

· 实验研究 Experimental research ·

脐带血干细胞移植对兔糖尿病后肢血管病变介入术后支架内再狭窄的影响

丁海霞, 王富军, 马红芳, 杜亚萍, 齐会卿, 丁娟

【摘要】 目的 观察脐带血干细胞移植对糖尿病实验兔后肢血管病变血管内介入术后支架内再狭窄的影响。**方法** 制备糖尿病后肢血管病变兔模型 22 只, 随机分成 A 组($n=8$, 介入术联合脐带血干细胞移植)、B 组($n=8$, 单纯介入术)、C 组($n=6$, 未治疗干预)、D 组($n=6$, 未制模, 为正常对照)。采用酶联免疫吸附试验分别测定血清血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)和血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)水平, 苏木精-伊红染色测定新生内膜面积及内膜面积与中膜面积比值。**结果** 治疗后 A 组 VE-cadherin 和 Lp-PLA2 水平明显低于 B、C 组(P 均 <0.01), 与 D 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。A 组兔股动脉有轻度内膜中断和增生, 弹力膜轻度断裂; A 组内膜面积、内膜面积与中膜面积比值均显著小于 B、C 组(P 均 <0.05), 与 D 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 脐带血干细胞移植可有效保护血管内介入术后血管内皮损伤, 预防术后支架内再狭窄。

【关键词】 脐带血干细胞; 支架内再狭窄; 血管内介入治疗; 糖尿病血管病变

中图分类号: R528.1 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2016)-08-0695-04

The effect of umbilical cord blood stem cell transplantation on the in-stent restenosis after intervention therapy for diabetic vascular diseases in experimental rabbits DING Hai-xia, WANG Fu-jun, MA Hong-fang, DU Ya-ping, QI Hui-qing, DING Juan. Department of Endocrinology, Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province 050011, China

Corresponding author: WANG Fu-jun, E-mail: wangfujun139@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of umbilical cord blood stem cell transplantation on the in-stent restenosis (ISR) after intervention therapy for diabetic vascular diseases in experimental rabbits. **Methods** A total of 22 rabbit models with diabetic hind limb vascular diseases were prepared. The rabbits were randomly divided into group A ($n=8$, receiving umbilical cord blood stem cell transplantation together with interventional therapy), group B ($n=8$, receiving interventional therapy only), group C ($n=6$, receiving no intervention) and group D ($n=6$, not being prepared, used as normal control group). Using enzyme linked immunosorbent assay, the levels of vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) and lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) were separately measured; HE staining was used to determine the newly-grown intimal area as well as the ratio of membrane area to medium area. **Results** After treatment, the levels of VE-cadherin and Lp-PLA2 in group A were significantly lower than those in group B and group C (both $P<0.01$), while no statistically significant differences in the levels of VE-cadherin and Lp-PLA2 existed between group A and group D ($P>0.05$). In the rabbits of group A, mild intimal disruption and proliferation, and slight fracture of elastic membrane of the femoral artery could be observed; both the newly-grown intimal area and the ratio of membrane area to medium area of group A were significantly smaller than those of group B and group C (both $P<0.05$), although the difference between group A and group D was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** Umbilical cord

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.08.012

基金项目: 河北省卫生计生委医学科学研究课题计划项目(20150760)

作者单位: 050011 石家庄 河北医科大学第四医院内分泌科

通信作者: 王富军 E-mail: wangfujun139@126.com.

blood stem cell transplantation can effectively protect vascular endothelium from injuries caused by endovascular intervention procedure and prevent the occurrence of postoperative ISR. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 695-698)

【Key words】 umbilical cord blood stem cell; in-stent restenosis; endovascular intervention therapy; diabetic vascular disease

