

骨髓间充质干细胞移植对损伤血管的内皮修复作用

刘志江, 石 蓓, 许官学, 沈长银, 王正龙, 龙仙萍, 陈攀科  
(遵义医学院第一附属医院心内科, 贵州省遵义市 563003)

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 再狭窄; 内皮修复

[摘 要] 目的 探讨兔颈动脉粥样硬化狭窄血管成形术后,骨髓间充质干细胞(BMSC)移植对损伤血管内皮修复的影响及可能机制。方法 制作兔颈动脉粥样硬化狭窄模型 48 只,随机分成 BMSC 移植组( $n=24$ )和对照组( $n=24$ )。体外培养兔 BMSC,流式细胞仪鉴定 BMSC 表面标志,DAPI 标记后备用。球囊损伤颈动脉的即刻,BMSC 移植组以  $10^7$  /kg 的细胞数经颈外动脉移植到损伤动脉局部,对照组注射等量的 PBS 液。术前及细胞移植后 3、7、14 及 28 天采集外周血用 ELISA 法测定血管内皮生长因子水平。移植后 7 天取材观察 DAPI 标记 BMSC 的归巢。移植后 14 天免疫组织化学染色检测损伤血管组织的血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)的表达;移植后 28 天 HE 染色后测定损伤血管新生内膜面积、新生内膜面积/中膜面积及再狭窄率。结果 BMSC 移植组在移植后各时间点血管内皮生长因子水平均显著高于对照组( $P<0.01$ )。移植后 7 天 BMSC 移植组损伤血管的内膜表面见 DAPI 标记的 BMSC。移植后 14 天血管内膜有 CD31 的连续性表达,对照组没有表达。与对照组比较,移植后 28 天 BMSC 移植组血管新生内膜面积( $0.092 \pm 0.009$  比  $0.189 \pm 0.007$ ,  $P<0.01$ )、新生内膜面积/中膜面积( $0.698 \pm 1.570$  比  $1.630 \pm 0.122$ ,  $P<0.01$ )及再狭窄率( $41.70\% \pm 3.70\%$  比  $61.28\% \pm 1.57\%$ ,  $P<0.01$ )均显著减轻。结论 局部移植 BMSC 可促进粥样硬化狭窄颈动脉球囊损伤后的内皮修复,从而有助于减轻血管再狭窄。

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Repairment of Injured Vascular Endothelial

LIU Zhi-Jiang, SHI Bei, XU Guan-Xue, SHEN Chang-Yin, WANG Zheng-Long, LONG Xian-Ping, and CHEN Pan-Ke  
(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[KEY WORDS] Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; Restenosis; Repairment of Endothelial

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect and possible mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-SC) transplation on repairing injured vessels endothelium after carotid atherosclerosis stenosis angioplasty in rabbits.

Methods Carotid atherosclerosis stenosis model of 48 rabbits had been successfully built up and randomly divided into BMSC transplantation group ( $n=24$ ) and control group ( $n=24$ ). BMSC were obtained by density gradient centrifugation and adherent cultured. Surface markers of BMSC were detected by flow cytometry, and BMSC pre-labled by DAPI. Bal-loon injured carotid artery of rabbits, meanwhile, BMSC ( $10^7$ /kg) were infused into injured artery of BMSC transplantation group rabbits by external carotid artery, and control group infused the same amount of PBS solution. The peripheral blood was collected and the vascular endothelial growth factor (VEGF) levels was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) at preoperative and 3, 7, 14, 28 days of BMSC transplantation. 7 days after BMSC transplantation, DAPI labeled BMSC were detected by immunofluorescence microscopy. 14 days after BMSC transplantation, the immunohisto-chemical staining was used to analyse platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31) expression in the injured vessels.

28 days after BMSC transplantation, the neointimal area, the ratio of the intima/media area and vascular restenosis were analysed in the vascular tissue by hematoxylin and eosin staining.

Results The expression of VEGF in BMSC trans-plantation group were elevated significantly compared with control group at 3, 7, 14, 28 days after BMSC transplantation.

