

小鼠 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞诱导分化为血管平滑肌细胞的体外培养*

张明杰, 李宗泽, 徐 杨, Simon Xun Liang[△]

锦州医科大学 生物化学与分子生物学教研室(锦州 121000)

【摘要】 目的 探讨在体外诱导分化 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞的特性。方法 取小鼠肺组织,流式细胞术分选小鼠 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞;免疫荧光检测其侧缘细胞表型标记物 ATP 结合盒转运蛋白 G2(ABCG2)和干细胞表面标记物干细胞抗原 1(stem cell antigen 1, Sca1)的表达,逆转录 PCR 检测其 ABCG2、平滑肌细胞标志物平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin, SMA)及血管平滑肌细胞标志物 α -血管平滑肌原肌球蛋白(α -SMT)表达。分选的 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞体外培养 14 d 后,细胞克隆形成实验和流式细胞术对其进行鉴定。分选的 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞体外诱导 14 d 后,免疫荧光检测细胞 α -SMT 的表达,逆转录-PCR 检测分化诱导前后细胞中的 ABCG2、SMA 及 α -SMT 基因表达。结果 成功分选出目的细胞群 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞,其表达 ABCG2 和 Sca1 蛋白,ABCG2 和 SMA 基因,不表达 α -SMT 基因。细胞体外培养 14 d 后,出现的细胞克隆鉴定为 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞。CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞分化诱导前表达 ABCG2,少量表达 SMA,不表达 α -SMT,分化诱导 14 d 后表达 α -SMT 基因和蛋白、SMA 基因,不表达 ABCG2 基因。结论 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞是血管平滑肌细胞的祖细胞,具有干细胞分化特性。在体外培养可分化为血管平滑肌细胞。

【关键词】 侧缘细胞 血管平滑肌细胞 ABCG2

Differentiation of Cultivated CD45⁻/CD31⁺ Mouse Lung Side Population Cells into Vascular Smooth Muscle Cells in vitro ZHANG Ming-jie, LI Zong-ze, XU Yang, Simon XunLiang[△]. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China

[△] Corresponding author, E-mail: simon1308@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the characteristics of differentiation of lung side population cells (LSP cells) *in vitro*. **Methods** CD45⁻/CD31⁺ LSP cells sorted by flow cytometry were taken from mouse lung tissues and cultured for 14 d. The cultured LSP cells were observed with colony formation assay and flow cytometry *in vitro*. The mRNA expressions of ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2), smooth muscle actin (SMA) and α -smooth muscle tropomyosin (α -SMT) in both freshly isolated LSP cells and cultured LSP cells were examined. The expressions of ABCG2 and stem cell antigen 1 (Sca1) in LSP cells were detected using immunofluorescence. RT-PCR tests were performed to detect the expressions of ABCG2, SMA and α -SMT in LSP cells. **Results** The isolated CD45⁻/CD31⁺ lung side population cells expressed ABCG2, SMA and Sca1, but not α -SMT. A large number of LSP in aggregated state were observed after 14 d of culture. Before induction of differentiation, the CD45⁻/CD31⁺ LSP cells expressed ABCG2 and SMA, but not α -SMT. After induction of differentiation, the CD45⁻/CD31⁺ lung side population cells expressed α -SMT and SMA, but not ABCG2. **Conclusion** CD45⁻/CD31⁺ LSP cells might be progenitor cells of vascular smooth muscle cells, possessing the characteristics of stem cell differentiations.

【Key words】 Side population cells Vascular smooth muscle cells ABCG2

肺部疾病在全球有较高的发病率和死亡率^[1]。到 2020 年,慢性阻塞性肺疾病(COPDs)预计将成为全球疾病死亡率的第三大原因^[2-3]。虽然可通过对症治疗改善,但是许多肺部疾病并没有治愈。因此迫切需要新的治疗肺部疾病及肺损伤的方法。侧

缘细胞是利用 Hoechst 染料和流式细胞术进行造血干/祖细胞分离时发现的一个特殊的细胞群体。侧缘细胞能够将荧光染料 Hoechst 33342 排出,从而在流式细胞图上呈现 Hoechst 33342 低染,研究者已在多种肿瘤组织和细胞系中检测出了侧缘细胞,并验证这些侧缘细胞具有强干细胞活性^[4]。CD45⁺为血液细胞标记,CD45⁻为肺细胞标记,CD31⁺为内皮细胞标记,CD31⁻为间充质细胞标

