持一定融合度(90%左右)。第2、3周末观察细胞形态学变化并收细胞做内皮细胞相关指标检测。

5. 流式细胞检测hMSCs表型:消化制备单细胞悬液,用不含胎牛血清的培养基悬浮细胞,调整浓度为 1×10^6 个/毫升,立刻进行细胞标记。向收获的细胞中分别加入荧光素标记的抗体:FITC-anti human CD44, CD105, PE-CD29, CD34, CD11b, PerCP-CD45。摇匀,避光于4℃冰箱放置30min,1000r/min离心3min,弃去上清液,PBS洗涤2次,1%多聚甲醛固定,-20℃保存,待上机检测。所有标本均在6h内完成检测,使用FACS Calibur流式细胞仪检测,结果用CellQuest分析软件分析。

6. 免疫荧光检测CD31和VCAM1表达:培养细胞吸去培养基,0.01MPBS洗两次,1次3min,2%正常驴血清(CD31、VCAM1)室温封闭60min。吸弃血清后,一抗(羊抗人CD31、VCAM1)4℃过夜,室温复温30min。0.01mol/L PBS洗3次,每次10min。R-PE偶联的山羊抗兔IgG(H+L,1:150),CY3偶联的驴抗羊IgG(H+L,1:150)室温孵育45min。0.01mol/L PBS洗3次,每次5min。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst33344衬染细胞核。荧光显微镜照相系统下观察拍照。

7. RT-PCR鉴定CD31,VWF,VE-Cadherin mRNA表达:按Trizol试剂盒说明所示方法提取细胞总RNA,并在紫外分光光度计260nm和280nm波长处鉴定。总RNA随引物在RT-PCR试剂盒中产生cDNA,然后PCR扩增。VWF上游引物

序列:5'gctctctcttaccggatg;下游引物序列:3'atactcttgccctgat-gga。CD31上游引物序列:5'-TCCGATGATAACCACTGCAA-3';下游引物序列:5'-GTGGTGGAGTCTGGAGAGGA-3'。VE-Cadherin上游引物序列:5'-CCACATTACAGGGAAT-GCTT-3';下游引物序列:5'-GAACATCTGCCCTTCTCAG-3'。 β -actin上游引物序列:5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3';下游引物序列:5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。PCR循环条件如下:94℃ for 5min, 95℃ for 30s, 55~62℃(depending on the primer set) for 30s, and 72℃ for 60s(40 cycles), 72℃ for 10min。反应结束后,取10 μl 产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,鉴定PCR产物片段大小。

8. 透射电镜观察:将大约 2×10^5 诱导以后的细胞用固定液室温固定15min,细胞刮子收集,3000r/min室温离心10min送检。使细胞聚结成块状;细胞块体积约1mm³大小。PBS缓冲液清洗后加入2%戊二醛于4℃下固定4h以上。用PBS缓冲液充分洗涤15min×3次后1%锇酸溶液固定2h,之后用缓冲液洗涤3次。使用乙醇梯度脱水,每个浓度10min,分别为50%,70%,90%,95%,100% I,100% II;100% III。再用丙酮脱水2次。使用环氧树脂Epon-812浸透、包埋处理,然后置于60℃温箱聚合8h。经过修块、超薄切片后使用醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色。

9. 统计学分析:以SPSS10.0软件进行统计学分析,实验结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验数据采用两样本t检验进行分析, $P < 0.05$ 表示有统计学显著差异。

结 果

1. hMSCs分离培养:hMSCs原代接种培养后3~4天,显微镜下即可见有稀疏分布的单个细胞贴壁生长,形态为梭状,呈典型的成纤维细胞样外观,偶有宽大平坦的多边形细胞。细胞以分散,克隆集落方式增生。原代培养第6天,见细胞形成多个细胞克隆样生长;第12~15天各个细胞克隆扩大直至铺满培养瓶底面。传代培养的细胞比原代细胞增生速度更快,传代后经过1~2天的适应期,第3天起细胞大量增加,进入对数生长期,第7天达到顶峰,以后进入平台期。

