

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2008 )02-0159-04

## CD133 免疫磁珠分选脐血内皮祖细胞的培养及鉴定

张军霞, 李 瑞, 赵 鹏, 石 磊, 程子昊, 尤永平\*, 傅 震( 南京医科大学第一附属医院 神经外科, 南京 210029 )

**[ 摘 要 ]** 目的: 建立具备高效增殖、血管生成与迁移能力的脐血内皮祖细胞( endothelial progenitor cell, EPC )分离培养鉴定方法。方法: 应用免疫磁珠分选纯化脐血单个核细胞中的 CD133<sup>+</sup> 细胞, 体外 EGM-2 MV 培养液培养扩增, 通过形态学、细胞表面标志及细胞功能鉴定 EPCs, 并与脐静脉内皮细胞( human umbilical vein endothelial cell, HUVEC )作比较。结果: EPCs 分离培养 7 d 左右开始出现小集落, 21 d 左右集落扩大、相互融合, 并呈现出典型铺路石样改变; 培养 14 d 左右, 约 90% 的细胞免疫荧光 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双阳性, 阳性率达 90%。CD133 和 CD34 阳性率从 86.04% 降至 2.96%、90.88% 降至 2.99%, 而 CD31 阳性率从 1.12% 升至 99.88%。在增殖、血管生成与迁移能力上比较, EPCs 明显优于 HUVECs(  $P < 0.05$  )。结论: 通过 CD133 免疫磁珠分选脐血单个核细胞, 可培养出具有高效增殖、血管生成与迁移能力的 EPCs。

**[ 关键词 ]** 内皮祖细胞; CD133; 免疫磁珠分选; 增殖; 血管生成; 迁移

**[ 中图分类号 ]** R730.231; R392.33 **[ 文献标志码 ]** A

## Culture and identification of endothelial progenitor cells from cord blood with CD133 immunomagnetic sorting

ZHANG Jun-xia, LI Rui, ZHAO Peng, SHI Lei, CHENG Zi-hao, YOU Yong-ping\*, FU Zhen ( Department of Neurosurgery, the First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China )

**[ Abstract ] Objective:** To establish a method for isolating and culturing endothelial progenitor cells( EPCs ), which have high potential of proliferation, migration and angiogenesis, from cord blood. **Methods:** CD133<sup>+</sup> cells were selected from fresh cord blood mononuclear cells by magnetic activated cell sorting system ( MACS ), and were cultured in EGM-2MV medium. EPCs were identified by examining the morphology, cell markers and functions. And the EPCs were compared with human umbilical vein endothelial cells ( HUVECs ). **Results:** On the 7<sup>th</sup> day, the adherent cells exhibited the small colonies; and on the 21<sup>th</sup> day, the colonies were expanded, confluent and displayed a typical “cobblestone” morphology. On the 14<sup>th</sup> day, 90% attached cells took up Dil-ac-LDL, and bound FITC-UEA-1 ( double positive fluorescence ). The cell markers of CD133 and CD34 decreased from 86.04% to 2.96% and 90.88% to 2.99%, respectively, while CD31 increased from 1.12% to 99.88%. Compared with HUVECS, EPCs had more potent potential of proliferation, migration and angiogenesis(  $P < 0.05$  ). **Conclusion:** CD133<sup>+</sup> MACS can be used to isolate EPCs, with high capacity of proliferation, angiogenesis and migration, from cord blood mononuclear cells.

**[ Key words ]** endothelial progenitor cell; CD133; immunomagnetic sorting; proliferation; angiogenesis; migration

[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15( 2 ):159-162 ]

自 1997 年 Asahara 等<sup>[1]</sup>从外周血分离出内皮祖细胞( endothelial progenitor cell, EPC )后,相继发现 EPC 也存在于骨髓<sup>[2]</sup>、脐血<sup>[3]</sup>。研究表明, EPC 参与生理性与病理性血管新生<sup>[4-6]</sup>。在许多病理条件下, EPC 被动员出骨髓, 归巢至相应部位, 参与代偿性血管重建或肿瘤血管新生。最近研究证实<sup>[7-9]</sup>, EPC 参与胶质瘤血管新生, 这就为血管疾病及肿瘤发生发展以及治疗的研究提供了靶点。目前, 体外分离 EPC 的方法有多种, 主要有密度梯度离心法和免疫磁珠分选法<sup>[10]</sup>。密度梯度离心法操作简单, 但分离不纯。而免疫磁珠分选法能有效提高 EPC 的

