

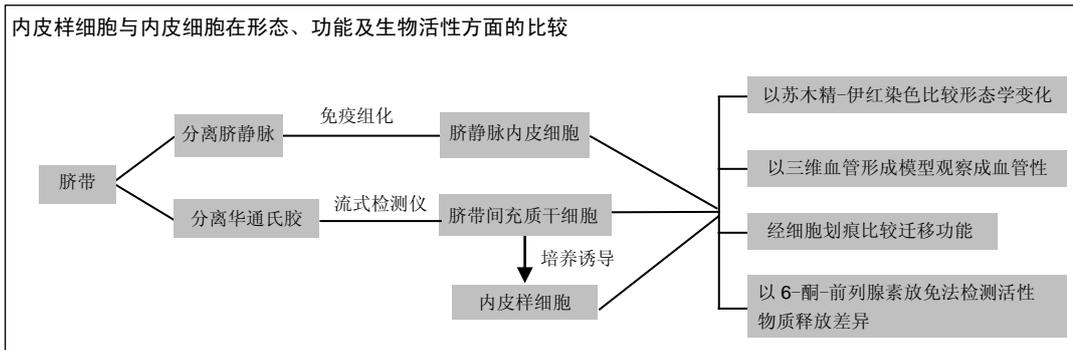
内皮样细胞与脐静脉内皮细胞的比较

郝晓娟¹, 郝海英¹, 朱敏杰¹, 袁 铮¹, 李伟伟¹, 陈 洁¹, 朱旅云²(¹邯郸市中心医院肾内二科, 河北省邯郸市 056001; ²白求恩国际和平医院, 河北省石家庄市 050000)

引用本文: 郝晓娟, 郝海英, 朱敏杰, 袁铮, 李伟伟, 陈洁, 朱旅云. 内皮样细胞与脐静脉内皮细胞的比较[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):83-88.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.015 ORCID: 0000-0002-1480-7513(郝晓娟)

文章快速阅读:



郝晓娟, 女, 1985年生, 甘肃省民勤县人, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事临床医学、内分泌及肾脏病学方面的研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)01-0083-06

稿件接受: 2015-11-20

http://www.crter.org

文题释义:

脐静脉内皮细胞: 血管内表面由一层内皮细胞所覆盖, 细胞直接与血液接触, 通过多种途径在调节血压、凝血和纤溶、炎性细胞的黏附和迁移, 以及血管形成等生理、病理过程中发挥重要作用。长期以来, 对于人体血管内皮细胞的各项研究决大多数是基于人脐静脉内皮细胞。

内皮样细胞: 是脐带间充质干细胞通过加入含血管内皮生长因子及碱性成纤维生长因子的内皮细胞诱导液诱导分化而来, 经免疫组化鉴定强表达内皮细胞特异性的标志 CD31、VWF。

摘要

背景: 干细胞可诱导分化为内皮样细胞, 用于治疗糖尿病下肢血管病变, 但诱导后的内皮样细胞是否完全可以取代内皮细胞改善血管病变呢? 内皮样细胞与内皮细胞有哪些异同? 尚未得到解决。

目的: 探讨诱导后的内皮样细胞与脐静脉内皮细胞在形态、功能及活性方面的异同。

方法: 分离、培养脐带间充质干细胞及脐静脉内皮细胞, 分别通过流式细胞仪及免疫组化进行鉴定, 将分离出的脐带间充质干细胞用含 10 μg/L 血管内皮生长因子、10 μg/L 的碱性成纤维细胞生长因子及体积分数为 2% 胎牛血清的 DMEM-LG/F12 培养液向内皮样细胞方向诱导分化并用免疫组化进行鉴定, 通过细胞迁移、活性物质测定及三维血管形成实验对内皮样细胞及内皮细胞进行比较。

结果与结论: 分离的脐带间充质干细胞经流式及免疫组化鉴定高表达间充质干细胞相关表面标志, 脐静脉内皮细胞经免疫组化鉴定高表达 CD31 和 VWF。脐带间充质干细胞经诱导液诱导后, 进行免疫组化鉴定高表达 CD31 和 VWF。细胞迁移、活性物质及三维血管形成实验均显示诱导后的内皮样细胞在功能及活性上与内皮细胞相似, 且优于内皮细胞。

关键词:

干细胞; 培养; 脐带间充质干细胞; 内皮样细胞; 内皮细胞; 细胞迁移; 血管形成

主题词:

脐带; 间质干细胞; 内皮细胞; 细胞迁移分析; 组织工程

Endothelial-like cells versus human umbilical vein endothelial cells

Abstract

BACKGROUND: Stem cells are induced to differentiate into endothelial-like cells that can be used for the treatment of diabetic lower extremity vascular disease. However, it is unclear whether these endothelial-like cells can completely replace endothelial cells to improve vascular disease and what are the differences between endothelial-like cells and endothelial cells.