2. HUVECs原代培养:原代培养4天,在光学显微镜下观察,发现细胞贴壁呈多边形,生长汇合后细胞呈典型的铺路鹅卵石状,符合内皮细胞的形态特征。

3. Transwell半透膜非接触共培养诱导hMSCs向内皮细胞分化:hMSCs与HUVECs在Transwell半透膜内共培养1周,细胞形态无明显改变;共培养2周时,诱导hMSCs胞体回缩,呈多角形;共培养3周,细胞增生迅速,形态呈卵圆形或“铺路石”样改变(图1)。

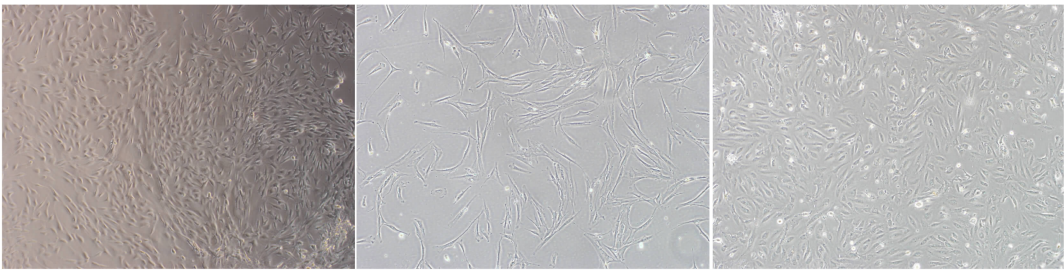


图 1 Transwell 共培养诱导 3 周的 hMSCs
左图为诱导 3 周的内皮样细胞 (×200); 中图为 hMSCs (×100); 右图为脐静脉内皮细胞 (×100)

4. hMSCs 表型分析:hMSCs 表达 CD29 (98.64% ± 0.8%), CD44 (96.70% ± 1.5%), CD105 (2.21% ± 0.6%), CD11b (0.8% ± 0.05%), CD45 (1.39% ±

