

· 实验研究 Experiment research ·

血管内皮祖细胞局部移植防治血管内皮损伤后再狭窄形成的实验研究

马占龙, 滕皋军, 麦筱莉, 居胜红, 孙军辉, 陈 骏, 张洪英,
石红建, 余 辉, 李国昭

【摘要】 目的 探讨血管内皮祖细胞(EPC)局部移植防治血管成形术后再狭窄形成的可行性。方法 分离、鉴定并培养新西兰大白兔外周血(EPC),用 2.5 F 球囊扩张并损伤兔右侧颈动脉血管内皮,对损伤血管进行局部 EPC 移植。共作细胞移植兔 13 只,其中 3 只移植荧光标记 EPC,对照组 8 只,局部灌注生理盐水。细胞移植后 4 d,对 2 只荧光标记细胞移植兔取移植细胞后受损伤血管行病理组织学检查,其余实验兔 4 周后对损伤血管行病理组织学检查。结果 荧光标记细胞移植后 4 d,病理学检测显示损伤血管内皮有强荧光表达;4 周后,细胞移植组血管壁轻度增厚,对照组血管壁增厚明显,血管腔明显狭窄。两组间血管壁厚度差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 介入法局部移植同种异体血管内皮祖细胞可防治血管成形术后再狭窄的形成。

【关键词】 血管内皮祖细胞;再狭窄;细胞移植;兔

中图分类号 R543.3 文献标识码 A 文章编号:1008-794X(2007)02-0095-04

Local transplantation of endothelial progenitor cells to reduce restenosis after angioplasty in rabbit model MA Zhan-long, TENG Gao-jun, MAI Xiao-li, JU Sheng-hong, SUN Jun-hui, CHEN Jun, ZHANG Hong-ying, SHI Hong-jian, YU Hui, LI Guo-zhao. Molecular Imaging Laboratory, Department of Radiology, Zhong-Da Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 **Objective** To investigate homografting vascular endothelial progenitor cells (EPCs) for preventing restenosis formation of carotid artery in New Zealand white rabbit models. **Methods** EPCs of New Zealand white rabbits were isolated, confirmed and expanded through the injured carotid arterial endothelium of rabbit model induced by dilatation with a 2.5 F balloon; and then EPCs were transplanted into the injured endothelium of the cells transplantation group ($n = 13$, 3 of them were transplanted with fluorescently-labeled-EPCs), while equal volume of saline without EPCs was injected into the injured endothelium in the control group ($n = 8$). Histopathology was performed at 4 days after transplantation for the 2 rabbits, with fluorescently-labeled-EPCs. All of the rest remained rabbits were killed 4 weeks later for histological examinations. **Results** The histopathological slides showed that the fluorescence-positive expression existed in the injured endothelium 4 days after transplantation. At 4 weeks after the EPCs transplantation, there were less restenosis and less vascular wall thickening in the rabbits of cells transplantation group than those of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The local interventional homografting heterogeneous endothelial progenitor cells can prevent restenosis after the carotid artery angioplasty in New Zealand White rabbit model. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 95-98)

【Key words】 Endothelial progenitor cells; Restenosis; Cells transplantation; Rabbits

血管内皮损伤及功能失调是发生动脉粥样硬化的最初事件,同时内皮损伤及功能失调也是经皮

经腔血管成形术(PTA)术后再狭窄的一个重要病理生理步骤。逆转失调的内皮功能遂成为多种血管损伤性疾病防治的新趋势^[1,2]。最近的研究表明,血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)在内皮损伤或功能不全修复中起重要作用,治疗血管内皮修复的细胞疗法由此成为研究热点。

基金项目:东南大学优秀博士学位论文基金(200720)

作者单位:210009 南京 东南大学附属中大医院放射科分子影像实验室

通讯作者:滕皋军

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新西兰雄性大白兔 21 只(购自南京金陵种兔场),平均体重 2 kg。

