文章编号:1000-5404(2006)15-1553-04

论著

大鼠脾源性内皮祖细胞移植在损伤血管内膜修复中的作用

崔 斌,黄 岚,周音频,武晓静,于世勇 (第三军医大学新桥医院全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 研究血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)移植在损伤血管再内皮化及抑制新生内膜增生中的作用。**方法** 大鼠脾源性单个核细胞贴壁培养法定向扩增EPCs,检测其内皮细胞特性。通过尾静脉将EPCs移植到颈动脉内皮损伤的大鼠体内。10只大鼠行偶氮蓝染色,观察内皮损伤血管段再内皮化情况;其余大鼠于术后14 d处死,行病理学观察。**结果** 脾源性单个核细胞体外可诱导出内皮祖细胞,表现为表达内皮细胞特异性标志。EPCs移植组损伤血管57%不被偶氮蓝着染,而球囊损伤组损伤血管几乎完全被偶氮蓝染成蓝色。球囊损伤+EPCs移植组在球囊损伤2周后血管新生内膜增生明显减轻,血管腔狭窄程度显著减轻。球囊损伤+EPCs移植组新生内膜与中膜比值显著低于单纯球囊损伤组及M199组。球囊损伤+EPCs移植组PCNA阳性表达细胞较单纯球囊损伤组及M199组明显减少。**结论** EPCs参与损伤血管的再内皮化过程。增加循环EPCs数量可以促进损伤血管的再内皮化,抑制血管平滑肌细胞增殖,减轻新生内膜增生程度。

关键词:内皮祖细胞;细胞移植;血管;再内皮化
中图法分类号:R322.12;R329.28;R543.05 **文献标识码**:A

Effect of intravenous transfusion of endothelial progenitor cells on reendothelialization and intimal hyperplasia after vessel injury

CUI Bin, HUANG Lan, ZHOU Yin-pin, WU Xiao-jing, YU Shi-yong (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of transplanting EPCs in vascular endothelium repair after vascular injury. Methods EPCs from spleen were isolated using a Ficoll density gradient centrifugation, and cultured in fibronectin-coated plate in M199 medium supplemented with 20% fetal bovine serum and 50 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF). The endothelial characteristics of EPCs were identified by immunologic cell chemical staining and fluorescent labeling. After induction of arterial injury in all 40 Wistar rats, 15 rats received intravenous injection of spleen-derived EPCs (2×10^6) through tail vein immediately after arterial injury and again 24 hours later, 10 control rats received a corresponding amount of M199 medium. Thirty minutes before sacrifice, 5 rats that only underwent arterial injury and 5 rats of EPCs injection received Evan blue intravenously. The morphology of arterial intima and media was studied by optical microscopy and image analysing system. Results The adherent cells were considered as EPCs that had spindle shape and form blood-land-like structures during development. They also gave rise to vessel-like cord structures. The adherent cells had many endothelial characteristics. They were von Willebrand Factor positive and could endocytose Ac-LDL and bind to UEA-I. The neointima/media area ratio in EPCs transplantation rats was obviously reduced than that in only arterial injury rats and M199 rats [(0.82 ± 0.09) *vs* (1.52 ± 0.21), (1.48 ± 0.19), $P<0.01$]. The cells positive for PCNA expression were evidently decreased as compared with only arterial injury rats and M199 rats [(19.25 ± 3.96) *vs* (31.42 ± 5.23), (29.37 ± 3.16), $P<0.05$]. Conclusion EPCs incorporated into the process of injured carotid reendothelialization. EPCs transplantation induced increase of the circulating EPCs, accelerated the process of endothelial repair and reduced neointima formation.

Key words: endothelial progenitor cells; cell transplantation; vascula; reendothelialization

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470729)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470729)
作者简介:崔 斌(1975-),女,陕西省西安市人,博士研究生,医师,主要从事冠心病防治方面的研究。电话:(023)68774601, E-mail: cuibin_xqhospital@126.com
通讯作者:黄 岚,电话:(023)68755601, E-mail: huanglans@21cn.com
收稿日期:2005-07-01;**修回日期**:2005-09-14

