

EVIDENȚIEREA MULTILINEARITĂȚII CELULELOR STEM MEZENCHIMALE MURINE PRIN DIFERENȚIEREA PE LINIE ENDOTELIALĂ

IOANA CRISTINA ILEA, EMOKE PALL, MIHAI CENARIU,
IOAN ȘTEFAN GROZA

Departamentul de Reproducție, Obstetrică și Ginecologie Veterinară,
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca

Rezumat

Introducere. Numeroase studii din literatura de specialitate evidențiază capacitatea multipotentă a celulelor stem mezenchimale derivate din măduva osoasă murină, prin proprietatea acestora de a se diferenția în multiple lineaje, incluzând liniile osoasă, adipoasă, cartilaginoasă și neurală. Cercetări recente prezintă posibilitatea diferențierii in vitro a celulelor stem mezenchimale în celule endoteliale vasculare.

Obiective. Scopul prezentei lucrări a fost izolarea și cultivarea celulelor stem mezenchimale murine de la nivelul măduvei osoase hematogene. Acestea au fost urmate de caracterizarea morfologică a celulelor din culturile primare și secundare, precum și de evidențierea multilinearității prin diferențiere pe linie endotelială și imunofenotipizarea celulelor diferențiate.

Material și metodă. Celulele stem mezenchimale au fost izolate de la șoareci din linia CD1 și cultivate în mediul IMDM suplimentat. Diferențierea pe linie endotelială s-a efectuat utilizând mediul EMB-2 suplimentat cu EGM2 Sigle Quots. Caracterizarea celulelor diferențiate s-a realizat prin imunofenotipizare, utilizând citometrul în flux BD FACS Canto II.

Rezultate. În urma izolării și cultivării celulelor stem mezenchimale, în ziua 12 s-a constatat o creștere semnificativă a numărului și densității coloniilor. Celulele fibroblast-like au prezentat o morfologie multiplă, observându-se celule cu aspect alungit, stelat și triunghiular. La patru zile după inducția endotelială, în cultură s-au observat insule celulare multiple delimitate de spații poligonale interconectate prin cordoane celulare, caracteristice diferențierii endoteliale. Evaluarea imunofenotipică a relevat un procent de 67,2% de celule CD105 pozitive și 73,5% celule CD105 și CD31 pozitive, sugerând un grad avansat al diferențierii.

Concluzii. Recomandăm utilizarea mediului EMB-2 suplimentat pentru inducerea diferențierii MSCs, în vederea obținerii culturilor celulare endoteliale uniforme.

Cuvinte cheie: celule stem mezenchimale, diferențiere endotelială, imunofenotipizare.

MOUSE MESENCHYMAL STEM CELLS DIFFERENTIATION INTO THE ENDOTHELIAL LINEAGE

Abstract

Background. Numerous studies have showed that bone marrow derived mesenchymal stem cells are multipotent and present the capacity to differentiate into various cell types, including osteocytes, adipocytes, chondrocytes and neural cells. Recent studies have reported the stem cells ability to differentiate into vascular endothelial cells in vitro.

Aims. Our objectives were the isolation and the cultivation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. This was followed by the morphological characterization of primary and secondary culture cells and the highlighting of

multipotent properties by endothelial lineage differentiation and immunophenotyping of differentiated cells.

Material and Methods. *Mesenchymal stem cells were isolated from CD1 mice and cultured in supplemented IMDM medium. Multipotent potential was evaluated by mesenchymal stem cells differentiation into endothelial-like cells using EMB-2 medium supplemented with EGM2 Single Quots. Cells characterization was done by immunophenotyping, using the BD FACS Canto II flow cytometer.*

Results. *In the 12th day of culture, the number and density of fibroblast-like cells colonies increased. Cell population shared diverse morphologies: spindle-shaped, star-shaped and hexagonal-shaped cells. Four days after induced differentiation, there were obvious cell islets delimited by empty polygonal areas and interconnected by cellular cords, which is characteristic for differentiated endothelial cells. Immunophenotyping showed a percentage of 67,2% CD105 positive cells and a percentage of 73,5% CD105 and CD31 positive cells. All these suggest an advanced stage of cells differentiation.*

Conclusions. *To obtain a homogenous cell population of derived endothelial cells from mesenchymal stem cells in mice, we recommend the use of supplemented EMB-2 culture medium.*

Keywords: mesenchymal stem cells, endothelial differentiation, immunophenotyping.

