

实验方法

小鼠血管壁CD34⁺干细胞的分离、培养及鉴定

杨礼菊^{1,2}, 马颖¹, 李源¹, 党青亚¹, 程俊¹, 杨艳¹, 李鹏云^{1,*}

¹西南医科大学心血管医学研究所, 医学电生理学教育部重点实验室, 医学电生理四川省重点实验室, 四川省心血管疾病防治协同创新中心, 泸州 646000; ²西南医科大学附属医院心内科, 泸州 646000

摘要: 血管壁干细胞(vascular wall-resident stem cells, VW-SCs)在维持血管正常功能以及损伤血管的修复过程中发挥着关键性的作用, 对其功能特性的研究将有助于干细胞的调控及应用。本文旨在建立稳定的VW-SCs分离、培养及分选鉴定技术, 为进一步深入研究VW-SCs在生理和疾病状态下的增殖、迁移和分化等机制提供丰富、可靠的细胞来源。首先利用组织块贴壁法获取小鼠主动脉外膜以及肠系膜动脉血管壁细胞, 传代培养到细胞数量至少达到 1×10^7 后经磁珠分选和流式细胞术鉴定CD34⁺的VW-SCs; 其次采用细胞免疫荧光染色检测干细胞标志物(CD34、Flk-1、c-kit、Sca-1)以及平滑肌标志物(SM22、SM MHC)、内皮标志物(CD31)和细胞核内分裂增殖相关蛋白(Ki-67); 血管壁CD34⁺干细胞的定向分化采用EBM-2内皮分化诱导培养基和FM-2成纤维细胞培养基分别培养7天和3天; 利用细胞免疫荧光染色和q-PCR检测内皮细胞标志物(CD31, VWF)和成纤维细胞标志物(Vimentin, PDGFR α)的表达。此外, 采用TILLvisION胞内钙信号检测系统结合Ca²⁺荧光探针Fura-2/AM观察CD34⁺干细胞胞内钙库Ca²⁺释放和胞外Ca²⁺内流特性。结果显示, 血管组织块贴壁法和磁珠分选可获取较高纯度(> 90%)的小鼠主动脉外膜以及肠系膜动脉血管壁CD34⁺干细胞。体外培养的血管壁CD34⁺干细胞可诱导分化为内皮细胞和成纤维细胞。咖啡因和ATP可显著激活CD34⁺干细胞胞内钙库Ca²⁺释放, 毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)耗竭内质网钙库Ca²⁺后触发钙库操纵的外钙内流(store-operated Ca²⁺ entry, SOCE)。该方法建立了稳定、高效的血管壁CD34⁺干细胞分离、培养和鉴定技术, 为体外深入研究VW-SCs的调控机制以及靶向药物的筛选提供了保障。

关键词: 血管壁干细胞; 细胞分离; 细胞鉴定; 磁珠分选

Isolation, culture and validation of CD34⁺ vascular wall-resident stem cells from mice

YANG Li-Ju^{1,2}, MA Ying¹, LI Yuan¹, DANG Qing-Ya¹, CHENG Jun¹, YANG Yan¹, LI Peng-Yun^{1,*}

¹Key Laboratory of Medical Electrophysiology, Ministry of Education & Medical Electrophysiological Key Laboratory of Sichuan Province, Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease of Sichuan Province, Institute of Cardiovascular Research, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; ²Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Vascular wall-resident stem cells (VW-SCs) play a critical role in maintaining normal vascular function and regulating vascular repair. Understanding the basic functional characteristics of the VW-SCs will facilitate the study of their regulation and potential therapeutic applications. The aim of this study was to establish a stable method for the isolation, culture, and validation of the CD34⁺ VW-SCs from mice, and to provide abundant and reliable cell sources for further study of the mechanisms involved in proliferation, migration and differentiation of the VW-SCs under various physiological and pathological conditions. The vascular wall cells of mouse aortic adventitia and mesenteric artery were obtained by the method of tissue block attachment and purified by magnetic

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82070502, 31972909), Collaborative Innovation Project for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease of Sichuan Province (No. xtcx2019-05), Sichuan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (No. 2021MS529), and Sichuan Science and Technology Program, China (No. 2022YFS0607).

*Corresponding author. E-mail: lpyun@swmu.edu.cn

microbead sorting and flow cytometry to obtain the CD34⁺ VW-SCs. Cell immunofluorescence staining was performed to detect the stem cell markers (CD34, Flk-1, c-kit, Sca-1), smooth muscle markers (SM22, SM MHC), endothelial marker (CD31), and intranuclear division proliferation-related protein (Ki-67). To verify the multipotency of the isolated CD34⁺ VW-SCs, endothelial differentiation medium EBM-2 and fibroblast differentiation medium FM-2 were used. After culture for 7 days and 3 days respectively, endothelial cell markers and fibroblast markers of the differentiated cells were evaluated by immunofluorescence staining and q-PCR. Furthermore, the intracellular Ca²⁺ release and extracellular Ca²⁺ entry signaling were evaluated by TILLvisION system in Fura-2/AM loaded cells. The results showed that: (1) High purity (more than 90%) CD34⁺ VW-SCs from aortic adventitia and mesenteric artery of mice were harvested by means of tissue block attachment method and magnetic microbead sorting; (2) CD34⁺ VW-SCs were able to differentiate into endothelial cells and fibroblasts *in vitro*; (3) Caffeine and ATP significantly activated intracellular Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum of CD34⁺ VW-SCs. Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) was activated by using thapsigargin (TG) applied in Ca²⁺-free/Ca²⁺ reintroduction protocol. This study successfully established a stable and efficient method for isolation, culture and validation of the CD34⁺ VW-SCs from mice, which provides an ideal VW-SCs sources for the further study of cardiovascular diseases.

Key words: vascular wall-resident stem cells; cell isolation; cell identification; magnetic separation

血管内皮损伤后修复是贯穿于动脉粥样硬化、冠脉支架术后再狭窄等一系列血管疾病发生和发展的重要环节。以往研究表明外周血中分离的 CD34⁺CD31⁻ 细胞 [被认为是内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs)] 可分化为内皮细胞并促进血管新生^[1]。然而近年来研究显示, 采用 CD34 抗体包被支架捕获循环血液中骨髓来源的 CD34⁺ 细胞确实能促进狭窄血管的再内皮化, 然而伴随的炎症反应和新生内膜的增加限制了其临床应用^[2]。随后进一步采用改良的 Combo 支架 (生物降解雷帕霉素联合 CD34 抗体复合支架) 捕获 EPCs 也未能取得更满意的预防再狭窄的效果^[3]。因此循环血液中的 CD34⁺ 细胞是否是骨髓来源的真正的 EPCs, 是否有助于促进血管新生参与血管损伤后修复仍存在较大争议。

血管壁在血管的发育、稳态调控以及血管疾病进展中发挥着重要的作用。近年来越来越多的研究发现血管壁上存在多种干细胞谱系。2004 年徐清波教授课题组首次报道在成人血管壁外膜存在血管干/祖细胞, 这些外膜干细胞表达 CD34、Sca-1、c-kit 和 Flk-1, 在动物体内可分化为平滑肌细胞, 参与血管损伤后新生内膜的形成^[4]。新近研究发现血管壁上局部驻留的 CD34⁺ 干细胞可参与股动脉导丝拉伤后内皮细胞的再生^[5]。这些血管壁干细胞 (vascular wall-resident stem cells, VW-SCs) 具有多向分化和增殖的潜能, 在正常情况下是相对静止的, 一旦在病理状态下被一些特定因子激活后, 就可分化成平滑肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞等, 或通过旁分泌效应调控血管周围基质以及微血管形成等机制促进损伤血管的修复或重构^[5-9]。目前关于 VW-SCs 的

