基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0530-05

间充质干细胞移植对兔颈动脉损伤后的内皮修复作用研究

许官学,赵然尊,石 蓓,郭 艳,王冬梅,沈长银
(遵义医学院附属医院心内科,贵州 563003)

【摘 要】目的:探讨经骨髓动员后自外周血分离培养的间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs)移植对模型兔颈动脉损伤后的修复作用及可能机制。方法:建立兔动脉粥样硬化狭窄模型,粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)动员 5 d 后采集外周血,用密度梯度离心法结合反复贴壁法培养获得纯化的 MSCs,增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein,EGFP)报告基因标记。对模型兔颈动脉进行球囊损伤,术毕立即耳缘静脉内分别注入标记的 MSCs(移植组)或培养液(对照组),分别于术后 7、14、28 d 处死动物,取颈动脉血管标本进行形态学和内皮化程度分析,并对归巢的 MSCs 进行鉴定和分化跟踪。结果:各个时段血管形态学分析均显示移植组内膜增殖程度显著低于对照组($P<0.01$);内皮化程度分析显示移植组明显优于对照组($P<0.01$)。MSCs 移植组于各个时间段均可见血管组织中有 EGFP(+)细胞分布,且部分细胞同时为 EGFP 和 CD31 阳性,对照组则无。结论:静脉移植 MSCs 能促进模型兔颈动脉球囊损伤血管的内皮修复,并抑制内膜增生。

【关键词】间充质干细胞;内皮;颈动脉;兔
【中国图书分类法分类号】R543.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-18

Effect of transplantation of mesenchymal stem cells on endothelium repair in rabbits with balloon-induced injury carotid

XU Guan-xue, et al
(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Zunyi Medical College*)

【Abstracts】*Objective*: To investigate the effect and its possible mechanism of peripheral blood mesenchymal stem cells (MSCs) on endothelium repair in Rabbits with balloon-induced injury carotid. *Methods*: Purified MSCs were Obtained from peripheral blood through combining density gradient centrifugation with repeating adherence cultivation after the application of Granulocyte

作者介绍:许官学(1971-),男,副主任医师,
研究方向:冠心病介入治疗学。
通讯作者:石 蓓,女,教授,E-mail: shibei2147@yahoo.com.cn。
基金项目:贵州省教育厅重点项目(编号:黔教科 2007-040 号)。

参 考 文 献

[1] 肯尼思 A 博哈特,迈克尔 A 诺布尔.性传播疾病:流行病学、病理学、诊断和治疗[M].北京:科学技术文献出版社,2000.262-266.

[2] Jones R W. Vulval intraepithelial neoplasia: current perspectives[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2001, 22(6): 393-340.

[3] Ohta M, Inoue H, Cotticelli M G, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma2associated t (3; 8) breakpoint is abnormal in digestive tract cancers[J]. Cell, 1996, 84(4): 587-597.

[4] Yuan B Z, Keck-Waggoner C, Zimonjic D B, et al. Alterations of the FHIT gene in human hepatocellular carcinoma [J].Cancer Res, 2000, 60(4): 1049-1053.

[5] Trapasso F, Krakowiak A, Cesari R, et al.Designed FHIT alleles establish that Fhit-induced apoptosis in cancer cells is limited by substrate binding[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(4): 1592- 1597.

[6] Campiglio M, Bianchi F, Andriani F, et al.Diadenosines as FHITF HIT-ness instructors[J].J Cell Physiol, 2006, 208(2): 274-281.

[7] Chaudhuri A R, Khau I A, Prasa D V, et al.The tumor suppressor protein Fhit, A novel interaction with tubulin[J].J BioChem, 1999, 274 (34): 24378-24382.

[8] 冉桂萍,朱 岷,杨文秀,等.乳腺癌 FHIT 基因微卫星不稳定性及其蛋白表达的研究[J].山东医药,2007,47(27):7-9.

[9] Wu Y, Meng L, Wang H, et al.Regulation of DNA methylation on the expression of the FHIT gene contributes to cerical carcinoma cell tumorigenesis[J].Oncol Rep, 2006, 16(3): 625-629.