0.13%), CD34 (1.73% ± 0.08%)。流式细胞仪检测的数据说明所分离培养的细胞比较均一,具有 BMSCs 的表面标志特征(图 2)。

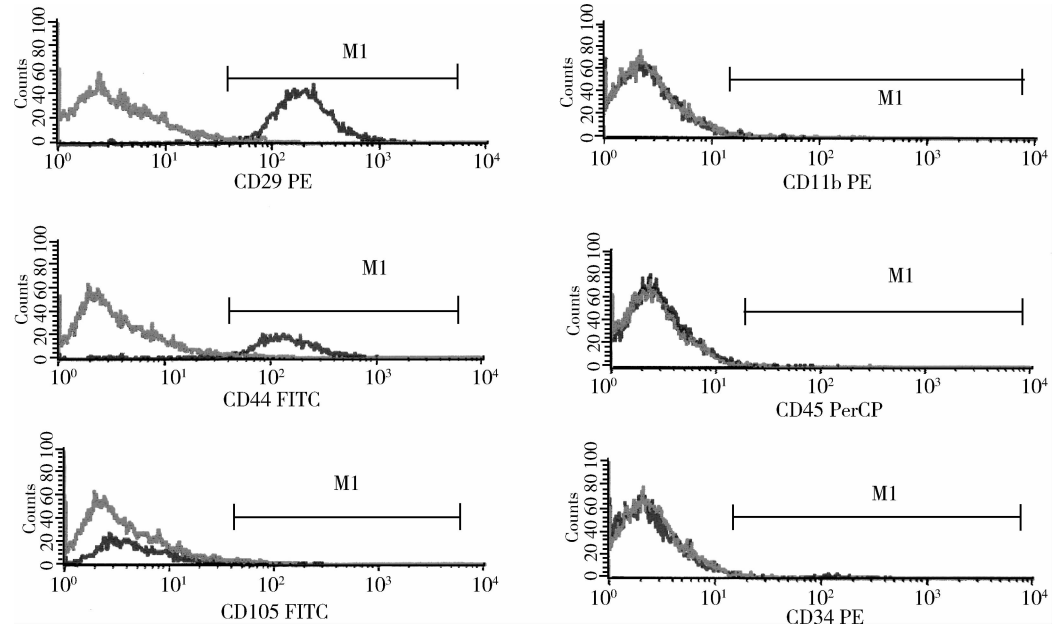


图 2 流式细胞仪检测 hMSCs 的表面标志
CD29 (98.64% ± 0.8%); CD44 (96.70% ± 1.5%); CD105 (2.21% ± 0.6%);
CD11b (0.8% ± 0.05%); CD45 (1.39 ± 0.13%); CD34 (1.73% ± 0.08%)

5. 免疫组化检测 CD31 和 VCAM1 的表达:免疫荧光检测显示 Transwell 共培养诱导 3 周的 hMSCs CD31、VCAM1 表达阳性,胞质呈红色荧光(第 139 页彩图 6、第 140 页彩图 7);未诱导 hMSCs CD31、VCAM1 表达阴性。

6. RT-PCR 鉴定 CD31、VWF、VE-Cadherin mRNA 表达:诱导 3 周的 hMSCs 经 RT-PCR 检测显示内皮特异性标志物 CD31、VWF 和 VE-cadherin mRNA 表达阳性,未诱导 hMSCs 表达阴性,HUVECs 做阳性对照(图 3)。

7. 透射电镜观察:细胞多呈梭形,核大,常染色质

丰富,核仁明显,胞质内少量线粒体,体小,嵴少,内质网呈短杆状,无明显扩张,糖原散在分布;部分细胞中可见 W-P 小体样电子致密颗粒,周围可见张力丝缠绕(图 4)。

讨 论

目前对于骨髓中的 BMSCs 的分离纯化的方法主要有:贴附细胞分离法、流式细胞分离、免疫磁珠分离、梯度离心分离^[4-6]。每种方法各有优缺点:①贴附细胞分离法,简单,易操作,但所得细胞的成分复杂,骨髓 MSC 的纯度有限;②流式细胞仪、免疫磁珠分离,获得的 BMSCs 纯度较高,但操作繁杂,需要昂

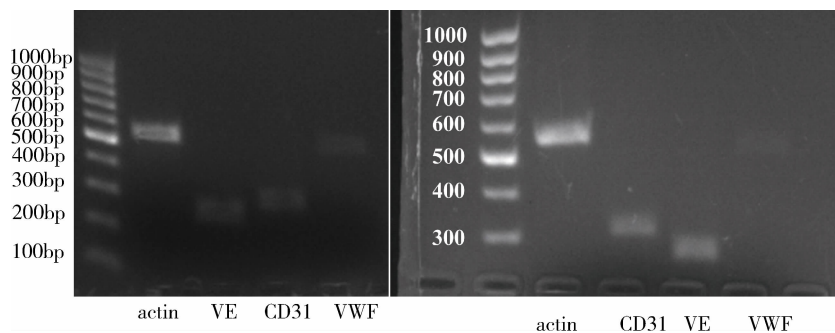


图3 CD31, VWF, VE - cadherin mRNA RT - PCR 表达

左图为诱导3周的hMSCs;右图为HUVECs做阳性对照

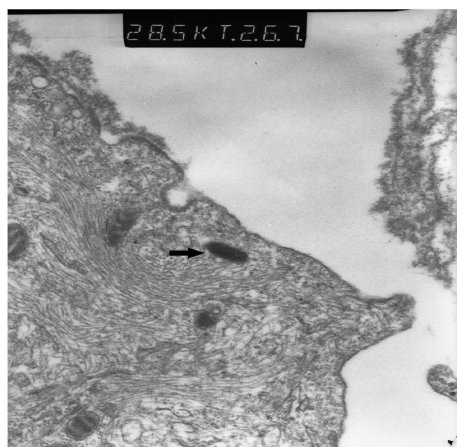


图4 透射电镜下诱导后细胞显示特有的Weibel - Palade小体 (×28000)

