

[文章编号] 1000-1182(2009)03-0321-05

## 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记实验性牙移动大鼠血管内皮祖细胞的研究

刘超<sup>1</sup> 苗雷英<sup>2</sup> 孙新华<sup>1</sup> 刘金钟<sup>3</sup>

(1.吉林大学口腔医院 正畸科; 2.牙体牙髓病科; 3.病理科, 吉林 长春 130041)

**[摘要]** 目的 探讨5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记大鼠外周血血管内皮祖细胞(EPCs)的最佳标记时间与剂量。方法 建立实验性牙移动大鼠模型,密度梯度离心分离大鼠外周血EPCs并体外培养;免疫细胞化学、荧光化学鉴定细胞表面抗原;终浓度分别为5、10、15  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU标记EPCs,并于标记后12、24、48、72、96 h检测各组BrdU的标记率,筛选BrdU的最佳标记计量和时间。结果 所培养细胞CD34、CD133呈阳性表达,且DiI-ac-LDL、FITC-UEA-1呈双荧光阳性;终浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU标记细胞72 h后标记率达 $(66.8\pm 2.9)\%$ ,与5  $\mu\text{mol/L}$ 组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与15  $\mu\text{mol/L}$ 组相比无统计学意义( $P>0.05$ )。各浓度BrdU对细胞均无毒性影响。结论 成功分离、培养了实验性牙移动大鼠外周血EPCs;终浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU标记EPCs 72 h后可获得较高标记率。本实验可为研究EPCs的趋化、分化机制奠定基础。

**[关键词]** 5-溴脱氧尿嘧啶核苷; 血管内皮祖细胞; 外周血

**[中图分类号]** R781.4 **[文献标识码]** A

**Study of 5-bromodeoxyuridine labeling of endothelial progenitor cells from the circulating blood from tooth movement rat** LIU Chao<sup>1</sup>, MIAO Lei-ying<sup>2</sup>, SUN Xin-hua<sup>1</sup>, LIU Jin-zhong<sup>3</sup>. (1. Dept. of Orthodontics, School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130041, China; 2. Dept. of Operative Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130041, China; 3. Dept. of Pathology, School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130041, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the optimal dosage and timing for 5-bromodeoxyuridine(BrdU) labeling of endothelial progenitor cells(EPCs) from rat circulating blood. **Methods** The animal model for rat tooth movement was established. EPCs were obtained by density gradient centrifugation. The expressions of specific antigens on cell surface were analysed by immunocytochemistry and fluorescence chemistry. EPCs were incubated with BrdU at different concentrations(5, 10, 15  $\mu\text{mol/L}$ ) for different incubating time(12, 24, 48, 72, 96 h) to identify the optimal BrdU concentration and incubating time for cell labeling. Immunohistochemistry was performed to calculate the labeling index(LI). **Results** The culture cell positively expressed CD34, CD133 and could be shown to endocytose DiI-ac-LDL, FITC-UEA-1. Incubation of the EPCs with BrdU at 10  $\mu\text{mol/L}$  and for an optimal length of 72 h appeared to achieve the highest LI( $66.8\pm 2.9\%$ ), which was significantly higher than group of 5  $\mu\text{mol/L}$ ( $P<0.05$ ), while there was no significant difference between the group of 15  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$ ( $P>0.05$ ). **Conclusion** EPCs can be isolated from tooth movement rat circulating blood and cultured. Incubation of the EPCs with BrdU at 10  $\mu\text{mol/L}$  and for an optimal length of 72 h appeared to achieve the optimal LI. This provides a foundation for us to investigate the mechanism of chemotaxis and differentiation for EPCs.