[10] liopoulos D, Guler G, Han S Y, et al. Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer[J].Cancer Lett, 2006, 232(1): 27- 36.

[11] Stam R W, den Boer M L, Passier M, et al. Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia[J]. Leukemia, 2006, 20(2): 264-271.

[12] Bragantini E, Barbi S, Beghelli S, et al.Loss of Fhit expression is associated with poorer survival in gastric cancer but is not an independent prognostic marker[J].Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(1): 45-50.

[13] 王言飞,刘玉芝,李莲娜.p21 蛋白在食管鳞癌中表达的临床意义[J].实用诊断与治疗杂志,2008,22(2):108-111.

(责任编辑:冉明会)

colony-stimulating factor (G-CSF) for 5 days in rabbits with atherosclerosis stenosis carotid artery, and marked with enhanced green fluorescent protein (EGFP). EGFP marked MSCs were transplanted into the rabbits in the transplantation of MSCs groups and equivalence culture solution was injected in the control groups through surrounding ears veins after balloon-induced carotid artery in rabbits. The specimens of carotid artery were harvested to use for the analysis of vessels morphology and endothelialization in 7,14,28 days of post-operative, and the homing MSCs were identified. *Results*: Carotid artery morphology analysis in each stage indicates that intima hyperplasia is obviously less in the transplantation of MSCs groups than that in the control groups ($P<0.01$). Endothelialization analysis shows that the degree of endothelialization is better in the transplantation of MSCs groups than that in the control groups ($P<0.01$). EGFP-positive cells and EGFP- and CD31-positive cells were found in the carotid artery of each stage in the transplantation of MSCs groups, but there was nothing in the control groups. *Conclusion*: Intravenous transplantation of PBMSCs may accelerate reendothelialization and attenuate neointimal thickening in rabbits with balloon-induced injury carotid.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Endothelialization; Carotid artery; Rabbit

冠状动脉介入治疗(Percutaneous coronary intervention,PCI)是冠心病最有效的血运重建手段,然而手术中球囊扩张和支架植入对病变血管内皮的机械损伤所导致的新生内膜增生,是引起术后血管内再狭窄的重要因素。研究表明,间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)除具有多向分化潜能外,还能分泌血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)等多种细胞因子。目前对 MSCs 改善心肌梗死后心功能的效应在动物模型和早期的小规模临床实验中已经得到证实,但其对血管损伤的修复效应则研究报道甚少且结论不一。因此,本研究拟通过观察 MSCs 移植对模型兔颈动脉球囊损伤后的血管内皮修复及内膜增生的影响,为临床 PCI 术后再狭窄的防治提供初步的动物实验资料。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

60 只新西兰雄性大白兔,体重(2.0±0.5) kg,成功构建动脉粥样硬化狭窄并球囊损伤模型,随机分为 MSCs 移植组(n=30)和对照组(n=30)。2 组动物移植组接受 MSCs 移植,对照组接受同等体积的无血清培养液。2 组均术后 7、14、28 d(n=10)留取血管段标本,分别截取前后两端及中部约 3~4 mm 的血管组织进行石蜡包埋待用。

1.2 MSCs 的动员、分离及培养

同一批次实验兔中随机取 5 只作为产生 MSCs 的种子兔。以粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF,长春金赛药业,批号 S10980099)30 μg/(kg·d)连续 5 d 于种兔腹壁皮下注射给药,于第 6 d 在接受干细胞动员兔的耳中央动脉无菌采血 20 ml,密度梯度离心法分离出其中的单个核细胞,新鲜无血清培养基洗涤 2 次,然后接种于含 15%胎牛血清、青霉素、链霉素各 100 U/ml 的 DMEM 完全培养液中,置于 37℃,5%CO_2 浓度,饱和湿度的孵育箱中培养。每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况。原代培养 4~5 d 后初次换液,弃去非贴壁细胞,以后每 3 d 换液 1 次,大约 10 d 左右可传代,此后每 3~4 d 传 1 代,生长不良的细胞弃去,传到第 3 代长至 80%~90%融合时用于移植。移植时 0.25%胰蛋白酶进行消化,无血清及抗生素的新鲜 DMEM 培养液重悬,调整密度为 1×10^7 个 /ml 备用。

