

骨髓间充质干细胞移植对大鼠钙化 主动脉结构及顺应性的影响

孙晓楠¹, 刘国树¹, 石蕊², 庞伟², 李玉明², 叶平¹, 曾强¹

(1. 解放军总医院南楼心血管二科, 北京市 100853; 2. 武警医学院附属医院心血管病研究所, 天津市 300162)

[关键词] 病理学与病理生理学; 骨髓间充质干细胞; 移植; 动脉顺应性; 动脉钙化; 脉搏波传导速度; 细胞外基质

[摘要] 目的 研究骨髓间充质干细胞对大鼠大血管钙化是否具有修复作用。方法 选用 8 周龄健康 Wistar 鼠复制维生素 D₃ 尼古丁钙化模型, 采用左心室直接注射干细胞的方法进行干预移植, 4 周后检测有创血压、脉搏波传导速度, 评价动脉顺应性; 采用不同染色方法分析组织中弹性纤维、胶原纤维比例, 动脉壁中 iv、Ⅲ型胶原的水平 and 比例变化及动脉钙化程度; 采用原子吸收光谱法测定钙化组织中钙含量。结果 维生素 D₃ 尼古丁钙化大鼠接受骨髓间充质干细胞干预后弹性/胶原纤维比值发生改变, 细胞移植组高于假移植组 (1.5% ± 0.3% 比 0.9% ± 0.2%, $P < 0.01$)。骨髓间充质干细胞移植组弹性纤维保持固有形状, 与胶原纤维结合紧密; 动脉组织局部钙含量较假移植组下降 (13.80 ± 1.28 mg/g 比 29.90 ± 1.85 mg/g, $P < 0.01$)。上述动脉结构的改变伴有动脉顺应性的改善。结论 骨髓间充质干细胞移植能改善细胞外基质成分的构成比例, 部分抑制钙在动脉壁中的沉积过程, 这种动脉结构的恢复伴有动脉顺应性的改善。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Calcification Aortic in Rats

SUN Xiao-Nan¹, LIU Guo-Shu¹, SHI Rui², PANG Wei², LI Yu-Ming², YE Ping¹, and ZENG Qiang¹

(1. Second Department of Geriatrics Cardiology, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853; 2. Cardiology Institute of the Affiliated Hospital, China Armed Forced Police Medical College, Tianjin 300162, China)

[KEY WORDS] Mesenchymal Stem Cells; Transplantation; Artery Compliance; Artery Calcification; Pulse Wave Velocity; Extracellular Matrix

[ABSTRACT] **Aim** To explore the structural and functional changes of aortic wall in vessel calcification rats after mesenchymal stem cells (MSC) transplantation and try to find a new way to cure serious vessel damage. **Methods** 8-weeks old healthy Wistar rats were used to copy calcification model using vitamin D₃ plus nicotine and receive MSC transplantation. Pulse wave velocity (PWV), blood pressure, elastic/collagen ratio, type iv/Ⅲ collagen, calcification degree were measured according to different coloration methods. **Results** MSC infusion can reduce elastic/collagen ratio (1.5% ± 0.3% vs 0.9% ± 0.2%) and PWV (204 ± 20 vs 298 ± 26) in rats compared with the pseudos operation group ($P < 0.01$). Pathologic analysis showed a obvious decrease of Calcium amounts in cell transplantation group (13.80 ± 1.28 mg/g vs 29.90 ± 1.85 mg/g, $P < 0.01$).

Conclusion MSC infusion can slow down or reverse the aortic remodeling progress in calcification rats by changing the ratio of extracellular matrix (ECM). Such structural change came with the reduction of PWV, which was a sign of artery compliance. MSC can regulate calcium content in artery to regress the vessel remodeling during the calcification, which led to function improvement in the end.