贵的仪器和试剂,成本较高,并且对细胞的活性影响较大;③梯度离心分离,利用BMSCs属于单核类细胞的特点,白细胞及骨髓中造血干细胞在体外培养条件下主要呈悬浮生长的特性,通过体外单层细胞培养及定期更换培养液,即可剔除不贴壁生长的白细胞和造血干细胞,所余的贴壁生长细胞即主要为BMSCs,操作方法简单。

本研究采用密度梯度法与贴壁法相结合,根据比重差别,用比重为1.073g/ml的Percoll分离液分离骨髓单个核细胞,然后又根据BMSCs与血系细胞贴壁性能差异,经体外贴壁培养,随换液去除悬浮生长的血细胞。通过这些步骤,贴壁细胞大部分剩下BMSCs,也含有极少量单核细胞,淋巴细胞或其他细胞,再利用它们在培养瓶底的贴壁性能不同,每次传代时控制胰酶的量 and 消化条件,以保证较易脱落的BMSCs消化下来而单核细胞和淋巴细胞等其他细胞因贴壁性强仍贴附于瓶底,从而传代次数越多,细胞越纯。传至第3代,细胞比较均一,流式细胞仪检测表

面标志提示细胞纯度达到98%以上,与文献报道一致^[7]。流式细胞仪检测发现BMSCs表达CD29和CD44,不表达造血细胞表面抗原,如造血前体细胞标志抗原CD34,白细胞标志抗原CD45,以及淋巴细胞表面抗原CD11b和CD105等抗原。从第3代细胞开始均一性较好,其中CD45在原始BMSCs的表达率为32.81%,而到第3代则降为4.81%,再次说明通过贴壁传代培养,可以去除掉培养细胞中大多数的白细胞,得到纯化的BMSCs。MSCs是来源于早期中胚层和外胚层的一类多能干细胞,理论上可分化为所有外、中胚层来源的细胞。内皮细胞(endothelial cell, EC)属于中胚层,因此MSCs具有分化为EC的可能性。MSCs在体外定向诱导分化为血管内皮样细胞的方法主要有以下几种:(1)细胞因子诱导分化:这是目前文献报道最多的方法。多数学者认为血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是间充质干细胞定向分化为内皮细胞的关键所在。Oswald等将间充质干细胞在2%胎牛血清和50ng/ml VEGF的培养基中,含10%胎牛血清的DMEM培养基作为阴性对照,7天能诱导间充质干细胞分化成内皮样细胞,诱导后流式细胞仪检测,血管内皮细胞受体KDR和Fit-1表达增加,免疫荧光分析表达vWF因子,分化的细胞功能检测形成血管结构^[8]。(2)与成熟内皮细胞共培养诱导分化:包括接触性共培养和非接触性共培养。武晓静等用直接接触共培养法诱导hMSCs,5天时免疫荧光检测,25.71%hMSCs表达F1K-1。Liu等^[9]采用Millicell(pore size 0.4μm, Millipore, USA)细胞培养池在缺氧条件下共培养hMSCs和兔脑微血管内皮细胞5天,用流式细胞和免疫荧光化学法检测F1K-1,阳性细胞为23.64%^[10]。(3)其他:Wang等发现剪切力能明显诱导胚胎间充质前体细胞(embryonic mesen-

chymal progenitor cell) 在 mRNA 和蛋白水平上表达成熟内皮标志物 CD31、vWF、VE-cadherin^[11]。王文等用 10 μg/L VEGF 预诱导 24h 后, 加入 15% 芪丹通脉片含药血清体外对 MSCs 诱导分化, 至第 7 天, 诱导的 MSCs 形态上呈“卵石样”改变, 透射电镜下细胞胞质内可见 Weibel-palade 小体, 共聚焦显微镜下可见 CD31、vWF 因子阳性细胞^[12]。