1.3 MSCs 的鉴定

分别用第 3 代 MSCs 先后与 CD34、CD44、CD45 抗体(USBiological 公司,美国)及异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗 37℃孵育 30 min,然后 MSCs 用 1%的多聚甲醛固定后进行流式细胞仪(Becton-Dickinson,美国)检测。

1.4 EGFP 载体腺病毒(Ad-EGFP)的扩增及滴度测定

待 HEK293 细胞(为本院中心实验室保存)生长至 70%~80%时,弃培养基以 Ad-EGFP 包装病毒液(Ad-GFP 包装病毒液为美国 Dr.Tuet I 惠赠)进行感染,4 h 后加入完全培养基继续培养。在 293 个细胞出现明显的致病变效应同时发出强烈荧光(约 3~5 d)时收集细胞,通过反复冻融法得到高滴度的重组腺病毒,可反复扩增。用空斑形成实验测定病毒滴度。

1.5 MSCs 的标记

取第 3 代长至 80%~90%融合的 MSCs,在含 2%血清培养基中加入感染复数为 300(预实验得出的最佳感染复数)的 Ad-EGFP 孵育细胞过夜,换新鲜完全培养基继续培养,每天监测荧光情况和生长情况。

1.6 动脉粥样硬化模型的建立及细胞移植

按课题组已成功构建的方法和标准[9]建立颈动脉粥样硬化模型兔并行右颈动脉球囊损伤:动物经 3%戊巴比妥 1 ml/kg 静脉麻醉,颈部用 5%硫化钠脱毛后清洁消毒皮肤,作颈正中切口暴露气管,分离右侧颈内、外动脉和颈总动脉。肝素 100 U/kg 抗凝,在距离颈总动脉分叉处约 0.5 cm 处结扎颈外动脉,在结扎线近心侧进行穿刺,送入直径 2.5 mm×12 mm 球囊(美国 Cordis 公司)至颈总动脉,6 个大气压充盈球囊后缓慢拖动,持续 1 min,间歇 1 min 后重复,总共 3 次,使颈总动脉损伤长度大约 3 cm。将事先准备好的 MSCs 按 107 个 /kg 的总量通过耳缘静脉注入模型兔体内,对照组注入同等体积的无血清及抗生素培养基。撤出球囊,在穿刺点近心端处结扎劲外动脉。术毕青霉素连用 3 d 预防感染。

1.7 形态学分析

MSCs 移植后 7、14、28 d 时空气栓塞法处死动物，留取病变血管标本(取未损伤侧做正常对照)用 10%甲醛固定、石蜡包埋等处理后制成 4 μm 厚的血管横断面切片。切片进行 weigert 弹力纤维染色及 HE 染色，通过光学显微镜和计算机病理图像分析系统(leica Qwin，德国)测定内膜面积和内膜中膜面积比。

1.8 内皮化程度分析

取部分血管组织石蜡切片进行 EGFP(EGFP 一抗购自加拿大 CHEMICON 公司)、CD31(CD31 一抗购自武汉博士德公司)免疫组化染色。通过计算机病理图像分析系统分析 MSCs 移植后的归巢、分化情况及损伤血管内皮修复情况。EGFP 阳性细胞为归巢细胞，EGPF 及 CD31 均为阳性的细胞为来源于 MSCs 的内皮细胞；内皮化程度通过 CD31 阳性指数表示，CD31 阳性指数定义为 CD31 染色阳性细胞吸光度与阳性率的乘积。

1.9 数据处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行分析。定量资料实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两样本均数间比较用 t 检验，多个样本均数间比较用方差分析。

