脐带华通胶间充质干细胞向 Flk1 阳性细胞分化的研究 *

陈海英[1,2] 高连如[1△] 张宁坤[1] 杨 明[3] 王志国[1]

(海军总医院 1.心脏中心；3.检验科 北京 100048；2.解放军第 210 医院内分泌科 辽宁 大连 116021)

摘要 目的：诱导脐带华通胶间充质干细胞向 Flk1 阳性细胞分化。**方法：**胶原酶法分离培养脐带华通胶间充质干细胞，第 3 代细胞以含 2- 巯基乙醇的分化培养基培养，应用 RT-PCR 和流式细胞仪从 mRNA 和蛋白水平检测 Flk1 阳性细胞分化水平。**结果：**脐带华通胶间充质干细胞 Flk1mRNA 及蛋白表达极低，分化培养基培养后表达上调，48h 达高峰(P<0.05)，之后表达降低。**结论：**2- 巯基乙醇可诱导脐带华通胶间充质干细胞向 Flk1 阳性细胞分化，为从中分选 Flk1 阳性细胞进行进一步研究提供了依据。

关键词：脐带；华通胶；间充质干细胞；Flk1；心血管前体细胞；2- 巯基乙醇

中图分类号：Q132.7 Q813 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2012)04-645-04

Induce Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Differentiate into Flk1-positive Cells*

CHEN Hai-ying[1,2], GAO Lian-ru[1△], ZHANG Ning-kun[1], YANG Ming[3], WANG Zhi-Guo[1]

(1.Heart Center,3. Department of Medical Laboratory, Naval General Hospital, Beijing 100048, China; 2. Department of Endocrinology, the 210th Hospital of PLA, Dalian, Liaoning, 116021,China)

ABSTRACT Objective: Induce mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly differentiate into Flk1-positive cells. Methods: Mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly (WJ-MSCs) were isolated by collagenase digestion and passage 3 cells were cultured by differentiation medium contained 2-mercaptoethanol, Flk1 mRNA were examined by RT-PCR, Flk1 protein were analyzed by flow cytometry. Results: Low expression of Flk1 mRNA and Flk1 protein were detected in WJ-MSCs. Flk1 expression increased after cultured by differentiation medium, and reached maximum after 48h culture, then declined. Conclusions: Mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly could be induced and differentiated into Flk1-positive cells by 2-mercaptoethanol, which can be used to select Flk1-positive cells in WJ-MSCs.

Key words: Umbilical cord; Wharton's jelly; Mesenchymal stem cells; Flk1; Cardiovascular progenitors; 2-mercaptoethanol

Chinese Library Classification: Q132.7 Q813 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)04-645-04

前言

心血管前体细胞是心脏再生治疗的理想细胞。Flk1(KDR)即血管内皮生长因子受体 -2(VEGF-2),是内皮细胞和侧板中胚层的早期标志，Flk1 阳性胚胎干细胞在体外可分化为血管内皮细胞、壁细胞和心肌细胞，为心血管前体细胞[1,2]，但胚胎干细胞来源的心血管前体细胞由于具有免疫原性、致畸胎瘤危险以及存在伦理争议而限制了其临床应用。成体间充质干细胞亦具有心肌、血管分化潜能[3-6]，但取材不便，并且受患者年龄和疾病的影响，其质量和数量均有下降[7-8]。因此，选择合适来源的心血管前体细胞是其临床应用的关键。来源于脐带的华通胶间充质干细胞 (WJ-MSCs) 无免疫原性及致肿瘤性，且为原始的干细胞，在体内外具有较强的心肌、血管分化潜能[9-12]，可以弥补上述细胞的缺陷，是细胞治疗的理想选择。因此，本研究观察化学诱导剂 2- 巯基乙醇诱导 WJ-MSCs 向 Flk1 阳性细胞分化的能力，为筛选及进一步应用 WJ-MSCs 来源的心血管前体细胞进行实验研究和临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞培养瓶、离心管、移液管 (美国 Corning)，倒置显微镜 (日本 Olympus)，二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司)，流式细胞仪 (美国 BECKMAN)，5804R 型低温超速离心机 (德国 Eppendorf 公司)，RS232C 型核酸测定仪 (德国 Eppendorf 公司)，DY-300 型低压电泳仪 (中国汕头广播仪器厂)，GDS-800 型凝胶扫描成像系统 (美国 UVP 公司)；DMEM 培养基、α -MEM 培养基、青霉素、链霉素 (Hyclone 公司)；胰蛋白酶、II 型胶原酶、IV 型胶原、胎牛血清 (Gibco 公司)，2- 巯基乙醇 (Sigma 公司)；FITC-Flk1 抗体 (美国 BD 公司)；Trizol (Invitrogen 公司)，RT-PCR 试剂盒、DL2000DNAmarker (宝生物工程大连有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 WJ-MSCs 的分离与培养 无菌取足月剖宫产健康新生儿脐带。用平衡盐洗去脐带残留血液，剪成 3-4 cm 小段，取每一