冠心病已成为严重威胁人类健康的重大疾病之一。尽管经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary interventions, PCI)已成为治疗冠心病的重要手段,然而PCI术后冠状动脉再狭窄仍是困扰其发展的重要原因。药物涂层支架可大大降低再狭窄的发生率,其主要是抑制平滑肌细胞的迁移和增殖,但同时也引起靶血管的内皮修复不全,产生支架裸露及迟发性血栓形成等危险[1]。近来研究证实,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)可能参与损伤血管的内皮修复、抑制平滑肌细胞的过度增殖,在损伤血管的再内皮化过程中发挥作用[2,3]。细胞移植近来已成为治疗多种疾病的新策略,本研究拟通过对内皮祖细胞的移植来探讨其在损伤血管再内皮化及抑制新生内膜增生中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性Wistar大鼠40只,6~8月龄,体质量350~450 g,由第三军医大学实验动物中心提供。30只雄性Wistar大鼠分为3组,单纯球囊损伤组(10只)、球囊损伤+EPCs移植组(10只)、球囊损伤+M199培养液组(10只,简称M199组);另有10只大鼠行偶氮蓝染色,分为球囊损伤组(5只)及EPCs移植组(5只)。

1.2 动物模型的建立

1.2.1 脾切除模型建立[4] 雄性Wistar大鼠,以3%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔麻醉。取左腹部旁切口,逐层切开腹壁,6/0丝线小心双重结扎脾门血管,行全脾切除。检查有无活动性出血,逐层关腹。

1.2.2 大鼠颈动脉球囊损伤模型建立[5] 雄性Wistar大鼠,以3%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔麻醉。取颈部正中切口,从颈外静脉注射肝素钠100 U/kg。暴露左侧颈总动脉和颈外、颈内动脉,暂时阻断颈总动脉近心端及颈内动脉血流,从颈外动脉处行动脉切开术,将1.5 F PTCA球囊导管从切口插入至颈总动脉约1.5 cm,以1.5 atm充盈球囊,来回抽动球囊3次以剥脱内膜。

1.3 内皮祖细胞的分离培养[6]

将脾切除获取的脾脏机械性切碎,Ficoll密度梯度离心法收集白膜层的单个核细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,接种于包被纤连蛋白(fibronetin, Sigma公司)的24孔培养板中。在添加了青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml、VEGF 50 ng/ml(Pepro Tech公司)、20%优质胎牛血清(Hyclone公司)的M199(Hyclone公司)培养液中培养14 d,3~4 d更换培养液1次。

1.4 内皮祖细胞的鉴定[7,8]

细胞与2.4 μg/ml DiI-Ac-LDL(Molecular Probe公司)37 ℃下孵育1 h以检测EPCs对AcLDL的摄取。然后用2%多聚甲醛固定细胞10 min。固定后用PBS液浸洗,再将10 μg/ml FITC-UEA-I(Vector公司)加于上述标本37 ℃下孵育1 h。荧光显微镜(fluorescence microscope, Leica)鉴定DiI-Ac-LDL和FITC-UEA-I染色双阳性细胞为正在分化的内皮祖细胞。

vWF因子免疫细胞化学染色,vWF多克隆抗体免疫组化染色试剂盒购于北京中山生物技术有限公司,具体步骤按说明书进行,一抗浓度为1:100,以不加一抗的标本作为阴性对照。

流式细胞仪检测细胞表型:脾源性单个核细胞培养14 d后的梭形贴壁细胞经0.1%胰酶/1 mmol/L乙二胺四乙酸(EDTA)消化后分别用FITC-CD31、FITC-CD34各10 μl进行标记,流式细胞仪检测分析。

1.5 内皮祖细胞移植

细胞培养第14天,0.1%胰酶/1 mmol/L EDTA消化脾源性单个核细胞诱导出的梭形贴壁细胞,离心后重悬于M199培养液中,调整浓度为2×10^6/500 μl。颈动脉内皮损伤即刻及24 h后,球囊损伤+EPCs移植组每只大鼠通过尾静脉注入2×10^6扩增后的贴壁细胞,M199组通过尾静脉注入500 μl M199培养液。

1.6 内皮祖细胞移植在损伤血管再内皮化中作用

1.6.1 偶氮蓝染色观察细胞移植对损伤血管再内皮化的影响[9] 血管损伤后14 d,在动物处死前30 min经尾静脉注射偶氮蓝25 mg/kg。处死动物后,取目标血管,修剪外膜结缔组织,冲洗管腔后纵剖血管,显微镜下观察,剥脱面积为获得动脉节段的总面积,内皮再生面积为不被偶氮蓝着染的面积,并通过计算机图像分析软件Image-Pro Plus 4.5测定损伤总面积和内皮再生面积,计算内皮再生面积与损伤总面积比。

