

内皮祖细胞移植修复大鼠颈总动脉内皮损伤

徐明国, 陶 军, 王洁梅, 杨 震, 陈 龙, 涂 昌, 王 妍
(中山大学附属第一医院心内科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨内皮祖细胞修复动脉内皮损伤的作用。【方法】建立大鼠颈总动脉内皮损伤模型, 16 只大鼠随机等分为内皮祖细胞移植组和对照组。体外诱导大鼠外周血单个核细胞为内皮祖细胞。在动脉损伤后, 将 5- 溴脱氧尿苷标记的内皮祖细胞注入损伤动脉段, 14 d 后取损伤动脉段和对侧正常动脉段。采用病理学方法、免疫组织化学和图像分析技术评价内皮祖细胞的修复效果。【结果】内皮祖细胞移植组的损伤动脉段 5- 溴脱氧尿苷免疫组化为阳性。内皮祖细胞移植组损伤动脉段的新生内膜厚度较对照组明显减轻 (43.5 ± 5.5) μm vs (90.7 ± 12.7) μm , $P < 0.05$; 内皮祖细胞移植组的再内皮化程度明显高于对照组 $77.8\% \pm 0.1\%$ vs $52.2\% \pm 0.1\%$, $P < 0.05$ 。【结论】内皮祖细胞具有修复动脉内皮细胞损伤的作用, 内皮祖细胞可作为心血管疾病细胞移植疗法的种子细胞。

关键词: 内皮祖细胞; 细胞移植; 动脉损伤; 大鼠

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2006) 04- 0365- 04

Transplantation of Endothelial Progenitor Cells Repairs Common Carotid Arterial Endothelium Injury of Rat

XU Ming- guo, TAO Jun, WANG Jie- mei, YANG Zhen, CHEN Long, TU Chang, WANG Yan

(Department of Cardiovascular Medicine, The First Affiliated Hospital, SUN Yat- Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the reparative functions of endothelial progenitor cells(EPCs) transplantation in the arterial endothelium injury.【Methods】We established the rat arterial endothelium injury model and divided 16 rats into EPCs transplantation group and control group averagely and randomly. Then the peripheral blood mononuclear cells of rats were collected and induced into endothelial progenitor cells (EPCs). The labeled EPCs with 5- bromodeoxyuridine (BrdU) in vitro were injected into the injured artery. After 14 days, the injured arterial segments and the correspond normal arteries were harvested. The samples were analyzed by pathology, immunohistochemistry and morphometry to evaluate the reparative functions of EPCs transplantation.【Results】The Brdu immunohistochemistry analysis was positive in transplantation group. The neointimal thickness in transplantation group was significantly lower than that of control group ($43.5 \mu\text{m} \pm 5.5 \mu\text{m}$ vs $90.7 \mu\text{m} \pm 12.7 \mu\text{m}$, $P < 0.05$). The rate of reendothelialization in transplantation group was much higher than that of control group ($77.8\% \pm 0.1\%$ vs $52.2\% \pm 0.1\%$, $P < 0.05$).【Conclusions】EPCs can repair the arterial endothelium injury. EPCs can be used as the source cells of the cell- based therapy for cardiovascular diseases.

Key words: endothelial progenitor cell; cell transplantation; artery injury; rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):365- 368]

正常的内皮细胞功能在调节血管张力、抗血小板聚集、抑制白细胞黏附和减轻血管壁炎症反应等方面具有重要作用, 内皮细胞结构和功能损伤导致的动脉粥样硬化是缺血性血管疾病的病理基础^[1]。修复内皮细胞损伤对防治缺血性血管疾病具有重要意义。内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞, 可以定向分化为内皮细胞。已有研究显示内皮

祖细胞在血管新生和血管损伤修复中具有重要作用^[2]。迄今国内尚未见有关内皮祖细胞修复动脉急性损伤的研究报道。本研究采用球囊导管损伤大鼠颈总动脉内皮细胞, 建立动脉内皮细胞损伤模型。然后将 5- 溴脱氧尿苷(5- bromodeoxyuridine, BrdU) 标记的内皮祖细胞注射到大鼠体内。14 d 后利用病理学方法、免疫组化和图像分析技术评价