以上研究表明, 骨髓基质干细胞能在局部微环境中重新编程, 分化成与其周围细胞生物学特性相似的细胞, 细胞与细胞间的直接接触对 hMSCs 的分化不是必须的^[13]。本研究采用模拟体内诱导微环境的半透膜隔离非接触共培养的方法体外诱导 hMSCs 向内皮细胞表型分化, 结果表明, 与成熟内皮共培养的骨髓基质干细胞具有微环境依赖性向内皮分化的能力。细胞培养第 2 周, 开始出现形态学改变, 胞体回缩, 呈多角形改变。细胞培养第 3 周, 细胞增生速度明显加快, 形态学上呈卵圆形或“铺路石”样改变; 在基因水平上, RT-PCR 显示经典内皮细胞标志物 CD31、VWF、VE-cadherin mRNA 的高表达; 在蛋白水平上, 免疫荧光染色 CD31 和 VCAM1 表达阳性; 透射电镜下诱导后细胞显示内皮细胞特有的 Weibel-Palade 小体。目前关于骨髓基质干细胞的分化调控机制仍未阐明, 其微环境依赖性可能与周围成熟内皮细胞分泌的促内皮分化的细胞因子的诱导作用有关。这与干细胞的可塑性研究结果相一致, 一些环境或局部微环境而不是细胞受体对移植的干细胞的分化是至关重要的^[14,15]。

综上所述, hMSCs 在共培养的微环境中, 可以分化成内皮细胞表型, 其机制是通过内皮细胞的旁分泌作用, 而不需要 hMSCs 与内皮细胞的直接接触。转化的内皮细胞在形态上、基因、蛋白表达、超微结构等方面均显示了内皮细胞的特征。

参考文献

- 1 张超纪. 组织工程化血管种子细胞研究现状[J]. 生物医学工程与临床, 2003, 7(3): 176-180
- 2 Lam C, Liu Y, Hsu J, *et al.* Autologous transplantation of endothelial progenitor cells attenuates acute lung injury in rabbits. *Anesthesiol-*

- gy, 2008, 108: 392-401
- 3 Guilherme V, Silvio L, Joao A. R., *et al.* Mesenchymal cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, 2005, 111: 150-156
- 4 Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood* 1997, 90(9): 3471-3481
- 5 Encina NR, Billotte WG, Hofman MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest*, 1999, 79(4): 449-457
- 6 Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure. *Connect Tissue Res*, 2001, 42(1): 49-58
- 7 Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cell: co-expression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis*, 2000, 26(3): 234-246
- 8 Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 2004, 22(3): 377-384
- 9 Liu K, Chi L, Guo L, *et al.* The interactions between brain microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Microvascular Research*, 2008, 75: 59-67
- 10 武晓静, 黄岚, 周骥, 等. 不同诱导条件对人骨髓基质干细胞向内皮分化的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(4): 393-396
- 11 Wang H, Riha G, Yan S, *et al.* Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1817-1823
- 12 王文, 张金洲, 李静, 等. 芪丹通脉片含药血清体外诱导 MSCs 分化为内皮细胞的作用. *现代生物医学进展*, 2006, 6(11): 20-21
- 13 Bittira B, Kuang JQ, Al-Khaldi A, *et al.* In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74: 1154-1159
- 14 lmeida-Porada G, El Shabrawy D, Porada C, *et al.* Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*, 2002, 30(12): 1454-1462
- 15 Chen J, Wang C, Lu S, *et al.* In vivo chondrogenesis of adult bone marrow derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*, 2005, 319(3): 429-438

(收稿: 2010-03-19)

(修回: 2010-05-28)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统启事

自 2010 年起, 《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统, 请各位作者登陆《医学研究杂志》网站: <http://www.xyjzz.cn>, 注册登陆投稿系统, 填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话: 010-52328679(单政)。

《医学研究杂志》编辑部