* 国家自然科学基金(No. 81370619)资助

[△] 通信作者, E-mail: simon1308@163.com

记。已有对 CD45⁺ 和 CD31⁻ 细胞群的研究^[6-8] 报道,但 CD45⁻/CD31⁺ 这一细胞群目前尚未见研究报道。本实验选用小鼠肺组织收集细胞,通过流式细胞仪分选出 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞,体外分化诱导培养,探讨其是否为血管平滑肌细胞的祖细胞,可否在体外发育成血管平滑肌细胞,为临床治疗肺部疾病提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 SmGm-2 购自美国 Cambrex 公司, Methocult GF M3534 购自加拿大 STEMCELL Technologies。Trypsin 购自 Sigma 公司。胶原酶、分散酶购自上海吉凯基因公司。RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司。cDNA 逆转录试剂盒购自 ABI 公司。RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。抗体购自 Abcam、Enzo 公司。Hoechst33342、DAPI、胰蛋白酶、维拉帕米和碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 仪器 二氧化碳孵箱购自美国 Sheldon Manufacturing Inc.。流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司。超净工作台购自 ESCO 公司。酶标仪购自德国 BMG 公司。离心机购自德国 Het-tich 公司。PCR 仪购自 Thermo Scientific。

1.1.3 小鼠 昆明系成年雌鼠(12~14 周),10 只,体质量 25~30 g,购自锦州医科大学动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 收集细胞 取 10 只小鼠肺组织用刀片搅碎,在 37 °C、0.1% 胶原酶、2.4 U/mL 分散酶和 2.5 mmol/L CaCl₂ 条件下孵育 1 h, PBS 悬浮、过滤,收集细胞^[8]。

1.2.2 流式细胞术分选 CD45⁻/CD31⁺ 小鼠肺侧缘细胞及检测 取 1.2.1 收集的细胞,细胞计数,将细胞数量调整为 1×10⁶ mL⁻¹,重悬细胞于培养液中。实验组加入终质量浓度为 5 mg/L 的荧光染料 Hoechst33342;对照组加入终质量浓度为 5 mg/L 荧光染料 Hoechst33342 及终质量浓度为

100 mg/L 的维拉帕米作为钙拮抗剂。37 °C 避光水浴 90 min,每隔 20 min 轻微震荡一次。90 min 后终止染色,用冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,4 °C、1 000 r/min 离心 5 min,去上清,用冷的 PBS 重悬。加入终质量浓度为 2 mg/L 的 PI,上流式细胞仪分选,Hoechst33342 的激发光为 375 nm。流式细胞仪分别收集侧缘细胞与主群细胞。用 CD105、细胞间黏附分子 1(ICAM1)及干细胞抗原 1(Sca1)抗体检测其表达情况^[9]。后继实验使用的侧缘细胞皆为分选后的 CD45⁻/CD31⁺ 侧缘细胞。

1.2.3 免疫荧光染色检测侧缘细胞 ATP 结合盒转运蛋白 G2(ABCG2)和 Sca1 蛋白表达 将玻片放在流式特定位置收集 1.2.2 分选后的细胞。取分选的肺侧缘细胞,丙酮固定(-20 °C)后,PBS 漂洗 3 次,每次 2 min。0.5% Txiton X-100 处理 20 min, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min。血清封闭 20 min, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min。滴加按 1:500 稀释好的抗鼠 ABCG2 和抗鼠 Sca1,37 °C 孵育 2 h, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min。滴加二抗,37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min。加入 DAPI 染色 5 min, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min。荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 逆转录(RT)-PCR 检测 ABCG2、平滑肌肌动蛋白(SMA)及 α-血管平滑肌原肌球蛋白(α-SMT)基因的表达 将 1.2.2 流式分选收集的侧缘细胞和主群细胞用冷的 PBS 漂洗两次,12 000 r/min 离心 3 min,弃上清,加入 350 μL 裂解缓冲液,充分裂解。加入 1 mL Trizol,冰上匀浆。转管后室温保存 5 min。加 0.2 mL 氯仿,震荡混匀,室温放置 5 min。4 °C、10 000 r/min 离心 15 min,将上层吸到一个新的试管里,按照试剂盒说明书方法提取 RNA,将其反转录成 cDNA,进行 PCR 反应(引物见表 1),程序为:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 1 min,55 °C 退火 30 s,72 °C 延长 1 min,共计 30 个循环。末次循环后补延 72 °C,10 min,终止反应。PCR 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,电压 60~100 V。当溴酚蓝移动到距离胶板下沿约 1 cm 处时,停止电泳。采用凝胶成像仪拍照保存。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplified product length
ABCG2	GTGGCATCTCTGGAGGAGAA	GGGCCACATGATTCTTCCAC	232 bp
α-SMT	TGAAGTGGACAAATACTCCG	CAGTGACTTGAAGTTGTTCG	382 bp
SMA	AGCTTTGGGCAGGAATGATTTGG	AAGATCATTGCCCTCCAGAACG	356 bp
β-actin	GGTGTGATGGTGGGAATGGGTC	CTTCTCCAGGGAGGAAGAGGATG	282 bp