Introducere

Numeroase studii din literatura de specialitate evidențiază multipotența celulelor stem mezenchimale (MSCs) derivate din măduva osoasă murină, prin capacitatea acestora de a se diferenția în multiple lineaje, incluzând liniile osoasă, adipoasă, cartilaginoasă și neurală [1]. Cercetări recente prezintă posibilitatea diferențierii in vitro a MSCs în celule endoteliale vasculare (EVCs) [2,3,4,5].

Derivarea *in vitro* a celulelor vasculare din MSCs multipotente a evidențiat faptul că în timpul procesului de diferențiere, celulele dobândesc din punct de vedere morfologic și funcțional caracterele celulelor vasculare, exprimând pe suprafața membranelor markerii specifici. Aceste caracteristici permit urmărirea în detaliu a transformării MSCs în celule mature vasculare, oferind astfel posibilitatea de a le distinge de alte linii celulare [6]. Până în prezent nu există un protocol standardizat de obținere a celulelor vasculare din celule stem/progenitoare, aceasta datorându-se în special cineticii diferențierii celulelor vasculare și a markerilor membranari specifici. Chiar și în urma îndeplinirii condițiilor menționate anterior, s-a reușit izolarea în proporție de doar 10% a celulelor progenitoare endoteliale CD34 pozitive [7,8].

Terapia vasculară bazată pe utilizarea MSCs este un pas important atât pentru terapia bolilor cardiovasculare ischemice, cât și pentru inițierea procesului de vasculogeneză și angiogeneză în condiții de ischemie tisulară. De asemenea, tindem să ajungem la un nivel la care ar fi posibilă crearea de țesuturi vascularizate care să poată fi utilizate ca grefe [2,9,10].

Obiective

Scopul prezentei lucrări a fost izolarea și cultivarea celulelor stem mezenchimale murine de la nivelul măduvei osoase hematogene. Acestea au fost urmate de caracterizarea morfologică a celulelor din culturile primare și secundare, precum și de evidențierea multilinearității prin diferențiere pe linie endotelială și imunofenotipizarea celulelor diferențiate.

Material și metodă

Materialul biologic utilizat a fost reprezentat de șoareci din linia CD1, cu vârsta cuprinsă între 10-12 săptămâni, de la care s-a recoltat osul femur în condiții de maximă sterilitate, după sacrificarea acestora.

Mediul de spălare utilizat a fost α MEM (Gibco) suplimentat cu 10% FCS (ser fetal bovin, Gibco), 1% penicilină-streptomicină (Gibco) și 1% aminoacizi neesențiali (Sigma). Cultivarea MSCs izolate de la nivelul măduvei osoase hematogene s-a realizat utilizând mediul IMDM (Lonza) suplimentat cu 10% FCS (Hyclone), 1% Antibiotic-Antimicotic (Gibco), 1% glutamine (Sigma), 1% NEA (Sigma) și 5% ser de cal (horse serum, Sigma), într-un microclimat favorabil dezvoltării și diviziunii celulare 37°C, 5% CO₂ și 90% umiditate. Schimbarea mediului s-a efectuat după 24 de ore, iar apoi din două în două zile. Culturile celulare au fost pasate de cinci ori înainte de testarea multilinearității. Pentru obținerea subculturilor, celulele au fost tratate enzimatic cu 0.25% tripsină și pasate în proporție 1:3.