7 days after BMSC transplantation, DAPI labeled BMSC were detected in injured vessels intima. 14 days after BMSC

[收稿日期] 2010-12-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(NSFC30860100)

[作者简介] 刘志江, 硕士, 主治医师, 主要从事冠心病介入治疗的基础与临床研究, E-mail 为 liuzhijiang348@126.com。通讯作者石蓓, 教授, 硕士研究生导师, E-mail 为 shibei2147@yahoo.com.cn。

transplantation, CD31 continues to express in intima of BMSC transplantation group, while the control group did not express CD31. The neointimal area ( $0.092 \pm 0.009$  vs  $0.189 \pm 0.007$ ,  $P < 0.01$ ), the ratio of the intima/media area ( $0.698 \pm 1.570$  vs  $1.630 \pm 0.122$ ,  $P < 0.01$ ) and the luminal stenosis ratio ( $41.70\% \pm 3.70\%$  vs  $61.28\% \pm 1.57\%$ ,  $P < 0.01$ ) were significantly decreased in BMSC transplantation group compared with control group at 28 days. **Conclusion** BM-SC transplantation can promote repairing of endothelial after atherosclerotic stenosis carotid artery by balloon injury and reduce the restenosis of injured vessels.

血管内皮的损伤伴随功能的异常是经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后血管再狭窄的始动环节。目前临床上广泛使用的药物洗脱支架通过局部抑制平滑肌细胞增殖,在一定程度上降低了再狭窄率,但同时也进一步加重了对损伤血管内皮的延迟修复及功能的抑制。因此,如何促进损伤血管内皮的早期修复仍是防治血管再狭窄的关键环节之一。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)是具有多向分化潜能的成体干细胞,研究发现 BMSC 在一定条件下可以分化为血管内皮细胞<sup>[1,2]</sup>,同时还具有旁分泌效应,能分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种细胞因子,在组织修复中发挥积极作用。本研究通过对颈动脉粥样硬化狭窄模型兔在血管成形术后行 BMSC 移植,初步探讨 BMSC 移植对损伤血管的内皮修复作用及其可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

L-DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶、二甲基亚枫(北京拜尔迪生物公司);Percoll 分离液(美国 Pharmacia 公司);DAPI(美国 Sigma 公司);小鼠抗兔 CD34、CD44 及 CD45 抗体(美国 US-Biological 公司)。FITC 标记的二抗及通用型免疫组织化学二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。CD31 一抗(英国 Abcam 公司),PCNA 一抗(武汉博士德公司)。VEGF 的 ELISA 检测试剂盒(上海西塘科技有限公司);PTCA 球囊导管(2.5 mm × 15 mm)(Cordis 公司);倒置荧光显微镜(Nikon, 日本);病理图像分析系统(Leica Qwin Plus, 德国);流式细胞仪(B-D 公司, 美国)。

### 1.2 动物与分组

新西兰健康雄性大白兔 48 只,体重  $2.0 \pm 0.5$  kg。按课题组已成功构建的方法和标准<sup>[2]</sup>建立颈动脉粥样硬化狭窄模型后,随机分为 BMSC 移植组( $n = 24$ )和对照组( $n = 24$ )。细胞移植前两组均接受

颈动脉球囊成形术, BMSC 移植组接受 BMSC 移植,对照组接受等量的 PBS 液注射。

### 1.3 骨髓间充质干细胞的分离、培养、鉴定和标记

抽取兔股骨新鲜骨髓液,通过密度梯度离心法分离出其中的单个核细胞,接种于含 15% 胎牛血清及青霉素、链霉素各 100 ku/L 的 L-DMEM 完全培养液中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。原代培养 3 天后首次换液,以后每 3 天换培养液, BMSC 增殖到 80% 时传代,第二代细胞冻存备有。取第三代 BMSC 先后与 CD34、CD44、CD45 抗体及异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗 37℃ 孵育 30 min, 然后 BMSC 用 1% 多聚甲醛固定后进行流式细胞仪检测。移植前用 DAPI(50 mg/L)对第三代的 BMSC 进行标记,置于 37℃ 孵育箱中孵育 30 min,再用 PBS 洗 4 ~ 5 次除去未结合的 DAPI。

### 1.4 颈动脉粥样硬化球囊损伤模型的建立及细胞移植

建立兔右侧颈动脉粥样硬化狭窄模型后<sup>[3]</sup>,在无菌条件下行右颈动脉球囊成形手术。动物经 3% 戊巴比妥 1 ml/kg 静脉麻醉,颈部用 5% 碘化钠脱毛后清洁消毒皮肤,作颈正中切口分离右侧颈内、外动脉和颈总动脉。肝素 200 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,在结扎线近心端进行穿刺,送入 2.5 mm × 15 mm 球囊至颈总动脉,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,然后将事先已标记好的 BMSC 按  $10^7$ /kg 的总量通过颈外动脉注入损伤血管局部,对照组注入同等体积 PBS,孵育 30 min 后恢复血流。术后每天青霉素 80 万 u 连用 3 天预防感染。