近年糖尿病下肢血管病变发病率逐年升高,而血管内介入治疗以创伤小、立竿见影效果等优势逐渐成为下肢血管病变不可或缺的治疗方法。介入治疗后支架内再狭窄(in-stent restenosis, ISR)也成为影响远期预后的主要原因。支架技术不断进步使得再狭窄率逐渐下降,但仍有报道提示药物洗脱支架再狭窄率达 20%^[1]。李菁等^[2]报道采用巴曲酶联合阿司匹林预防 50 例糖尿病下肢血管病变患者介入术后 ISR,观察 12 个月后再狭窄率为 28.9%。上述药物和非药物方法尚缺乏大规模临床应用研究基础^[3],如何预防 ISR 发生仍是目前研究重点。以往研究显示 ISR 与内皮细胞功能受损后一系列炎症反应有关^[4],干细胞移植可促进血管新生,保护血管内皮细胞功能。脐带血富含造血干细胞、间充质干细胞及内皮祖细胞,可用于治疗糖尿病周围神经血管病变^[5-8]。本研究构建糖尿病后肢血管病变兔模型,在介入治疗后局部注入人脐带血干细胞(hUCBSC),观察 hUCBSC 对 ISR 危险因素血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)、脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)和动脉局部内膜增殖的影响,为临床防治介入术后 ISR 提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验器材

实验器材包括 28 只体重为(2.3±0.5) kg 的健康雄性新西兰大白兔(河北医科大学动物实验中心提供)、淋巴细胞分离液(密度 1.077 g/ml,天津灏洋生物制品科技公司)、酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(北京华夏远洋科技公司)、RT-6000 型 450 nm 全自动酶标仪(美国 Rayto 公司)、兔后肢动脉腔内扩张用 3 mm×40 mm 球囊(美国 Medtronic 公司)、倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)和 QWin Plus 图像分析软件(德国 Leica 公司)。

1.2 hUCBSC 混悬液制备

足月分娩健康产妇(乙型肝炎病毒标志、艾滋病、梅毒抗体等检测阴性)脐带血由石家庄市妇产医院提供,产妇及家属均签署知情同意书,实验方案经医院医学伦理委员会批准。取新鲜脐带血(6 h 内用毕),用磷酸缓冲液(PBS)等倍稀释后置于

50 ml 离心管中,按 1:1 比例加至人淋巴细胞分离液,4℃、2 000 r/min 离心 20 min 后脐带血分 5 层,中间白膜层即为单个核细胞;用移液器小心吸取富含单个核细胞的悬液放入另一离心管内,4℃、1 000 r/min 离心 15 min, PBS 洗涤 3 次;用低糖 DMEM 培养液悬浮,计数细胞浓度为 5×10^5 /ml, hUCBSC 混悬液制备成功。

1.3 糖尿病后肢血管病变兔模型制作

取 22 只大白兔,基础饲料适应性喂养 1 周,给予 100 g 高脂饲料喂养,配方为 2%胆固醇、1%脱氧胆酸钠、5%猪油、92%普通饲料;第 5 周所有动物禁食 16 h(不禁水),经耳缘静脉一次性快速注射链脲佐菌素(STZ)60 mg/kg 造模,造模后 1、2 周分别空腹采血 1 次,及时分离血清并测定空腹血糖(FBG),以 $\text{FBG} \geq 11.0 \text{ mmol/L}$ 为糖尿病造模成功;以 3%戊巴比妥 1 ml/kg 静脉注射麻醉,于右侧腹股沟搏动处暴露股动脉,无血管分支处用 7 号手术线绕股动脉轻轻结扎(注意不要完全结扎),缝合切口,术后肌内注射青霉素 20 万 U/只;1 周后静脉注射牛血清白蛋白(250 mg/kg),继续喂养高脂饲料共 12 周。造模完成后随机分为 3 组,8 只接受介入术联合脐带血干细胞移植(A 组),8 只接受单纯介入术(B 组),6 只未接受治疗干预(C 组);另取 6 只未制模健康兔,作为正常对照组(D 组)。