**[Key words]** 5-bromodeoxyuridine; endothelial progenitor cells; peripheral blood

近年研究发现成体外周血血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)在人出生后的新血管形成中发挥重要作用,但是关于其如何趋化、分

化并参与血管形成的机制目前尚不明<sup>[1]</sup>。因此寻找合适的标记方法追踪观察EPCs成为其体内外诱导分化机制研究的一项重要课题。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)是胸腺嘧啶核苷的类似物,可掺入细胞S期核酸序列,作为反映细胞增殖活性的指标确切可靠,因其无放射性污染且容易检测而逐渐成为一种特异而便捷的标记物,在肿

[收稿日期] 2008-10-01; [修回日期] 2009-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672338)

[作者简介] 刘超(1978-),男,吉林人,博士

[通讯作者] 孙新华, Tel: 0431-88796023

瘤生物学、分子生物学、遗传学、药物代谢动力学、核医学等领域得到广泛应用<sup>[2]</sup>。本研究旨在采用BrdU体外标记分离培养的实验性牙移动大鼠外周血EPCs,检测BrdU对EPCs的最佳标记时间和标记剂量,为追踪观察EPCs趋化至牙周并参与牙周组织改建奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

M199培养基(Gibico公司,美国),10%胎牛血清(PAA公司,美国),VEGF164(RD公司,美国),人碱性成纤维细胞生长因子、人胰岛素样生长因子、BrdU(Sigma公司,美国),BrdU小鼠单克隆抗体、兔抗大鼠CD133多克隆抗体(北京博奥森有限公司),Percoll细胞分离液(Sigma公司,美国),乙酰化低密度脂蛋白(Acetylated lipoprotein low density, Ac-LDL)(Invitrogen公司,美国),FITC标记的荆豆凝集素(Sigma公司,美国),兔抗小鼠CD34多克隆抗体(Santa Cruz公司,美国)等。

### 1.2 实验动物

健康雄性Wistar大鼠10只,体重 $120\text{ g}\pm 10\text{ g}$ ,吉林大学动物实验中心提供。

### 1.3 主要仪器

CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱(Sanyo公司,日本),荧光倒置显微镜(Olympus公司,日本)。

### 1.4 方法

1.4.1 大鼠外周血EPCs的分离培养 按文献<sup>[3]</sup>描述建立Wistar大鼠牙移动模型,于加力第1天麻醉动物,无菌条件下暴露心脏,用经抗凝处理的注射器抽取5 mL血液,移入装有5 mL Percoll(工作密度为57%)分离液离心管离心( $2\,000\text{ r/min}$ , 20 min),取云雾状单核细胞层,PBS洗涤2次后以含10%胎牛血清、血管内皮生长因子164( $20\text{ }\mu\text{g/L}$ )、人碱性成纤维细胞生长因子( $2\text{ }\mu\text{g/L}$ )、人胰岛素样生长因子( $2\text{ }\mu\text{g/L}$ )的M199培养基制成细胞悬液。以每毫升 $1\times 10^6$ 个密度接种于培养瓶, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养。24 h后首次换液,弃早期贴壁细胞,留未贴壁细胞接种于铺有细胞爬片的24孔板中继续培养,以后每3 d换液1次。每天于倒置相差显微镜下观察贴壁细胞的生长形态变化并拍摄照片。

1.4.2 细胞表型鉴定 细胞培养至第7天,取细胞爬片,在含Dil标记的ac-LDL( $10\text{ }\mu\text{g/L}$ )的培养液中孵育12 h,2%多聚甲醛固定10 min,PBS漂洗后与FITC标记的UEA-1( $10\text{ }\mu\text{g/L}$ )作用1 h。激光共聚焦显微镜下观察计数,显示红色荧光的细胞为ac-LDL阳性,显示绿色荧光的细胞为UEA-1阳性,显示黄

色荧光为双荧光阳性。

取培养7 d的细胞爬片,PBS漂洗,冷丙酮固定10 min,漂洗后分别滴加CD34(1:200)和CD133(1:150)抗体,PBS代替一抗作为空白对照。按试剂盒说明操作,行SP法染色。二氨基联苯胺显色,中性树胶封片,显微镜下观察拍照。