* 基金项目：国家 863 计划资助课题 (No：2006AA02Z469)

作者简介：陈海英(1972,12-)，博士，主治医师。Tel：15313235288 E-mail：jjhchy@163.com

△通讯作者：高连如, E-mail: lianru@yahoo.com.cn

(收稿日期：2011-07-18 接受日期：2011-08-13)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

段沿静脉腔剪开，剔除 2 根动脉，取动脉之间，血管与外膜之间的胶状物即华通胶，并剪成 1mm³ 及以下的小块，以平衡盐溶液冲洗后，浸于 0.2%Ⅱ型胶原酶溶液中，37℃水浴 17h，组织块消化成粘稠状，加入相当于原液 4 倍量的含胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化，并使血清浓度达到 20%，分装于 75cm² 培养瓶，置 5%CO_2，37℃培养箱，待细胞贴壁后，更换为完全 DMEM 培养基，以后每隔 3-4 天换液 1 次，细胞贴壁融合后传代培养。

1.2.2 WJ-MSCs 的诱导培养 第 3 代 WJ-MSCs 以 1× 10^6/ 瓶接种于Ⅳ型胶原包被的 75cm² 培养瓶中，以分化培养基（含 10% 胎牛血清和 50 M 2- 巯基乙醇的 α-MEM 培养基）培养细胞。检测分化培养基培养前、培养 24h、48h、72h 及 96h 细胞 Flk1 mRNA 及蛋白表达。实验重复 3 次。

1.2.3 提取细胞总 RNA PBS 漂洗细胞后，加入 1ml Trizol，用毛滴管反复吹打多次，室温孵育 5 分钟，转入 1.5ml 离心管，加入 0.2ml 氯仿，震荡 15s，4℃、12000G 离心 15 分钟，吸上清置新 1.5ml 管，加入 0.5ml 异丙醇，混匀，4℃、12000G 离心 10 分钟，弃上清，加入 75%乙醇 1ml，震荡混匀，4℃、7500G 离心 5 分钟，尽弃液体，沉淀溶于 DEPC 水中，应用核酸测定仪检测 RNA 浓度及纯度。

1.2.4 逆转录聚合酶链反应（RT-PCR） 取 1 g RNA 逆转录合成 cDNA，PCR 反应 Flk1 上游引物：5'- ACG CTG ACA TGT ACG GTC TAT-3'，下游引物 5'- GCC AAG CTT GTA CCA TGT GAG-3'，扩增片段 438bp；内参 β-actin 上游引物：5'-CTT GCC ATC CTA AAA GCC ACC-3'，下游引物 5'-GAC CAA AAG CCT TCA TAC ATC TC-3'，扩增片段 231bp，反应条件：94℃ 5min, 94℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 60s,共进行 30 个循环，最后，72℃ 10min。反应产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶成像系统采集电泳结果，并应用附带软件分析目标条带与内参条带吸光度之比，进行半定量 PCR 分析。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞 Flk1 蛋白 消化细胞，PBS 洗 2 遍后，以 200 l PBS 重悬细胞，取 100 l 加入 20 l FITC-Flk1 抗体（阴性对照加 20 l PBS），混匀，室温暗室孵育 20min，1500r 离心 5min，弃上清，沉淀 PBS 洗 2 遍（1500r，5min），弃上清，加 PBS 调整细胞浓度上机检测。以标记抗体呈阳性的细胞百分率作为表达 Flk1 蛋白的计量标准。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件统计，结果以均值± 标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，多个样本均数的两两比较采用 LSD 法检验。P＜0.05 为在统计学上有显著差异。