纯度。本课题通过 CD133 免疫磁珠分选脐血单个核细胞培养 EPC, 建立具备高效增殖、血管生成与迁移能力的 EPC 培养鉴定方法。

**[ 基金项目 ]** 江苏省卫生厅医学科技发展基金资助项目( No. H200510 ); 江苏省医学重点人才项目( No. RC2007061 )。Supported by the Medicine Science and Technology Development Foundation of Jiangsu Health Department ( No. H200510 ); the Medical Major Talent Program of Jiangsu Province( No. RC2007061 )

**[ 作者简介 ]** 张军霞( 1982 - ), 男, 江苏省苏州市人, 硕士研究生, 主要从事胶质瘤基因治疗方面的研究, E-mail: zjx2032@126.com

\* Corresponding author. E-mail: YYPL3@sohu.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

EGM-2 MV 培养液为基础培养液 EBM 中含 FBS、hEGF、VEGF、hFGF-B、R3-IGF-1, 购自于 Cambrex 公司。人淋巴细胞分离液购自于天津灏洋公司, CD133 免疫磁珠分离试剂盒、MACS 磁性分选系统、PE-CD133 均购自于 Miltenyi Biotec 公司, FITC-UEA-1、明胶均购自于 Sigma 公司, 纤维连接蛋白、纤维蛋白凝胶体外血管生成试剂盒均购自于 Chemicon 公司, Dil-ac-LDL 购自于 Invitrogen 公司, Transwell 购自于 Costar 公司, Matrigel 购自于 BD PharMingen 公司, FITC-CD34、FITC-CD31 均购自于 eBioscience 公司。

### 1.2 脐血中内皮祖细胞的分离与培养

采集新鲜脐血, 与 3% 明胶 1:1 混匀静置 30 min, 取上清。经人淋巴细胞分离液 (1.077 g/ml) 密度梯度离心, 白膜层收集获得脐血单个核细胞。单个核细胞悬液 ( $1 \times 10^8$  个/300  $\mu$ l) 中加入 FCR 阻断反应剂 100  $\mu$ l 和 CD133 免疫磁珠 100  $\mu$ l 混匀, 4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。通过 MACS 磁性分离柱, 获取 CD133<sup>+</sup> 细胞。将获得的 CD133<sup>+</sup> 细胞悬浮于 EGM-2 MV 培养液。调整细胞密度为  $5 \times 10^5$ /ml, 种植于纤维连接蛋白包埋的培养瓶。5% CO<sub>2</sub> 持续通气、湿度 95%、37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养。3 d 后首次换液, 弃去含有非贴壁细胞的上清液, 换新鲜培养液。每 2 d 换 1 次培养液。细胞融合约 80% 时进行传代。

### 1.3 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 分离与培养

新鲜脐带 (2 h 以内) 以预温的 0.25% 胰酶灌注, 于 37  $^{\circ}$ C 孵箱中消化 20 min, 收集细胞离心, 悬浮于 EGM-2 MV 培养液, 接种于纤维连接蛋白包埋的培养瓶。

### 1.4 细胞表面标志鉴定

1.4.1 细胞双荧光染色鉴定 在细胞培养至 14 d 后, 进行 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双荧光染色鉴定。细胞在含 Dil-ac-LDL (10  $\mu$ g/ml) 的培养液中避光孵育 4 h, 然后以 4% 的中性甲醛固定 10 min, PBS 液漂洗后加 FITC-UEA-1 (10  $\mu$ g/ml) 避光孵育 1 min。PBS 液漂洗后在共聚焦显微镜下观察。

1.4.2 流式细胞仪分析 用流式细胞仪检测新鲜分离和培养 14 d 后的 CD133<sup>+</sup> 细胞。成单细胞悬液后, 计数  $2 \times 10^5$  细胞分别与 PE-CD133、FITC-CD34、FITC-CD31 抗体于 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 清洗后, 用 300  $\mu$ l PBS 悬浮细胞后流式细胞仪检测。

### 1.5 细胞功能鉴定

1.5.1 细胞增殖活性的检测 EPCs 与 HUVECs 分别按每孔  $5 \times 10^3$  接种于 96 孔板, 每 2 d 每组取 3 孔, 用 MTT 法检测细胞增殖状况, 连续 14 d, 绘制细胞生长曲线。