2 结 果

2.1 G-CSF 能有效动员骨髓 MSCs 到外周血循环

在兔身上 G-CSF30 μg/(kg·d)连续应用 5 d 后采集的外周血中能够分离出 MSCs 并进行体外扩增(如图 1)。

2.2 MSCs 的鉴定

其形态在生长较稀时胞体呈长梭形，两端有长突起，胞质内颗粒较多，折光性差，核不清楚；长至融合时细胞变得扁平，胞体狭长，有长突起，核呈椭圆形，呈鱼群样、漩涡状、辐射状或网状排列。表面标志：流式细胞仪检测结果：CD34 阳性率是 0.57%；CD45 阳性率是 0.47%，CD44 阳性率是 92.4%。

2.3 荧光表达

HEK293 细胞感染 Ad-EGFP 后 48 h 可观察到微弱荧光表达，72 h 可以观察到明亮的荧光，平均 96 h 出现完全病变效应同时监测到强烈的绿色荧光，此时收获细胞用反复冻融法可以得到高滴度的腺病毒，测得病毒滴度为 1.38×10^{11} pfu/ml。用感染复数为 300 的 Ad-EGFP 转染 MSCs 不影响细胞的生长和增殖，平均转染率为 75%(见图 2、图 3)。

这是 Ad-EGFP 感染 72 h 的荧光照片，可见原贴壁细胞肿胀、变圆、成团脱落，出现病毒空斑；在 488 nm 蓝光的激发下发出明亮的黄绿色荧光 。

2.4 形态学分析

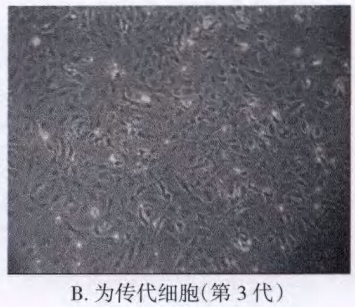
球囊损伤后 7、14 d 和 28 d 分别取材，组织形态学染色显示，各组均可见新生内膜增殖。移植组弹力纤维基本保持完整，形态改变不明显，而对照组弹力纤维大多断裂，形态变得僵直(见图 4)。病理图像分析测定，各时间点，移植组内膜面积和内膜面积/中膜面积比均低于对照组，而中膜面积无明显差异；同一组内分析，见移植组于损伤后 14 d 和 28 d 均可有内膜增生，但与 7 d 相比，差异不明显，而对照组内膜增殖明显，与 7 d 比较，14 d 和 28 d 内膜面积和内膜面积/中膜面积比均增高，具有统计学差异(见表 1)。

2.5 损伤血管内皮化程度分析

于各个时间段均可见 MSCs 移植组血管近内膜附近有 GFP(+)细胞分布，但未损伤血管及对照组血管则无；部分 GFP(+)细胞同时为 CD31(+)；内皮化程度分析显示 MSCs 组明显优于对照组($P<0.01$)(见图 5)。

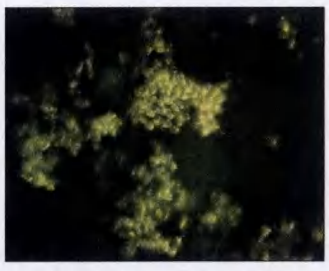


A. 为原代第 7 d



B. 为传代细胞(第 3 代)

图 1 体外培养的外周血 MSCs (倒置相差显微镜 × 100 倍)