2 结果

2.1 WJ-MSCs 分离及培养

细胞培养 2、3d 后，显微镜下可见粘附培养瓶生长，呈长梭形的成纤维样细胞，有伪足伸出，细胞具有折光性，3、4d 呈集落生长（图 1），5-7d 左右细胞融合，传代 1× 10^6 个 /75cm² 培养瓶培养，此为 p1 代，以后以此类推，传代后的细胞生长较原代加快，形态无变化，3-4 天即融合传代（图 2）。

2.2 WJ-MSCs 诱导培养前后 Flk1 mRNA 的表达变化

Flk1 mRNA 表达以 Flk1OD 值 / β-actinOD 值分析。WJ-MSCs Flk1mRNA 表达极低，以分化培养基培养后，Flk1 mRNA 表达逐渐增高，至培养后第 48h 达高峰，之后表达量突然下降（表 1，图 3）。

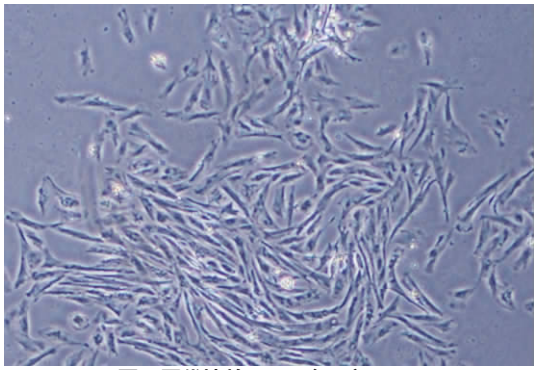

图 1 原代培养 3-4 天（× 40）

Fig. 1 Primary cell culture, day 3-4 (× 40)

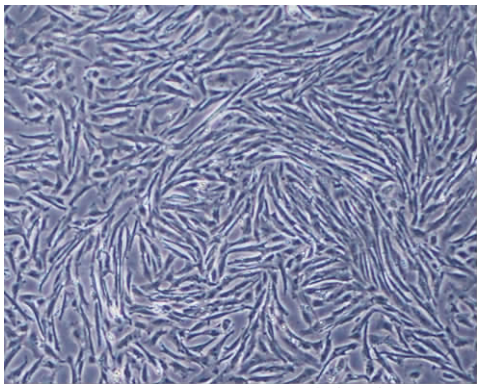

图 2 P2 代 3-4 天细胞融合（× 40）

Fig.2 Passage 2 cell fusion, day 3-4 (× 40)

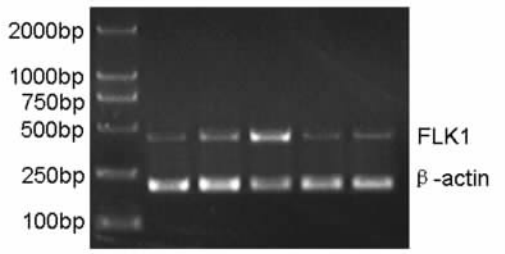

图 3 Flk1 与 β-actin RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图；从左至右依次为 DNA marker，0h，24h，48h，72h，96h

Fig. 3 Electrophoresis of PCR amplified products of Flk1 and β-actin；From left to right: DNA marker，0h，24h，48h，72h，96h

2.3 流式细胞仪检测诱导培养前后 Flk1 蛋白表达变化

Flk1 蛋白表达变化与其 mRNA 表达变化一致，分化培养基培养前表达很低，培养 48h 表达最高，之后表达下降。（表 1，图 4）。

3 讨论

本研究发现 Flk1 在 WJ-MSCs 中表达极低，2- 巯基乙醇可诱导 WJ-MSCs 向 Flk1 阳性细胞分化。在低浓度 2- 巯基乙醇作用下，WJ-MSCs Flk1 mRNA 和蛋白表达于培养后第 1 天即增加，第 2 天达高峰，流式分析 Flk1 蛋白表达可达 20%，表明 WJ-MSCs 在分化培养基作用下表达 Flk1 的细胞数目增加，为从 WJ-MSCs 中分选 Flk1 阳性细胞提供了依据。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 WJ-MSCs Flk1 mRNA 及蛋白表达变化