收稿日期: 2006-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470475)

作者简介: 徐明国(1980-), 男, 河南新乡人, 博士生; 陶 军, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E- mail: taojungz@yahoo.com

内皮祖细胞移植对损伤动脉新生内膜厚度和再内皮化程度的影响。

1 材料和方法

1.1 单个核细胞的诱导分化、鉴定及 BrdU 标记

无菌条件下从大鼠下腔静脉抽取外周血,用 Ficoll-Paque 离心法,分离大鼠外周血单个核细胞。最后将分离得到的细胞置于含体积分数 10% 的胎牛血清、内皮细胞生长因子 10 ng/L、碱性成纤维细胞生长因子 2 ng/L 的 DMEM 培养基中。第 4 天加入 BrdU,使培养液的最终浓度为 10 g/mL。第 7 天行 Dil-acLDL 和 FITC-Lectin,用 Carl Zeiss 荧光显微镜观察。FITC-Lectin 购于 Sigma 公司, Dil-acLDL 购于 Molecular Probes 公司。诱导分化 7 d 并经 BrdU 标记的大鼠外周血单个核细胞,经多聚甲醛固定、H₂O₂ 和甲醇灭活内源性过氧化物酶及 HCl 变性后加入 1 200 稀释的鼠单克隆抗 BrdU 抗体。然后滴加抗小鼠 IgG, 37 °C 孵育 30 min 后 DAB 法显色。

1.2 动物模型的建立和细胞移植

16 只雄性 SD 大鼠(购于中山大学北校区实验动物中心),质量 300~350 g,用随机数字法完全随机分为 2 组,对照组(n=8)和移植组(n=8)。以标准饲料喂养,环境保持室温 25 °C,相对湿度 85% 左右。2 组大鼠首先切除脾脏,大鼠恢复 14 d 后开始颈总动脉损伤。大鼠用水合氯醛麻醉后,暴露左侧颈总动脉及其分叉处,从分叉处向近心端游离颈总动脉约 2 cm。然后用 25 U/mL 的肝素生理盐水溶液 1 mL 从手术视野临近可暴露的静脉注入体内,以防止手术过程中血栓形成。3 min 后用动脉夹夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉。然后结扎颈外动脉远端,并在靠近结扎线的近心端剪断颈外动脉。从左颈外动脉向颈总动脉插入 2F 的 Fogarty 导管约 1.5 cm,然后向导管内注入 200 μL 空气,拉脱 3 次即可。随后从颈外动脉向颈总动脉的损伤动脉段注入含有 5 × 10⁶ 个按上述方法体外诱导分化并用 BrdU 标记的内皮祖细胞,保持 30 min 后松开两侧的动脉夹以恢复血流;对照组只注入等量的 PBS 溶液 500 μL。最后结扎颈外动脉的游离端并缝合颈中部切口。14 d 后取损伤动脉段和对侧的正常动脉。

1.3 免疫组化

动脉石蜡切片经脱水、脱蜡、柠檬酸抗原修复、过氧化氢灭活内源性酶后滴加 1 200 稀释的

鼠单克隆抗 BrdU 抗体。然后滴加抗小鼠 IgG, 37 °C 孵育 30 min 后 DAB 法显色。按同样的方法对移植组和对照组的动脉石蜡切片行 Von Willebrand's 因子(Von Willebrand's factor, vWf)的免疫组织化学。每只大鼠分别做 5 张切片,以供图像分析时计算再内皮化程度使用。

1.4 扫描电子显微镜观察

用戊二醛固定标本 2 d。将标本纵向剖开并切成小块,用 PBS 清洗,然后经系列酒精脱水、醋酸异戊酯置换、临界点干燥(Hitachi HCP-2 临界点干燥仪)、贴台后镀膜(Giko IB-3 离子溅射仪)过程后用扫描电镜观察(Hitachi S520 扫描电镜)。