通过 image pro plus6.0 软件进行分析,测其积分光密度(IOD)值,以内参 β -actin 条带值与各条带 IOD 值的比为目的基因的相对表达量。

1.2.5 细胞克隆形成实验及流式技术鉴定侧缘细胞 将 1.2.2 中分选后的侧缘细胞与主群细胞分别在 Methocult GF M3534 media 培养基中培养,用移液器吹散均匀。在 37 °C、体积分数 5%CO₂ 的培养箱中培养 14 d,终止培养。通过流式细胞术进行鉴定克隆形成实验中的细胞是否是 CD45⁻/CD31⁺ 小鼠肺侧缘细胞。

1.2.6 侧缘细胞体外分化诱导及免疫荧光检测 α -SMT 表达和 RT-PCR 检测 ABCG2、 α -SMT 及 SMA 表达 将 1.2.2 流式分选的细胞用 SmGm-2 培养基在 37 °C、体积分数 5%CO₂ 条件下,连续培养 14 d。14 d 后,取一部分培养的细胞应用免疫荧光技术检测 α -SMT 的表达,再取一部分培养的细胞(14 d)和新分选的细胞(0 d)通过 RT-PCR 技术检测两者 ABCG2、SMA 和 α -SMT 的表达情况,方法同 1.2.4。

1.2.7 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术分选小鼠 CD45⁻/CD31⁺ 肺侧缘细胞

见图 1。分离收集的细胞经过流式分选后,侧缘细胞位于左下角两种荧光均很弱的区域。侧缘细

胞右上方荧光很强的区域为主群细胞。低染区侧缘细胞比例为 0.4%,被维拉帕米阻滞后,低染区侧缘细胞比例 $< 0.4%$,证实从小鼠肺组织收集的细胞中确实存在侧缘细胞。将侧缘细胞进一步分选,CD45⁻/CD31⁺ 侧缘细胞占 25%,CD45⁺/CD31⁻ 侧缘细胞占 62%,CD45⁻/CD31⁻ 侧缘细胞占 13%。本实验选择 CD45⁻/CD31⁺ 这一群体的侧缘细胞,进一步行 CD105、ICAM1 及 Sca1 抗体检测,结果显示:CD105 阳性占 21%,ICAM1 阳性占 69%,Sca1 阳性占 100%。

2.2 免疫荧光染色检测侧缘细胞 ABCG2 和 Sca1 蛋白的表达

分选的侧缘细胞表达侧缘细胞标志物 ABCG2 蛋白,且表达干细胞表面标志物 Sca1,见图 2。

2.3 RT-PCR 检测侧缘细胞 ABCG2、 α -SMT 及 SMA 基因的表达

侧缘细胞高表达 ABCG2,少量表达 SMA,不表达 α -SMT;主群细胞高表达 α -SMT 和 SMA,不表达 ABCG2。见表 2。

2.4 侧缘细胞的鉴定

体外培养 14 d,分选的侧缘细胞克隆形成实验之后,细胞大量增殖并呈现聚集生长状态(图 3A),而分选的主群细胞并未大量扩增形成克隆(图 3B)。流式技术显示细胞克隆仍然是 CD45⁻/CD31⁺ 侧缘细胞。