OBJECTIVE: To explore the differences and similarities between endothelial-like cells and human umbilical vein endothelial cells in the aspects of morphology, function, and viability.

METHODS: Umbilical cord mesenchymal stem cells and umbilical vein endothelial cells were isolated, cultured and identified using flow cytometry and immunohistochemical method. Isolated umbilical cord mesenchymal stem cells were induced in DMEM-LG/F12 containing 10 μg/L vascular endothelial growth factor, 10 μg/L basic

Hao Xiao-juan¹, Hao Hai-ying¹, Zhu Min-jie¹, Yuan Zheng¹, Li Wei-wei¹, Chen Jie¹, Zhu Lv-yun² (¹Second Department of Nephrology, Handan Central Hospital, Handan 056001, Hebei Province, China; ²Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China)

Hao Xiao-juan, Master,
Attending physician, Second
Department of Nephrology,
Handan Central Hospital,
Handan 056001, Hebei
Province, China

Subject headings: Umbilical
Cord; Mesenchymal Stem
Cells; Endothelial Cells; Cell
Migration Assays; Tissue
Engineering

fibroblast growth factor and 2% fetal bovine serum to differentiate into endothelial-like cells followed by immunohistochemical identification. To compare endothelial-like cells with human umbilical vein endothelial cells, cell migration detection, active substance measurement and three-dimensional angiogenesis test were performed.

RESULTS AND CONCLUSION: Isolated umbilical cord mesenchymal stem cells strongly expressed the surface markers of mesenchymal stem cells, and human umbilical vein endothelial cells strongly expressed CD31 and VWF. After induction, the umbilical cord mesenchymal stem cells were identified to highly express CD31 and VWF. Through cell migration, active substance and three-dimensional angiogenesis tests, endothelial-like cells were similar to endothelial cells in the function and activity, and superior to endothelial cells.

Cite this article: Hao XJ, Hao HY, Zhu MJ, Yuan Z, Li WW, Chen J, Zhu LY. Endothelial-like cells versus human umbilical vein endothelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):83-88.

0 引言 Introduction

干细胞具有多向分化潜能, 其可诱导分化为心肌样细胞、神经样细胞、成骨样细胞、内皮样细胞等^[1-3], 正因如此其在神经、心血管、骨科、血管外科等各大领域广泛应用, 但现研究只局限在其可诱导分化为相应的细胞而未深入探索它们之间的异同。实验对内皮样细胞与内皮细胞在形态、功能及生物活性方面进行比较, 从而为今后用于临床治疗血管病变提供坚实的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 分组样本比较观察。

1.2 时间及地点 2012年8月至2013年1月在白求恩国际和平医院输血科实验室及检验科完成。

1.3 材料

1.3.1 脐带来源 脐带取自白求恩国际和平医院妇产科健康足月剖宫产妇, 无传染性疾病病史, 胎儿无先天性疾病, 获得产妇知情同意, 并签署知情同意书。

1.3.2 主要材料和仪器 流式抗体 CD29-FITC, CD44-FITC, CD105-PE, CD45-PECY5, CD14-FITC, CD34-PE, IgG1-FITC, IgG1K-PE, IgG2ak-PECY5, IgG2ak-FITC(BECKMAN公司, 美国), 血管内皮生长因子、碱性成纤维生长因子(PEPROTECH 公司), 抗人CD31单克隆抗体、兔抗人八因子相关抗原多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司), pics XL流式细胞检测仪(BECKMAN公司, 美国), XDS-1B倒置显微镜(重庆光学仪器厂), 二氧化碳恒温孵育箱(上海力申科学仪器有限公司), 6-酮-前列腺素F1a放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所)。

1.4 实验方法

1.4.1 脐带间充质干细胞的分离培养与扩增 把无菌条件下取得的足月剖宫产胎儿的脐带浸泡于含有肝素的生理盐水中, 将脐带剪成约3.0 cm长的小段, 剔除3根血管, 分离出其中的Wharton's Jelly剪碎成大小约1 mm×1 mm×1 mm的组织块, 以含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基重悬, 接种于25 cm²的培养瓶中, 37 °C, 体积分数为5%CO₂孵箱培养, 倒置显微镜下观察, 待细胞贴壁后弃掉组织块, 并更换培养基, 以后视细胞生长情况每3 d换液1次, 细胞融合达80%~90%进行传代培养。