这是 Ad-EGFP 感染 72 h 的荧光照片，可见原贴壁细胞肿胀、变圆、成团脱落，出现病毒空斑；在 488 nm 蓝光的激发下发出明亮的黄绿色荧光

图 2 HEK293 细胞完全病变效应

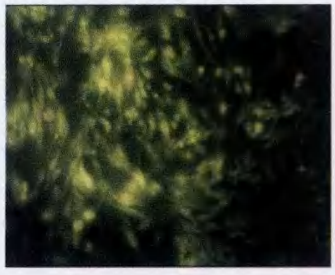
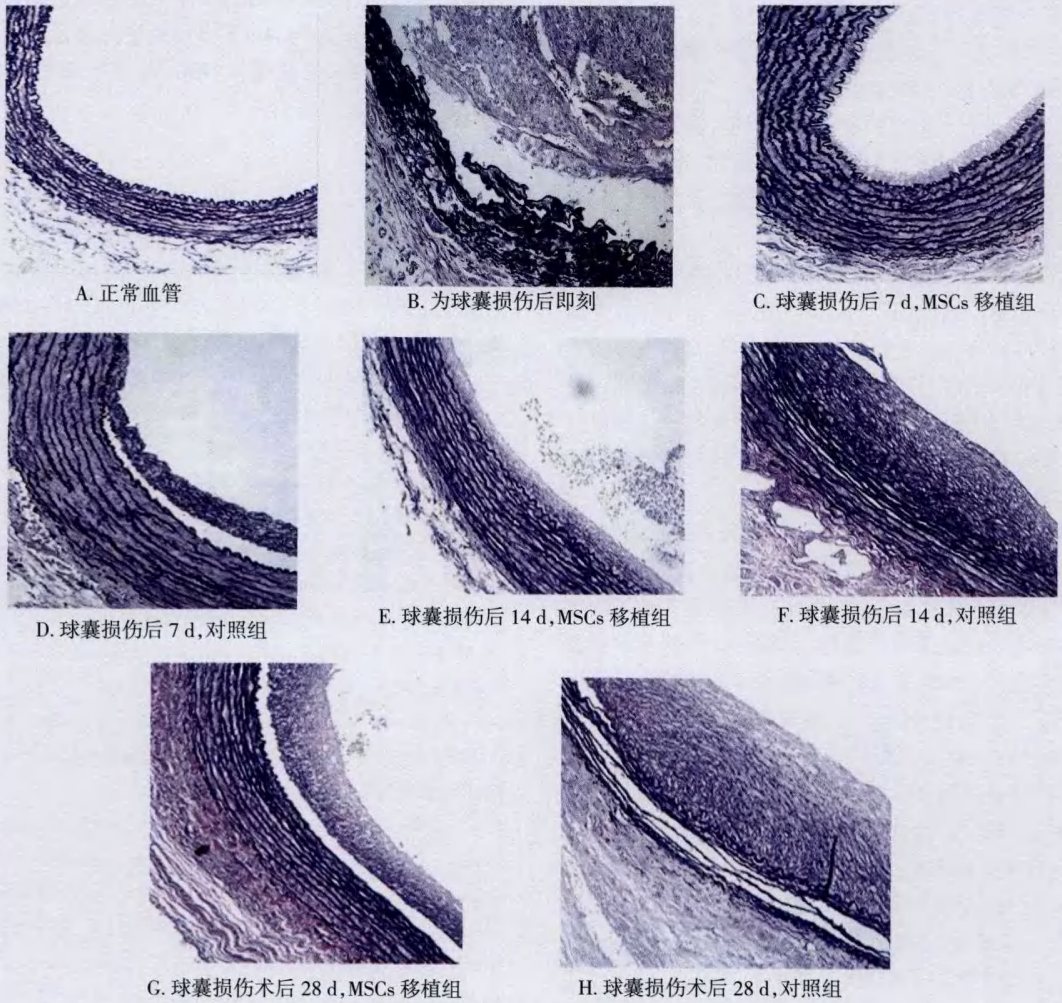


图 3 标记上 EGFP 基因的 MSCs (荧光显微镜 × 100 倍)