1.4.3 BrdU标记EPCs 按1.4.1操作分离细胞并以每毫升 $1\times 10^6$ 个密度接种于铺有细胞爬片的12孔板中,加入终浓度分别为5、10、15  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU,于孵育后12、24、48、72、96 h取细胞爬片进行免疫细胞化学染色,随机数取10个非重叠视野( $\times 100$ )计算BrdU阳性细胞数占总细胞数的比例,确定BrdU对EPCs的最佳标记剂量和标记时间。设正常对照组细胞观察各浓度组BrdU对细胞有无细胞毒性。

1.4.4 MTT检测BrdU标记的EPCs增殖活性 将经上述浓度BrdU标记的各组EPCs以每孔 $5\times 10^3$ 个的细胞密度接种于96孔板,每组接种10孔。培养72 h后每孔加入20  $\mu\text{L}$  MTT溶液( $5\text{ g/L}$ )孵育4 h,弃培养基后每孔加二甲亚砜150  $\mu\text{L}$ ,振荡10 min,所有结晶全部溶解后于全自动酶标仪测定490 nm波长的光密度值,记录各组细胞的增殖活性。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0软件,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EPCs的形态

细胞培养48 h后开始贴壁,早期细胞多呈小球形,仅少数细胞伸展。4 d后细胞两端突起伸出呈梭形,核清晰呈圆形或卵圆形。7~10 d后细胞增殖较快,局部可见细胞线样排列或有集落形成(图1)。

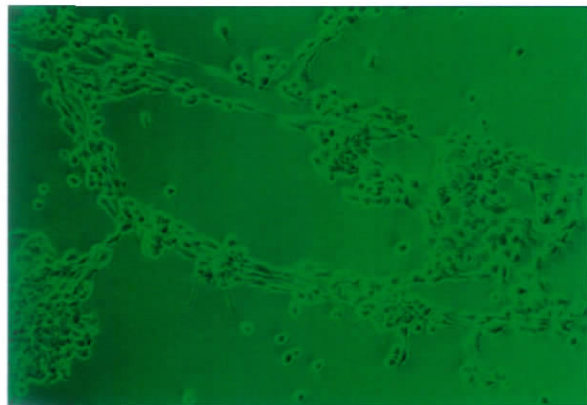


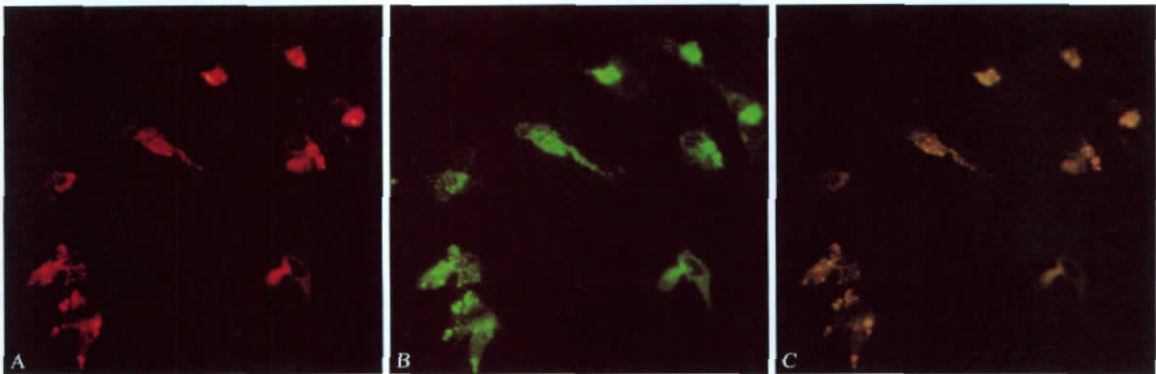
图1 EPCs培养第10天,细胞线样排列、集落生长 倒置相差显微镜  $\times 100$

Fig 1 Cells in experiment group culture for 10 d exhibited the line and clonal morphology inverted phase contrast microscope  $\times 100$