1.4.2 脐静脉内皮细胞的分离培养与扩增 将无菌条件下新鲜取得的足月剖宫产胎儿脐带浸泡于含有肝素的生理盐水中, 反复冲洗后再用配好的含低分子肝素钠冲洗液冲洗, 剪去有血肿、钳痕以及较弯曲部分, 选取长约20 cm较直的脐带, 再次用含低分子肝素钠冲洗液反复冲洗脐静脉内残留血, 再用无菌生理盐水冲洗数次直至流出液清亮无色为止。将脐带两端抬起成U形, 一端用5 mL移液管将约10 mL的0.1% II型胶原酶注入脐静脉, 直到管腔完全充盈且另一端有II型胶原酶流出时, 用止血钳夹住两端, 常温消化30 min。待消化结束后, 松开两端止血钳, 用含体积分数为5%胎牛血清的DMEM培养基冲洗数次, 以终止消化, 并将冲洗液与消化液一并收入离心管中, 以1 200 r/min离心3 min, 弃上清, 再次用含体积分数为5%胎牛血清的DMEM冲洗并离心, 弃上清, 用含体积分数为10%胎牛血清、1 mg/L血管内皮生长因子、1 mg/L碱性成纤维生长因子的DMEM/F12培养基重悬细胞, 移入25 cm²培养瓶内, 并加入配好的双抗(青霉素及链霉素)10 μL, 于37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。倒置相差显微镜下观察细胞生长情况, 待细胞贴壁后, 进行半量换液, 待细胞融合达80%~90%进行传代培养。

1.4.3 流式细胞学检测脐带间充质干细胞表面标志及鉴定 脐带间充质干细胞经0.25%胰蛋白酶消化后, 离心收集细胞, 并加入100 μL PBS稀释细胞, 制成细胞悬液, 放入8个试管中, 依次加入小鼠抗人单抗和同型阴性对照抗体: CD29-FITC, CD44-FITC, CD105-PE, CD14-FITC, CD14/CD29/CD44-FITC-ISO, CD105-PE-ISO, CD34/CD45-PE-ISO, CD34/CD45-FITC, 室温孵育30 min, PBS离心洗涤3次, 加入100 μL PBS重新制成细胞悬液, 流式细胞仪进行分析, 每个标本均重复实验3次。

1.4.4 免疫组化检测脐静脉内皮细胞表面标志及鉴定 将脐静脉内皮细胞经0.25%胰蛋白酶消化后, 离心收集细胞, 加入已放入盖玻片的6孔板中, 加入DMEM/F12+体积分数为10%胎牛血清+10 μg/L血管内皮生长因子+10 μg/L碱性成纤维生长因子培养基, 37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养, 待细胞达80%融合后, 取出玻片, 40 g/L多聚甲醛固定细胞, 用中性树脂粘于载玻片过夜, 体积分数为3%过氧化氢浸泡冲洗15 min, 蒸馏水冲洗2遍, 进行热修复, 加3%小牛血清白蛋白20 min, 加入鼠抗人CD31

单克隆抗体和兔抗人八因子相关抗原多克隆抗体, 室温孵育2 h后4 ℃过夜, 加入二抗, 二氨基联苯胺显色剂显色4 min, 苏木精染色3 min, 中性树脂胶封固, 镜下观察阳性细胞。

1.4.5 诱导脐带间充质干细胞及免疫组化鉴定 将生长状态良好的第4代脐带间充质干细胞进行消化, 以 10^8 L^{-1} 细胞浓度接种于 25 cm^2 培养瓶中, 待细胞贴壁后换液, 加入内皮细胞诱导液(含体积分数2%胎牛血清、 $10 \mu\text{g/L}$ 血管内皮生长因子、 $10 \mu\text{g/L}$ 碱性成纤维生长因子的DMEM/F12培养基), 倒置相差显微镜下观察细胞生长状态, 每4 d半量换液, 共培养35周, 消化收集细胞, 接种在含有盖玻片的6孔板中进行免疫组化检测CD31及VWF细胞表面标志进行鉴定(方法同上)。

1.4.6 苏木精-伊红染色 苏木精-伊红染色进行诱导后的内皮样细胞及脐静脉内皮细胞形态学比较, 将脐静脉内皮细胞及诱导后的内皮样细胞以 10^9 L^{-1} 细胞浓度接种于含有盖玻片的6孔板中, 待细胞融合达80%左右, 取出玻片, 生理盐水洗涤3次, 40 g/L 多聚甲醛固定, 固定盖玻片于载玻片上, 放入配好的苏木精染液中3 min, 自来水冲洗, 1%盐酸乙醇溶液30 s, 自来水冲洗, 伊红液染3 min后冲洗, 再依次放入体积分数80%乙醇、体积分数90%乙醇、无水乙醇、二甲苯 I、二甲苯 II, II中5 min, 中性树脂胶封固, 镜下观察细胞形态。