研究主要集中于 Sca-1⁺ 干细胞, 而关于 CD34⁺ 干细胞的基本生物学特性以及参与体内血管损伤后修复或重构机制的报道相对较少。本文旨在建立一种稳定可靠的体外 VW-SCs 的培养方法, 描述血管壁 CD34⁺ 干细胞的基本生物学特性和细胞内钙信号特征, 为进一步深入研究生理和病理状态下 VW-SCs 的功能及其调控机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 动物 6~8 周龄 C57BL/6 健康小鼠, 雌雄不拘, 体重 18~20 g, 购自成都达硕实验动物有限公司 [许可证号: SCXK(川)2020-030], 饲养于西南医科大学实验动物中心 [许可证号: SYXK(川)2018-065], 实验中对动物的处理按照《实验动物饲养管理和使用指南》标准执行, 严格遵循动物实验的伦理学要求 (动物伦理审批号: swmu2020664)。

1.2 主要试剂 FM-2 培养基购自 ScienCell, EBM-2 培养基购自 Lonza; DMEM 高糖培养基购自 ATCC; 胎牛血清、白血病抑制因子 (leukaemia inhibitory factor, LIF) 购自 Millipore; 2% 明胶溶液购自 Sigma; 二巯基乙醇购自 Gibco; 兔抗 CD34 抗体、兔抗 Vimentin 抗体、兔抗 PDGFR α 抗体、兔抗 SM MHC 抗体、兔抗 SM22 和兔抗 Flk-1 均购自 Abcam; 兔抗 Sca-1 抗体和 Fura-2/AM 购自 Invitrogen; 兔抗 c-kit 抗体和兔抗 Ki67 抗体均购自 CST; 山羊抗 CD31 抗体购自 R&D; 兔抗 VWF 抗体购自 Novus; NucleoZOL 试剂购自 MN; 逆转录试剂以及 q-PCR 试剂均购自 TaKaRa; FITC 标记小鼠 CD34 抗体、REAffinity Clone REA383 和 Anti-FITC MicroBeads MACS 购自 Miltenyi 生物科技公司。

1.3 组织免疫荧光染色检测小鼠动脉血管 CD34⁺ 干细胞的分布

3% 异氟烷吸入麻醉小鼠后颈椎脱臼处死,用眼科剪和镊子依次打开胸腔,暴露心脏和肠管,快速将主动脉及肠系膜动脉周围脂肪分离干净,将主动脉和肠系膜动脉用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 min × 3 次, 0.5% Triton X-100 室温通透 30 min, PBS 洗 3 min × 3 次, 5% 驴血清封闭 1 h (0.5% Triton X-100 配制), 孵育兔抗 CD34 抗体、兔抗 c-kit 抗体、兔抗 Sca-1 抗体 (根据抗体说明书进行稀释), 4 °C 过夜, PBS 洗 3 min × 3 次, 室温孵育二抗 1 h, 0.005 mg/mL Hoechst 34580 染核 10 min, 用 PBS 洗去多余未结合的染料后将血管放置到载玻片上, 在体视显微镜下用显微镊将血管铺平展开, 滴加抗荧光淬灭封片剂封片, 适当的重力压片 24 h 后采用激光扫描共聚焦显微镜 (Zeiss 980) 进行拍照。

1.4 组织块贴壁法分离和培养原代血管壁细胞

同前处理小鼠后暴露心脏和肠管,沿脊柱快速分离主动脉及肠系膜动脉与周围组织,将主动脉及肠系膜动脉转移到含有双抗 PBS 缓冲液的 6 cm 平皿中。漂洗两次之后转移到超净台中在体视显微镜下小心剔除血管周围的脂肪和结缔组织,之后沿血管纵轴剖开动脉,用显微镊分离主动脉外膜层并移入另一个含有 0.2 mL 培养基的 3.5 cm 平皿中,将血管外膜剪成 0.5 mm³ 的小碎片 (因肠系膜动脉较细,外膜难以分离,故直接将分离好的肠系膜动脉剪成小碎段)。然后将其转移到预先用 0.04% 明胶包被的培养瓶底部,放入培养箱 (37 °C、5% CO₂) 中竖立静置 3 h 让组织块贴壁。随后向培养瓶加入 5 mL DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清、0.2% LIF、0.2 mmol/L 二巯基乙醇、1% 青 / 链霉素), 其中胎牛血清促进 VW-SCs 增殖, LIF 和二巯基乙醇可抑制细胞的分化^[10, 11], 3 h 后放平培养瓶, 一般 3 天后可在显微镜下观察组织块周围细胞爬出情况。

1.5 血管壁 CD34⁺ 干细胞的分选和鉴定 取对数生长期的细胞,用 TrypLE™ Express 消化处理后用分选缓冲液 (含 2 mmol/L EDTA 和 0.5% FBS) 吹打制成单细胞悬液,同时加入一抗 (FITC 标记小鼠 CD34 抗体, REAfinity Clone REA383, 0.2 mg/mL) 4 °C 避光孵育 30 min。按 100 μL 细胞悬液加入 2 mL 流式染色缓冲液洗涤 1 次, 之后 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入 200 μL 流式染色缓冲液

重悬细胞,一部分上流式细胞仪 (BD FACSVerse) 进行检测; 剩余部分细胞悬液参考说明书加入相应体积的磁珠 (Anti-FITC MicroBeads MACS) 4 °C 避光孵育 15 min, 同前离心洗涤后, 加入 1 mL 缓冲液重悬细胞, 经装有磁性细胞分选系统 (magnetic activated cell sorting, MACS) 的柱子中流出, 收集柱子上吸附的 CD34⁺ 细胞。为了获得更高纯度的 CD34⁺ 细胞, 使用第二个柱子重复该过程。收集 MACS 柱子分选后的细胞, 部分进行流式细胞术检测 CD34⁺ 干细胞的纯度。其余细胞种于预先用 0.04% 明胶包被的培养瓶中继续培养。

铺于玻片上的细胞贴壁伸展后, 去除培养基后经 PBS 清洗 3 min × 3 次, 随后经 4% 多聚甲醛固定爬片 10 min, PBS 洗 3 min × 3 次, 0.2% Triton X-100 (PBS 配制) 室温通透细胞膜 5 min, PBS 洗 3 min × 3 次, 在玻片上滴加 5% 驴血清封闭 1 h, 分别在 4 °C 过夜孵育一抗 (CD34、Flk-1、c-kit、Sca-1、CD31、SM MHC 和 SM22 抗体, 根据抗体说明书稀释), PBS 洗 3 min × 3 次, 室温孵育相应的二抗 (1:200) 1 h, PBS 洗 3 min × 3 次, DAPI 染核后封片在荧光显微镜下拍照。

1.6 血管壁 CD34⁺ 干细胞的诱导分化和鉴定 取血管壁 CD34⁺ 干细胞悬液, 调整合适密度后, 分别铺于玻片和 6 孔板中, 参考文献的诱导方案诱导细胞分化^[12-14], 分别采用内皮细胞培养基 EBM-2 培养 1 周, 成纤维细胞培养基 FM-2 培养 3 天诱导细胞分化, 对照组为正常培养的细胞。分化结束后, 细胞爬片进行免疫荧光染色, 检测内皮细胞标志物 (CD31、VWF) 和成纤维细胞标志物 (Vimentin、PDGFRα) 的表达。采用 NucleoZOL 试剂分离纯化 6 孔板中各组细胞的总 RNA, 根据 TaKaRa 试剂盒操作说明将 RNA 逆转录为 cDNA, 参照 TaKaRa TB Green® Premix DimerEraser (Perfect Real Time) 试剂盒操作说明进行 q-PCR, 总反应体积 20 μL, 其中 TB Green Premix Dimer Eraser (2 ×) 10 μL, ddH₂O 6.4 μL, Rox Reference Dye (50 ×) 0.4 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.6 μL, 100 ng/μL cDNA 2 μL。PCR 反应条件为: 预变性 95 °C 3 min; 40 个循环的变性 (95 °C 20 s)、退火 (60 °C 30 s) 和延伸 (72 °C 30 s); 然后是最终延伸 (72 °C 5 min)。采用 2^{-ΔΔCt} 法对分化前后内皮细胞标志物 *Pecam1* (CD31)、*Vwf* 和成纤维细胞标志物 *Vimentin*、*Pdgfra* 的 mRNA 表达情况进行相对定量分析。所用各引物序列见表 1,