2.2 EPCs表面标志

70% 以上的细胞能同时内吞 ac-LDL 与结合 UEA-1，呈双阳性的橙黄色染色(图2)。细胞免疫

化学检测CD34和CD133，显示细胞质含棕黄色颗粒，呈阳性表达(图3、4)。



A：细胞内吞ac-LDL显示红色；B：细胞结合UEA-1显示绿色；C：双荧光阳性细胞为EPCs

图 2 EPCs的UEA-1和DiI-ac-LDL双荧光染色 激光共聚焦显微镜 ×200

Fig 2 EPCs exhibited by double FITC-UEA-1 and DiI-ac-LDL fluorescence staining laser scanning confocal microscope ×200

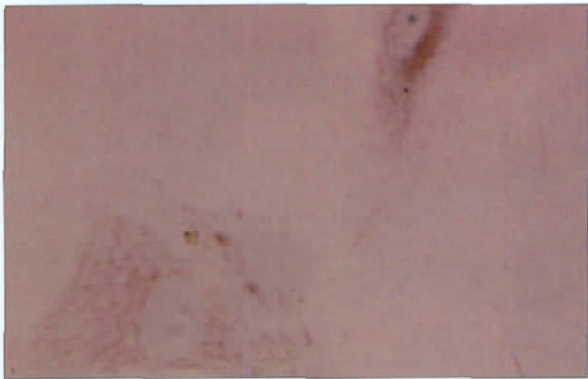


图 3 CD34在细胞质阳性表达 SP ×400

Fig 3 Positive expression of CD34 in EPCs SP ×400



图 4 CD133在细胞质阳性表达 SP ×400

Fig 4 Positive expression of CD133 in EPCs SP ×400

72 h，10 μmol/L的BrdU标记率明显高于5 μmol/L的BrdU( $P<0.05$ )，但与15 μmol/L的BrdU差异无统计学意义( $P>0.05$ )，图6)。96 h各组BrdU标记率虽然达到最高但与72 h时的标记率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。各标记组细胞经2次传代后仍可见到BrdU阳性细胞。

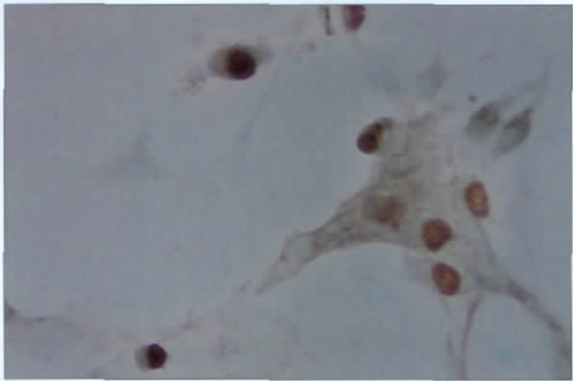


图 5 5 μmol/L BrdU 标记EPCs 12 h的形态 SP ×200

Fig 5 Positive EPCs expression for BrdU at 5 μmol/L after la-beled 12 h SP ×200

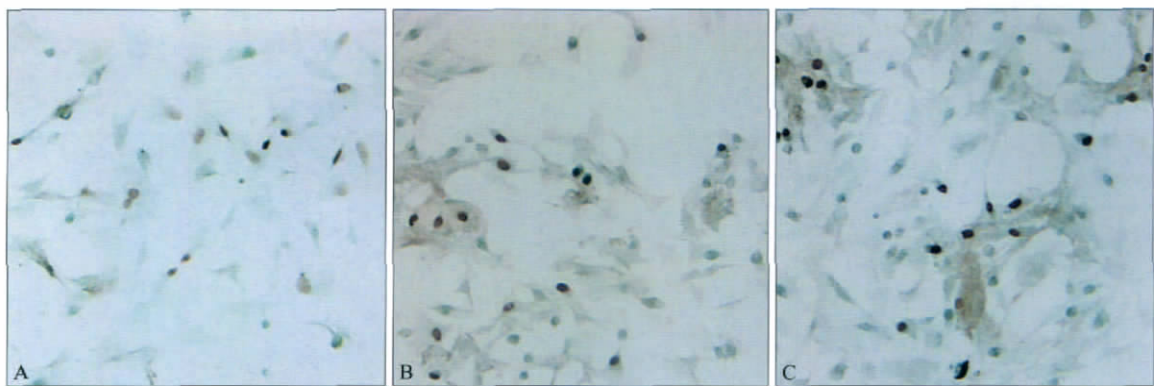
表 1 不同浓度BrdU不同时间的EPCs标记效率( $n=10$  ,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 The labeling index for EPCs incubated with BrdU at different concentrations for different incubating time( $n=10$  ,  $\bar{x}\pm s$ )