1.4.7 三维血管形成模型观察 取鼠尾5根, 体积分数75%乙醇浸泡30 min, 去掉皮毛, 抽银白色尾腱, 剪碎置150 mL 0.1%无菌冰醋酸中, 振荡, 4 ℃放置一两周后4 000 r/min离心30 min, 取上清, 即鼠尾胶原制备成功。取制备好的胶原200 μL , 用0.1 mmol/L NaHCO_3 调整pH至7.0, 放入6孔板中, 室温3 h, 胶原凝固, 收集诱导后的内皮样细胞及脐静脉内皮细胞以 5×10^5 个细胞接种于已铺入胶原的6孔板中, 补加培养基(DMEM/F12+体积分数为10%胎牛血清+ $10 \mu\text{g/L}$ 血管内皮生长因子+ $10 \mu\text{g/L}$ 碱性成纤维生长因子), 37 ℃、体积分数5% CO_2 培养箱中培养, 倒置相差显微镜观察细胞形态变化。

1.4.8 细胞划痕试验 准备好6孔板、标记笔、直尺、20 μL 移液枪头, 标记笔在6孔板背面沿直尺均匀的划横线, 每孔穿过5条线, 收集诱导后的内皮样细胞及内皮细胞以 5×10^5 个细胞接种于每孔, 过夜待融合达80%左右, 弃上清, 再用20 μL 移液枪头垂直于背面横线划痕, 无菌生理盐水冲洗2次, 加培养基(DMEM/F12+体积分数为10%胎牛血清+ $10 \mu\text{g/L}$ 血管内皮生长因子+ $10 \mu\text{g/L}$ 碱性成纤维生长因子), 37 ℃、体积分数为5% CO_2 培养箱孵育, 于0, 6, 9, 12, 24 h取样拍照并用象素差分析。

1.4.9 6-酮-前列腺素放免法检测 取诱导后的内皮样细胞及脐静脉内皮细胞培养液, 按6-酮-前列腺素F1a放免药盒说明书进行PGI2的测定。

1.5 主要观察指标 ①脐带间充质干细胞及脐静脉内皮

细胞培养传代过程中细胞形态变化。②流式细胞仪检测鉴定脐带间充质干细胞。③免疫组化检测鉴定脐静脉内皮细胞及诱导后的内皮样细胞。④诱导后的内皮样细胞及脐静脉内皮细胞通过苏木精-伊红染色、三维血管形成、划痕试验及PGI2测定进行形态学、成血管性、迁移能力及活性物质释放4个方面比较其异同。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0软件分析对各项数据进行t检验, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脐带间充质干细胞及脐静脉内皮细胞的形态 倒置相差显微镜下观察, 脐带中的Wharton's Jelly组织块培养至5 d左右, 组织块周围爬出贴壁生长的长梭形细胞, 细胞两端较长突起, 胞体中央膨大, 为细胞核。培养至第13天左右, 细胞形态逐渐变为均一的纺锤形(图1A)。脐静脉内皮细胞经消化培养至2 d左右隐约可见贴壁的花瓣样细胞, 7 d左右贴壁细胞明显增多, 于近14 d细胞融合达80%左右, 多呈小三角形相互嵌合排列, 呈“花瓣样”、“铺路石样”(图1B)。

2.2 流式细胞仪检测细胞表面标志 从脐带Wharton's Jelly中提取出的贴壁细胞高表达与MSH相关的细胞表面标志CD105、CD29、CD44, 低表达与造血干细胞相关的细胞表面标志CD14、CD34、CD45, 且细胞传代培养至10代后的细胞表面标志无改变(图2)。

2.3 诱导后的内皮样细胞形态 诱导起初细胞开始增殖, 细胞形态短梭形, 1周后细胞明显增殖, 细胞相互融合、重叠, 细胞呈长梭形, 随着时间的延长, 细胞增殖程度下降, 细胞交织成网状结构, 且边缘散在类圆形细胞(图1C)。

2.4 免疫组化进行诱导后内皮样细胞及脐静脉内皮细胞鉴定 诱导后的内皮样细胞及脐静脉内皮细胞均强表达细胞表面标志CD31及假性血友病因子(图3)。

2.5 苏木精-伊红染色结果 经诱导后的内皮样细胞形态呈多样性, 为“长梭形、多角形、短梭形、圆形、铺路石样”改变, 而脐静脉内皮细胞形态呈“铺路石样或花瓣样”, 与倒置显微镜下观察结果相符(图4)。