Tab.1 Expression of Flk1 mRNA and protein in WJ-MSCs

	0h	24h	48h	72h	96h
Flk1 mRNA	0.49± 0.04	0.62± 0.05*	1.13± 0.12*	0.57± 0.06#	0.51± 0.03#
Flk1protein(%)	6.2± 0.7	9.7± 0.9*	20.8± 2.9*	7.8± 1.8#	6.3± 1.2 #

注：* 与 0h 比较 P<0.05；与 24h 比较 P<0.05；# 与 48h 比较 P<0.05

Note: * P<0.05 vs 0h; P<0.05 vs 24h; # P<0.05 vs 48h

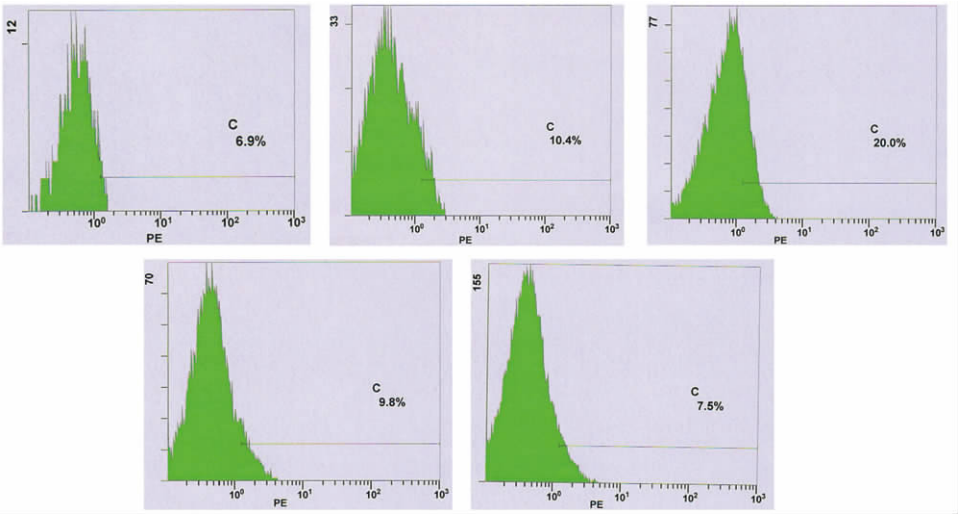

图 4 流式检测 Flk1 蛋白表达

Fig. 4 Flow cytometric analysis of Flk1 expression

Flk1 阳性细胞出现在胚胎早期中胚层，Flk1 是内皮细胞和侧板中胚层的早期标志。对小鼠的世系追踪研究表明，心肌发生起源于表达 Flk1 的细胞[13,14]。Flk1 阳性胚胎干细胞可分化为心肌细胞、内皮细胞和壁细胞，三维培养可形成血管[1,15-16]，Flk1 阳性诱导多能干细胞具有与 Flk1 阳性胚胎干细胞相同的心肌、血管分化潜能[1,17]。由此可见，Flk1 阳性干细胞为心血管前体细胞，Flk1 为干细胞中心血管前体细胞的标志。

心血管前体细胞可分化为心肌和血管，形成有功能的心肌组织，是心脏再生医学的理想选择。然而，胚胎干细胞来源的细胞由于具有免疫原性、致畸胎瘤危险以及存在伦理争议而限制了其应用。成体间充质干细胞亦具有心肌、血管分化潜能[3-6]，由于取材有创，而且受患者年龄和疾病的影响，其质量和数量均有下降[7-8]，需体外扩增培养，错过了心肌梗死的最佳治疗窗，也难以广泛应用。因此寻找合适来源的心血管前体细胞用于心脏再生研究和治疗极其必要。