### 1.5 血清血管内皮生长因子的检测

术前和 BMSC 移植后 3、7、14、28 天时采集外周血用 ELISA 法检测 VEGF 的水平。

### 1.6 血管内膜骨髓间充质干细胞归巢的检测

移植后 7 天取 BMSC 移植组损伤段颈动脉及对侧未损伤的颈动脉, PBS 反复冲洗后将血管纵向切开,平铺在载玻片上,置入 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 铺上盖玻片,在荧光显微镜下观察血管内膜

DAPI 阳性标记的 BMSC 的归巢。

1.7 血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)免疫组织化学分析

移植后 14 天取血管组织采用 SABC 法进行免疫组织化学染色。首先滴加小鼠抗兔 CD31 一抗和小鼠抗兔 PCNA 一抗(1:200 倍稀释),4℃ 孵育过夜,再滴加生物素标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗室温孵育 15 min,PBS 冲洗,DAB 显色,常规复染,脱水,透明,中性树胶封片。

1.8 血管形态学分析

移植后 28 天处死动物,留取部分损伤和正常血管组织用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋等处理后横断面切片 5 μm,进行常规 HE 染色。采集图像后通过计算机病理图像分析系统测定新生内膜面积、新生内膜面积/中膜面积及血管再狭窄率。

1.9 统计学处理

应用 SPSS16.0 统计软件进行分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨髓间充质干细胞的培养、标记及鉴定

培养的 BMSC 为形态均一的梭形细胞,并呈现漩涡状、鱼群样贴壁生长;DAPI 标记后细胞核发蓝光,标记率达 100%(图 1)。流式细胞仪检测结果表明 BMSC CD44 的表达率为 96.96%,CD34 和 CD45 的表达率分别为 0.23% 和 0.24%。

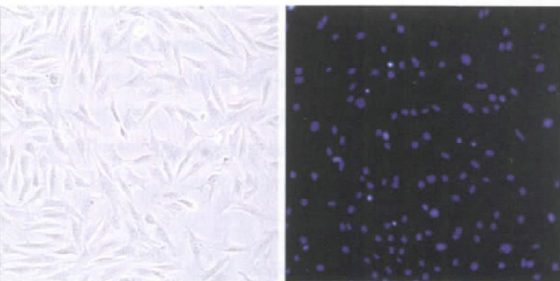


图 1. 骨髓间充质干细胞的培养与标记 左为培养的第三代 BMSC (×200),右为 DAPI 标记的 BMSC (×100)。

Figure 1. Culture and label of bone marrow mesenchymal stem cells

2.2 移植的骨髓间充质干细胞在损伤血管内膜的检测

细胞移植后 7 天,损伤侧血管腔面可见细胞核

发蓝色荧光的 BMSC 生长,对侧未损伤血管则无 DAPI 标记的 BMSC(图 2)。



图 2. DAPI 标记的骨髓间充质干细胞归巢至损伤血管内膜 (×200)

Figure 2. DAPI-positive bone marrow mesenchymal stem cells homing to injured vessels intima

2.3 骨髓间充质干细胞移植对损伤血管内膜血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)表达的影响

细胞移植后 14 天,BMSC 移植组血管内膜有连续性 CD31 的表达,而对照组未发现有 CD31 表达(图 3)。

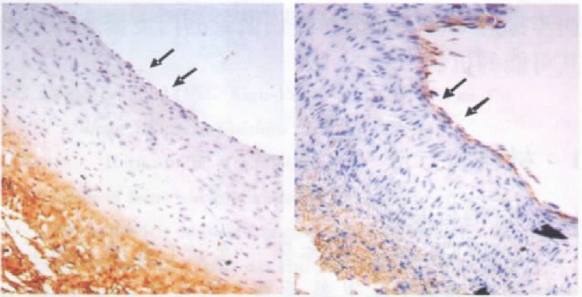


图 3. 兔颈动脉内膜血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)免疫组织化学染色 (×200) 左为对照组,右为 BMSC 移植组。

Figure 3. The immunohistochemical analysis of platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31) in rabbits carotid artery intima