血管钙化是血管损伤最为严重的表现形式之一, 也是重要的增龄性改变, 具有极高的发生率。钙在大血管壁中的沉积将造成相应动脉顺应性下降, 导致血管尤其是大血管对心脏射血的缓冲能力减

弱, 引发脉压差增大等各种临床症状^[1]。但动脉钙化过程并非一个单纯的钙沉积过程, 同时还伴有血管壁结构如中膜厚度、胶原含量等的改变, 多方共同作用导致血管功能减退。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 作为一种新兴的具有全能修复作用的种子细胞, 能对体内多种损伤组织进行修复, 其修复作用既强大又具有定向性^[2]。因此我们采用 MSC 作为血管钙化损伤的修复种子, 探讨干细胞移植治疗能否修复钙化主动脉的结构及功能。

[收稿日期] 2006-03-29 [修回日期] 2006-08-28

[作者简介] 孙晓楠, 博士, 主治医师, 主要从事高血压的临床与基础研究, E-mail 为 nancysun301@126.com。刘国树, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的临床与基础研究, E-mail 为 Guoshu_liu@sohu.com。叶平, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉硬化、血脂代谢的临床与基础研究, E-mail 为 Yeping@sina.com。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

选取 32 只 8 周龄健康 Wistar 大鼠, 其中 2 只用于 MSC 的分离, 剩余 30 只进入本实验研究, 上述动物均购自军事医学科学院环境卫生研究所, 动物达到实验要求级别。大鼠购入后适应性饲养 1 周后开始进行干预试验。造模所用尼古丁为北京医科大学药理研究所友情惠赠, 其他实验所用试剂均购自 TBD 公司。

1.2 动物模型的制作及分组

随机选取 22 只大鼠根据文献[3]采用尼古丁与维生素 D₃ 复制大鼠血管钙化模型, 具体方法如下: 只需模型制作第 1 天给药, 剂量为尼古丁 25 mg/kg, 灌胃, 早 8 点及晚 8 点各一次; 维生素 D₃ 300 000 u/kg, 肌肉注射, 给药后 14 天模型制作成功; 8 只大鼠采用生理盐水灌胃并注射生理盐水作为正常对照组。在造模后第 15 天进行 MSC 干预, 根据是否接受干细胞移植将模型大鼠分为细胞移植组 ($n=12$) 及假移植组 ($n=10$)。

1.3 骨髓间充质干细胞的分离与移植

根据文献报道方法^[4,8]分离 2 只健康 Wistar 大鼠长骨间质干细胞并进行体外培养, 采用 ICC 法检测 MSC 表面抗原 CD71 表达情况对分离细胞进行鉴定。移植前采用溴脱氧尿苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 标记干细胞。将标记后待移植 MSC 用胰酶消化后离心、冲洗, PBS 重新悬浮, 采用超声引导下经胸左心室腔内直接穿刺注射的方法移植细胞, 移植细胞数量为 1×10^6 , 体积为 100 μ L, 假移植组注射等量 PBS, 注射后观察 30 min, 确定无呼吸困难等情况出现后将动物放回饲养。移植后 14 天进行相关指标的检测。

1.4 有创血压及脉搏波传导速度的测定

腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉实验动物, 右侧颈动脉插管后, 连接压力传感器测定实验动物的动脉波形及压力值。同侧股动脉插管, 在波形稳定后记录同步波形, 稳定 30 min 后开始记录, 同时测定相应动脉距离, 计算脉搏波传导速度 (pulse wave velocity, PWV)。

1.5 动脉结构分析

处死动物后取主动脉常规包埋、切片, 采用三联染色法染色后, 采用 Image plus 分析动脉中弹性纤维与胶原纤维比例; 采用天狼猩红染色后偏振光显微镜检测动脉壁中 iv、 α 型胶原的变化。常规 HE 染色后测定动脉中膜厚度及动脉管腔直径, 根据

Moens Korteweg 公式计算主动脉弹力系数 (elastic modulus, EM)。动脉组织经过硝酸处理后采用原子吸收法测定动脉中钙的含量, 以 mg/动脉干重的形式记录, 免疫组织化学方法确定移植干细胞是否能够在动脉壁定居。

1.6 统计学处理

数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 对数据进行分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞在动脉壁中的定位