表1. 引物序列

Table 1. Sequences of the primers

Name	Primer sequence (5'-3')	Product (bp)
<i>Vwf</i>	F: CTTCTGTACGCCTCAGCTATG R: GCCGTTGTAATTCCCACACAAG	125
<i>Vimentin</i>	F: CGGCTGCGAGAGAAATTGC R: CCACTTTCCGTTCAAGGTCAAG	124
<i>Pdgfra</i>	F: GGAGACTCAAGTAACCTTGCCAC R: TCAGTTCTGACGTTGCTTTCAA	179
<i>Pecam1</i>	F: CTGCCAGTCCGAAAATGGAAC R: CTTTCATCCACCGGGGCTATC	218
<i>Gapdh</i>	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTG R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123

F: forward; R: reverse.

引物由北京擎科生物科技有限公司成都分公司根据设计合成。

1.7 血管壁 CD34⁺ 干细胞内钙信号检测 参考本实验室既往报道的胞内钙测定方法^[15], 将细胞爬片固定粘附于自制浴槽上, 加入终浓度为 5 μmol/L 的 Ca²⁺ 荧光探针 Fura-2/AM, 室温避光孵育 30 min, 然后使用台式液 (NaCl 137 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, MgCl₂ 1.2 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, CaCl₂ 2.4 mmol/L) 灌流去除多余的荧光染料。将浴槽固定在倒置荧光显微镜的载物台上, 在 TILL 离子影像系统 (TILLvisION3.3, TILL Inc., Germany) 采样软件中设置激发方案, 340 nm 和 380 nm 波长光波光交替激发并记录 F340 nm 和 F380 nm。用软件分析图像得到的数据, 除去背景荧光后得到 F340 nm/F380 nm 作为观测细胞内钙离子浓度 ([Ca²⁺]_i) 变化的指标。

1.8 统计学方法 数据统计分析采用 GraphPad Prism 8 软件, 结果用 mean ± SD 表示, 组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 认为差异显著, 有统计学意义。

2 结果

2.1 磁珠分选可得到高纯度的小鼠血管壁 CD34⁺ 细胞

血管组织免疫荧光染色显示小鼠主动脉外膜和肠系膜小动脉血管壁存在 CD34⁺Sca-1⁺c-kit⁺ 的血管干细胞 (图 1)。组织块贴壁培养后一般 3~4 天可观察到细胞从组织块边缘爬出, 10 天左右生长迅速可传代。CD34⁺ 细胞数 / 血管壁细胞总数百分比一般为 10%~30%。为了进一步证实磁珠分选的血管壁 CD34⁺ 干细胞的纯度, 我们将分选后获得的血管壁 CD34⁺ 干细胞进行流式细胞术鉴定, 结果证实, 磁

珠分选得到的细胞中 CD34⁺ 细胞的纯度 > 90% (图 2)。细胞初期形态不规则, 细胞体积较大, 约 6 代以后, 细胞形态变得相对均一。以上结果提示磁珠分选可得到高纯度的 CD34⁺ 干细胞, 为后续研究提供了细胞保障。

2.2 血管壁 CD34⁺ 干细胞的鉴定和增殖能力的评价

为了明确分选的血管壁 CD34⁺ 干细胞的基本特性, 我们采用细胞免疫荧光检测了细胞干性标志物的表达。细胞免疫荧光染色结果所示, 血管壁 CD34⁺ 干细胞主要表达 CD34、c-kit、Flk-1, 低表达 Sca-1, 不表达内皮细胞标志物 CD31 和平滑肌细胞标志物 SM MHC 和 SM22。Ki-67 是细胞增殖相关的核抗原, 其功能与有丝分裂密切相关, 结果显示血管壁 CD34⁺ 干细胞呈 Ki-67 阳性, 说明血管壁 CD34⁺ 干细胞具有活跃的增殖能力 (图 3)。

2.3 血管壁 CD34⁺ 干细胞分化能力鉴定

血管壁 CD34⁺ 干细胞定向诱导分化成内皮细胞 1 周后, 细胞形态变成近似鹅卵石状, 细胞免疫荧光染色检测结果显示内皮标志物 CD31、VWF 表达增加, q-PCR 检测内皮细胞 *Vwf* 基因和 *Pecam1* 基因较对照组分别增加了 3.6 倍和 12.2 倍 (*n* = 9~10, *P* < 0.001) (图 4A)。血管壁 CD34⁺ 干细胞定向诱导分化成成纤维细胞 3 天后, 细胞形态呈长梭形改变, 免疫荧光染色检测结果显示成纤维细胞标志物 Vimentin、PDGFRα 荧光强度增加, q-PCR 检测成纤维细胞 *Vimentin* 基因和 *Pdgfra* 基因较对照组分别增加了 2.8 倍和 1.4 倍 (*n* = 9, *P* < 0.001) (图 4B)。