Inducerea diferențierii MSCs pe linie endotelială s-a realizat prin utilizarea mediului EBM2 medium (Lonza) suplimentat cu EGM2 Single Quots (0,02 ml FCS, 1 μ g/ml acid ascorbic, 5 ng hEGF, 10 ng hFGF B, 20 ng R₃IGF-1, 22,5 μ g Heparină, 0,5 ng VEGF, 1% Antibiotic – Antimicotic). Pentru evidențierea multilinearității, celule

diferențiate au fost prelucrate cu ajutorul fluorocitometriei în flux utilizând BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, Ca). Anticorpii utilizați au fost reprezentativi de anticorpur anti-CD31 murin și anticorpur anti-CD105 (Endoglin) murin.

Rezultate

În ziua zero celulele au prezentat un aspect rotund, iar după 24 de ore am observat alungirea acestora, cu preluarea unui caracter fibroblastiform. După ziua a patra de cultură am constatat o proliferare accentuată și formarea coloniilor de dimensiuni mici. După ziua șapte, numărul coloniilor celulare de diferite mărimi a prezentat o creștere semnificativă (aproximativ 8–12 colonii/60 mm placă) (Fig. 1).

În cazul coloniilor mari am observat o densitate celulară mai crescută, celule cu formă alungită, constatându-se și celule cu caracter triunghiular și stelat. În următoarele zile coloniile celulare s-au extins treptat, cu apariția unor conexiuni între acestea.

Celulele pasate s-au comportat în mod similar cu cele din culturile primare, constatându-se doar celule cu dimensiuni mai mari și caracter mai heterogen. În cazul subculturilor, am observat prezența a două tipuri celulare: celule mici fusiforme sau triunghiulare și celule largi turtite. Celulele apatizate au prezentat o rată de proliferare scăzută și au fost înconjurată treptat de celule mici fusiforme/triunghiulare, cu proliferare rapidă și tendința de a forma colonii. Prin pasare, celule fusiforme s-au transformat treptat în celule largi apatizate. La sfârșitul primului pasaj, aproximativ 15-18% din celule au fost apatizate, iar după pasajul patru aproximativ 50% din celule au devenit celule largi apatizate, scăzând progresiv gradul de proliferare a MSCs. De asemenea, s-a înregistrat și o descreștere a formării coloniilor. Curbele de creștere a MSCs în cultura primară și în cele patru pasaje succesive sunt prezentate în Fig. 2.

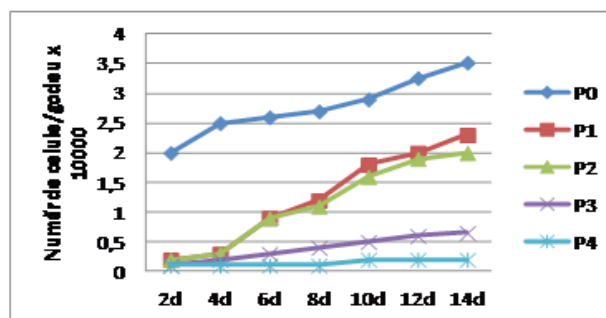


Fig. 2. Curba de creștere a MSCs în cultura primară și în cele 4 pasaje succesive.

La 24 de ore după inducția endotelială, realizată cu mediul EMB-2 suplimentat, am observat difuzia celulelor în placa de cultură, cu tendința de a forma aglomerări celulare, însă reduse ca număr și rare, precum și cordoane celulare. La 48 de ore s-au înregistrat aglomerări celulare multiple, cu apariția unor arii libere de dimensiuni reduse, înconjurată de insule celulare și lanțuri. La patru zile, am observat insule celulare multiple delimitate de spații poligonale interconectate prin cordoane celulare, caracteristice diferențierii endoteliale (Fig. 3).