表 1 兔颈动脉球囊损伤后 7、14 d 和 28 d 2 组血管形态学分析结果（$\bar{x} \pm s$）

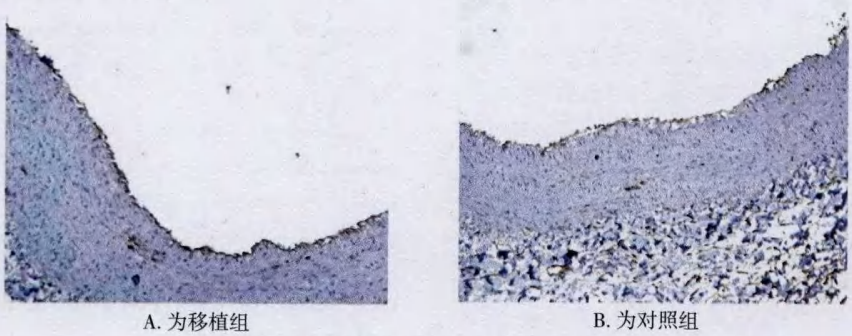
指标	术后 7 d（n=10）		术后 14 d（n=10）		术后 28 d（n=10）	
	移植组	对照组	移植组	对照组	移植组	对照组
内膜面积（mm^2）	$0.023 \pm 0.004^*$	0.036 ± 0.009	$0.031 \pm 0.009^*$	$0.049 \pm 0.011^\triangle$	$0.037 \pm 0.006^*$	$0.086 \pm 0.009^\triangle$
中膜面积（mm^2）	0.219 ± 0.016	0.232 ± 0.020	0.220 ± 0.016	0.230 ± 0.013	0.223 ± 0.037	0.183 ± 0.041
内膜面积/中膜面积（%）	$10.30 \pm 1.74^*$	15.51 ± 4.52	$14.49 \pm 5.17^*$	$21.43 \pm 4.22^\triangle$	$16.85 \pm 3.79^*$	$48.94 \pm 8.98^\triangle$

注：同一时间点内，移植组与对照组比较：$^*P<0.01$，具有显著统计学意义；同组内术后 14 d 和 28 d 分别与 7 d 比较，$^\triangle P<0.05$，具有统计学意义。



A. 正常血管　B. 为球囊损伤后即刻　C. 球囊损伤后 7 d，MSCs 移植组
D. 球囊损伤后 7 d，对照组　E. 球囊损伤后 14 d，MSCs 移植组　F. 球囊损伤后 14 d，对照组
G. 球囊损伤术后 28 d，MSCs 移植组　H. 球囊损伤术后 28 d，对照组

图 4 正常血管及损伤血管术后内膜增殖情况（weigert 染色，×200 倍）



A. 为移植组　B. 为对照组

图 5 血管成形术后 7 d 见 EGFP 的表达
免疫组化染色，×100 倍

3 讨 论

2004 年,韩国学者 Kang 等[2]将 G- CSF 动员后的外周血单个核细胞在 PCI 术后注入梗死相关动脉(MAGIC 试验),随访 6 个月后无心力衰竭、心律失常和心绞痛恶化现象及死亡事件发生,且心功能明显改善;然而同时也发现 CK-MB 水平增加 65%,并有 7 例患者发生了支架内再狭窄,因而实验被迫提前终止。但是,随后 2006 年该研究小组的 MAGIC Cell-3 试验[3]却排除了干细胞的潜在致再狭窄可能。因此,干细胞对损伤血管修复作用的影响尚有待进一步研究。已知血管内皮损伤后依赖自身修复的过程非常缓慢,并且损伤后再生的血管内皮细胞表型发生变化,不能有效的抑制新生内膜增生,因而 PCI 术后的内膜增生可能与损伤血管内皮修复延迟密切相关。

有研究者已对一些干细胞的组分如内皮祖细胞、$CD34^{-}/CD14^{+}$ 骨髓单核细胞进行了研究,发现其能够促进损伤血管快速再内皮化,减少新生内膜增殖[4,5]。这些可喜的研究结果意味着干细胞除了重建梗死心肌的效应外,可能还具有降低 PCI 术后再狭窄的潜能。那么,能不能找到一种成分单纯,易于获得和体外大量扩增的干细胞来同时担负起上述两种重要的治疗作用呢?