1.6.2 目标血管病理学观察 分离目标血管组织,10%甲醛液固定后,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片(4 μm厚度),行苏木精-伊红(HE)染色。通过计算机图像分析软件Image-Pro Plus 4.5测定以下指标:总管腔面积(通过内弹力膜测定,内弹力膜断裂者,以断裂处的中膜为界);残余管腔面积;血管最大内膜厚度;新生内膜面积;狭窄程度(1-残余管腔面积/总管腔面积)。

1.6.3 新生内膜和中膜中细胞增殖程度的免疫组化 用增殖核抗原(PCNA)免疫组化法,按试剂盒说明书进行。

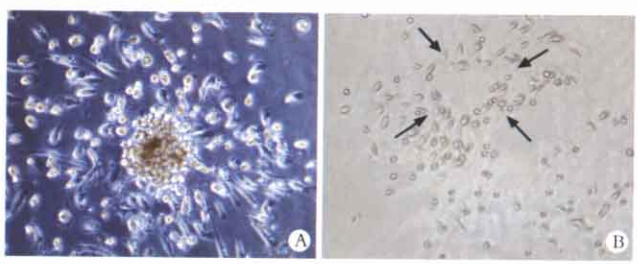
1.7 统计方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件行t检验和χ^2检验。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的诱导分化和鉴定

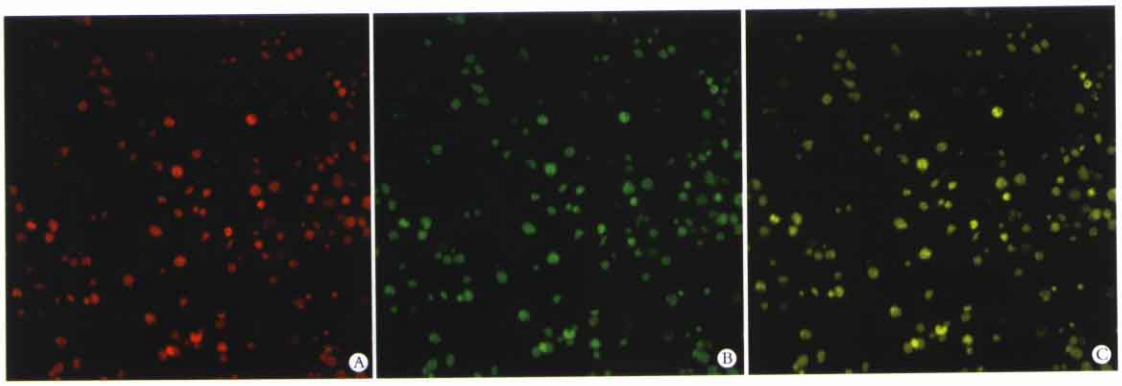
倒置相差显微镜下观察培养48 h后可见梭形贴壁细胞;7~10 d出现多个细胞团,贴壁的梭形细胞从细胞团的边缘出芽长出,中央为圆形细胞,类似于胚胎发生时期的血岛结构。10 d后梭形细胞逐渐增多,可观察到梭形细胞首尾相连形成条索状结构;14 d后脾源性单个核细胞形成管样结构(图1)。



A: EPCs克隆形成单位; B: EPCs形成管样结构(箭头)

图1 内皮祖细胞的形态学观察 (倒置相差显微镜×200)

vWF 因子染色可见细胞质内有棕黄色颗粒，流式细胞仪检测发现培养细胞表达内皮细胞特异性抗原：CD31 71.14 %，CD34 22.76%。用 DiI-Ac-LDL 及 FITC-UEA-I 对细胞染色后，通过荧光显微镜观察 EPCs 摄取 DiI-Ac-LDL 呈红色荧光，并且与 UEA-I(lectin)结合呈绿色荧光，染色双阳性细胞（黄色）为正在分化的 EPCs（图 2）。



A：EPCs 摄取 DiI-Ac-LDL；B：EPCs 与 UEA-I；C：正在分化的 EPCs

图 2　内皮祖细胞的荧光染色鉴定　（荧光染色 ×200）

2.2　内皮祖细胞移植对于损伤血管的再内皮化作用

偶氮蓝染色表明，球囊损伤组血管几乎完全被偶氮蓝染成蓝色，EPCs 移植组损伤血管约 57 % 不被偶氮蓝着染。计算机图像分析结果表明，EPCs 与球囊损伤组损伤血管段总面积无显著差异，但 EPCs 移植组内皮再生面积较球囊损伤组明显增加[分别为(98.0 ±2.6)、(3.0 ±0.9) mm^2，$P<0.05$]，EPCs 移植组内皮再生面积与总面积之比明显大于球囊损伤组[分别为(57.0 ±1.8)%、(1.7 ±0.6)%，$P<0.05$]。