2.6 三维血管形成模型观察 倒置相差显微镜下可见诱导后的内皮样细胞与脐静脉内皮细胞形态变化, 均形成大小不一的管腔样结构(图5)。

2.7 细胞划痕实验结果 通过比较脐静脉内皮细胞及诱导后的内皮样细胞迁移能力, 结果显示, 细胞迁移随时间呈逐渐上升趋势, 诱导后的内皮样细胞迁移程度大于内皮细胞, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 于24 h时二者迁移能力相当, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 提示诱导后的内皮样细胞的迁移能力优于脐静脉内皮细胞(图6)。

2.8 前列环素释放量的检测结果 通过PGI2释放量检测, 结果显示诱导后的内皮样细胞分泌的PGI2明显大于脐静脉内皮细胞, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。



图1 脐静脉内皮细胞及诱导前后脐带间充质干细胞的形态($\times 100$)
Figure 1 The morphology of umbilical vein endothelial cells and umbilical cord mesenchymal stem cells before and after induction ($\times 100$)

图注: 图中 A 为人脐带间充质干细胞原代培养 5 d, 细胞形态逐渐变为均一的纺锤形; B 为脐静脉内皮细胞原代培养 7 d, 细胞形态呈花瓣状或铺路石样; C 为人脐带间充质干细胞诱导后交织成网状结构, 边缘散在类圆形细胞。

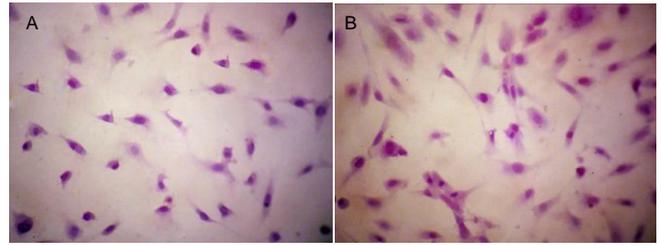


图4 诱导后的内皮样细胞及脐静脉内皮细胞形态学观察(苏木精-伊红染色, $\times 400$)

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of induced endothelial-like cells and umbilical vein endothelial cells ($\times 400$)

图注: 图中 A 为倒置显微镜下观察脐静脉内皮细胞; B 为倒置显微镜下观察诱导后的内皮样细胞。

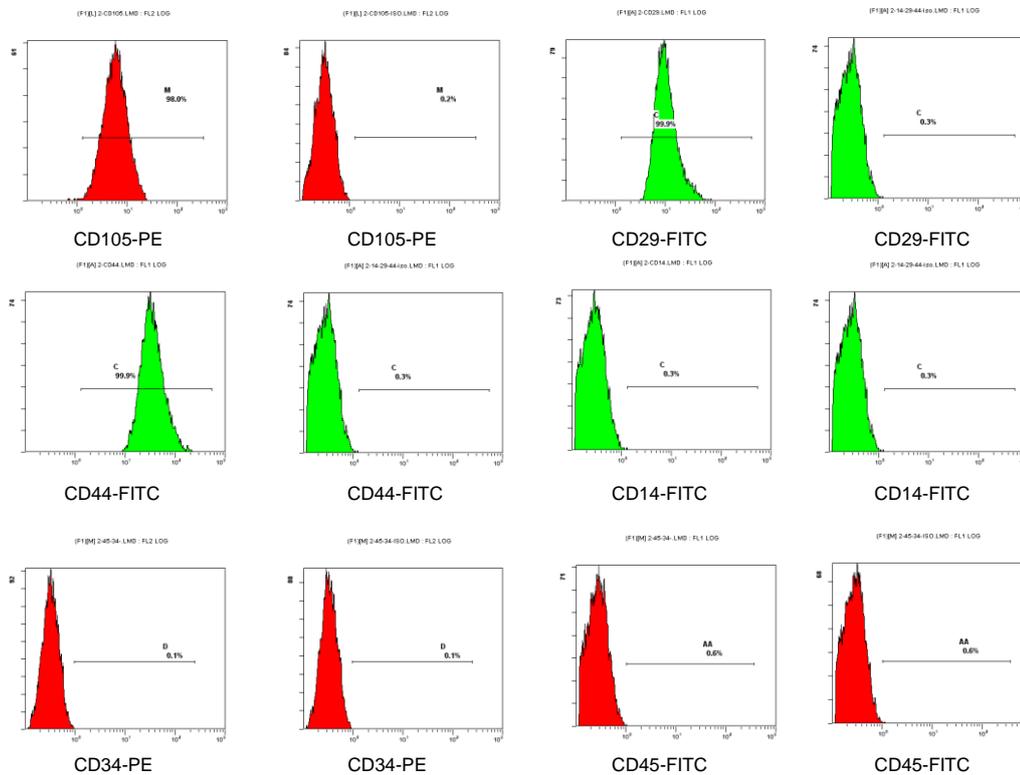


图2 脐带间充质干细胞表面标志鉴定
Figure 2 Determination of surface markers of umbilical cord mesenchymal stem cells