研究表明,MSCs 同时具备了易于获得和体外扩增、多向分化潜能、免疫耐受性及易于接受外源性基因等多种优点。此外,其在深低温下冻存 1 年、扩增到 30 代以上仍然不失上述特性,为其大规模临床生产奠定了基础[6]。体外实验也发现,经过血管内皮生长因子等多种细胞因子的诱导,MSCs 可以分化为内皮细胞[7];此外,与成熟内皮细胞共培养可以促进 MSCs 向内皮方向分化并部分抑制平滑肌细胞的增殖[5]。新近 Johansson 等[8]研究表明:MSCs 存在可以增强周围内皮细胞的增殖能力和迁移能力,促进血管芽的萌发,从而对血运重建或再血管化产生有益影响。Silva 等[9]给慢性心肌缺血的犬模型心肌内注射 MSCs 治疗中发现其能够改善心功能,但是并未见分化为心肌细胞,却发现其在缺血组织中分化为内皮细胞并增加了组织中的血管密度,这提示了 MSCs 在体内也能够分化为内皮细胞。然而,也有的研究者认为 MSCs 可能会分化为平滑肌细胞,加重新生内膜增殖。因此,鉴于目前针对 MSCs 对血管损伤修复潜能的意见分歧,有必要进行更多的研究。

动脉粥样硬化是临床冠心病等疾病的主要病理生理改变,本研究采用动脉粥样硬化狭窄模型,可更好的模拟临床冠心病发病的机制。我们采取了用 G-CSF 动员得到的外周血 MSCs 进行体外扩增和标记后,回输到颈动脉粥样硬化并行球囊损伤的模型兔,研究 MSCs 移植对损伤血管的修复作用,探讨其对再狭窄防治作用的潜能及可能机制。这种选择首先是克服了 G-CSF 直接动员干细胞时细胞成分种类复杂、数量不易控制,以及大规模应用时费用较高等不足,其次是避免了有创性的骨髓穿刺操作。

本研究结果显示:G-CSF 动员后外周血分离得到的 MSCs 在体外易于扩增,腺病毒介导增强型绿色荧光蛋白基因对其标记率可达 75%;MSCs 移植后模型兔血管内膜面积、内膜与中膜面积之比显著低于对照组;同时 MSCs 移植组血管近内膜附近有 EGFP(+)细胞分布,部分 EGFP(+)细胞同时为 CD31(+);内皮化程度分析也显示 MSCs 移植组明显优于对照组。上述结果提示 G-CSF 动员的外周血 MSCs 与骨髓衍生的 MSCs 具有同样的生物学特性,在血管损伤后即刻体内移植 MSCs,对损伤内皮具有快速修复的潜能,对减轻内膜增殖可能起重要作用。结合其它体内外实验结果,推测这一效应可能部分与 MSCs 归巢到损伤血管部位分化为内皮细胞有关;其次可能还与 MSCs 改善局部微环境,加速机体自身的修复过程有关。

参 考 文 献

[1] 沈长银, 石 蓓, 赵然尊, 等. 兔颈动脉粥样硬化狭窄动物模型的制备[J]. 四川大学学报(医学版), 2009, 40(5): 923-926.

[2] Kang H J, Kim H S, Zhang S Y, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilized With granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: The MAGIC cell randomized clinical trial [J]. Lancet, 2004, 363(9411): 751-756.

[3] Kang H J, Lee H Y, Na S H, et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial[J]. Circulation, 2006, 114(1): I145-I151.

[4] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury [J]. Circ Res, 2003, 93(2): e17- e24.

[5] Soichiro F, Katsuya A, Kazutaka U, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells[J]. Circ Res, 2003, 93(10): 980-989.

[6] Zhao Z G, Li W M, Chen Z C, et al. Hematopoiesis capacity, immunomodulatory effect and ex vivo expansion potential of mesenchymal stem cells are not impaired by cryopreservation[J]. Cancer Invest, 2008, 26(4): 391-400.

[7] Wu X J, Huang L, Zhou Q, et al. Effect of paclitaxel and mesenchymal stem cells seeding on ex vivo vascular endothelial repair and smooth muscle cells growth[J]. J Cardiovascular Pharmacol, 2005, 46(6): 779-786.

[8] Johansson U, Rasmusson I, Niclou S P, et al. Formation of composite endothelial cell mesenchymal stem cell-Islets: a novel approach to promote islet revascularization [J]. Diabetes, 2008, 57(9): 2393-2401.

[9] Silva G V, Litovsky S, Assad J A, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model[J]. Circulation, 2005, 111(2): 150-156.

(责任编辑:冉明会)