免疫组织化学结果发现, 接受干细胞移植的大鼠主动脉壁中可见 BrdU 标记的阳性细胞存在, 提示干细胞进入体内后能够在受损主动脉壁中定居 (图 1)。

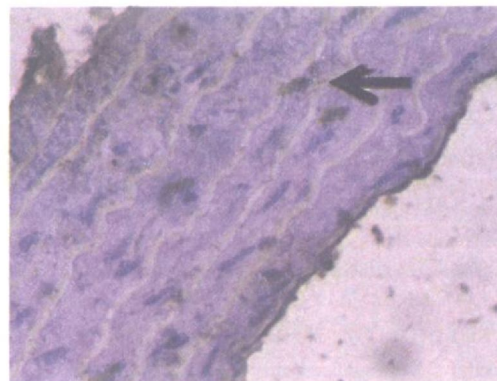


图 1. 免疫组织化学结果图 ($\times 20$)

2.2 骨髓间充质干细胞移植对血管钙化的影响

Wistar 大鼠接受尼古丁及维生素 D 干预 14 天后, 主动脉中钙含量明显高于正常对照组 (29.90 ± 1.85 mg/g 比 2.61 ± 0.45 mg/g, $P < 0.01$), 提示主动脉钙化的发生。给予 MSC 干预 2 周后即可明显降低组织钙化程度 (13.80 ± 1.28 mg/g, $P < 0.01$), 但仍高于正常对照组 ($P < 0.01$)。动脉壁 Vonkossa 染色结果发现, 细胞移植能明显降低动脉壁中钙沉积 (图 2)。

2.3 骨髓间充质干细胞移植对动脉形态及血压的影响

大鼠主动脉钙化造成收缩压水平明显增高 ($P < 0.01$), 但对舒张压水平无明显影响 ($P > 0.05$); 钙化时血管壁中膜厚度有减低趋势, 但与正常对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 血管弹力系数在钙化发生时明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。给予 MSC 干预可以减低收缩压升高水平, 降低血管

弹力系数($P < 0.01$), 见表 1。

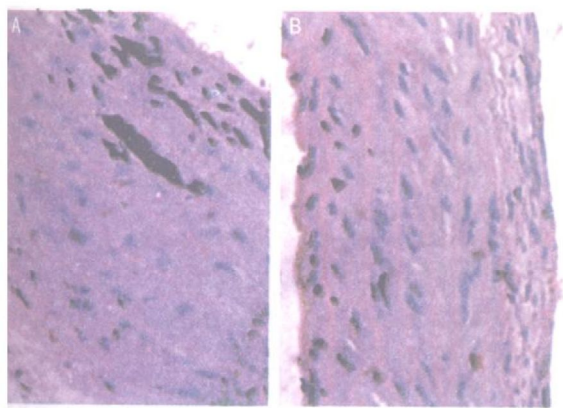


图 2. 动脉壁 Vonkossa 染色结果($\times 20$) A 为假移植组, 可见大量黑染的钙沉着; B 为细胞移植组。

表 1. 各组动物血管结构及血压的变化

检测指标	正常对照组	细胞移植组	假移植组
管腔直径 (mm)	1.49 \pm 0.01	1.49 \pm 0.03	1.51 \pm 0.03
动脉中膜厚度 (μ m)	51.0 \pm 1.7	49.0 \pm 2.1	46.0 \pm 2.7
体重 (g)	463 \pm 2	458 \pm 4	415 \pm 6 ^{ab}
心率 (次/min)	377 \pm 1	379 \pm 1	391 \pm 2
收缩压 (mmHg)	115 \pm 2	121 \pm 1 ^a	151 \pm 3 ^{ab}
舒张压 (mmHg)	88 \pm 1	87 \pm 1	81 \pm 1
脉压差 (mmHg)	27 \pm 2	35 \pm 1 ^a	70 \pm 3 ^{ab}
平均动脉压 (mmHg)	102 \pm 2	105 \pm 1 ^a	116 \pm 2 ^{ab}
弹力系数	5.7 \pm 1.9	8.1 \pm 1.3	17.1 \pm 2.1 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比, b 为 $P < 0.01$, 与细胞移植组比。