2.4 血管壁 CD34⁺ 干细胞内钙信号特性

细胞内钙信号的动态平衡对细胞功能的调控至关重要。为了进一步探究分选获取的血管壁 CD34⁺

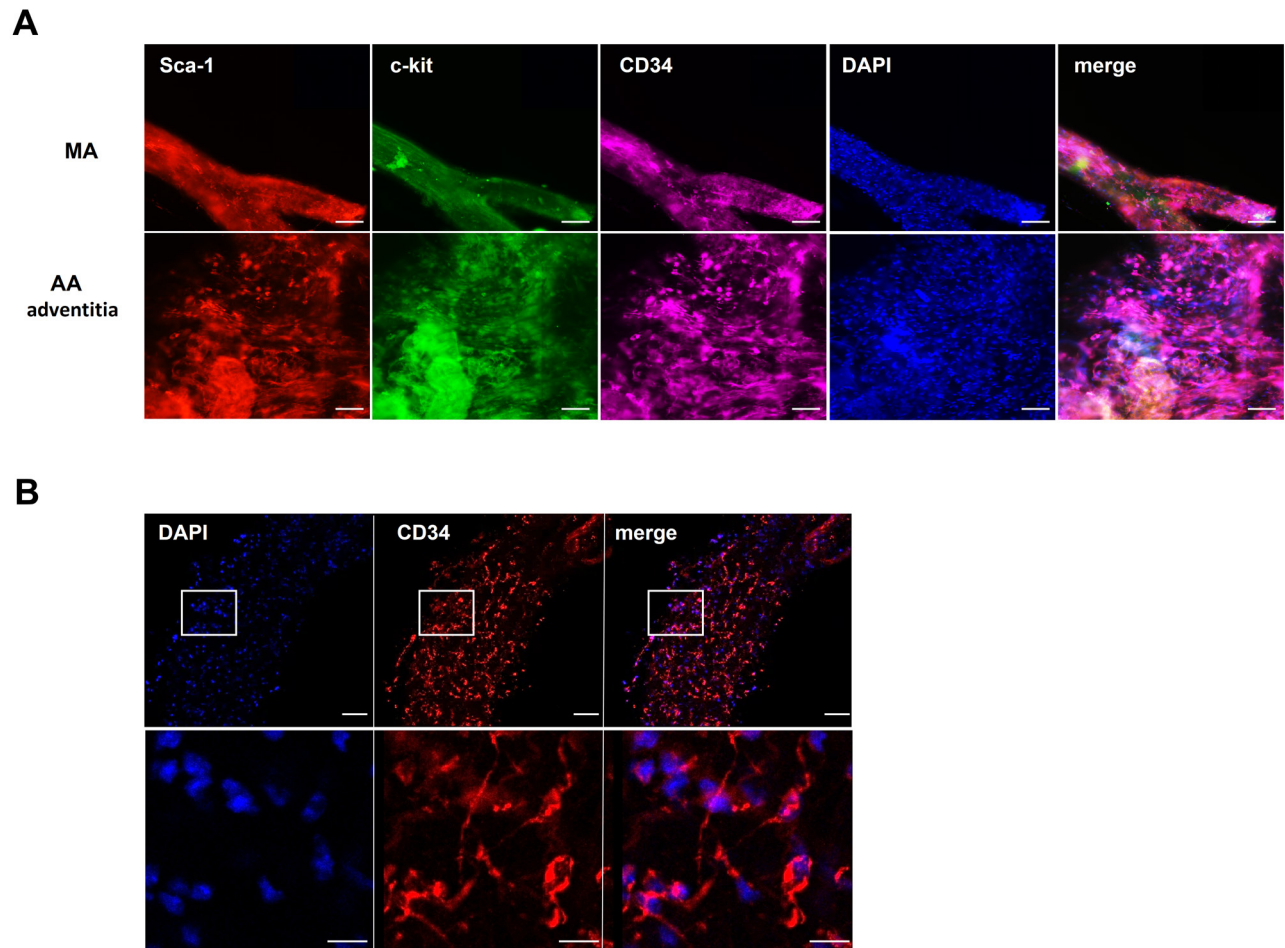


图 1. C57BL/6小鼠主动脉外膜和肠系膜动脉存在血管壁CD34⁺干细胞
Fig. 1. CD34⁺ vascular wall-resident stem cells (VW-SCs) in mesenteric artery (MA) and aortic artery (AA) of C57BL/6 mice. A: Whole mount en face preparations of MA and AA from mice combined with immunofluorescence staining showed the location of Sca-1⁺, c-kit⁺ and CD34⁺ cells. Scale bar, 50 μ m. B: Immunofluorescence staining showed the CD34⁺ VW-SCs in adventitia of mesenteric arteries (scale bar, 50 μ m). The inserted are magnification images (scale bar, 20 μ m).

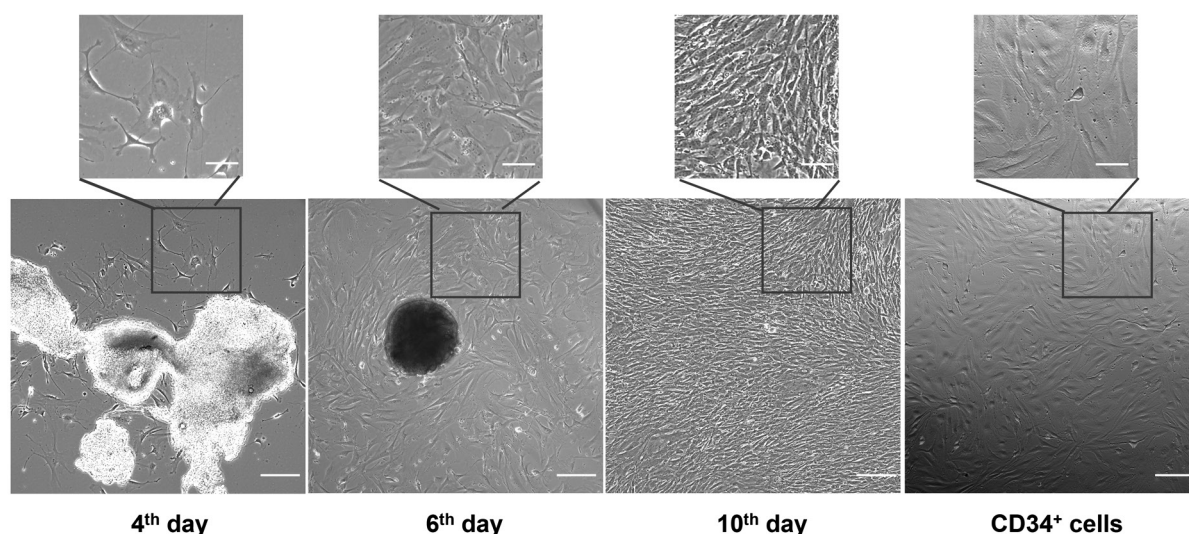
干细胞内钙信号调控的功能特性，我们分别在细胞外给予ATP、咖啡因以及毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG) 和Ca²⁺，观察血管壁CD34⁺干细胞的胞内钙库Ca²⁺释放和胞外Ca²⁺内流特性。如图5A所示，10 mmol/L 咖啡因刺激细胞时，[Ca²⁺]_i (F340 nm/F380 nm) 显著增加，然后快速下降。图5B所示为100 μ mol/L ATP刺激细胞时[Ca²⁺]_i的变化情况。与咖啡因刺激相比，ATP引起[Ca²⁺]_i变化的幅度相对较低。此外，我们采用TG-Ca²⁺方式^[16-18]检测了CD34⁺干细胞钙库操纵的外钙内流 (store-operated calcium entry, SOCE) 特性。如图5C所示，在无钙液中加入TG以耗竭细胞内内质网钙库的Ca²⁺，在此基础上细胞外施加2 mmol/L Ca²⁺，结果表明可触发胞外Ca²⁺内流。

3 讨论

在本研究中，我们提供了一种稳定、方便地从主动脉和肠系膜动脉获取血管壁CD34⁺干细胞的方法。该方法所获得的血管壁CD34⁺干细胞具有增殖活性和多向分化特性、细胞内质网钙库三磷酸肌醇受体 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, IP₃Rs)、兰尼碱受体 (Ryanodine receptors, RyRs) 和钙库操纵的钙通道具有敏感的反应性。这些细胞的获得为体外机制的深入研究提供了丰富、可靠的VW-SCs来源，该技术的建立将为进一步研究血管壁CD34⁺干细胞参与血管损伤后结构和功能重构的机制奠定基础。

CD34是一种跨膜磷酸糖蛋白，于1984年首次在造血干细胞和祖细胞上发现。CD34不仅在造血干细胞上表达，在许多其他非造血细胞中也有表达，

A



B

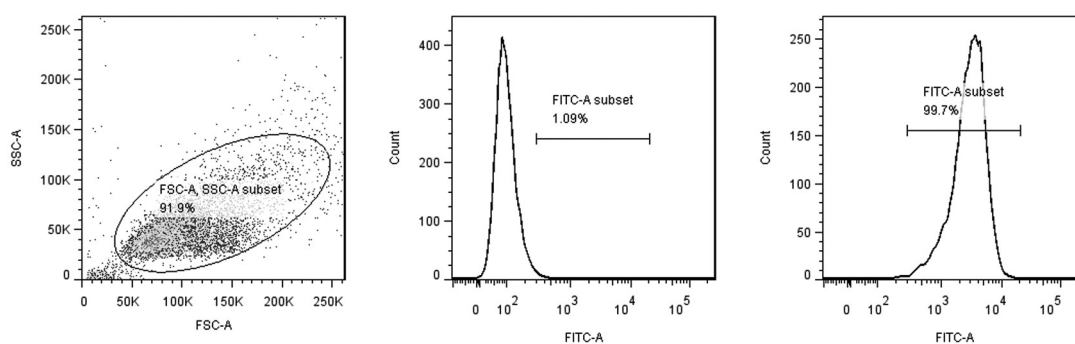


图 2. 组织培养和磁珠分选可获得高纯度血管壁CD34⁺干细胞

Fig. 2. Harvested CD34⁺ vascular wall-resident stem cells (VW-SCs) by tissue culture and magnetic activated cell sorting (MACS). A: Tissue cultured vascular resident cells at different days and CD34⁺ VW-SCs obtained by MACS (scale bar, 100 μ m). The inserted are magnification images (scale bar, 50 μ m). B: The MicroBead-purified CD34⁺ VW-SCs were identified for purity by flow cytometry.