2.4 骨髓间充质干细胞移植对血管新生内膜形成的影响

细胞移植后 28 天,对侧未损伤血管内膜仅见单层内皮细胞,无内膜增生。对照组可见内弹力膜断裂,内膜增生程度 BMSC 移植组较对照组减轻。经计算机病理图像分析系统测定,BMSC 移植组新生内膜面积、新生内膜面积/中膜面积及再狭窄率均显著低于对照组(图 4 和表 1)。



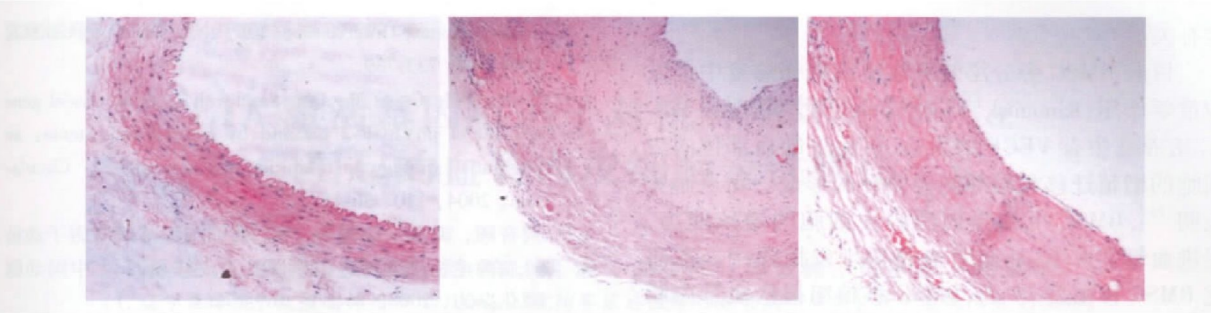


图 4. 正常血管和球囊损伤血管内膜增生变化(HE 染色, × 100) 左为正常血管, 中为对照组, 右为 BMSC 移植组。

Figure 4. Comparison of intimal hyperplasia in normal vessels and balloon injured vessels

表 1. 骨髓间充质干细胞移植后 28 天对血管新生内膜增生的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Effects of BMSC on neointimal hyperplasia at 28 days after transplantation

参 数	对照组	BMSC 移植组
内膜面积(mm <sup>2</sup> )	0.189 ± 0.007	0.092 ± 0.009 <sup>a</sup>
中膜面积(mm <sup>2</sup> )	0.132 ± 0.004	0.125 ± 0.009
内膜/中膜	1.63% ± 0.12%	0.70% ± 1.57% <sup>a</sup>
再狭窄率	61.28% ± 1.57%	41.70% ± 3.70% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

2.5 血管内皮生长因子水平的检测

BMSC 移植后 3、7、14 及 28 天 BMSC 移植组血清 VEGF 水平均显著高于对照组( $P < 0.05$ ; 表 2)。

表 2. 两组不同时期血管内皮生长因子水平( $\bar{x} \pm s$ , μg/L)

Table 2. Comparison of VEGF concentrations among groups at different time before and after BMSC transplantation ( $\bar{x} \pm s$ , μg/L)

时 间	对照组	BMSC 移植组
术前	174.00 ± 11.67	186.00 ± 10.54
移植后 3 天	309.25 ± 19.42	498.25 ± 15.24 <sup>a</sup>
移植后 7 天	286.31 ± 17.14	468.30 ± 15.80 <sup>a</sup>
移植后 14 天	265.50 ± 18.64	406.20 ± 21.60 <sup>a</sup>
移植后 28 天	246.50 ± 21.40	339.80 ± 23.16 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

3 讨 论

经皮冠状动脉介入治疗(PCI)是冠心病的主要治疗方法,然而术后再狭窄影响其远期效果。研究证实血管内皮的损伤和功能障碍是 PCI 术后再狭窄的始动环节<sup>[4]</sup>。PCI 过程中的球囊扩张和支架置入

造成血管内皮损伤,尤其是药物洗脱支架的使用抑制了内皮细胞的增殖,最终导致新生内膜增生。研究发现损伤血管内皮细胞的快速再生可以阻止新生内膜增生的发展<sup>[5]</sup>。由此推测,促进损伤血管内膜早期内皮化和内皮细胞正常功能的恢复,有助于减轻血管再狭窄。