1.1.2 主要试剂 密度梯度离心液(Histopaque 1077, Sigma), 人类纤维连接蛋白(Fibronectin, Sigma), 内皮细胞生长培养基(EGM-2MV, Sigma), 鼠抗兔单克隆抗体 CD105、VEGFR-2(天津灏洋生物制品科技公司), DIL 荧光蛋白(Biomedical Technologies Inc), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所), 普鲁士蓝试剂盒(上海虹桥乐翔医用试剂公司), 1%戊巴比妥钠注射液, 60%复方泛影葡胺。

1.1.3 主要设备 CO₂ 细胞培养箱(Herabius, Germany), 倒置显微镜(Zeiss, Germany), 1.5T 磁共振仪(Philips, Eclipse), 2.5 F 球囊导管(Boston), 大平板 DSA 数字减影(Innova 3100, GE), motic 数码摄像系统(motic 实业集团公司, 厦门)。

1.2 方法

1.2.1 兔外周血血管 EPC 的分离、培养与鉴定 用心脏穿刺法抽取新西兰大白兔自体外周血 20 ml, 用 Ficoll 密度梯度离心液 2 000 g × 30 min 梯度离心后, 将中间的白色云雾层吸出。用 D-Hanks 液 1 000 g × 10 min 洗 2 遍, 最后将细胞培养于铺有纤维连接蛋白的细胞培养瓶中。在培养第 3 周时用免疫组化法检测培养细胞中 CD105 和 VEGFR-2 的表达。

1.2.2 兔颈动脉内膜损伤模型的制作 手术切开暴露右侧股动脉, 穿刺针直视下穿刺股动脉, 留置管鞘, 造影导管造影, 交换 3.0 F 球囊导管至右侧颈总动脉中段, 球囊充气至直径 2.0 ~ 3.0 cm, 持续 30 s, 间隔 60 s, 重复 3 次后, 保留球囊内压力, 来回拖拉球囊 3 次, 退出球囊导管, 造影证实扩张成功后退出导管鞘(图 1)。术后动物喂养常规饲料。

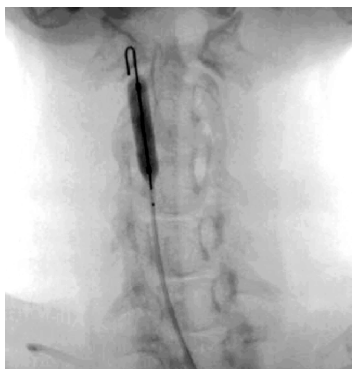


图 1 右侧颈总动脉球囊扩张

1.2.3 细胞移植 将 21 只新西兰大白兔随机分为 2 组, 治疗组 13 只, 手术切开颈部皮肤, 充分暴露损伤后右侧颈总动脉, 每只分别于颈动脉内膜损伤术后即刻, 经 4.0 F 造影导管灌注生理盐水, 充分冲洗血管腔后, 再钳夹血管远端, 对游离血管段局部经导管灌注、移植 EPC 悬液 2.0 ml, 细胞数为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。其中随机选择 3 只血管内膜损伤后模型, 局部介入移植荧光标记的 EPC。对照组 8 只, 颈动脉内膜损伤术后, 损伤血管局部注射生理盐水, 不移植 EPC, 手术后常规饲料喂养。

1.2.4 病理学检查 细胞移植后 4 d, 随机选取 2 只移植了荧光标记自体 EPC 的治疗组新西兰大白兔, 取损伤血管进行 HE 染色, 行病理学检查和荧光标记检测。其余实验兔在细胞移植后 4 周全部处死, 取移植细胞后血管及对照组血管进行病理学检查, 并用 motic 数码摄像系统测定血管壁厚度。

1.3 统计学方法

两组间血管壁厚度改变用配对 *t* 检验进行分析(由 SAS6.12 软件完成)。

2 实验结果

2.1 血管 EPC 的培养及鉴定

EPC 在分离培养后 3 d 时, 呈贴壁小圆细胞改变, 7 d 后呈轻度梭形改变, 14 d 后呈梭形内皮细胞样细胞并成簇血管样分布(图 2~4)。免疫组化检测呈 CD105 和 VEGFR-2 表达阳性, 分别表现为褐色和深蓝色(图 5, 6)。