1.5.2 体外血管生成实验 应用纤维蛋白凝胶体外血管生成试剂盒行体外血管生成实验。96 孔培养板每孔依次加 30  $\mu$ l 人纤维蛋白原与 20  $\mu$ l 凝血酶, 晃匀, 37  $^{\circ}$ C 30 min 成凝胶; 加入  $5 \times 10^3$  细胞悬液 (EPCs 或 HUVECs) 培养过夜; 去除培养液, 依次加 30  $\mu$ l 人纤维蛋白原与 20  $\mu$ l 凝血酶, 晃匀, 加 100  $\mu$ l 培养液, 24 h。显微镜观察血管生成, 随机选取 3 个视野 ( $\times 200$ ) 计血管数目。实验重复 3 次。

1.5.3 体外迁移实验 应用 24 孔预铺 Matrigel 的 Transwell (孔径 8  $\mu$ m) 行体外迁移实验。上室为 200  $\mu$ l 含 EPCs 或 HUVECs 的 EBM ( $1 \times 10^6$ /ml); 下室为 EGM-2 MV 培养液。37  $^{\circ}$ C 下培养 24 h, 将上室附着细胞用湿棉签擦去, 固定, 染色, 拍照 ( $\times 200$ ), 脱色, 酶标仪测 560 nm 光密度值 *D*。实验重复 3 次。

### 1.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据经 Stata7.0 软件分析, 组间比较应用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 CD133<sup>+</sup> 单个核细胞形态学变化

刚分离的 CD133<sup>+</sup> 单个核细胞, 呈圆形, 均匀地悬浮分布。3 d 后弃去非贴壁细胞, 可见少量梭形细胞出现。7 d 左右出现小集落。14 d 左右小集落逐渐形成典型集落。21 d 左右集落间相互融合, 梭形细胞逐渐缩短, 并呈现出典型铺路石样改变 (图 1)。

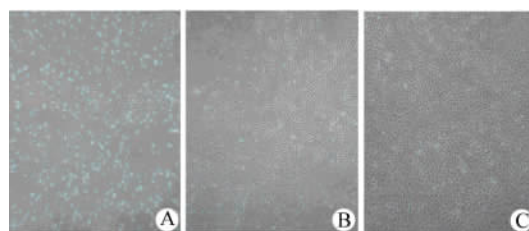


图 1 CD133<sup>+</sup> 细胞不同培养阶段的形态学改变 ( $\times 40$ )

Fig. 1 Morphology changes of CD133<sup>+</sup> cells at different culture stages ( $\times 40$ )

A: Cultured for 7 d; B: Cultured for 14 d;  
C: Cultured for 21 d

### 2.2 CD133<sup>+</sup> 细胞荧光表达变化

细胞培养至第 14 天的双荧光染色结果表明, 培养贴壁细胞中约 90% 的细胞呈 Dil-ac-LDL (红色荧

光)、FITC-UEA-1(绿色荧光)双阳性(图2)。

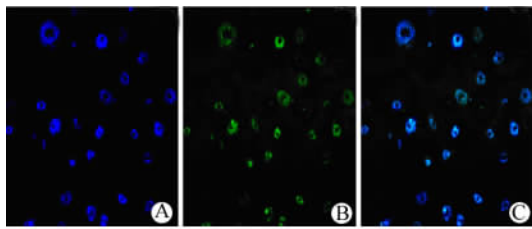


图2 荧光显微镜检测 CD133<sup>+</sup> 细胞 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 的表达 (×200)

Fig.2 Expression of Dil-ac-LDL, FITC-UEA-1 on CD133<sup>+</sup> cells as detected by immunofluorescence (×200)

A: Dil-ac-LDL; B: FITC-UEA-1; C: Merge

### 2.3 单个核细胞中 CD133<sup>+</sup> 细胞表面分子的表达

新鲜脐血得到的单个核细胞中 CD133<sup>+</sup> 细胞含量为 2.29%; 经磁珠分选, CD133<sup>+</sup> 细胞纯度为 86.04%。新分离和培养 14 d 后的 CD133<sup>+</sup> 细胞, CD133、CD34、CD31 表达率分别从 86.04% 降至 2.96%, 90.88% 降至 2.99%, 1.12% 升至 99.88%(图3)。