包括肌肉卫星细胞、角膜角质细胞、间质细胞、上皮祖细胞和血管内皮祖细胞。虽然 CD34 作为表面抗原的功能仍然未知，但它与抑制或促进粘附、细胞增殖和分化调节有关^[19]。为此，外周血中分离的 CD34⁺ 细胞已被用于多项临床试验，涉及缺血（例如外周动脉疾病、冠状动脉疾病和心肌缺血）、肺动脉高压、肝硬化和伤口愈合等^[5, 20]。尽管有研究发现构建 CD34 抗体涂层支架来捕捉 CD34⁺ 细胞，有助于血管成形术后的内皮愈合，但伴随的炎症反应却加剧了新生内膜的形成，这一副作用限制了它们的临床应用^[21]。最近有学者^[5] 在小鼠股动脉导丝拉伤模型上，采用 CD34⁺ 细胞谱系示踪和骨髓移植实验证实骨髓来源的 CD34⁺ 干细胞主要参与血管

损伤的炎症反应，而血管壁 CD34⁺ 干细胞可在体内分化为内皮细胞参与血管损伤后的修复过程，提示血管损伤后激活的血管壁 CD34⁺ 干细胞可促进损伤内皮细胞的修复。

Hu 等人在 2004 年首先发现血管外膜存在 CD34⁺、Sca-1⁺ 干细胞^[4]，随后，大量研究证明血管的外、中、内三层均存在各种干细胞，在静息状态下，VW-SCs 主要参与血管细胞的自我更新和稳态调节；在动脉粥样硬化、高血压、再狭窄等血管损伤后，它们迁移到血管损伤部位，通过旁分泌途径或分化为内皮细胞、平滑肌细胞等，参与血管损伤修复、血管重构和血管功能的调节^[6, 22–24]。其中大量研究证实^[25–27]，血管壁 Sca-1⁺ 干细胞主要迁移至血管损伤

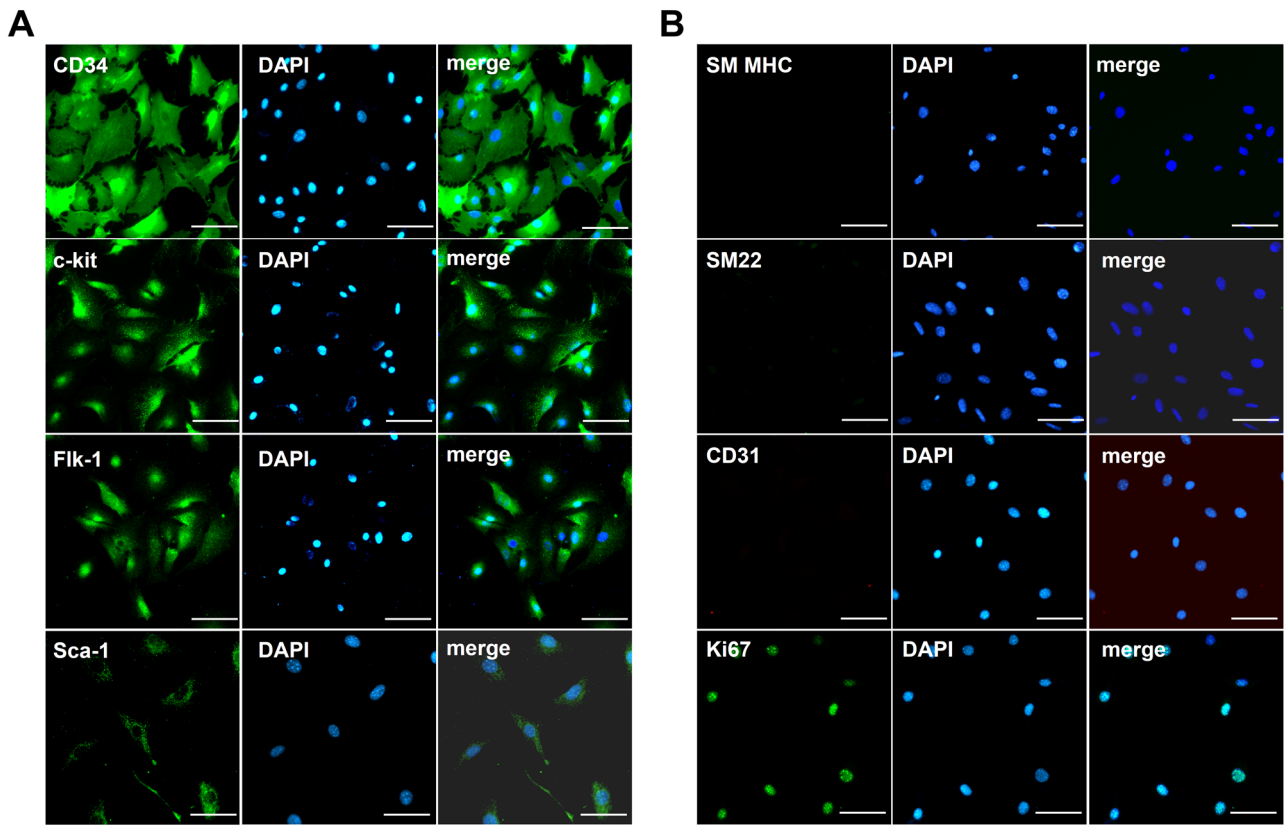


图 3. 免疫荧光染色检测血管壁CD34⁺干细胞表面标志物的表达
Fig. 3. Expression of surface markers in CD34⁺ vascular wall-resident stem cells (VW-SCs) measured by immunofluorescence staining. A: Immunofluorescence staining of stem cell markers CD34, c-kit, Flk-1 and Sca-1. B: The cell proliferation marker (Ki-67), endothelial cell marker (CD31) and smooth muscle cell markers (SM MHC, SM22) were determined by immunofluorescence staining. Scale bar, 50 μ m.

部位进而分化为平滑肌细胞参与血管重构。

本研究也证实，CD34⁺干细胞分布于小鼠肠系膜动脉和主动脉外膜和内膜层。常见细胞原代分离方法主要有组织块贴壁法和酶消化法^[28, 29]。在现有关于VW-SCs的原代分离的报道中，酶消化法分离VW-SCs主要用于单细胞测序，而用于后期研究培养的VW-SCs主要使用组织块贴壁法来获取细胞^[5, 11]。故本研究采用了组织块贴壁法获取血管壁细胞，然后利用磁珠分选CD34⁺干细胞。分选的血管壁CD34⁺干细胞免疫荧光染色检测CD34呈阳性，不表达内皮细胞标志物CD31以及平滑肌细胞标志物SM MHC、SM22，这与已有的研究报道基本一致^[30]。以往报道^[11]，血管壁CD34⁺干细胞能够向平滑肌细胞分化，然而最近Jiang等人^[5]通过急性分离小鼠股动脉血管壁细胞单细胞测序发现，CD34主要在内皮细胞群和间充质细胞群中表达，平滑肌细胞群中不表达CD34。且体内实验证实血管壁CD34⁺

干细胞能够分化为内皮细胞参与血管损伤后修复。故在本研究中，我们检测了血管壁CD34⁺干细胞向内皮细胞和成纤维细胞分化的能力，结果显示定向分化后内皮标志物及成纤维标志物的表达较分化前明显增高，提示血管壁CD34⁺干细胞能够分化为内皮细胞和成纤维细胞。此外培养的血管壁CD34⁺干细胞表达细胞核内分裂增殖相关蛋白Ki67，由此说明本研究方法分离培养的血管壁CD34⁺干细胞具备干细胞多向分化和强增殖特性^[31]。由于VW-SCs具有异质性^[5]，采用该方法分选的血管壁CD34⁺干细胞，同时带有其他干细胞阳性标志物如Flk-1、c-kit、Sca-1，存在不同的亚群，故其形态可能存在差异。