1.4 模型兔介入术及脐带血干细胞移植

A 组 8 只兔以 3%戊巴比妥 1 ml/kg 静脉麻醉,手术开始即给予肝素(200 U/kg)耳缘静脉注射抗凝,股动脉近心端穿刺成功后送入 3 mm×40 mm 球囊至股动脉,12 个大气压充盈球囊持续 3 min,血管夹封闭股动脉近端和远端后撤出球囊,缝合股动脉;恢复血流后于股动脉近心端注入制备好的 hUCBSC 混悬液约 0.5 ml,术后缝合穿刺点。B 组 8 只仅作右后肢股动脉穿刺及球囊扩张术,同时注射等量 PBS 作为对照。经耳缘静脉注射肝素($200 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)抗凝,同时肌内注射青霉素预防感染,连续 3 d。

1.5 VE-cadherin 和 Lp-PLA2 水平测定

hUCBSC 移植前及移植后 4 周分别采集外周血,采用 ELISA 技术分别测定血清 VE-cadherin 和血浆 Lp-PLA2 水平。

1.6 组织病理学观察

hUCBSC 移植后 4 周,全身麻醉下分离各组实验兔右后肢股动脉并留取标本,4%多聚甲醛固定、石蜡包埋后作横断面切片,常规苏木精-伊红(HE)染色;采集图像后通过图像分析软件测定新生内膜面积、中膜面积及内膜面积与中膜面积比值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件作统计学分析。组间比较用方差分析(F 检验)和非参数检验,组内差异作 t 检验两两比较,自身治疗前后用配对 T 检验比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

ELISA 测定结果见表 1、2。A、B、C 组间血清 VE-cadherin 水平和血浆 Lp-PLA2 水平在实验兔造模前无明显差别,造模后均明显高于 D 组;A 组术后 4 周两指标较术前明显下降,低于同期 B 组和 C 组(P 均 < 0.01),与 D 组比较差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 手术前后各组血清 VE-cadherin 水平变化

组别	VE-cadherin 水平/($\mu\text{g}/\text{ml}$)		t 值	P 值
	术前	术后 4 周		
A 组($n=8$)	3.314 \pm 0.213 ^d	1.630 \pm 0.115 ^{bc}	24.142	0.000
B 组($n=8$)	3.241 \pm 0.139 ^d	5.593 \pm 0.148 ^{acd}	-7.489	0.000
C 组($n=6$)	3.368 \pm 0.232 ^d	3.372 \pm 0.233 ^{abd}	-1.000	0.361
D 组($n=6$)	1.616 \pm 0.143	1.623 \pm 0.140	-0.091	0.931
F 值	130.52	180.57		
P 值	0.000	0.000		

注:^a与 A 组相比, $P < 0.01$;^b与 B 组相比, $P < 0.01$;^c与 C 组相比, $P < 0.01$;^d与 D 组相比, $P < 0.01$

表 2 手术前后各组血浆 Lp-PLA2 水平变化

组别	Lp-PLA2 水平(ng/ml)		t 值	P 值
	术前	术后 4 周		
A 组($n=8$)	251.910 \pm 3.198 ^d	195.901 \pm 1.615 ^{bc}	62.848	0.000
B 组($n=8$)	250.219 \pm 5.163 ^d	312.693 \pm 1.756 ^{acd}	-17.346	0.000
C 组($n=6$)	247.803 \pm 5.508 ^d	247.802 \pm 4.924 ^{abd}	0.007	0.995
D 组($n=6$)	195.675 \pm 1.954	196.708 \pm 1.803	-0.685	0.524
F 值	262.220	503.822		
P 值	0.000	0.000		