1.5 图像分析

弹力纤维染色的切片拍照后输入计算机。利用图像分析软件(image pro plus 5.0),对弹力纤维染色的动脉切片进行图像分析。测定指标包括新生内膜厚度和再内皮化程度。再内皮化程度以动脉内壁单位长度上 vWf 免疫组化阳性的细胞数目为定义。

1.6 统计分析

所有数据以均数 ± 标准差表示。对照组和试验组之间采用成组 t 检验。P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠外周血单个核细胞诱导分化为内皮祖细胞及其鉴定

培养至 7 d 左右细胞长成梭形;贴壁细胞培养到第 7 天时, Dil-acLDL 和 FITC-Lectin 染色双阳性。经 BrdU 标记的内皮祖细胞在第 7 天 BrdU 免疫细胞化学显示,细胞呈 BrdU 阳性反应(图 1)。

2.2 动物模型的建立与评价

动脉拉脱损伤后立即取该段用于组织学评价拉脱效果。病理切片 HE 染色显示:大鼠颈总动脉内皮细胞经拉脱后血管内皮细胞消失;扫描电子显微镜照片显示:正常动脉内表面有一层沿动脉长轴方向排列的梭形凸起;拉脱动脉内表面光滑可见内皮下纤维层,内皮细胞消失(图 2)。

2.3 内皮祖细胞移植对损伤动脉新生内膜厚度和再内皮化程度的影响

内皮祖细胞移植 14 d 后,内皮祖细胞移植组损伤动脉段可以见到 BrdU 免疫组化染色阳性的细胞,而对侧的正常动脉段 BrdU 免疫组化染色阴性(图 3)。动脉弹力纤维染色显示内皮祖细胞移植组

的内膜增生较对照组明显减轻(图 4)。在方差齐的情况下, 内皮祖细胞移植组新生内膜厚度显著低于对照组 ($43.5 \mu\text{m} \pm 5.5 \mu\text{m}$ vs $90.7 \mu\text{m} \pm 12.7 \mu\text{m}$, $t=$

28.88 , $P < 0.001$); 在方差齐的情况下, 内皮祖细胞移植组的再内皮化程度明显高于对照组 ($77.8\% \pm 0.1\%$ vs $52.2\% \pm 0.1\%$, $t= 21.86$, $P < 0.001$)。

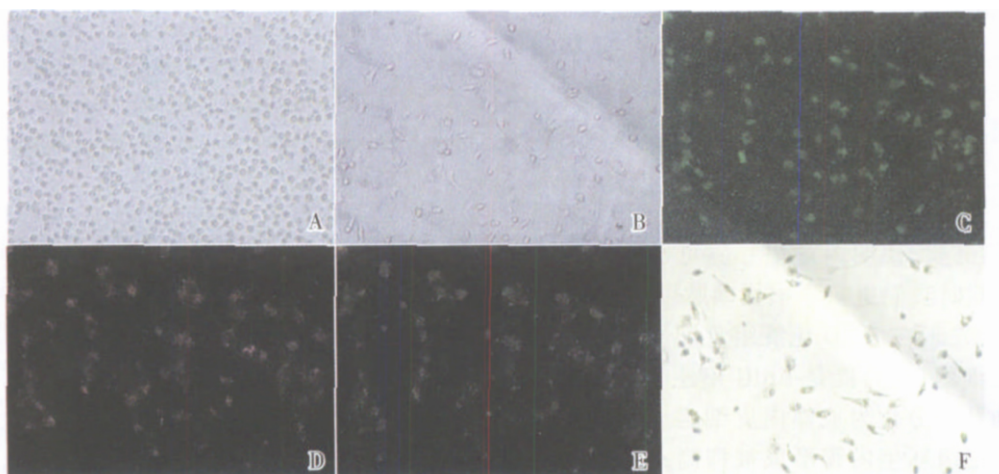


图 1 大鼠内皮祖细胞的诱导分化、鉴定与 BrdU 标记

Fig.1 The induction, assessment and BrdU labeling of rat endothelial progenitor cells($\times 100$)