本研究还利用流式细胞术进行了磁珠分选得到的血管壁CD34⁺干细胞纯度检测，发现磁珠分选可得到高纯度的血管壁CD34⁺干细胞。目前应用比较广泛的分选干细胞的方法是流式细胞分选和免疫磁

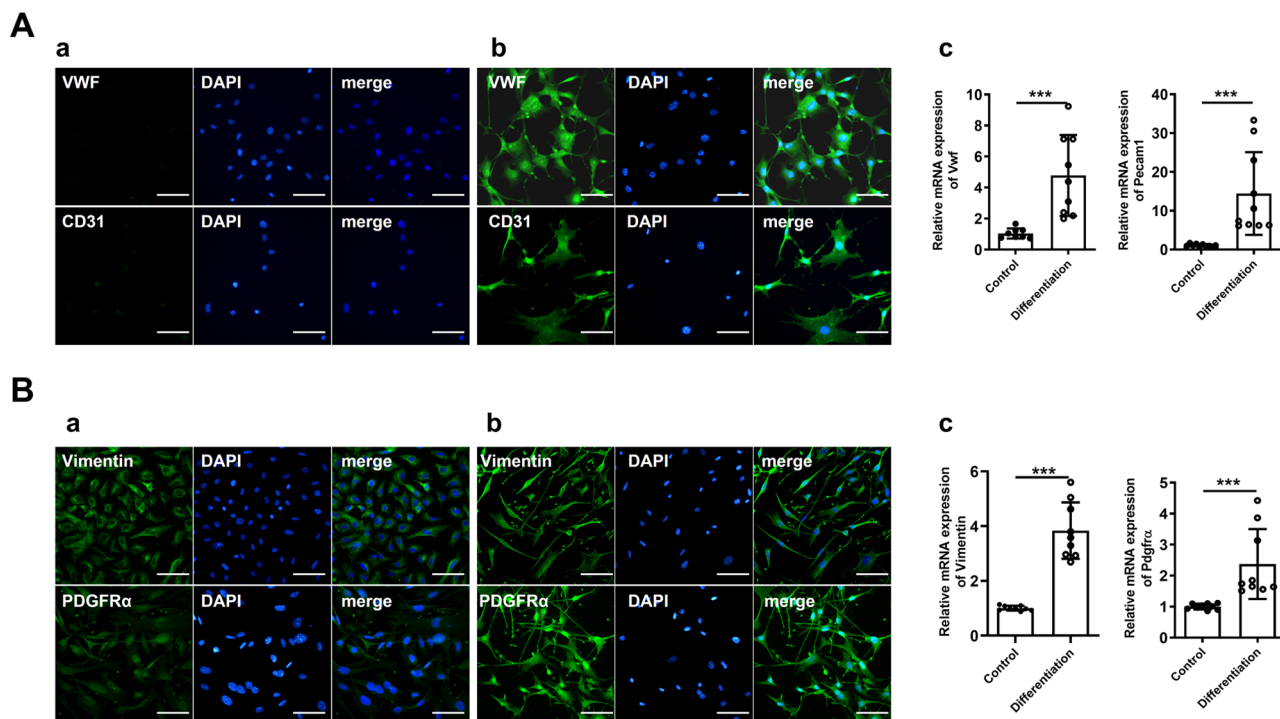


图 4. 血管壁CD34⁺干细胞多向分化能力检测

Fig. 4. Detection of multidirectional differentiation ability of CD34⁺ vascular wall-resident stem cells (VW-SCs). *A*: The expression of endothelial markers CD31 and VWF in CD34⁺ VW-SCs before and after differentiation was detected by cellular immunofluorescence staining (*a*, *b*) and q-PCR (*c*). *B*: The expression of fibroblast markers Vimentin and PDGFRα in CD34⁺ VW-SCs before and after differentiation was detected by cellular immunofluorescence staining (*a*, *b*) and q-PCR (*c*). Scale bar, 50 μm. Mean ± SD, *n* = 9–10, ****P* < 0.001.

珠吸附分离法^[32–34]。流式细胞荧光分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 法具有细胞纯度高和回收率高的特点, 但是 FACS 的缺点是速度较慢, 价格相对昂贵。免疫磁珠分离法以德国 Miltenyi 生物科技公司和美国 BD 公司和 StemCell 公司的分选试剂应用的比较多。该方法是一种集合了免疫学、细胞生物学和磁力学等理论于一体的高度特异性的细胞分选技术, 分选简单快速, 2 h 之内就可以完成细胞分选。不同的细胞分选方法影响细胞的纯度和得率^[35]。与以往报道类似^[36], 本实验中采用的 Miltenyi 生物科技公司的分选磁珠微粒直径仅有 50 nm, 对细胞造成的机械压力相对较小, 对细胞无损伤并可生物降解, 不干扰流式分选, 对细胞的生物学活性和分离后培养没有影响。此外, 分选前培养细胞的代数对磁珠分选能否得到良好活性的细胞至关重要。与文献^[11]中报道的分离方法不同的是, 我们一般在细胞培养 5 代左右进行分选, 此时细胞的数量可达到 1×10^7 左右, 细胞增殖活跃。

另外实验中也尝试了联合采用磁珠分选和流式分选, 得到的细胞纯度更好, 有利于后续的功能学研究。

在 VW-SCs 的传代培养过程中, 使用含 0.2 % LIF 的 DMEM 高糖培养基, 其中胎牛血清促进 VW-SCs 增殖, LIF 可抑制细胞的分化。结合已有研究^[11]发现, 低密度培养细胞有利于 VW-SCs 干性的维持, 而且随着细胞代数的增加, 干细胞有可能存在自分化。因此, 在 VW-SCs 的传代培养过程中, 每间隔 3~5 代需要进行纯化和鉴定。此外, 与以往报道一致^[37, 38], 在实验过程中我们观察到 VW-SCs 的培养和维持对血清成分的要求很高, 不同的血清成分及其浓度有可能导致细胞的自分化现象或影响细胞的生物学特性。因此, 在分选后细胞的培养过程中血清的选择也是至关重要的。

Ca²⁺ 是细胞内重要的第二信使, 参与调节细胞的收缩、分泌、代谢、基因表达以及细胞凋亡等过程^[39]。以往的报道^[11]只是简单描述了血管壁 CD34⁺ 干细胞的基本特性, 为了进一步明确本方法培养和