标记时间(h)	不同浓度的标记率(%)		
	5 μmol/L	10 μmol/L	15 μmol/L
12	11.9±3.4	16.5±2.5	17.2±2.1
24	18.2±2.6	23.1±3.1	26.8±3.5
48	32.4±5.4	42.6±4.3	46.7±2.8
72	44.2±1.3	66.8±2.9	68.2±3.2
96	48.2±2.1	68.8±2.4	70.7±3.1

2.3 BrdU标记率

经不同浓度BrdU标记的细胞与正常对照细胞比较，细胞形态、增殖速率没有差异。免疫细胞化学检测显示：不同浓度BrdU孵育12 h，各标记组均可见细胞核呈棕色颗粒状或弥漫分布的阳性细胞(图5)，各组间标记率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。不同浓度BrdU在不同时间的标记效率见表1。随着标记时间延长，各组BrdU阳性细胞率均增加。标记



A: 5  $\mu\text{mol/L}$ ; B: 10  $\mu\text{mol/L}$ ; C: 15  $\mu\text{mol/L}$   
图 6 不同浓度BrdU与EPCs孵育72 h后的阳性细胞 SP  $\times 100$

Fig 6 Positive EPCs after incubated with BrdU at different concentrations for 72 h SP  $\times 100$

2.4 MTT 法检测细胞的增殖活性

用MTT法比较经不同浓度BrdU标记的EPCs增殖活性，培养72 h后各组细胞在490 nm波长的光密度值差异没有统计学意义( $P>0.05$ )。

3 讨论

EPCs是一类具有增殖、分化潜能的内皮细胞前体细胞，可参与机体新血管形成<sup>[4]</sup>，在组织工程、缺血性疾病治疗等研究领域得到广泛应用<sup>[5]</sup>。通常情况下EPCs主要定居在成熟个体的骨髓中，仅有少量存在于外周血，但在组织损伤、缺血或生长因子、药物刺激等条件下，骨髓中的EPCs会被大量动员进入外周血。Gill等<sup>[6]</sup>在烧伤或者冠脉搭桥术继发急性血管损伤的患者中发现，在损伤后24 h内，外周循环中EPCs的数量几乎增加了50倍。进入外周血后，EPCs将进一步趋化、分化，参与缺血部位的新血管形成<sup>[7]</sup>。利用这一特性，已有学者将EPCs应用于口腔颌面领域的研究中。Cetrulo等<sup>[8]</sup>将来自人外周血中的EPCs由颈外动脉注入下颌骨牵张的裸鼠模型中，发现在牵张中期和保持期前期EPCs大量趋化至牵张区，此时实验组的新血管生成量也明显高于未注射EPCs组，提示EPCs参与了下颌牵张成骨区域的血管形成。目前已知在由机械力引起的正畸牙齿移动过程中，牙周组织将发生积极的改建活动：牙槽骨、牙周血管生成活跃，血管内皮生长因子等生长因子也呈规律性释放<sup>[9]</sup>，那么这种复杂的生物学改建过程是否也会动员骨髓EPCs进入外周血，并趋化至牙周组织发挥血管形成功能？这方面的研究还尚未见报道。据此，本研究用机械牵张使大鼠上颌第一磨牙牙移动，拟通过牙周改建刺激骨髓EPCs动员进入外周血，并于牵张后1 d分离、培养大鼠外周血单核细胞并进行鉴定。由于EPCs是内皮细胞的前体细胞，因此与内皮细胞一样均能表达包括CD34、VE-钙黏着素等在内的多种内皮标志，而早期EPCs