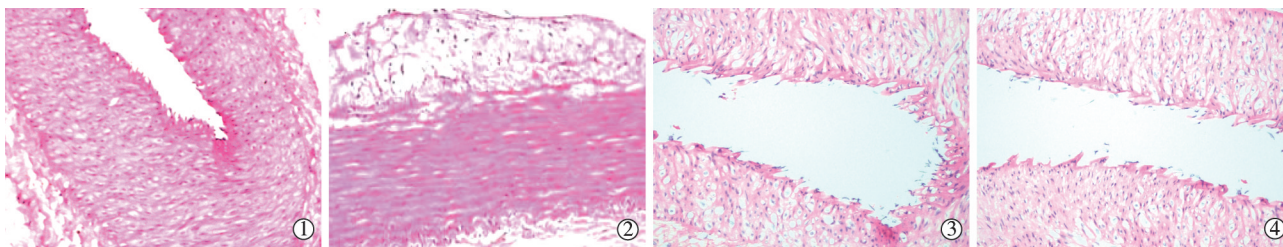
注:^a与 A 组相比, $P < 0.01$;^b与 B 组相比, $P < 0.01$;^c与 C 组相比, $P < 0.01$;^d与 D 组相比, $P < 0.01$

组织病理学观察结果见图 1、表 3。术后 4 周,A 组兔股动脉有轻度内膜中断和增生,弹力膜轻度断裂;B 组股动脉内膜连续性中断,内膜增生明显,弹力膜断裂明显;C 组股动脉内膜纤维帽增厚,其下可见大量泡沫细胞,中膜平滑肌排列紊乱;D 组兔股动脉内膜完整,弹力膜连续,无断裂。A 组、D 组内膜面积、内膜面积与中膜面积比值均显著小于 B、C 组(P 均 < 0.05)。

表 3 手术后各组股动脉内膜面积、中膜面积及内膜面积与中膜面积比值变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	股动脉内膜面积/ mm^2	中膜面积/ mm^2	内膜面积与中膜面积比值
A 组($n=8$)	0.035 \pm 0.007 ^{bcd}	0.245 \pm 0.018 ^d	0.143 \pm 0.038 ^{bcd}
B 组($n=8$)	0.601 \pm 0.030 ^{acd}	0.238 \pm 0.023 ^d	2.564 \pm 0.345 ^{acd}
C 组($n=6$)	0.857 \pm 0.031 ^{abd}	0.253 \pm 0.030 ^d	3.340 \pm 0.284 ^{abd}
D 组($n=6$)	0	0.206 \pm 0.013	0
F 值/ X^2 值	28.789	5.543	27.567
P 值	0.000	0.005	0.000

注:^a与 A 组相比, $P < 0.01$;^b与 B 组相比, $P < 0.01$;^c与 C 组相比, $P < 0.01$;^d与 D 组相比, $P < 0.05$



①D 组(正常对照)兔股动脉内膜完整,无增生,无断裂;②术后 4 周 C 组(未治疗干预)股动脉内膜纤维帽增厚,其下可见大量泡沫细胞,中膜平滑肌排列紊乱;③术后 4 周 B 组(单纯介入术)股动脉内膜连续性中断,内膜增生明显,弹力膜断裂明显;④术后 4 周 A 组(介入术联合脐带血干细胞移植)兔股动脉有轻度内膜中断和增生,弹力膜轻度断裂

图 1 组织病理学观察结果

3 讨论

血管内介入治疗具有创伤小、简便易行、成功率高、疗效确切等优点,已成为目前治疗糖尿病下肢血管病变的主要手段,但术后 ISR 严重影响远期疗效。ISR 基本机制包括血小板、白细胞、巨噬细胞聚集,

进一步导致平滑肌细胞迁移、增殖;近期研究发现,约 1/3 ISR 是由于支架内发生了新的动脉粥样硬化。这两种观点提示一共同机制,即有炎症反应参与其中^[4]。因此,如何防止和减少介入术后炎症反应发生是预防 ISR 关键。干细胞移植治疗糖尿病下

肢神经血管病变已在临床广泛应用,疗效确切^[5,9-10]。但介入治疗中局部应用干细胞移植是否有内皮细胞保护作用,即促进介入治疗所致内膜损伤修复,抑制炎症反应,防止介入治疗后 ISR 等作用,却少见报道。干细胞主要来源于骨髓、外周血及脐带血,而 hUCBSC 资源丰富,抗原性弱,免疫排斥反应低,成为异体干细胞移植首选。本研究通过制作糖尿病后肢血管病变兔模型和介入治疗后局部注入 hUCBSC 实验发现,ISR 危险因素 VE-cadherin、Lp-PLA2 水平较单纯介入术组明显下降,与正常对照组差异无明显统计学意义,股动脉内膜显示轻度增生。