În ziua a 12-a s-a observat creșterea semnificativă a numărului de celule cu caracter fusiform și poligonal. După 18 zile de diferențiere, au fost prezente foarte puține celule fusiforme cu bipolaritate accentuată, ceea ce a demonstrat faptul că majoritatea MSCs s-au diferențiat.

Evaluarea imunofenotipică a relevat un procent de 67,2% de celule CD105 pozitive (Fig. 4) și 73,5% celule CD105 și CD31 pozitive (Fig. 5), sugerând un grad avansat al diferențierii.

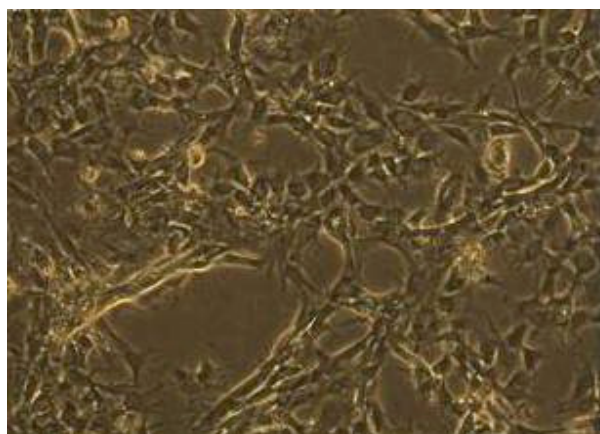
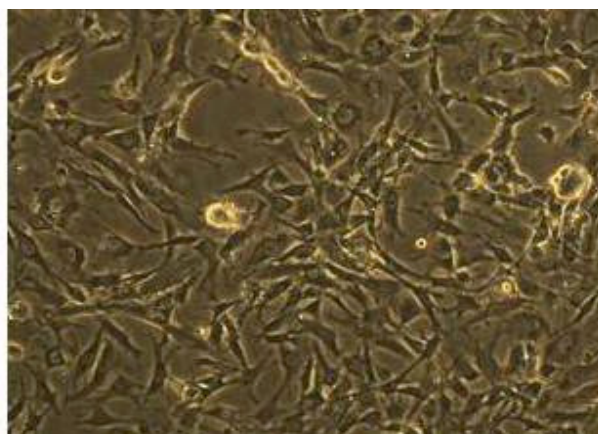


Fig. 1. Apariția conexiunilor între colonii (20x) (original).



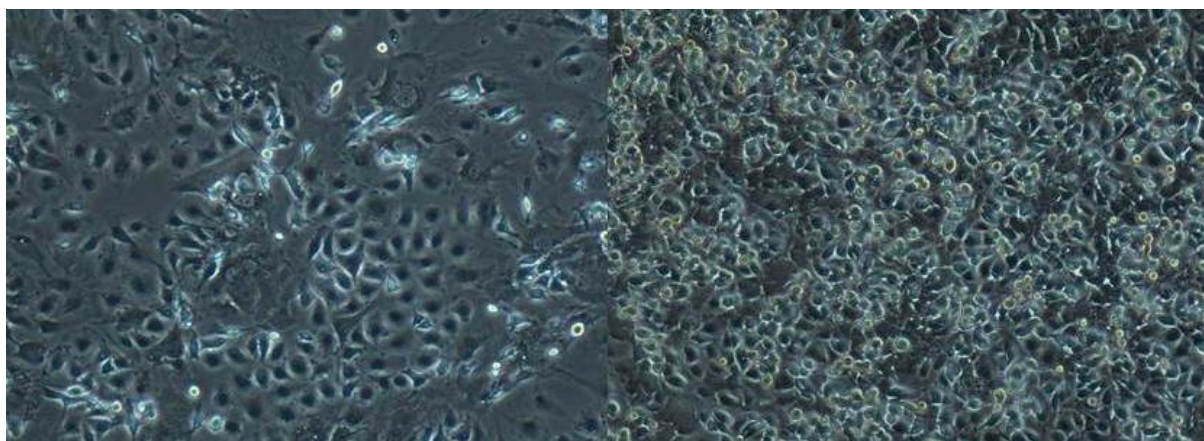


Fig. 3. Morfologia celulară la 4 zile (20x) (original).