2.4 骨髓间充质干细胞移植对动脉壁结构的影响

与正常对照组相比, 细胞移植组主动脉壁中胶原纤维含量(胶原容积积分)(19.5% \pm 3.8%)虽有变化, 但仍维持在正常范围中, 而假移植组动脉壁中胶原纤维含量明显增加(36.4% \pm 5.1%, $P < 0.01$); 弹力纤维容积积分发现细胞移植组与假移植组间差异无显著性(30.2% \pm 6.0% 比 34.4% \pm 5.8%, $P > 0.05$)。细胞移植组与假移植组动脉壁中弹力纤维/胶原纤维比值水平差异有显著性(1.5% \pm 0.3% 比 0.9% \pm 0.2%, $P < 0.01$)。病理形态学观察发现动脉壁间质排列也发生变化, 假移植组动脉壁中胶原纤维排列散乱, 丧失了正常结构(绿染的为弹力纤维成分, 红染的为胶原成分), 见图 3。

2.5 骨髓间充质干细胞移植对血流动力学指标的影响

骨髓间充质干细胞干预可使大鼠钙化动脉大动脉传导速度减慢, 但仍高于正常对照组大鼠($P <$

0.05)。与假移植组相比, MSC 移植组大鼠 PWV 降低(204 \pm 20 比 298 \pm 26), 但仍高于正常对照组(163 \pm 18, $P < 0.01$)。进一步相关分析发现 PWV 的变化同脉压差及平均动脉压的变化具有同向性(r 分别为 0.665 和 0.577, $P < 0.05$), 而与收缩压水平的变化无关($r = 0.444$, $P = 0.065$)。

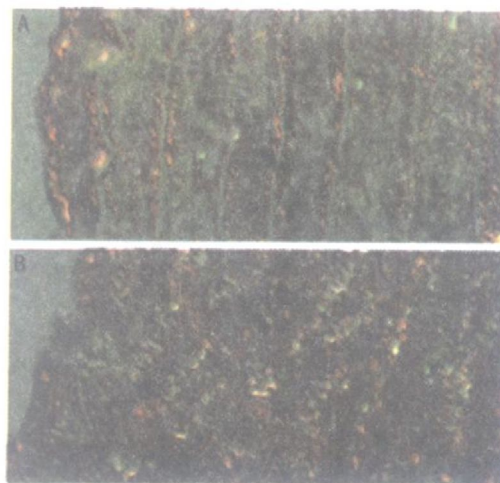


图 3. 动脉壁间质染色结果($\times 40$) A 为细胞移植组, B 为假移植组。

3 讨论

既往观点认为血管钙化是一种严重的、不可逆性血管损伤, 同时伴有主动脉顺应性降低, 脉压差增大, 是临床多种疾病共同的病理生理过程。本研究通过对大鼠钙化主动脉的研究发现, 骨髓间充质干细胞干预可有效减轻主动脉钙化程度, 改善动脉局部弹力纤维与胶原纤维的比例, 这种结构改变同时伴有主动脉功能的恢复, 主要表现为主动脉弹力系数减低、脉搏波传导速度减慢, 提示血管顺应性得到改善。

作为一种多能的修复种子细胞, 骨髓间充质干细胞通过循环途径进入体内后, 在局部炎症因子的作用下对体内存在损伤部位具有趋化性, 可在病变部位聚集并对损伤进行修复^[9]。MRI 示踪研究发现, 骨髓间充质干细胞在动脉壁中的聚集数量与心脏、肾脏处于相同水平^[10]。到达动脉壁中的骨髓间充质干细胞一方面可通过向成纤维母细胞分化^[11], 改善弹性纤维与胶原纤维的比例, 从而改变动脉的弹力系数; 促进纤维粘连蛋白的产生, 增加血管壁的基质成分与细胞成分间的相互作用来改善动脉壁的弹性。另一方面, 骨髓间充质干细胞可通过自身分泌的细胞因子调节主动脉局部骨桥蛋白等活性因子的表达水平, 而后者对血管钙化的进程具有重要影

响^[12,13]。因此,骨髓间充质干细胞对钙化主动脉的影响是多方面的,很难去界定是抗钙化作用的发挥改善了动脉功能还是动脉壁结构的改变促进动脉功能恢复;毋庸置疑,血管顺应性确实得到了改善,接受骨髓间充质干细胞治疗的小鼠脉压差明显缩小,提示动脉缓冲功能得到改善,而该组脉搏波传导速度减低从另一个方面证实这种动脉功能的改善。