近年，脐带华通胶间充质干细胞引起了各国科学家的广泛关注。脐带为剖腹产的废弃物，取材方便，应用无伦理争议。华通胶来源于胚胎发育 13 周左右的胚外中胚层，是脐带中 2 条动脉和 1 条静脉之间的胶状物质，其内含有大量的原始间充质干细胞。WJ-MSCs 具有稳定的端粒酶活性，其胚胎干细胞标志基因表达明显高于骨髓间充质干细胞，但低于胚胎干细胞[18]，因此具有较强的增殖、分化潜能而无致肿瘤性。本课题组既往研究及国内外的其他研究证实 WJ-MSCs 表达 HLA-ABC，不表达 HLA-DR[19-22]，表明其具有较低的免疫原性。在未使用免疫抑制剂的情况下，同种异体或异种移植 WJ-MSCs 均未发现免疫排斥反应。可见，WJ-MSCs 是细胞治疗修复组织损伤的理想选择。WJ-MSCs 在体内外均具有较强的心肌、血管分化潜能。体外在 5- 氮杂胞苷和二甲基亚砜诱导下可分化为表达心肌特异性标志物的心肌样细胞[9-10]，人 WJ-MSCs 移植给急性心肌梗死大鼠心肌能够存活并分化为心肌样细胞，同时可改善心功能[10-11]。WJ-MSCs 体外的内皮分化潜能及形成毛细血管网的能力明显强于骨髓间充质干细胞[23]，WJ-MSCs 移植给后肢缺血的小鼠后可分化为内皮细胞[12]。因此，WJ-MSCs 中存在心血管前体细胞，从 WJ-MSCs 中分选心血管前体细胞具有可行性，分选 WJ-MSCs 中心血管前体细胞对其进行实验研究及临床应用具有重要意义。

本研究发现心血管前体细胞标志 Flk1 在 WJ-MSCs 中表达极低，给其分离、纯化及进一步应用带来困难。既往研究表明，2- 巯基乙醇可诱导细胞分化。Narazaki G 等[1]应用含低浓度 2- 巯基乙醇的分化培养基诱导培养于Ⅳ型胶原上的胚胎干细胞和诱导多能干细胞分化为 Flk1 阳性心血管前体细胞。孙伟等[24]应用(3-5)mM 的 2- 巯基乙醇诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞。因此，本实验采用与 Narazaki G 等类似的方法培养 WJ-MSCs[1]，结果发现，2- 巯基乙醇可诱导 WJ-MSCs 向 Flk1 阳性细胞分化，为从 WJ-MSCs 中分选 Flk1 阳性细胞提供了依据。2 巯基乙醇在微浓度时其抗氧化作用对细胞有保护效力，因此采用本实验方法对细胞无毒性，为筛选的 Flk1 阳性细胞进行进一步的研究和应用提供了保证。在今后的研究中，我们还需进一步证实来源于 WJ-MSCs 的 Flk1 阳性细胞体内、体外的心肌、血管分化潜能。

参 考 文 献 (References)

[1] Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M,et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

stem cells[J]. Circulation, 2008, 118(5): 498-506

[2] Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent Flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages[J]. Dev. Cell, 2006, 11:723-732

[3] 刘建华,陈嘉榆.骨髓间质干细胞在心血管疾病治疗中的应用[J].国际内科杂志, 2007,34(1):1-5
LIU Jian-hua,CHEN Jia-yu. The application of bone marrow mesenchymal stem cell in cardiovascular disease[J]. Int J Intern Med, 2007, 34: (1)1-5

[4] Wang Lin-lin, Dong Wei-ren, Zhu Yan-fei,et al. Differentiation of adipose tissue-derived stem cells into myocardial cells and their transplantation for treatment of cardiovascular diseases [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2011,15 (14): 2648-2652

[5] 翟羽佳,仉红刚.脂肪来源间充质干细胞体外定向诱导分化血管细胞的研究进展[J].中国生物工程杂志,2010,30(6): 134-138
ZHAI Yu-jia, ZHANG Hong-gang. Adipose Derived-Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Vascular Cells in Vitro [J], China Biotechnology, 2010, 30(6): 134-138