2.5 体外诱导分化侧缘细胞的 α -SMT、SMA 和 ABCG2 表达

结果见图 4、表 3。侧缘细胞体外分化诱导

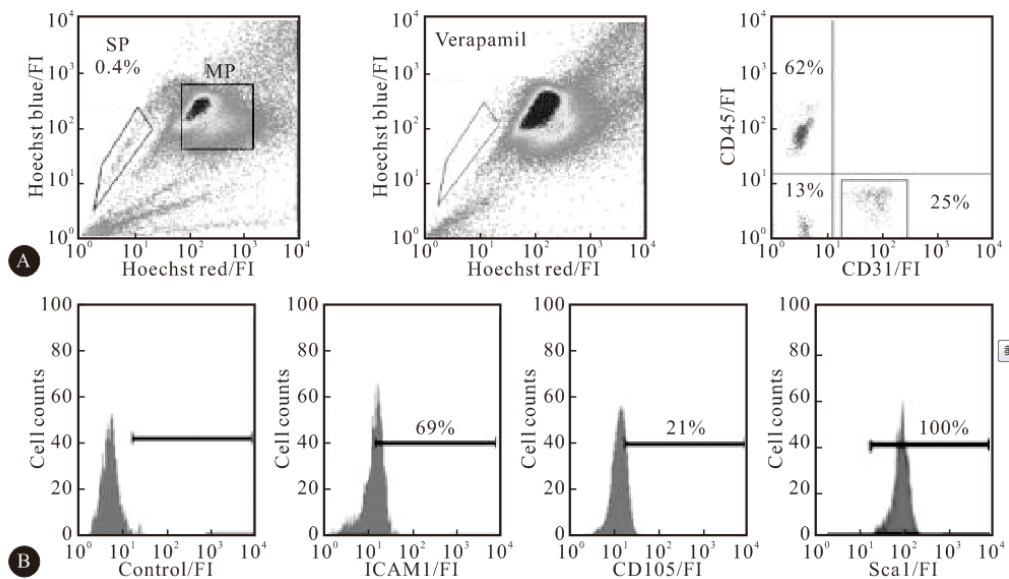


图 1 流式细胞仪检测(A)以及分选目的细胞群(B)