可阳性表达CD133，成熟的内皮细胞则阴性表达，因此CD133阳性可鉴别EPCs<sup>[1]</sup>。另外，如果细胞能够同时吞噬DiI-ac-LDL、FITC-UEA-1，可以说明此时的细胞为正在分化的EPCs<sup>[10]</sup>。在本研究中，经免疫细胞化学染色显示，所培养的牙移动大鼠外周血单核细胞CD34、CD133阳性表达，且DiI-ac-LDL和FITC-UEA-1双染阳性，这些均符合EPCs的特点。

为进一步研究外周血EPCs趋化、分化并参与移动牙牙周组织改建的机制，选择一种能高效、便捷标记EPCs的方法显得尤为重要。目前细胞标记方法包括放射性核素如<sup>3</sup>H-TdR标记酶联标记，非放射性核素如荧光标记、特定基因标记及BrdU标记等。20世纪中期，<sup>3</sup>H-TdR作为放射性标记物用于研究染色体的复制，当其结合到子代细胞DNA中时，通过检测细胞核中氚的 $\beta$ 衰减可显示被标记的细胞核，但此方法周期长且有放射性，因此逐渐被非放射标记法所取代。

非放射标记物中的BrdU是一种嘧啶类似物，其胸腺嘧啶的碱基嘧啶环与5位C原子连接的甲基被溴代替。当细胞处于DNA合成期(S期)时，加入的BrdU可像胸腺嘧啶核苷一样渗入合成的DNA中并可长期存留。Gratzner<sup>[12]</sup>首先利用抗5-BrdU和抗5-碘脱氧尿嘧啶核苷(5-iododeoxy-uridine, IudR)单克隆抗体显示DNA复制，与<sup>3</sup>H-TdR标记法所获结果一致。此后该方法得到广泛应用。与同位素和荧光标记技术相比较，BrdU抗体不与胸腺嘧啶发生交叉反应，而且只要不受紫外线照射，被BrdU标记的细胞功能不受影响，经免疫细胞化学染色即可观察BrdU在细胞内的渗入情况。因此采用BrdU标记检测方法简便、安全。

但是，EPCs在由外周血趋化至缺血区的过程中会损失一部分<sup>[11]</sup>，因此选择适宜BrdU的标记剂量及标记时间，获取对EPCs的最佳标记效率，是目前需要解决的问题。本研究以不同浓度的BrdU标记大鼠

外周血EPCs。发现标记后12 h各组BrdU标记率差别无统计学意义( $P>0.05$ ), 72 h时10  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU标记率明显高于5  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU组( $P<0.05$ ), 但与15  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU差异无统计学意义( $P>0.05$ )。随着标记时间延长, 各组BrdU阳性细胞率呈递增趋势。但标记96 h与标记72 h组相比阳性细胞数增加不明显, 考虑可能为循环中的EPCs多为晚期EPCs<sup>[12]</sup>, 体外培养时会有部分EPCs分化为成熟内皮细胞, 使细胞增殖速度变缓。另外培养细胞一般3~4 d换液1次, 若换液间隔时间过长, 培养基中营养成分消耗殆尽, 存留过多的代谢产物也将影响细胞的生长, 使其DNA合成减缓或停止。因此本实验选用10  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU标记72 h为最佳标记浓度及标记时间用于完成后续实验。

综上所述, 本实验结果显示采用BrdU标记与正常对照组相比不影响细胞的增殖, 而且其检测方法简便, 表达率高, 是反映细胞增殖及跟踪监测移植细胞动态变化的理想指标。以10  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU标记细胞并孵育72 h, 能够满足移植细胞的标记需要。本实验为深入研究EPCs参与大鼠实验性牙移动牙周血管改建的作用奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] Zammaretti P, Zisch AH. Adult endothelial progenitor cells. Re-newing vasculature[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(3) :493-503.
- [2] Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iodo-deoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication [J]. Science, 1982, 218(4571) :474-475.