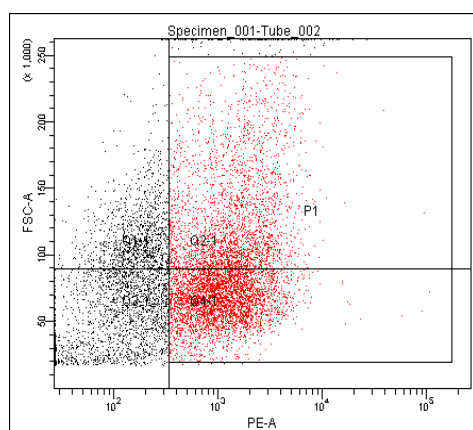


Fig. 4. Reprezentarea histografică a celulelor CD105 pozitive (original).

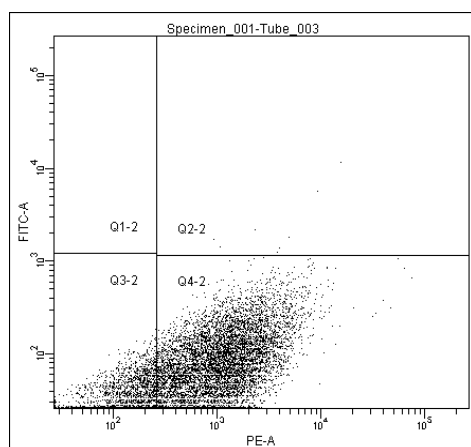


Fig. 5. Reprezentarea histografică a celulelor CD105 și CD31 pozitive (original).

Discuții

Izolarea MSCs de la nivelul măduvei osoase hematogene se bazează pe proprietatea acestora de a adera

la placa de cultură, aspect evidențiat de către Friedestein și col. [11]. În studiul de față, după 24 de ore de la izolare, celulele au preluat un caracter fibroblastiform, proprietate specifică MSCs, celulele neaderente fiind îndepărtate prin schimbarea mediului de cultură. Proliferarea accentuată și tendința de a forma colonii de dimensiuni mici am constatat-o după ziua 4 de cultivare, aceste aspecte fiind evidențiate și de către Friedestein și col. [11].

După ziua 7 de cultivare, creșterea semnificativă a densității celulelor cu formă alungită și a numărului coloniilor de diferite dimensiuni, precum și prezența celulelor cu aspect stelat și triunghiular în coloniile de dimensiuni mari, denotă faptul că o parte din celulele din coloniile mari intră în senescență, în timp ce celulele din coloniile neoformate mici sunt încă în stadii incipiente de replicare, conform literaturii de specialitate [12].

Obținerea, la sfârșitul primului pasaj, a unui procent de 15-18% celule aplatizate, iar după pasajul patru aproximativ 50% de celule largi aplatizate, denotă scăderea progresivă a gradului de proliferare a MSCs, fapt evidențiat și de către Phinney și col. [12], care demonstrează că pasarea celulelor poate întârzia senescența MSCs, însă treptat aceste celule pierd capacitatea de proliferare și are loc o conversie morfologică din forma fusiformă în cea triunghiulară aplatizată.

Prin diferențierea pe linie endotelială cu mediul EMB-2 suplimentat, am evidențiat caracterul multipotent al MSCs obținute. Mediul utilizat a fost suplimentat cu un complex de factori de creștere, dintre care VEGF este mediatorul de bază pentru formarea țesutului vascular în timpul dezvoltării embrionare timpurii, având de asemenea un rol determinant și în procesul de angiogeneză la organisme postnatale. Totodată, induce diferențierea, proliferarea, migrarea și aderarea EVCs la structurile vasculare deja existente [13,14]. Prezența în cultură la 4 zile de la inducție a insulelor celulare multiple delimitate de spații poligonale, interconectate prin cordoane celulare, este caracteristică diferențierii endoteliale, aspecte subliniate și

de către Zeng L. și col. [15].