2.2 兔颈动脉内膜损伤检测

任意选取 2 只实验组兔, 分别于颈动脉内膜球囊损伤后即刻取受损伤血管, 固定于 4% 甲醛溶液, 送 HE 染色, 病理检查, 显微镜下观察见: 颈动脉内膜球囊损伤后即刻见血管内膜损伤明显, 内膜部分脱落, 局部内皮细胞缺损, 血小板聚集, 中膜层损伤不明显(图 7)。

2.3 细胞移植后损伤血管内膜的变化

细胞移植治疗 4 d 后, 移植血管荧光标记检测显示损伤血管内皮表面有强荧光表达(图 8)。细胞移植治疗 4 周后, 治疗组血管壁轻度增厚, 血管壁平均厚度 (176.27 ± 10.33) μm , 对照组血管壁增厚明显, 血管壁平均厚度 (234.35 ± 12.46) μm , 血管腔明显狭窄。两组资料进行统计学分析, 血管壁厚度存在显著性差异 ($P < 0.01$, 图 9, 10)。

3 讨论

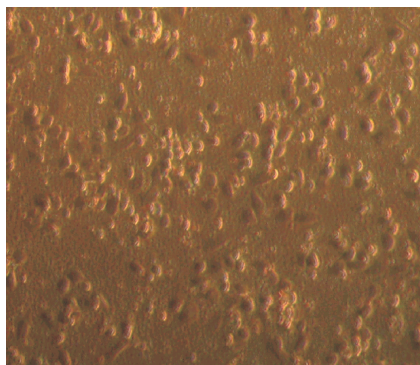


图 2 兔外周血内皮祖细胞, 培养 3 d 后贴壁的小圆细胞(100 ×)

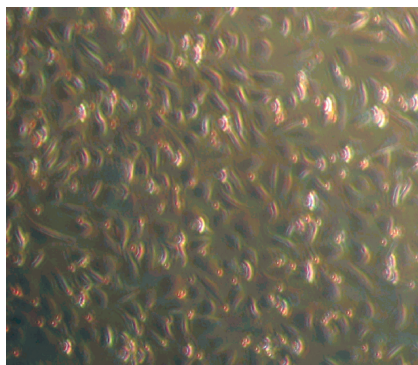


图 3 1 周后部分小圆细胞呈梭形改变(100 ×)

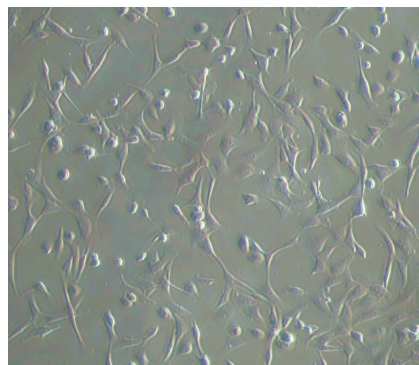


图 4 21 d 后呈内皮细胞样改变(100 ×)

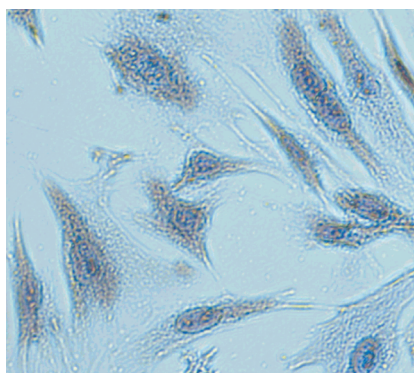


图 5 CD105 细胞膜表达阳性, 呈褐色(SP × 200)