2.3　内皮祖细胞移植对于损伤血管新生内膜增生的抑制作用

2.3.1　各组血管 HE 染色观察　　正常血管腔内膜可见 1 层扁平的内皮细胞覆盖，血管各层层次清楚，未见新生内膜增殖。单纯球囊损伤组 2 周后可见血管腔内新生内膜增殖明显，血管腔狭窄。球囊损伤 + EPCs 移植组在球囊损伤 2 周后血管新生内膜增生明显减轻，血管腔狭窄程度减轻，新生内膜与中膜比值较单纯球囊损伤组及 M199 组显著降低（$P<0.05$）。M199 组内膜增生程度较单纯球囊损伤组无显著性差异（$P>0.05$）（表 1）。

表 1　内皮祖细胞移植对损伤血管新生内膜增生的影响（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	新生内膜厚度 (mm)	新生内膜面积 (mm^2)	血管腔狭窄面积(%)	新生内膜与中膜比值
单纯球囊损伤组	0.54 ±0.12[a]	0.85 ±0.15[a]	82.10 ±7.32[a]	1.52[a]
球囊损伤 + EPCs 移植组	0.23 ±0.10	0.42 ±0.14	38.00 ±6.20	0.82
M199 组	0.52 ±0.13[a]	0.84 ±0.11[a]	81.25 ±5.42[a]	1.48[a]

a：$P<0.05$，与球囊损伤 + EPCs 移植组比较

2.3.2　新生内膜增生效应的免疫组化观察　　术后 2 周各组标本进行 PCNA 免疫组化，结果表明未损伤血管仅有极少数细胞 PCNA 表达阳性；单纯球囊损伤组及 M199 组新生内膜和中膜均可见较多 PCNA 阳性表达细胞，其特点是在细胞核内有黄褐色物质表达，提示 PCNA 阳性。球囊损伤 + EPCs 移植组新生内膜和中膜表达 PCNA 阳性细胞数量(19.25 ±3.96)% 较单纯球囊损伤组(31.42 ±5.23)% 及 M199 组(29.37 ±3.16)% 明显减少（$P<0.05$）；而单纯球囊损伤组 M199 组之间 PCNA 阳性细胞数量无显著性差异（$P>0.05$）。

3　讨论

PCI 在冠心病治疗领域得到广泛应用，但 PCI 术后冠状动脉再狭窄严重影响了其远期疗效。内皮损伤及功能失调是再狭窄发生的始动及促进因素，且动脉内放射疗法或药物涂层支架等防治 PCI 术后再狭窄的新技术在抑制平滑肌细胞增生的同时也抑制了内皮细胞增生，使再内皮化时间延长。Losordo 等[10]强调指出内皮恢复是预防 PCI 术后再狭窄新策略。近来研究表明，成体外周血中存在能够直接分化为血管内皮细胞的前体细胞——内皮祖细胞，其在治疗性血管新生及损伤血管再内皮化过程中发挥重要作用。国外多项研究表明骨髓来源的 EPCs 有利于内皮损伤部位的再内皮化、可阻止血栓形成，通过修复完整内皮以维持血管稳定的内环境[3]。循环内皮祖细胞的发现为 PCI 术后再狭窄的解决提供了新的思路。

我们研究了脾源性的 EPCs 在体外的生物学特性及体内移植对于损伤血管再内皮化的可行性。本研究选用具有转化为内皮细胞潜能的脾源性单个核细胞进行体外诱导分化。结果表明，脾源性单个核细胞在体外血管内皮细胞生长因子（VEGF）的作用下能够分化为具有内皮特性的细胞：细胞表面标志 CD31、CD34 及 vWF 因子均表达阳性；能够吞噬乙酰化低密度脂蛋白，并能结合 UEA-1；且细胞在培养过程中形成内皮样集落，显示其具有高增殖潜能。我们通过建立大鼠颈动脉球囊损伤模型，移植脾源性内皮祖细胞，研究内皮祖细胞对于损伤血管再内皮化和抑制新生内膜增生的

可能作用。通过尾静脉移植EPCs可使新生内膜增殖明显减轻，血管腔狭窄程度减轻，代表平滑肌细胞增殖程度的PCNA阳性细胞指数也明显降低。此外，进入血液循环的偶氮蓝可快速与血浆蛋白结合，因此血管壁偶氮蓝的积聚代表血浆蛋白的漏出，反映血管完整性破坏[11]。EPCs移植组损伤血管段有近57%面积不被偶氮蓝着染，说明移植的内皮祖细胞在损伤血管段形成有功能的内皮屏障。这些表明通过细胞移植增加循环中EPCs数量可促进损伤血管再内皮化，抑制平滑肌细胞过度增殖，从而减少新生内膜的形成。因此，推测EPCs可能参与加速损伤血管的再内皮化过程。

参考文献：

[1] LOWE H C, OESTERLE S N, KHACHIGIAN L M. Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(2): 183-193.