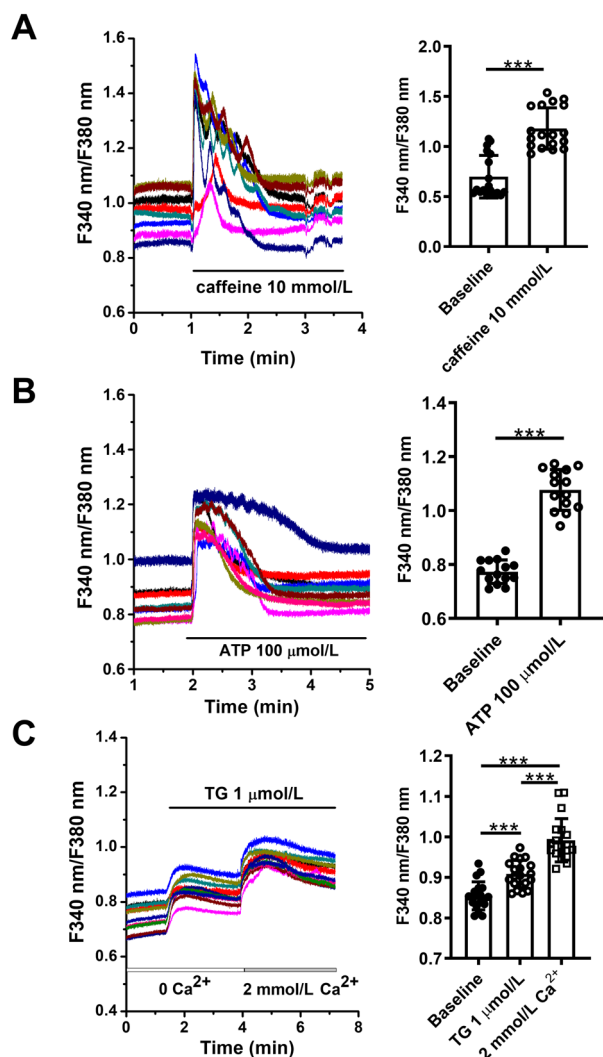


图 5. 血管壁CD34⁺干细胞胞内钙变化

Fig. 5. Intracellular calcium signal of CD34⁺ vascular wall-resident stem cells (VW-SCs). The intracellular Ca²⁺ release and extracellular Ca²⁺ entry signaling were evaluated by TILLVISION system in Fura-2/AM loaded cells. [Ca²⁺]_i was calculated by F340 nm/F380 nm. The curves in colors indicated different cells recorded. A: Representative curves and statistical analysis showed the effect of caffeine (10 mmol/L) on intracellular calcium signaling in CD34⁺ VW-SCs (*n* = 18). B: Representative curves and statistical analysis showed the effect of ATP (100 μmol/L) on intracellular calcium signaling in CD34⁺ VW-SCs (*n* = 14). C: Representative curves and statistical analysis showed the TG (1 μmol/L) induced intracellular Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum (ER) stores and the subsequent extracellular Ca²⁺ influx triggered by Ca²⁺ depletion was observed after re-addition of 2 mmol/L Ca²⁺ (*n* = 19). Mean ± SD, ****P* < 0.001.

纯化的血管壁 CD34⁺ 干细胞的钙信号功能是否正常, 我们分别采用 ATP、咖啡因和 TG 来检测细胞

内钙库 Ca²⁺ 释放和胞外 Ca²⁺ 内流情况。ATP 除了作为细胞内的能量载体外, 还是一种重要的信号分子, 一方面通过与细胞膜上 P2Y 受体结合后, 激活磷脂酶 C, 激活的磷脂酶 C 将磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) 转换为二酰基甘油 (DAG) 和磷酸肌醇 (IP₃), IP₃ 与内质网上 IP₃Rs 结合后, 引起内质网内的 Ca²⁺ 释放。此外 ATP 还能与细胞膜上 P2X 受体结合, 使细胞外 Ca²⁺ 内流。故细胞对 ATP 的反应性在一定程度上可以反映细胞的功能状态^[40]。SOCE 是介导胞外 Ca²⁺ 进入细胞内的重要通道之一, 存在于大多数非兴奋细胞和部分兴奋细胞上。当内质网内 Ca²⁺ 减少, 内质网上的 Ca²⁺ 浓度感受器基质相互作用分子 (stromal interaction molecule, STIM) 发生构象变化, 转位到内质网膜靠近细胞膜的位置并形成斑块状结构, 结合并激活 Orai 通道, 引起外 Ca²⁺ 内流^[41]。而 TG 通过抑制内质网上 Ca²⁺-ATP 酶, 耗竭细胞钙库内的 Ca²⁺, 进而激活 SOCE^[17]。研究报道^[42], 咖啡因通过与内质网膜上 RyRs 结合, 引起内质网内 Ca²⁺ 释放, 进而使细胞内 Ca²⁺ 快速增加。在本研究中, ATP 和咖啡因均能迅速使细胞内 Ca²⁺ 显著增加, 升高的胞内 Ca²⁺ 在约 1 min 内缓慢降低至基础状态; TG 引起的细胞内 Ca²⁺ 增加相对缓和, 增加后维持高水平状态, 无显著下降趋势。ATP、TG、咖啡因对血管壁 CD34⁺ 干细胞胞内 Ca²⁺ 的影响与已有研究报道的其他细胞基本一致^[43, 44], 提示本研究分离培养的血管壁 CD34⁺ 干细胞具有正常的胞内钙释放和外钙内流信号特征。我们的研究也为进一步深入探讨生理和病理状态下血管壁 CD34⁺ 干细胞内钙信号的调控机制做了初步铺垫。

本研究结合以往的研究报道, 成功分离和培养了小鼠主动脉和肠系膜动脉血管壁 CD34⁺ 干细胞, 并且探究了 ATP、咖啡因、TG 对血管壁 CD34⁺ 干细胞胞内 Ca²⁺ 的影响。本实验建立了体外分离和研究血管壁 CD34⁺ 干细胞的方法, 初步了解了血管壁 CD34⁺ 干细胞的一些生物学特性。

参考文献

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302): 964-967.
- Sethi R, Lee CH. Endothelial progenitor cell capture stent: safety and effectiveness. *J Interv Cardiol* 2012; 25(5): 493-500.

- 3 Jakobsen L, Christiansen EH, Freeman P, Kahlert J, Veien K, Maeng M, Raungaard B, Ellert J, Villadsen AB, Kristensen SD, Ahlehoff O, Christensen MK, Terkelsen CJ, Erik Botker H, Aaroe J, Thim T, Thuesen L, Aziz A, Eftekhari A, Jensen RV, Stottrup NB, Rasmussen JG, Junker A, Jensen SE, Hansen HS, Jensen LO. Randomized clinical comparison of the dual-therapy CD34 antibody-covered sirolimus-eluting combo stent with the sirolimus-eluting orsiro stent in patients treated with percutaneous coronary intervention: The SORT OUT X trial. *Circulation* 2021; 143(22): 2155–2165.
- 4 Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004; 113(9): 1258–1265.
- 5 Jiang L, Chen T, Sun S, Wang R, Deng J, Lyu L, Wu H, Yang M, Pu X, Du L, Chen Q, Hu Y, Hu X, Zhou Y, Xu Q, Zhang L. Nonbone marrow CD34⁺ cells are crucial for endothelial repair of injured artery. *Circ Res* 2021; 129(8): e146–e165.
- 6 Tamma R, Ruggieri S, Annese T, Ribatti D. Vascular wall as source of stem cells able to differentiate into endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 2020; 1237: 29–36.
- 7 Patel J, Seppanen EJ, Rodero MP, Wong HY, Donovan P, Neufeld Z, Fisk NM, Francois M, Khosrotehrani K. Functional definition of progenitors versus mature endothelial cells reveals key soxF-dependent differentiation process. *Circulation* 2017; 135(8): 786–805.
- 8 Chen K (陈开), Xu QB. Roles of stem cells in vascular remodeling. *Chin J Cell Biol (中国细胞生物学报)* 2021; 43(7): 1352–1361 (in Chinese).
- 9 Zhang L, Issa Bhaloo S, Chen T, Zhou B, Xu QB. Role of resident stem cells in vessel formation and arteriosclerosis. *Circ Res* 2018; 122(11): 1608–1624.
- 10 Wu Y, Shen Y, Kang K, Zhang YH, Ao F, Wan Y, Song J. Effects of estrogen on growth and smooth muscle differentiation of vascular wall-resident CD34⁺ stem/progenitor cells. *Atherosclerosis* 2015; 240(2): 453–461.
- 11 Tang JM, Wu Y, Zhang RN, Sen Z. Isolation and culture of vascular wall-resident CD34⁺ stem/progenitor cells. *Cardiol Plus* 2019; 4(4): 116–120.
- 12 Yao Z, Yang Z, Chen F, Jiang Y, Fu CZ, Wang Y, Lu R, Wu H. Autophagy is essential for the endothelial differentiation of breast cancer stemlike cells. *Int J Mol Med* 2020; 45(1): 255–264.
- 13 Sang P (桑鹏), Liu Y. Scleraxis combined with basic fibroblast growth factor promotes the differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into human ligament fibroblasts *in vitro*. *Chin J Tiss Eng Res (中国组织工程研究)* 2021; 23(29): 4644–4650 (in Chinese).
- 14 Ling S, Ma Z, Teng Y, Jiang X, Cheng J, Li R, Zhang M, Luo H, Chen Y. Adventitial progenitor cells of human great saphenous vein enhance the resolution of venous thrombosis via neovascularization. *Stem Cells Int* 2021; 2021: 8816763.
- 15 Lei M (雷明), Zeng XR, Chen GL, Liu ZF, Yang Y. The establishment of an intracellular free Ca²⁺ concentration measuring system. *J Southwest Med Univ (西南医科大学学报)* 2010; 33(5): 477–481 (in Chinese).
- 16 Jung HS, Seo MS, An JR, Heo R, Kang M, Han ET, Park H, Song G, Son YK, Jung WK, Choi IW, Na SH, Park WS. The anti-diabetic drugalogliptin induces vasorelaxation via activation of Kv channels and SERCA pumps. *Eur J Pharmacol* 2021; 898: 173991.
- 17 Sehgal P, Szalai P, Olesen C, Praetorius HA, Nissen P, Christensen SB, Engedal N, Moller JV. Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺-ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca²⁺ depletion and the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2017; 292(48): 19656–19673.
- 18 Chaumonnot K, Masson S, Sikner H, Bouchard A, Baverel V, Bellaye PS, Collin B, Garrido C, Kohli E. The HSP GRP94 interacts with macrophage intracellular complement C3 and impacts M2 profile during ER stress. *Cell Death Dis* 2021; 12(1): 114.
- 19 Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* 2014; 32(6): 1380–1389.
- 20 Prasad M, Corban MT, Henry TD, Dietz AB, Lerman LO, Lerman A. Promise of autologous CD34⁺ stem/progenitor cell therapy for treatment of cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2020; 116(8): 1424–1433.
- 21 Rotmans JI, Heyligers JM, Verhagen HJ, Velema E, Nagtegaal MM, de Kleijn DP, de Groot FG, Stroes ES, Pasterkamp G. *In vivo* cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation* 2005; 112(1): 12–18.
- 22 Yu B, Chen Q, Le Bras A, Zhang L, Xu Q. Vascular stem/progenitor cell migration and differentiation in atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2018; 29(2): 219–235.
- 23 Tang J, Wang H, Huang X, Li F, Zhu H, Li Y, He L, Zhang H, Pu W, Liu K, Zhao H, Bentzon JF, Yu Y, Ji Y, Nie Y, Tian X, Zhang L, Gao D, Zhou B. Arterial Sca1⁺ vascular stem cells generate de novo smooth muscle for artery repair and regeneration. *Cell Stem Cell* 2020; 26(1): 81–96.
- 24 Tao J, Cao X, Yu B, Qu A. Vascular stem/progenitor cells in vessel injury and repair. *Front Cardiovasc Med* 2022; 9: 845070.