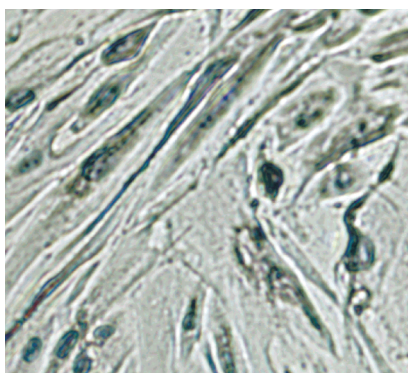


图 6 VEGFR-2 表达阳性, 细胞质有蓝褐色颗粒形成(SP × 200)

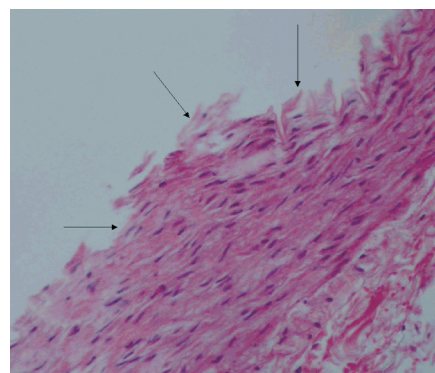


图 7 球囊损伤后即刻病理学检查示: 内皮层广泛破坏, 内皮细胞脱落(箭头, HE × 200)

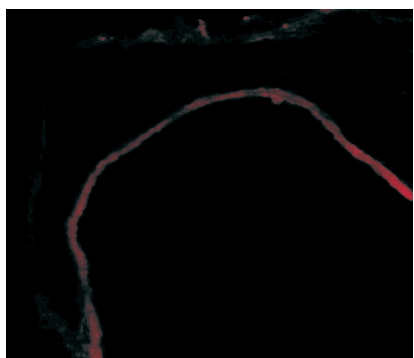


图 8 荧光标记检测显示荧光标记细胞移植后, 损伤血管内皮表面有强荧光表达(荧光 × 100)

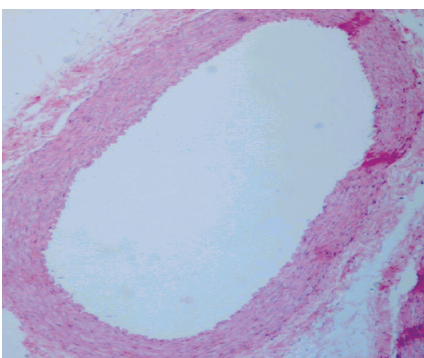


图 9 细胞移植后 4 周, 细胞移植组血管壁轻度增厚, 血管腔轻度狭窄(HE × 40)

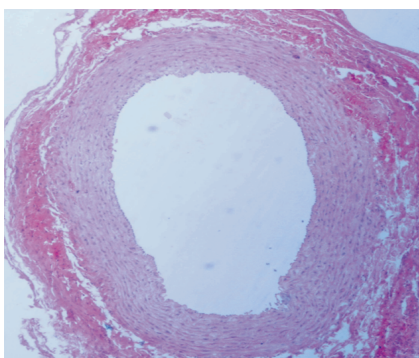


图 10 4 周后, 对照组血管壁增厚明显, 血管腔明显狭窄(HE × 40)

血管内皮在组织学上由紧贴血管腔的单层血管内皮细胞和内弹性膜组成。血管内皮不仅具有屏障功能, 而且具有重要的内分泌功能, 血管内皮的改变与诸多疾病的发生、发展有密切联系。血管内皮细胞是血管内皮的主要组成部分, 在维持血管稳态中起重要作用。它位于循环血液与血管壁内皮下组织之间, 衬于心血管内表面, 是血管壁与血液间的分界细胞。内皮细胞不仅是一种机械屏障, 也是一种多功能细胞, 其生物学功能有: ①对血管平滑肌舒缩及生长具调节作用; ②参与血小板功能调

节; ③屏障作用; ④信息传递作用^[3,4]。

血管内皮细胞的损伤、丢失及功能障碍是血管性疾病的重要始动因素, 也是 PTA 术后再狭窄的重要病理生理步骤。通过建立以血管内皮损伤为主要病理学特征的动物模型, 研究如何逆转失调的内皮功能, 进而达到血管性疾病的防治目的, 遂成为多种血管损伤性疾病防治的新趋势^[5-7]。