[2] YOON Y S, LEE N, SCADOVA H. Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells [J]. Biol Cell, 2005, 97(4): 253-263.

[3] WERNER N, PRILLER J, LAUFS U, *et al*. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(10): 1567-1572.

[4] 张 坤，郭光金，叶明福，等. 自体移植脾组织血管再生的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(3)：308-310.

[5] 韩雅玲，王效增，康 建，等. 大鼠颈动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞E1A激活基因阻遏子的表达变化[J]. 中华心血管病杂志，2004，32(1)：53-58.

[6] MUROHARA T. Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors[J]. Trends Cardiovasc Med, 2001, 11(8): 303-307.

[7] SZMITKO P E, FEDAK P W, WEISEL R D, *et al*. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart[J]. Circulation, 2003, 107(24): 3093-3100.

[8] KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, *et al*. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3422-3427.

[9] GANGADHARAN S P, ESLAMI M H, WEISS I P, *et al*. Monocyte adhesion to balloon-injured arteries: the influence of endothelial cell seeding[J]. J Vasc Surg, 2001, 33(6): 1247-1254.

[10] LOSORDO D W, ISNER J M, DIAZ-SANDOVAL L J. Endothelial recovery: the next target in restenosis prevention[J]. Circulation, 2003, 107(21): 2635-2637.

[11] CONTE M S, BIRINYI L K, MIYATA T, *et al*. Efficient repopulation of denuded rabbit arteries with autologous genetically modified endothelial cells[J]. Circulation, 1994, 89(5): 2161-2169.

（编辑 栾 嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)15-1556-01

根管治疗引起颏神经损伤1例

杨彦春，周维祥，杨 军 （第三军医大学西南医院口腔科，重庆 400038）

1 临床资料

患者，女性，35岁。因右下第1磨牙咬合疼痛，间歇性波动性疼痛5 d就诊。患者一般情况良好，无发热等不适，发病以来未经药物治疗。口外检查：下颌及颏部皮肤色泽质地正常，皮温不高，触觉正常。口内检查：右下第1磨牙咬合面深龋坏，叩诊(++)，无明显松动，牙髓活力测试无反应。X线片显示右下第1磨牙根尖明确暗影，范围约3 mm×2 mm，未与下牙槽神经管相连。治疗：第1次治疗以开放引流为主。以X线片法测量根管长度，控制扩挫长度，常规根管预备。充分引流、冲洗，吸干，以纸尖引流。2 d后患者右侧下唇及颏部自中线开始出现麻木不适，皮肤黏膜无触觉、痛觉、温度觉等，对侧感觉正常。常规完成根管治疗后，同时予以营养神经等对症治疗。经随访，患者下唇、颏部麻木等不适未出现加重，经坚持对症治疗约3个月后症状消失。

2 讨论

根管治疗作为根尖周炎的常规治疗手段，在临床应用已非常广泛。关于其引起颏神经麻木的相关报道在临床上尚少见[1]。面部感觉异常48%为牙源性，颏神经受累较为多见，但常规根管治疗引起颏神经麻木不适的报道较为少见[2]。感觉异常的判断要结合病史，以及受累区对温度、化学等刺激反应。当然，更为客观的是进行神经电生理分析。治疗措施主要为去除病因，如创伤、占位性病变、医源性损伤、局部感染等。同时辅助康复治疗手段，及时治疗可达到较为满意的治疗效果。

关键词：根管治疗；颏神经

中图法分类号：R781.33 文献标识码：B

参考文献：

[1] 周薇山. 右下第一前磨牙根尖周炎导致颏神经麻木1例报告[J]. 口腔医学杂志，2002，22(1)：47.

[2] 黄迪英，张美玲. 拔除阻生齿致下齿槽神经及舌神经损伤6例[J]. 实用医药杂志，2005，22(5)：470.

（编辑 栾 嘉）

作者简介：杨彦春(1974-)，男，河北省保定市人，硕士，医师，主要从事口腔颌面部缺损的修复及整形方面的研究。电话：(023)68754406

收稿日期：2005-10-18；修回日期：2005-12-15