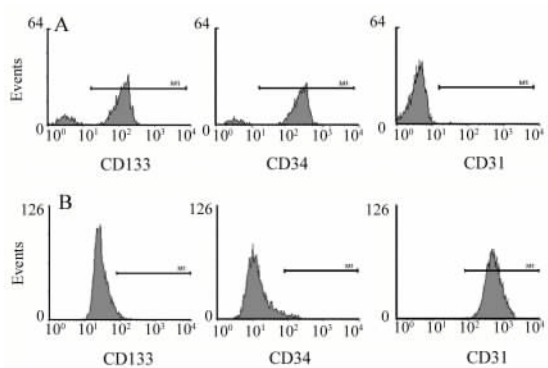


图3 CD133<sup>+</sup> 细胞表面分子的流式细胞术分析

Fig.3 Changes of cell markers on CD133<sup>+</sup> cells as detected by FACS

A: After CD133 immunomagnetic sorting;

B: Cultured on the 14<sup>th</sup> day

### 2.4 EPCs 与 HUVECs 的增殖能力

由细胞生长曲线(图4)可见, EPCs 的增殖能力明显强于 HUVECs。实验中发现, HUVECs 培养至第 6 代时逐渐开始衰退, 而 EPCs 培养 15 代时仍无衰减趋势, 生长旺盛。

### 2.5 EPCs 与 HUVECs 的体外血管生成能力

EPCs 与 HUVECs 在纤维蛋白凝胶上形成血管数目(3 个随机视野血管数之和)分别为 35 ± 3.8, 18.3 ± 1.2 (P < 0.05)。EPCs 形成的血管管腔相对更圆润(图5)。表明 EPCs 参与血管新生能力更强。

### 2.6 EPCs 与 HUVECs 的体外迁移能力

EPCs 组穿越的细胞明显多于 HUVECs 组, 两组 D 值分别为(0.86 ± 0.05)和(0.45 ± 0.04), 可见 EPCs 迁移能力明显优于 HUVECs (P < 0.05, 图6)。

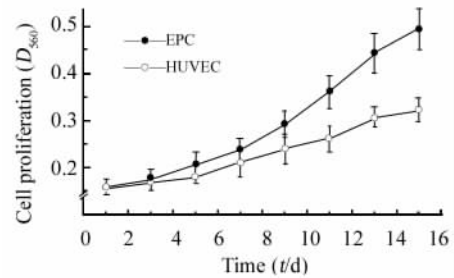


图4 EPCs 与 HUVECs 细胞的生长曲线

Fig.4 Cell growth curves of EPCs and HUVECs

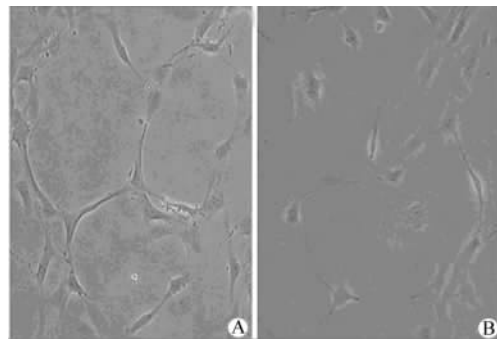


图5 EPCs (A) 与 HUVECs (B) 的体外血管生成 (×200)

Fig.5 Angiogenesis of EPCs (A) and HUVECs (B) in vitro (×200)

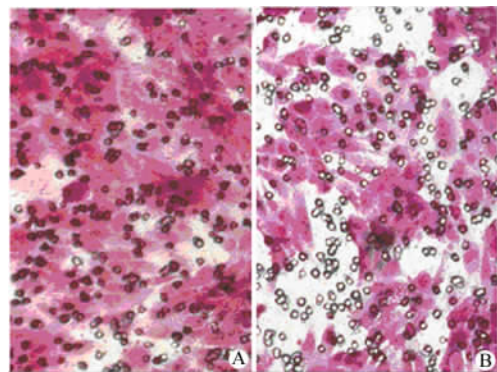


图6 EPCs (A) 与 HUVECs (B) 的体外迁移 (×200)

Fig.6 Migration of EPCs (A) and HUVECs (B) in vitro (×200)

## 3 讨论

EPC 作为内皮细胞的前体细胞, 功能上接近于干细胞<sup>[11-12]</sup>, 不仅参与胚胎时期的血管生成, 而且参与出生后的生理性和病理性血管新生。因此,

EPC 在血管损伤与再生、心脑血管疾病及肿瘤的发病机制研究与治疗上有巨大应用价值。但脐血、外周血、骨髓中的 EPC 比例很低。成人外周血中 EPC 数量约占单个核细胞的 0.002%；脐血中 EPC 数量相对多,约为外周血中 EPC 的 10 倍<sup>[13]</sup>。故探讨高效分离和纯化 EPC 及其体外扩增培养的有效方法具有重要意义。