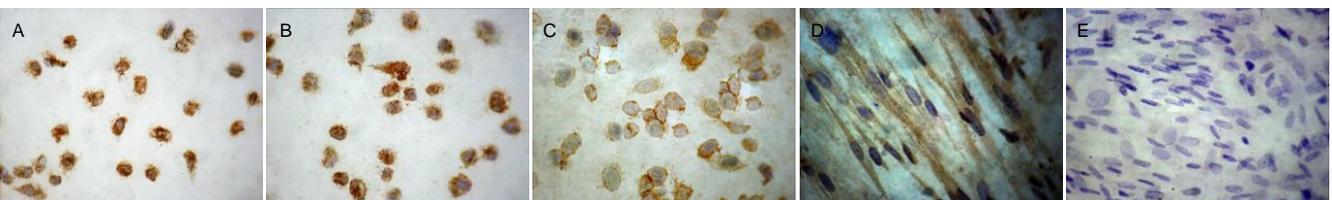


图3 诱导后的内皮样细胞与脐静脉内皮细胞特异表型的表达($\times 100$)

Figure 3 Expression of specific surface markers of induced endothelial-like cells and umbilical vein endothelial cells ($\times 100$)

图注: 图中 A 为脐静脉内皮细胞 VWF 阳性表达; B 为诱导后的内皮样细胞 VWF 阳性表达; C 为脐静脉内皮细胞 CD31 阳性表达; D 为诱导后的内皮样细胞 CD31 阳性表达; E 为脐带间充质干细胞阴性表达。

3 讨论 Discussion

干细胞具有自我更新及多向分化潜能等特点, 成为研究的热点, 干细胞已有百年发展史, 从受精卵、克隆到胚胎干细胞, 直到现在的成体干细胞及诱导多潜能干细胞的发展, 脐带间充质干细胞被大家公认为良好的种子细胞^[4], 已有不少研究将不同来源的间充质干细胞进行

了比较, 脐带间充质干细胞优于骨髓及脐血^[5-7], 且也有学者通过比较脐带间充质干细胞及骨髓间充质干细胞进行内皮样细胞诱导中发现^[8], 脐带间充质干细胞更能诱导分化为内皮样细胞, 故进一步说明脐带间充质干细胞的优势。近年来来自不同国家的学者进行了大量实验研究, 证实了干细胞的多向分化潜能, 它可以诱导分化为神经样细胞、

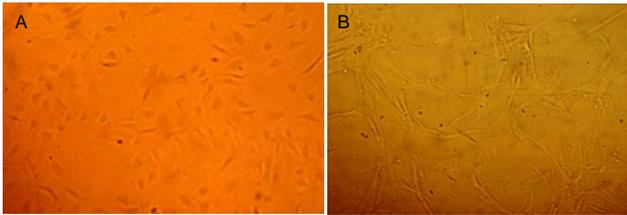


图5 倒置相差显微镜下观察诱导后的内皮样细胞及脐静脉内皮细胞三维模型 ($\times 100$)

Figure 5 Three-dimensional models of induced endothelial-like cells and umbilical vein endothelial cells under inverted phase contrast microscope ($\times 100$)

图注: 图中 A 为脐静脉内皮细胞的三维血管形成模型; B 为诱导后的内皮样细胞的三维血管形成模型。

表 1 不同细胞在不同时间下 PGI₂ 释放量的比较

($\bar{x} \pm s$, $n=32$, ng/L)

Table 1 Comparison of PGI₂ secretion levels from different cells at different time

时间	脐带间充质干细胞	内皮样细胞	脐静脉内皮细胞
1 周	69.317 \pm 1.090	590.513 \pm 2.328	524.76 \pm 2.690
2 周	69.317 \pm 1.090	1 228.293 \pm 2.776	524.76 \pm 2.690
3 周	69.317 \pm 1.090	1 234.230 \pm 3.271	524.76 \pm 2.690
4 周	69.317 \pm 1.090	603.783 \pm 6.523	524.76 \pm 2.690
5 周	69.317 \pm 1.090	599.253 \pm 3.200	524.76 \pm 2.690