- 25 Yang F, Chen Q, Yang M, Maguire EM, Yu X, He S, Xiao R, Wang CS, An W, Wu W, Zhou Y, Xiao Q, Zhang L. Macrophage-derived MMP-8 determines smooth muscle cell differentiation from adventitia stem/progenitor cells and promotes neointima hyperplasia. *Cardiovasc Res* 2020; 116(1): 211–225.
- 26 Wang X, Karamariti E, Simpson R, Wang W, Xu Q. Dickkopf homolog 3 induces stem cell differentiation into smooth muscle lineage via ATF6 signalling. *J Biol Chem* 2015; 290(32): 19844–19852.
- 27 Karamariti E, Zhai C, Yu B, Qiao L, Wang Z, Potter CMF, Wong MM, Simpson RML, Zhang Z, Wang X, Del Barco Barrantes I, Niehrs C, Kong D, Zhao Q, Zhang Y, Hu Y, Zhang C, Xu Q. DKK3 (Dickkopf 3) alters atherosclerotic plaque phenotype involving vascular progenitor and fibroblast differentiation into smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38(2): 425–437.
- 28 Ma HG (马华根), Liu HQ, Liu SD, Tang YY. Primary culture and identification of rat glomerular microvascular endothelial cells. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2021; 73(6): 926–930 (in Chinese).
- 29 Liu WH (刘维海), Wang P, Yang J. Isolation, culture and identification of rats hairfollicle neural crest stem cells. *Chin J Neuroanat (神经解剖学杂志)* 2019; 35(2): 207–211 (in Chinese).
- 30 Shen Y, Wu Y, Zheng Y, Ao F, Kang K, Wan Y, Song J. Responses of adventitial CD34⁺ vascular wall-resident stem/progenitor cells and medial smooth muscle cells to carotid injury in rats. *Exp Mol Pathol* 2016; 101(3): 332–340.
- 31 Ahmed TA, El-Badri N. Pericytes: the role of multipotent stem cells in vascular maintenance and regenerative medicine. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1079: 69–86.
- 32 Kumar P, Garg N. Flow cytometry approaches to obtain medulloblastoma stem cells from bulk cultures. *Methods Mol Biol* 2022; 2423: 87–94.
- 33 Haroon MM, Vemula PK, Palakodeti D. Flow cytometry analysis of planarian stem cells using dna and mitochondrial dyes. *Bio Protoc* 2022; 12(2): e4299.
- 34 Catchpole T, Nguyen TD, Gilfoyle A, Csaky KG. A profile of circulating vascular progenitor cells in human neovascular age-related macular degeneration. *PLoS One* 2020; 15(2): e0229504.
- 35 Wang G, Yu G, Wang D, Guo S, Shan F. Comparison of the purity and vitality of natural killer cells with different isolation kits. *Exp Ther Med* 2017; 13(5): 1875–1883.
- 36 Moore DK, Motaung B, du Plessis N, Shabangu AN, Loxton AG, Consortium SI. Isolation of B-cells using Miltenyi MACS bead isolation kits. *PLoS One* 2019; 14(3): e0213832.
- 37 Khasawneh RR, Al Sharie AH, Abu-El Rub E, Serhan AO, Obeidat HN. Addressing the impact of different fetal bovine serum percentages on mesenchymal stem cells biological performance. *Mol Biol Rep* 2019; 46(4): 4437–4441.
- 38 Kirsch M, Rach J, Handke W, Seltsam A, Pepelanova I, Strauss S, Vogt P, Scheper T, Lavrentieva A. Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum, and platelet lysate in 2D and 3D systems. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 598389.
- 39 Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, Aguiari G, Previati M, Pinton P, Giorgi C. Various aspects of calcium signaling in the regulation of apoptosis, autophagy, cell proliferation, and cancer. *Int J Mol Sci* 2020; 21(21): 8323.
- 40 Jiang LH, Mousawi F, Yang X, Roger S. ATP-induced Ca²⁺-signalling mechanisms in the regulation of mesenchymal stem cell migration. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(20): 3697–3710.
- 41 Ong HL, Subedi KP, Son GY, Liu X, Ambudkar IS. Tuning store-operated calcium entry to modulate Ca²⁺-dependent physiological processes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2019; 1866(7): 1037–1045.
- 42 Meissner G. The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J Gen Physiol* 2017; 149(12): 1065–1089.
- 43 Garcia-Carlos CA, Camargo-Loaiza JA, Garcia-Villa D, Lopez-Cervantes JG, Dominguez-Avila JA, Gonzalez-Aguilar GA, Astiazaran-Garcia H, Montiel-Herrera M. Angiotensin II, ATP and high extracellular potassium induced intracellular calcium responses in primary rat brain endothelial cell cultures. *Cell Biochem Funct* 2021; 39(5): 688–698.
- 44 Reggiani C. Caffeine as a tool to investigate sarcoplasmic reticulum and intracellular calcium dynamics in human skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 2021; 42(2): 281–289.