A: 0 day after induction; B: 7 days after induction; C: positive FITC- Lectin immunofluorescence analysis; D: positive DiI- acLDL immunofluorescence analysis; E: merging of C and D; F: BrdU labeled endothelial progenitor cells

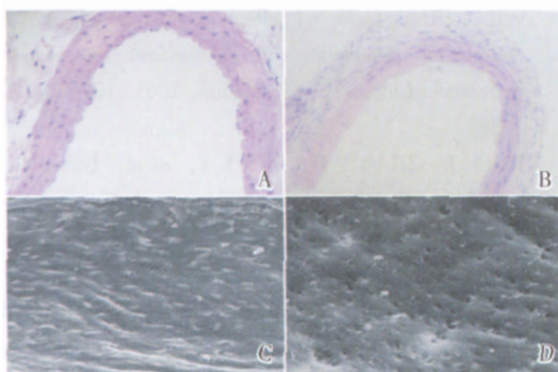


图 2 大鼠颈总动脉内皮细胞拉脱模型的建立与评价

Fig.2 Establishment and assessment of rat common carotid artery endothelium denudation model

A: normal artery (HE, $\times 200$); B: denuded artery (HE, $\times 200$); C: normal artery (SEM, $\times 500$); D: denuded artery (SEM, $\times 500$)

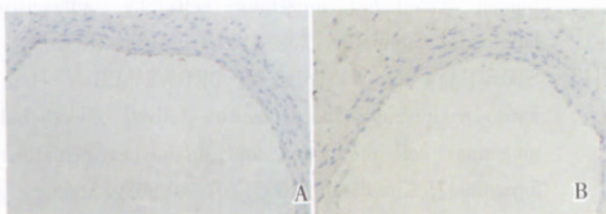


图 3 损伤动脉和对侧正常动脉的 BrdU 免疫组化

Fig.3 BrdU immunohistochemistry analysis of denuded artery and correspondent normal artery($\times 200$)

A: denuded artery; B: normal artery

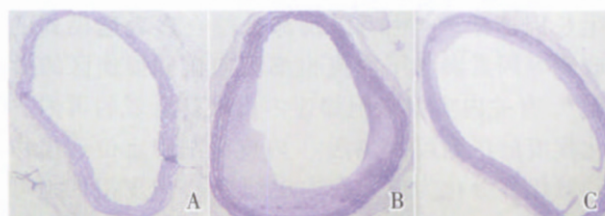


图 4 三种动脉的弹性纤维染色

Fig.4 Elastic fiber staining sections from three kinds of artery ($\times 100$)

A: normal artery; B: control group; C: transplantation group

3 讨 论

研究表明内皮细胞是维持正常血管生理功能动态平衡的重要调节因子。传统的心血管疾病的危险因素如高血脂、高血糖、高血压、吸烟、衰老^[3]等可以损伤内皮细胞的结构和功能, 最终导致缺血性血管疾病的发生和发展。

1997 年 Asahara 等^[4]首次证明出生后循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞, 这种细胞被称为内皮祖细胞。DiI- acLDL 和 FITC- Lectin 免疫荧光双标阳性是鉴定内皮祖细胞的标志。本实验中体外诱导分化的细胞在第 7 天时可以吞噬 DiI- acLDL 和 FITC- Lectin 标记阳性, 同时 Flk- 1 表达阳性。说明大鼠外周血单个核细胞在

VEGF和 bFGF 的诱导下在第 7 天已具有内皮祖细胞的特性。研究显示内皮祖细胞可以促进血管新生改善缺血肢体和缺血心脏的毛细血管密度^[5]。研究发现传统的心血管病的危险因素及其相关的靶器官损伤时,循环中内皮祖细胞数目减少、迁移和分化能力降低而凋亡增加^[6]。这些研究说明循环中内皮祖细胞的数目和功能对维持正常心血管系统的动态平衡有重要意义。