表注: 各组之间比较, $P < 0.05$ 。

成骨样细胞、心肌样细胞、脂肪样细胞、胰岛样细胞、内皮样细胞^[9-13], 为神经系统、骨骼肌系统、心血管系统、内分泌系统等各大系统疾病带来福音, 但具体治疗机制研究甚少, 诱导后的细胞是否完全或部分取代相应的细胞尚未被研究, 而且干细胞治疗方法尚未在临床治疗中大量推广。

实验选用脐带间充质干细胞, 通过加入血管内皮生长因子及碱性成纤维生长因子的培养基进行内皮样细胞诱导^[14-17], 用内皮细胞特异性标志 CD31 及 VWF 进行内皮细胞鉴定^[18-20], 结果显示诱导后的内皮样细胞强表达 CD31、VWF, 不管是从内皮祖细胞提取的内皮细胞还是诱导后的内皮样细胞, 均与提取的静脉内皮细胞同程度的表达内皮细胞特异性标志^[21]。Choi 等^[22]研究发现诱导后的内皮样细胞还表达 VEGFR1。

血管的形成离不开内皮细胞, 血管的损伤很大原因为内皮细胞破坏、受损导致内皮细胞凋亡或坏死, 所以按理论讲内皮细胞有成血管性是毋庸置疑的, 近来大量研究也表明脐带间充质干细胞有成血管性^[23], 所以推测诱导后的内皮样细胞也有成血管性, 同时有学者研究发现间充质干细胞诱导后的内皮样细胞可形成毛细血管网, 实验已进一步证实内皮样细胞的成血管特性, 且类似脐静脉内皮细胞。

实验还通过苏木精-伊红染色形态学观察并结合倒置相差显微镜下形态学观察, 综合证明诱导后的内皮样细胞与内皮细胞形态有相似之处, 但诱导后的内皮样细胞形态更呈现多样性, 有长梭形、短梭形、多角形、铺路石样、

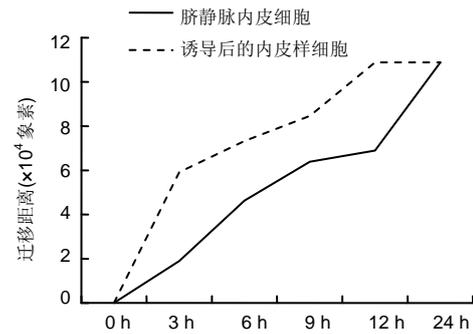


图6 诱导后的内皮样细胞与脐静脉内皮细胞的迁移能力

Figure 6 The migration of induced endothelial-like cells and umbilical vein endothelial cells

类圆形, 结合脐带间充质干细胞和脐静脉内皮细胞于一体。细胞划痕试验是一种反应细胞迁移能力的指标^[23], 结果显示脐静脉内皮细胞的趋化、迁移能力弱于诱导后的内皮样细胞, 说明诱导后的内皮样细胞更能修复受损血管, 促进血管形成及侧支循环建立。

内皮细胞在体内可分泌多种活性物质, 如前列环素、一氧化氮等血管活性物质, 其中前列环素是由血管内皮细胞合成和释放的一种抗血小板聚集和舒张血管的生物活性物质, 是较强的扩血管物质, 其在血管形成及改善血液循环方面起不可或缺的作用, 其代谢产物为 6-酮-前列腺素 F1a^[24], 结果显示, 诱导后的内皮样细胞分泌 PGI₂ 水平明显大于脐静脉内皮细胞, 也有研究进行检测一氧化氮浓度反应内皮细胞生物学活性^[25], 内皮细胞分布在全身各组织中, 比如全身各大动静脉及毛细血管中, 在器官或组织的重要部位内皮细胞分布多, 且活性强, 而且活性物质的释放与机体的生理病理机制的变化息息相关。实验选用脐静脉内皮细胞, 考虑其提取容易方便, 不伤害机体, 且脐静脉是胎儿供血及营养摄取的主要通道, 故其内皮细胞功能可反映机体整体的内皮细胞功能。通过诱导后的内皮样细胞与脐静脉内皮细胞生物活性释放的比较, 显示诱导后的内皮样细胞更能释放活性物质, 更能改善机体血液循环及血管建立。