[6] 张秀英,李一雷,任淑萍.等.VEGF 受体 flt-1 和 KDR 在骨髓间充质干细胞中的表达及意义[J]. 吉林大学学报, 2005, 4(31): 487-490
ZHAN G Xiu-ying1, L I Yi-lei, REN Shu-ping, et al. Expressions of VEGF receptors flt-1 and KDR in bone marrow mesenchymal stem cells. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2005,4 (31): 487-490

[7] 朱灏,许建中.不同年龄供体间充质干细胞在骨组织工程中的应用[J]. 中国临床康, 2004,8(2): 328-329
ZHU Hao,XU Jian-zhong. Application of mesenchymal stem cells of donors of different ages in the bone tissue engineering [J].Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2004,8(2):328-329

[8] Tokalov SV, Grü ner S, Schindler S,et al.Age-Related Changes in the Frequency of Mesenchymal Stem Cells in the Bone Marrow of Rats [J].Stem Cells and Development, 2007,16(3): 439-446

[9] 林晓波,何红燕,罗敏洁,等.人脐带间充质干细胞向心肌样细胞分化的研究[J].实用儿科临床杂志,2007,22(13):971-973
LIN Xiao-bo, HE Hong- yan,LUO Min-jie, et al. Differentiation of Human Umbilical Cord- Der ivedM esenchymal Stem Cells into Cardiomyocytes[J]. J Appl Clin Pediatr, 2007, 22(13): 971-973

[10] Wu KH, XM Mo, B Zhou, et al. Cardiac potential of stem cells from whole human umbilical cord tissue [J]. J Cell Biochem, 2009,107: 926-932

[11] 何红燕,林晓波,应文娟,等.人脐带间充质干细胞经体内定植并向心肌样细胞分化的研究[J].中国输血杂志,2009,22(3):188-191
HE Hong-yan, LIN Xiao-bo, YING Wen-juan, et al. Differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte s in rat model [J]. Chin J Blood Transfus ion, 2009,22 (3):188-191

[12] Zhou B, Lu SH. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells [J]. J Cell Biochem, 2007, 100: 608-616

[13] Ema M, Takahashi S, Rossant J. Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors [J]. Blood, 2006,107(1):111-117

[14] Motoike T, Markham DW, Rossant J, et al. Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage[J]. Genesis,2003,35 (3),153-159

[15] Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors [J]. Nature, 2000, 408(6808):92-96

[16] Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR1 embryonic-stem-cell-derived population[J]. Nature, 2008, 453(7194):524-528

[17] Schenke LK, Rhodes KE, Angelis E, et al. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages[J]. Stem Cells, 2008, 26(6):1537-1546

[18] Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Rev, 2011, 7 (1): 1-16

[19] 陈宇,张宁坤,杨明,等.脐带华通胶间充质干细胞的分离培养及鉴定[J].中国现代医学杂志, 2010, 20(16):2412-2415
CHEN Yu, ZHANG Ning-kun,YANG Ming, et al. Isolation and Identification of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly[J]. China Journal of Modern Medicine, 2010,20 (16):2412-2415,2410

[20] 野向阳,李相军,徐岩,等.人脐带间充质干细胞体外成骨及其免疫学特征[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,36:7029-7033
YE Xiang-yang, LI Xiang-jun, XU yan, et al. In vitro osteogenesis and immunological characteristics of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 36:7029-7033

[21] Qiao C, Xu WR, Zhu W, Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord[J]. Cell Biology International, 2008,32:8-15

[22] 祝加学, 沈尊理, 秦金宝, 等. 一种大量快速分离脐带间充质干细胞的新方法[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(6):1164-1169
ZHU Jia-xue, SHEN Zun-li, QIN Jin-bao, et al. A novel method to isolate mesenchymal stem cells from the human umbilical cord [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10(6): 1164-1169

[23] Chen MY, Lie PC, Li ZL,et al. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Exp Hematol, 2009, 37 (5):629-640

[24] 孙伟,胡亮,赵兴,等. 体外定向诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J]. 安徽农业科学, 2010,38(7): 3492-3495, 3530
Sun Wei,Hu Liang,Zhao Xing,et al. The research of rMSCs induced and differentiated into neuron-likecells in vitro [J]. Journal of Anhui Agri. Sci,2010,38(7):3492-3495,3530

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net