Fig 1 Flow cytometry detected (A) and sorted (B) the target cell population

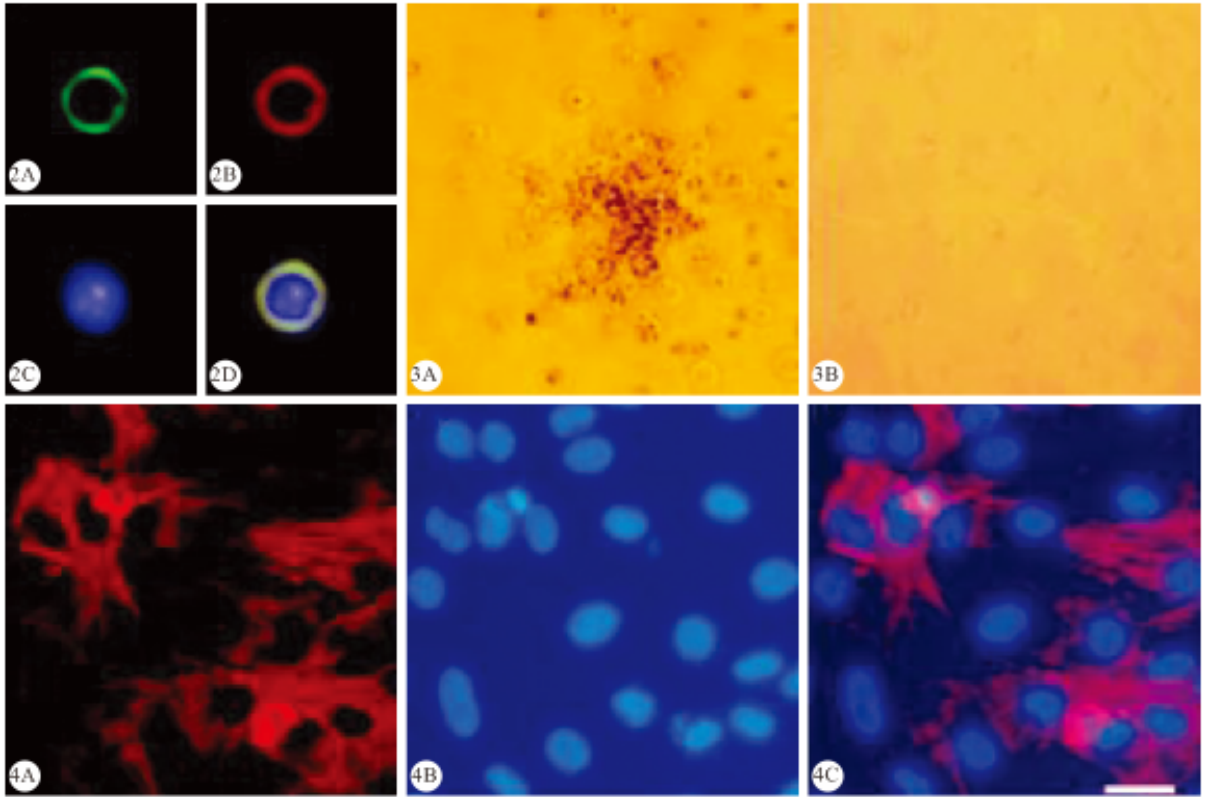


图 2 免疫荧光染色检测侧缘细胞 ABCG2 和 Sca1 的表达。×40 (B)。×10

图 4 侧缘细胞体外分化诱导 14 d 的 α -SMT 表达。×40

Fig 2 Expressions of ABCG2 and Sca1 in SP cells. Immunofluorescence staining ×40

CD31⁺ SP cells (A), but not in MP cells (B). ×10

Fig 3 Clone formation was observed in CD45⁻ / CD31⁺ SP cells (A), but not in MP cells (B). ×10

Fig 4 Expression of α -SMT in SP cells after 14 d of *in vitro* induction of differentiation. ×40

2A: ABCG2 (green); 2B: Sca1 (red); 2C: DAPI (blue), nucleus; 2D: Merged; 4A: α -SMT; 4B: DAPI; 4C: Merged

表 2 侧缘细胞和主群细胞 ABCG2、 α -SMT 及 SMA 的表达 (n=8)

Table 2 The mRNA expressions of ABCG2, α -SMT and SMA in SP and MP cells (n=8)

Gene	CD45 ⁻ /CD31 ⁺ SP cells	MP cells
ABCG2	0.550±0.014*	0.020±0.017
α -SMT	0.018±0.012*	0.370±0.027
SMA	0.100±0.019	0.740±0.030

SP: Side population; MP: Main population. * $P < 0.05$, vs. MP cells

表 3 侧缘细胞体外分化诱导前后 ABCG2、 α -SMT 和 SMA 的表达 (n=8)

Table 3 The mRNA expressions of ABCG2, α -SMT and SMA before and after *in vitro* induction of differentiation (n=8)

Gene	0 d	14 d
ABCG2	0.710±0.054*	0.021±0.013
α -SMT	0.020±0.012*	0.630±0.032
SMA	0.210±0.033*	0.960±0.062

* $P < 0.05$, vs. 14 d

14 d, 免疫荧光检测结果显示有 α -SMT 的表达。RT-PCR 检测结果显示新分离 (0 d) 的侧缘细胞表达 ABCG2, 少量表达 SMA, 不表达 α -SMT; 分化诱

导 (14 d) 的侧缘细胞表达 α -SMT 及 SMA, 不表达 ABCG2。

3 讨论

侧缘细胞广泛分布于多种成体组织、胚胎和某些肿瘤细胞系中, 它既具有类似干细胞的自我更新和多向分化潜能, 还具有独特的表型标记和生物学特征, 代表了一种新的干细胞类型^[4,10]。

ABCG2, 相对分子质量为 70 000, 为三磷酸腺苷(ATP)结合盒转运蛋白 G 超家族成员(ATP-binding cassette transporter, ABC 转运蛋白)之一, 首先发现于抗阿霉素的人乳腺癌 MCF-7 细胞中。SCHARENBERG 等^[10]应用 RT-PCR 方法对具不同表型特征造血细胞中该转运蛋白的表达进行了分析。结果表明, ABCG2 在侧缘细胞中高表达。以往的研究已经证实 ABCG2 是侧缘细胞表型的分子基础^[11], 且 ABCG2 的表达与侧缘细胞表型呈强相关^[12], 提示 ABCG2 可作为侧缘细胞的表型标记而