EPC 也称血管内皮干细胞, 是血管内皮细胞的前体细胞, 由 Asahara 等^[8]于 1997 年首次从出生后人外周血中分离并证实具有分化为血管内皮细胞

功能的前体细胞。EPC 可导致血管内皮形成的潜在机制是通过 EPC 分化成 EC 或增加生长因子激活局部成熟的 EC。EPC 进入体内后,对损伤的血管内皮有特异的靶向性,其高增殖潜能、定向归巢特性以及自体移植无毒性、无免疫反应等特点,又使其成为基因治疗的理想靶细胞。内皮细胞损伤也是血管介入治疗后再狭窄病理过程的重要环节,目前,再狭窄仍是影响动脉血管介入治疗疗效的主要并发症。通过细胞移植促进受损血管内皮细胞的修复和再生,也就成为防治再狭窄的重要研究方向。Werner 等^[9]研究发现,如果将体外培养的 EPC 从外周静脉注入到颈动脉球囊损伤后的小鼠体内,术后 14 d 行免疫组化检测,发现移植组 EPC 集中到受损伤血管的局部,其损伤血管的内皮覆盖率明显高于对照组。Griese 等^[10]通过分离兔外周血 EPC,进行体外培养并转染标记基因 LacZ,然后再种植到球囊损伤后的兔颈动脉局部 4 d 后扫描电镜观察,发现受损血管 60%面积有内皮覆盖,而对照组则少于 5%。而移植 4 周后检查,发现细胞移植组受损血管 70%被 LacZ 标记的内皮细胞覆盖,对照组少于 57%。提示 EPC 研究对预防和治疗 PTA 术后再狭窄具有重要的临床应用价值。

在本研究中,对损伤血管局部移植组荧光标记 EPC 后 4 d,病理组织学检测显示损伤血管内皮表面也有强荧光表达。证明通过介入灌注导管局部移植血管内皮祖细胞,可靶向集中到受损血管内皮面,进行修复作用。细胞移植后 4 周,病理学检测发现细胞移植组损伤后血管内膜部分被修复,假性内膜形成及中膜平滑肌层增厚程度较轻,与对照组血管壁厚度有明显的统计学差异,说明 EPC 防治 PTA 术的再狭窄是可行的。

介入放射学由于其微创性和高度的靶向性,在细胞移植及基因治疗的前沿医学治疗中有重要的应用前景。现已有成功应用 EPC 携带扩血管基因降低肺动脉性高血压的研究,避免了为将腺病毒载体注入局部动脉时所需的开胸手术,并可消除重组蛋

白或基因治疗直接全身应用所伴随的不良反应用^[11]。本研究再次证明,介入局部移植 EPC,对于防治血管球囊成形术后再狭窄的形成,具有重要的作用和临床应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] John F, Keaney Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction[J] Mol Asp Med, 2000, 21: 99 - 166.
- [2] Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease[J] Clin Chim Acta, 2006, 368: 33 - 47.
- [3] 马占龙, 滕皋军. 血管内皮祖细胞的研究及其在介入治疗中的应用前景[J] 中国介入影像与治疗学, 2006, 3: 153 - 155.
- [4] Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, et al. Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis[J] Pharmacol Therapeut, 2006, 111: 508 - 531.
- [5] Domenico P. Antioxidants and endothelium protection (Review)[J] Atherosclerosis, 2005, 181: 215 - 224.
- [6] Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis (Review)[J] J Mol Med, 2004, 82: 671 - 677.
- [7] Liew A, Barry F, O'Brien T. Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations[J] Bioessays, 2006, 28: 261 - 270.
- [8] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J] Science, 1997, 275: 964 - 967.
- [9] 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: e17 - e24.
- [10] Griese DP, Ehsan A, Melo LG, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy[J] Circulation, 2003, 108: 2710 - 2715.
- [11] Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, et al. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease[J] Circ Res, 2005, 96: 442 - 445.

(收稿日期 2006-11-29)