我们发现在移植组的损伤动脉处可以发现 BrdU 标记的细胞,说明内皮祖细胞可以定植到损伤动脉段。同时我们进行了损伤动脉段的 vWF 免疫组化染色,发现在 BrdU 免疫组化阳性的区域有 vWF 阳性的细胞。这可能是 BrdU 阳性的内皮祖细胞在损伤动脉处分化为成熟内皮细胞。图像分析结果显示移植组新生内膜形成被抑制,同时再内皮化速度较对照组明显加快。

内皮祖细胞在动脉损伤处的定植和修复作用的机制尚不十分清楚。下列因素可能促进内皮祖细胞向损伤动脉段处定植:血管损伤处的基质细胞源性因子表达上调^[7]、血管损伤部位的内皮细胞生长因子浓度增加^[8]以及部分整合素表达模式的改变等因素参与了内皮祖细胞向血管损伤区的游走^[9]。有关内皮祖细胞加速内皮损伤区域的再内皮化程度的机制可能包括:内皮祖细胞定位到损伤动脉段并分化为成熟的内皮细胞;内皮祖细胞可以分泌一些生长因子^[10]诸如:bFGF、VEGF 等促进周围的内皮细胞增殖迁移。

本实验采用切除脾脏的雄性 SD 大鼠作为实验动物是基于:正常情况下移植的内皮祖细胞大部分归巢到脾脏和骨髓,可能使其定植到损伤动脉处的数目减少^[11];已有研究表明雌激素具有动员内皮祖细胞并抑制其凋亡的能力^[12]。为了减少实验过程中的干扰因素,本研究选择了切除脾脏的雄性大鼠。

总之,本研究结果表明内皮祖细胞可以定植到动脉损伤段并抑制新生内膜的生长,加速损伤动脉再内皮化的形成。提示内皮祖细胞具有修复动脉损伤的作用,内皮祖细胞可以作为心血管疾病细胞移植疗法的种子细胞。

参考文献:

[1] LERMAN A, ZEHER A. Endothelial function: cardiac

events[J]. *Circulation*,2005,111(3):363- 368.

- [2] URBICH C, HEESCHEN C, AICHER A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*,2003,108(20):2511 - 2516.
- [3] JUN T, YA - FEI J, ZHENG Y, et al. Reduced arterial elasticity is associated with endothelial dysfunction in persons of advancing age[J]. *Am J Hypertens*,2004,17(8): 654- 659.
- [4] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*,1997, 275(5302):964- 967.
- [5] TATEISHI - YUYAMA E, MATSUBARA H, MUROHARA T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone- marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2002, 360(9331): 427- 435.
- [6] 陶 军,王 研,杨 震,等. 年龄相关的循环内皮祖细胞变化与动脉弹性关系的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2005,33(4):347- 350.
- [7] YAMAGUCHI J, KUSANO K, MASUO O, et al. Stromal cell - derived factor - 1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization[J]. *Circulation*, 2003, 107(9):1322- 1328.
- [8] RUEF J, ZHAO Y H, YIN L Y, et al. Induction of vascular endothelial growth factor in balloon - injured baboon arteries: A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 1997, 81(1): 24 - 33.
- [9] URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. *Circ Res*, 2004, 95(4):343 - 353.
- [10] TONGRONG H, SMITH L, HARRINTON S, et al. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries[J]. *Stroke*, 2004, 35(10):2378- 2384.
- [11] AICHER A, BRENNER W, ZUHARYRA M, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling[J]. *Circulation*, 2003, 107(16):2134- 2139.
- [12] STREHLOW K, WERNER N, BERWEILER J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation[J]. *Circulation*, 2003, 107(24):3059- 3065.

(编辑 黄小延)