În urma diferențierii, pentru evaluarea celulelor endoteliale am efectuat analiza imunofenotipică, obținând un procent de 67,2% de celule CD105 pozitive. CD105 este o glicoproteină localizată pe suprafața membranară a celulelor, fiind exprimată în special de către celulele endoteliale, la nivelul macrofagelor activate, fibroblastelor, celulelor musculare netede vasculare, mielomonocitelor și precursorilor eritrocitari. De asemenea, are rol în organizarea morfologică a citoscheletului și migrarea celulelor, în dezvoltarea sistemului cardiovascular și remodelarea vasculară [16]. Obținerea unui procent de 73,5% celule CD105 și CD31 pozitive sugerează un grad avansat al diferențierii, deoarece CD31, denumită și PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule), face parte din clasa imunoglobulinelor, fiind o proteină membranară cu rol în medierea aderenței celulelor endoteliale și în angiogeneză. Este exprimată constant la nivelul suprafeței membranare a celulelor endoteliale embrionare și adulte [17].

Concluzii

Utilizarea mediului de propagare IMDM a permis obținerea culturilor de MSCs cu o confluență de 70%, cu formarea unor colonii celulare de diferite mărimi care au prezentat o proliferare semnificativă. În cazul culturilor primare, celulele au prezentat o stagnare în dezvoltare în primele 4 zile de cultură, urmând o proliferare rapidă până în ziua 10, cu o medie de $15.37 \pm 0.10 \times 10^4$ celule/ml. Celulele din pasajul 1 și 2 au prezentat curbe de proliferare similare cu cele ale culturii primare.

În cazul culturilor pretratate cu mediul EBM2 suplimentat, după 4 zile de la inducție s-au observat insule celulare multiple, delimitate de spații poligonale interconectate prin cordoane celulare. Evaluarea imunofenotipică a relevat un procent de 67,2% de celule CD105 pozitive și 73,5% celule CD105 și CD31 pozitive, sugerând un grad avansat al diferențierii.

Bibliografie

1. Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in bone marrow. In: Heersche JNM, Kanis JA, editors, Bone and Mineral Research, Amsterdam, 1990, 243-272

2. Sekine H, Shimizu T, et al. Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocytes sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation*, 2008; 118(14Supl): 145-S152;
3. Asahara T, Murohara T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997; 275(5302):964-967
4. Orlic D, Kajstura J, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001a; 410(6829): 701-705
5. Orlic D, Kajstura J, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001b; 98(18): 10344-10349
6. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 2007; 110: 3438-3446
7. Wang ZZ, Au P, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells from durable blood vessels in vivo. *Nat Biotechnol*, 2007; 25(3): 317-318
8. Lagarkova MA, Volchkov PY, et al. Efficient differentiation of hESCs into endothelial cells in vitro is secured by epigenetic changes. *Cell Cycle*, 2008; 7(18): 2929-2935
9. Asakawa N, Masuda H, et al. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials*, 2010; 31(14): 3903-3909
10. Sasagawa T, Shimizu T, et al. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology. *Biomaterials*, 2010; 31(7): 1646-1654
11. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblasts precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976; 4: 267-274
12. Tropel P, Noel D, Platet N, et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental Cell Research*, 2004; 295(2): 395-406
13. Millauer B, Witzmann-Voos S, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 1993; 72(6): 835-846
14. Shalaby F, Rossant J, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995; 376(6535): 62-66
15. Zeng L, Xiao Q, et al. HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells. *J Cell Biol*, 2006; 174(7): 1059-1069
16. Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res*, 2009; 19(1): 103-115
17. Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem*, 2007; 102(4): 840-847