损伤血管内皮的修复主要是通过临近正常内皮细胞的增殖和迁移,但修复作用有限。而循环中的内皮前体细胞可归巢到损伤血管参与修复内皮<sup>[6]</sup>。因此,增加循环或血管局部移植的细胞可有助于修复作用。有报道使用细胞动员剂能增加循环中的内皮祖细胞数量,促进损伤血管内皮修复<sup>[7,8]</sup>。

BMSC 是中胚层来源的多能成体干细胞,主要存在于骨髓基质。BMSC 移植治疗心肌梗死的有效性已得到基础和临床研究证实。然而, BMSC 移植对损伤血管修复影响的研究较少。Oswald 等<sup>[1]</sup>体外实验证实, BMSC 在 VEGF 诱导下可向内皮细胞分化。BMSC 治疗心肌梗死的研究中发现 BMSC 能分化为内皮细胞参与新生血管的形成<sup>[9,10]</sup>。由此推测,在体移植 BMSC 具有向内皮细胞分化促进损伤血管内皮修复的潜力。

本研究在颈动脉粥样硬化狭窄的基础上,球囊损伤狭窄颈动脉建立血管损伤模型,以更接近临床 PCI 治疗,并于球囊成形术后即刻在损伤血管局部移植 BMSC,7 天后发现 BMSC 移植组损伤血管内膜有 DAPI 标记的 BMSC 存在。14 天后免疫组织化学染色显示, BMSC 移植组损伤血管内膜表达内皮细胞的特异性表型蛋白(CD31),而对照组没有。血管形态学分析表明 BMSC 移植组的新生内膜面积、新生内膜面积/中膜面积及血管狭窄率均明显小于对照组。上述结果表明, BMSC 移植减轻了损伤血管再狭窄,其作用可能与 BMSC 迁移至损伤血管内膜后分化为内皮细胞,并促进内皮修复和恢复内皮功

能有关。

目前 BMSC 旁分泌效应在组织损伤修复中也发挥重要作用;Kinnaird<sup>[11]</sup> 和 Chen<sup>[12]</sup> 均发现在 BM-SC 培养液中有 VEGF 的表达,可促进缺血部位内皮细胞的增殖迁移和局部侧枝循环的形成。新近研究表明<sup>[13]</sup>,BMSC 可增强周围内皮细胞的增殖能力,促进血管芽发生,从而对血管再生发挥作用。本研究 BMSC 移植后 14 天,BMSC 移植组损伤血管内膜有连续性 CD31 表达,在移植后 3、7、14 及 28 天,VEGF 水平均显著高于对照组。由此推测早期的内皮修复除与 BMSC 向内皮细胞的分化有关外,还有 BMSC 的旁分泌效应参与。

综上所述,本研究在球囊损伤兔颈动脉粥样硬化模型上,局部移植 BMSC 后抑制新生内膜增生,减轻了血管再狭窄,其主要机制可能与 BMSC 分化为内皮细胞,促进损伤血管早期再内皮化有关,此外,BMSC 的旁分泌效应可能部分参与了上述机制。

#### [参考文献]

- [1] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro [J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 377-384.
- [2] 田少华, 张荣庆, 魏丽萍, 等. 剪应力和血管内皮生长因子诱导骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(5): 379-382.
- [3] 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.
- [4] Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2001, 12: 383-389.
- [5] Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculo-protective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44: 733-739.
- [6] Walter DH, Cejna M, Diaz-Sandoval L, et al. Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis [J]. *Circulation*, 2004, 110: 36-45.
- [7] 周音频, 黄 岚, 宋耀明, 等. 粒细胞集落刺激因子动员骨髓内皮祖细胞促进损伤血管内皮修复 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(3): 169-172.
- [8] Kong D, Melo LG, Gneocchi M, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries [J]. *Circulation*, 2004, 110: 2 039-046.
- [9] Silva GV, Litovsky S, Assad JA, 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: 150-156.
- [10] 李 贺, 周 欣, 舒 瑶, 等. 骨髓间充质干细胞移植对心肌缺血/再灌注大鼠心肌胶原与血管新生的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(4): 813-818.
- [11] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms [J]. *Circulation*, 2004, 109: 1 543-549.
- [12] Chen L, Tredget EE, Wu PY, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing [J]. *PLoS One*, 2008, 3: e1 886.
- [13] Johansson U, Rasmussen I, Niclou SP, et al. Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization [J]. *Diabetes*, 2008, 57: 2 393-401.

(此文编辑 许雪梅)