研究<sup>[14-16]</sup>认为 EPC 可分为早期和晚期 EPC,前者在 2 至 3 周出现增殖高峰,第 4 周逐渐死亡;后者在 2 至 3 周出现铺路石样改变,旺盛增殖能力可持续 8 周以上。在表面标志 CD31 等表达与体内外血管生成能力上,早期 EPC 明显弱于晚期 EPC。

目前大多数研究中,EPC 通过 Dil-ac-LDL<sup>+</sup>/FITC-UEA-1<sup>+</sup><sup>[10]</sup>或者 CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup><sup>[3]</sup>来鉴定。CD133 是一种早期抗原,它仅表达于骨髓和外周造血干细胞及 EPC,在成熟内皮细胞上不表达。目前,体外分离 EPC 的方法主要有密度梯度离心法和免疫磁珠分选法。早期研究多采用密度梯度离心法,该法操作简单,价格较低,但分离不纯,常混杂有血管壁脱落的成熟内皮细胞及成纤维细胞等。早期免疫磁珠分选法一般采用 CD34 免疫磁珠,但随着 CD133 抗原功能研究的深入,目前认为 CD133 免疫磁珠分选法能更有效排除其他细胞的干扰,提高 EPC 的纯度。

本研究采用 CD133 免疫磁珠分选脐血单个核细胞培养 EPCs。经 CD133 免疫磁珠分选后的脐血单个核细胞,CD133 与 CD34 表达率分别为 86.04% 与 90.88%,而成熟内皮细胞的表面标志 CD31 表达率为 1.12%。分选后 CD133<sup>+</sup>单个核细胞经 EGM-2 MV 培养液培养 14 d,用 Dil-ac-LDL<sup>+</sup>/FITC-UEA-1<sup>+</sup>荧光染色法鉴定,显示约 90% 的细胞同时吞噬 ac-LDL 和结合 UEA-1,即为 EPCs。但此时的 EPCs CD133、CD34 表达率迅速下降,而 CD31 阳性率上升至 99.88%。同时,本研究从增殖、血管生成与迁移能力 3 个方面比较 EPCs 与 HUVECs(代表成熟内皮细胞)的功能。结果显示,本实验培养的 EPCs 在增殖、血管生成与迁移能力等功能上均明显强于 HUVECs,类似于 Hur 等<sup>[14]</sup>培养的晚期 EPCs。本实验中也尝试经密度梯度离心法提取脐血单个核细胞,将所得的单个核细胞悬液种植于纤维连接蛋白包埋的培养瓶,用 EGM-2 MV 培养液培养,同样也培养出 EPCs,但相比 CD133 免疫磁珠分选法,细胞纯度相对较低,常常夹杂成纤维细胞等,影响其增殖、血管生成与迁移能力的评价。

## [参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [2] Shi Q, Rafii S, Wu MH, *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells[J]. *Blood*, 1998, 92(2): 362-367.
- [3] Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, *et al.* *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells[J]. *Blood*, 2000, 95(10): 3106-3012.
- [4] Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis[J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(3): 294-300.
- [5] Kopp HG, Ramos CA, Rafii S. Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue[J]. *Curr Opin Hematol*, 2006, 13(3): 175-181.
- [6] Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2007, 11(1): 18-25.
- [7] Anderson SA, Glod J, Arbab AS, *et al.* Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model[J]. *Blood*, 2005, 105(1): 420-425.
- [8] Santarelli JG, Udani V, Yung YC, *et al.* Incorporation of bone marrow-derived Flk-1-expressing CD34<sup>+</sup> cells in the endothelium of tumor vessels in the mouse brain[J]. *Neurosurgery*, 2006, 59(2): 374-382.
- [9] Arbab AS, Pandit SD, Anderson SA, *et al.* Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 671-678.
- [10] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance[J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(4): 498-508.
- [11] Doyle B, Caplice N. A new source of endothelial progenitor cells--vascular biology redefined[J]? *Trends Biotechnol*, 2005, 23(9): 444-446.
- [12] Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells[J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1525-1531.
- [13] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, *et al.* Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34<sup>+</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. *Blood*, 2000, 95(3): 952-958.
- [14] Hur J, Yoon CH, Kim HS, *et al.* Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 288-293.
- [15] Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, *et al.* Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(1): 71-77.
- [16] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, *et al.* Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(3): 337-346.

[收稿日期] 2007-11-08

[修回日期] 2008-02-23

[本文编辑] 郁晓路