综合结果得出, 脐带中可分离培养出间充质干细胞, 且可诱导为内皮样细胞, 脐静脉中可提取出内皮细胞, 诱导后的内皮样细胞和内皮细胞表达相同的细胞表面标志, 诱导后的内皮样细胞形态学、功能及生物学等方面类似于脐静脉内皮细胞, 甚至在功能及活性方面优于脐静脉内皮细胞, 为脐带间充质干细胞治疗血管病变提供坚实的实验基础及理论基础, 血管病变同样也需要神经的修复, 下一步可进行神经样细胞与神经细胞相似性的研究。

致谢: 感谢白求恩国际和平医院输血科实验室提供支持, 感谢白求恩国际和平医院妇产科大力支持。

作者贡献: 实验设计、实施者、数据分析、资料整理机论文撰写均为第一作者兼通讯作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 脐带获取已经产妇及家属知情同意, 并签署知情同意书。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(10):584-594.
- [2] Qi Y, Feng G, Yan W. Mesenchymal stem cell-based treatment for cartilage defects in osteoarthritis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(5):5683-5689.
- [3] Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Yang JQ, et al. Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008;187(4):263-274.
- [4] Hynes K, Menicanin D, Han J, et al. Mesenchymal stem cells from iPS cells facilitate periodontal regeneration. *J Dent Res*. 2013;92(9):833-839.
- [5] Nekanti U, Rao VB, Bahirvani AG, et al. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(1):117-130.
- [6] Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 2003;121(2):368-374.
- [7] Secco M, Zucconi E, Vieira NM, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood. *Stem Cells*. 2008;26(1):146-150.
- [8] 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. *Exp Hematol*. 2009;37(5):629-640.
- [9] Wu R, Tang Y, Zang W, et al. MicroRNA-128 regulates the differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neuron-like cells by Wnt signaling. *Mol Cell Biochem*. 2014;387(1-2):151-158.
- [10] Ohgushi H. Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(2):197-208.
- [11] Panfilov IA, de Jong R, Takashima S, et al. Clinical study using adipose-derived mesenchymal-like stem cells in acute myocardial infarction and heart failure. *Methods Mol Biol*. 2013;1036:207-212.
- [12] Bhonde RR, Sheshadri P, Sharma S, et al. Making surrogate β -cells from mesenchymal stromal cells: perspectives and future endeavors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;46:90-102.
- [13] 田新, 符仁义, 陈艳, 等. 脐带间充质干细胞分离及向成骨与脂肪细胞的分化[J]. *四川大学学报*, 2008, 39(1):26-29.
- [14] Zhang X, Nan Y, Wang H, et al. Model microgravity enhances endothelium differentiation of mesenchymal stem cells. *Naturwissenschaften*. 2013;100(2):125-133.
- [15] Guan XM, Cheng M, Li H, et al. Biological properties of bone marrow-derived early and late endothelial progenitor cells in different culture media. *Mol Med Rep*. 2013;8(6):1722-1728.
- [16] Lai WH, Ho JC, Chan YC, et al. Attenuation of hind-limb ischemia in mice with endothelial-like cells derived from different sources of human stem cells. *PLoS One*. 2013;8(3):e57876.
- [17] Portalska KJ, Chamberlain MD, Lo C, et al. Collagen modules for in situ delivery of mesenchymal stromal cell-derived endothelial cells for improved angiogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Apr 17. [Epub ahead of print]
- [18] Vishnubalaji R, Manikandan M, Al-Nbaheen M, et al. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells. *BMC Dev Biol*. 2012;12:7.
- [19] Marchal JA, Picón M, Perán M, et al. Purification and long-term expansion of multipotent endothelial-like cells with potential cardiovascular regeneration. *Stem Cells Dev*. 2012; 21(4):562-574.
- [20] Yan D, Wang X, Li D, et al. Macrophages overexpressing VEGF, transdifferentiate into endothelial-like cells in vitro and in vivo. *Biotechnol Lett*. 2011;33(9):1751-1758.
- [21] Marchand M, Anderson EK, Phadnis SM, et al. Concurrent generation of functional smooth muscle and endothelial cells via a vascular progenitor. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(1): 91-97.
- [22] Choi M, Lee HS, Naidansaren P, et al. Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(3):560-570.
- [23] 刘红, 俞小芳, 滕杰, 等. 低氧预处理对大鼠骨髓间充质干细胞迁移能力的影响[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(10):703-719.
- [24] 朱斌, 王云雅, 张志勇, 等. 大鼠内皮祖细胞的分离、培养与定向诱导分化[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(6):608-611.
- [25] 邵琴, 王长谦, 范华骅, 等. 脐血、外周血内皮祖细胞分化为内皮细胞的实验研究[J]. *心脏杂志*, 2006, 18(1):18-22.