- [3] 莫水学. 正畸牙移动动物实验常用建模方法[J]. 国外医学口腔医学分册, 2003, 30(5) :378-380.  
MO Shui-xue. The commonly used modeling methods for orthodontic movement [J]. Foreign Medical Sciences (Stomatology), 2003, 30(5) :378-380.
- [4] Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis[J]. Physiology (Bethesda), 2005, 20(1) :36-42.
- [5] 董青山, 毛天球. 骨组织工程血管化技术的构建思路[J]. 国际口腔医学杂志, 2008, 35(3) :321-324.  
DONG Qing-shan, MAO Tian-qiu. Construction of angiogenesis in bone tissue engineering[J]. Int J Stomatol, 2008, 35(3) :321-324.
- [6] Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells[J]. Circ Res, 2001, 88(2) :167-174.
- [7] Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review[J]. Leuk Res, 2007, 31(4) :439-444.
- [8] Cetrulo CL Jr, Knox KR, Brown DJ, et al. Stem cells and distraction osteogenesis: Endothelial progenitor cells home to the ischemic generate in activation and consolidation[J]. Plast Reconstr Surg, 2005, 116(4) :1053-1064.
- [9] Kaku M, Motokawa M, Tohma Y, et al. VEGF and M-CSF levels in periodontal tissue during tooth movement[J]. Biomed Res, 2008, 29(4) :181-187.
- [10] Schmeisser A, Graffy C, Daniel WG, et al. Phenotypic overlap between monocytes and vascular endothelial cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 522 :59-74.
- [11] Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis[J]. Circ Res, 2007, 101(2) :125-136.
- [12] Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood[J]. Circ Res, 2003, 93(11) :1023-1025.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第320页)

第四军医大学学报, 2006, 27(10) :895-897.

- TIAN Rong, LI Wei, YU Ji-yun, et al. *In vitro* and identification of mouse dendritic cells[J]. J Fourth Military Medical University, 2006, 27(10) :895-897.
- [7] 王志勇, 李声伟, 胡勤刚, 等. 树突状细胞体外诱导淋巴细胞抑制舌癌细胞生长的实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2004, 20(5) :517-521.  
WANG Zhi-yong, LI Sheng-wei, HU Qin-gang, et al. Experimental study on inhibition of lymphocyte against tongue cancer cell growth induced *in vitro* by dendritic cells[J]. J Pract Stomatol, 2004, 20(5) :517-521.
- [8] 季海峰, 孙卫民, 陈杰, 等. LPS持续刺激对小鼠骨髓树突状细胞成熟的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(1) :6-9.  
JI Hai-feng, SUN Wei-min, CHEN Jie, et al. Impact of continued stimulation by LPS to maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cell[J]. China J Microbiol Immunol, 2004, 24

(1) :6-9.

- [9] Gabriele L, Borghi P, Rozera C, et al. IFN- $\alpha$  promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment[J]. Blood, 2004, 103(3) :980-987.
- [10] Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells[J]. J Leuk Biol, 1999, 66(2) :205-208.
- [11] Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution[J]. Nat Immunol, 2002, 3(7) :667-672.
- [12] 吴淑燕, 古涛, 周桓, 等. 小鼠骨髓前体细胞来源的树突状细胞超微结构[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(1) :34-36.  
WU Shu-yan, GU Tao, ZHOU Huan, et al. Ultrastructure of dendritic cell from the precursor cells of mouse bone marrow[J]. Shanghai Laboratory Animal Science, 2004, 24(1) :34-36.

(本文编辑 汤亚玲)