本研究发现骨髓间充质干细胞干预可改善钙化主动脉的功能,但由于观察时间及指标的限制,并没有进一步明确其主要机制,未能进一步阐明到底是骨髓间充质干细胞的自身增殖作用抑或是旁分泌作用在修复中具有决定性意义,这是本研究的局限所在,我们将在随后的研究中进一步完善。

[参考文献]

- [1] Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duviols C, Peslin R. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity [J]. *Hypertension*, 1997, **29** (44): 999-1 006
- [2] Jorgensen C, Noel D, Apparailly F, Sanny J. Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, **60** (4): 305-309
- [3] Atkinson J, Poitevin P, Chillon JM, Lartaud I, Levy B. Vascular calcium overload produced by vitamin D₃ plus nicotine treatment diminishes arterial distensibility in rats [J]. *Am J Physiol*, 1994, **266** (2): H540-H547
- [4] Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow [J]. *Exp Cell Res*, 2004, **295** (2): 395-406
- [5] Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2001, **18** (8): 813-819
- [6] Van Kerckhoven R, Kalkman EA, Saxena PR, Schoemaker RG. Altered cardiac collagen and associated changes in diastolic function of infarcted rat hearts [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, **46** (2): 316-323
- [7] 艾国平, 粟永萍, 闫国和. 间充质干细胞的分离与培养[J]. 第三军医大学学报, 2001, **23** (5): 553-555
- [8] 蒋文慧, 马爱群, 王亭忠, 董安平, 赵晓鸽, 许正云, 等. 绿色荧光蛋白基因转染骨髓间质干细胞[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, **13** (5): 549-552
- [9] Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, et al. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2003, **228** (1): 51-59
- [10] Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion [J]. *Cells Tissues Organs*, 2001, **169** (1): 12-20
- [11] Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon [J]. *Tissue Eng*, 1999, **5** (3): 267-277
- [12] Shuichi J, Christopher P, Cecilia MG. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification [J]. *J Bio Chem*, 2000, **275** (26): 20 197-203
- [13] Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest*, 2000, **105** (11): 1 527-536

(此文编辑 许雪梅)

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎引用! 欢迎刊登广告!

《中国动脉硬化杂志》

中国科技核心期刊

作为专业性极强的高级学术期刊,我刊主要报道国内外防治动脉硬化性疾病中的研究论文、诊治经验、研究综述、文献综述、病例报道、知识讲座等。其办刊宗旨是:通过报道防治动脉硬化性疾病的新理论、新观点、新疗法、新药物;介绍防治的新经验和新知识;既引导和弘扬我国的学术研究,促进国内外学术交流,将中国这一领域的研究推向世界和未来;又普及防治知识,提高全民的健康水平。我刊是科技部《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、中国科学院《中国科学引文数据库》来源期刊和《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,被美国《化学文摘(CA)》、俄罗斯《文摘杂志(AJ)》和国内全部数据库收录。据中国科技期刊引证报告,我刊2004年的影响因子(IF)为0.953,位居当年全国1 608种统计源期刊中的第93位;总被引频次689,列第266位,这二项指标都进入优秀期刊行列。

我刊为月刊,每月26日出版,A4开本,高档双胶纸印刷。定价11元,全年132元。由湖南省报刊发行局发行,医药卫生类,邮发代号42-165。我刊热忱欢迎海内外同仁和社会各届朋友向《中国动脉硬化杂志》投稿,到当地邮局订阅。若错过邮局征订日期,可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。同时欢迎并采取下述措施激励广大同仁引用:凡在《中国科技论文统计源期刊》和《中国科学引文数据库来源期刊》上发表的文章中引用了我刊的文章者,凭当期封面、目次页和文章的复印件可获赠第二年全年刊物一份。

主编杨永宗教授和副主编兼编辑部主任胡必利教授率全体办刊人员向长期关心、爱护和支持《中国动脉硬化杂志》的海内外同仁和社会各界朋友致以衷心的感谢!祝愿您健康长寿,万事如意!