用于分离鉴定。

侧缘细胞具有多向分化潜能,在体内可以分化为多种组织类型细胞^[13],因此,侧缘细胞有分化为血管平滑肌细胞的可能。目前,国内关于侧缘细胞的研究集中于它和肿瘤的关系,而没有关于利用侧缘细胞来治疗肺部疾病的报道。国外的报道有关于应用侧缘细胞治疗肺部疾病和心脏疾病,但目前还没有研究 CD45⁻/CD31⁺这一群侧缘细胞群体。本研究选用小鼠肺组织为研究对象,通过流式细胞术分选出小鼠肺侧缘细胞群。为研究 CD45⁻/CD31⁺这一群侧缘细胞,我们首先进行抗体染色,结果显示干细胞表面标志物 Sca1 阳性占 100%。说明分选的侧缘细胞表达干细胞表面标志,提示其具有干细胞特性。随后,我们对所分选的细胞进行免疫荧光检测,结果显示其有 ABCG2 和 Sca1 表达,证明我们所分选的细胞为侧缘细胞,且具有干细胞特性。本研究通过 RT-PCR 检测 α -SMT 发现所分选的侧缘细胞表达平滑肌细胞标志物 SMA,不表达血管平滑肌细胞标志物 α -SMT;而主群细胞既表达 α -SMT,也表达 SMA。提示肺侧缘细胞可能是血管平滑肌的祖细胞,且现在处于未分化状态。本研究的克隆实验也提示侧缘细胞具有类似干细胞的增殖特性,且所增殖的侧缘细胞仍是 CD45⁻/CD31⁺这个群体。将所分选的侧缘细胞用特定 SmGm-2 培养基培养 14 d,免疫荧光染色检测显示其有 α -SMT 的表达,说明所分选的 CD45⁻/CD31⁺肺侧缘细胞经过诱导培养分化为血管平滑肌细胞;为进一步验证本研究的结果,我们用 RT-PCR 检测诱导前后的侧缘细胞 ABCG2、SMA 和 α -SMT 的表达,结果显示:诱导前的侧缘细胞表达 ABCG2,少量表达 SMA,不表达 α -SMT。而诱导后的侧缘细胞恰好相反,表达 α -SMT 和 SMA,不表达 ABCG2,证明诱导后的 CD45⁻/CD31⁺肺侧缘细胞分化为了血管平滑肌细胞。

综上,本研究通过流式细胞术分选出 CD45⁻/CD31⁺小鼠肺侧缘细胞,通过特定的体外诱导培养,最终 CD45⁻/CD31⁺侧缘细胞分化为血管平滑肌细胞,证实了肺侧缘细胞是血管平滑肌细胞祖细胞,同时,对肺侧缘细胞的研究,于肺损伤及肺部疾病的治疗有非常重要的意义,于肿瘤的防治和干细胞生物学的发展有深远的影响。

参 考 文 献

- [1] TASHKIN DP, ROTH MD, CLEMENTS PJ, *et al.* Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med*,2016,4(9):708-719.
- [2] GUYATT GH, BERMAN LB, TOWNSEND M, *et al.* A measure of quality of life for clinical trials in chronic lung disease. *Thorax*,1987,42(10):773-778.
- [3] VAN MARTER LJ, ALLRED EN, PAGANO M, *et al.* Do clinical markers of barotrauma and oxygen toxicity explain interhospital variation in rates of chronic lung disease. *Pediatrics*,2000,105(6):1194-1201.
- [4] 吴旭彤,朱萱萱,李七一,等. 中药对血管内皮细胞损伤的保护作用的研究进展. *中华中医药学刊*,2011,29(12):2648-2650.
- [5] SUMMER R, KOTTON DN, LIANG S, *et al.* Embryonic lung side population cells are hematopoietic and vascular precursors. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2005,33(1):32-40.
- [6] LIANG SX, KHACHIGIAN LM, AHMADI Z, *et al.* *In vitro* and *in vivo* proliferation, differentiation and migration of cardiac endothelial progenitor cells (SCA1⁺/CD31⁺ side-population cells). *J Thromb Haemost*,2011,9(8):1628-1637.
- [7] SUMMER R, FITZSIMMONS K, DWYER D, *et al.* Isolation of an adult mouse lung mesenchymal progenitor cell population. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2007,37(2):152-159.
- [8] LIANG SX, SUMMER R, SUN X, *et al.* Gene expression profiling and localization of Hoechst-effluxing CD45⁻ and CD45⁺ cells in the embryonic mouse lung. *Physiol Genomics*,2005,23(2):172-181.
- [9] LIANG SX, TAN TYL, GAUDRY L, *et al.* Differentiation and migration of Sca1⁺/CD31⁻ cardiac side population cells in a murine myocardial ischemic model. *Int J Card*,2010,138(1):40-49.
- [10] SCHARENBERG CW, HARKEY MA, TOROK-STORB B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*,2002,99(2):507-512.
- [11] KIM M, TURNQUIST H, JACKSON J, *et al.* The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res*,2002,8(1):22-28.
- [12] NATHAN C. Points of control in inflammation. *Nature*,2002,420(6917):846-852.
- [13] 杨再峰,邵健忠,项黎新,等. 一种新型干细胞——侧群细胞. *细胞生物学杂志*,2005,27(2):109-112.

(2016-10-29 收稿,2017-02-11 修回)

编辑 吕熙