VE-cadherin 是血管内皮细胞特异性钙黏蛋白,也是血管内皮细胞黏附连接的主要黏附蛋白^[11]。研究显示可溶性 VE-cadherin 水平可间接推断是否存在血管内皮细胞损伤^[12]。有报道通过免疫组织化学方法研究 VE-cadherin 在血管中的表达,发现 VE-cadherin 在动脉粥样硬化血管壁全层均有表达,而在无粥样硬化动脉管壁上只在外膜和中膜表达^[13]。Lp-PLA2 是近年引起广泛关注的一种与动脉硬化密切相关的磷脂酶 A2 超家族成员,其从炎症细胞中产生和释放,被认为是一种新的炎症标记物和独立危险因素;其在血管壁内产生氧化分子,更易于导致动脉粥样硬化和产生不稳定性斑块;其水平升高预示有斑块形成和破裂危险性很大,且参与动脉粥样硬化发生发展过程,与心血管疾病进展密切相关^[14]。本研究结果显示,糖尿病下肢血管病变兔模型 VE-cadherin、Lp-PLA2 水平均高于正常对照组,与上述研究结果一致;介入治疗后上述两指标明显增高,说明介入治疗的确损伤血管内皮细胞功能,导致新的动脉粥样硬化,从而发生 ISR;介入治疗联合 hUCBSC 移植后上述两指标明显下降并接近正常,提示 hUCBSC 移植可有效干预内皮损伤后炎症反应并预防 ISR,组织病理学检查发现动脉内膜轻度增生进一步证明其有效性。采用药物和非药物方法控制介入治疗后 ISR 相关因素,如糖尿病、吸烟、高血脂等,也同样重要^[15]。

综上所述,血管内介入术联合脐带血干细胞移植可有效预防介入治疗后血管内皮损伤,为 ISR 预防提供了一种新方法。

[参考文献]

- [1] Pan J, Lu Z, Zhang J, et al. Angiographic patterns of in-stent restenosis classified by computed tomography in patients with drug-eluting stents: correlation with invasive coronary angiography[J]. Eur Radiol, 2013, 23: 101-107.
- [2] 李菁,王珏,朱悦琦,等. 巴曲酶联合阿司匹林预防糖尿病下肢缺血病变介入术后再狭窄的疗效分析[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 865-869.
- [3] 王燕,段峰,李志伟,等. 预防血管内支架植入术后再狭窄的研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2011, 20: 665-668.
- [4] Park SJ, Kang SJ, Virmani R, et al. In-stent neoatherosclerosis: a final common pathway of late stent failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59: 2051-2057.
- [5] 彭艳,程培,徐勇. 脐血内皮祖细胞尾静脉与局部注射治疗糖尿病下肢缺血[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15: 3499-3502.
- [6] 秦汉林,贺克武,高斌,等. 血管成形与脐带干细胞移植治疗糖尿病足: 3 个月血管造影评价[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17: 2544-2551.
- [7] 彭艳,徐玲,徐勇. 脐血内皮祖细胞治疗糖尿病大鼠下肢缺血的实验研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 21: 76-79.
- [8] 王富军,杜亚萍,丁海霞,等. 人脐血干细胞对兔后肢动脉球囊损伤后内膜增殖和内皮功能的影响[J]. 中华细胞与干细胞杂志·电子版, 2015, 5: 87-91.
- [9] 杨华强,李东升,杜玲,等. 脐血干细胞移植在糖尿病足治疗中的应用: 附二例报告[J]. 中国全科医学, 2010, 13: 2551-2553.
- [10] Shrestha C, Zhao L, Chen K, et al. Enhanced healing of diabetic wounds by subcutaneous administration of human umbilical cord derived stem cells and their conditioned media[J]. Int J Endocrinol, 2013, 2013: 592454.
- [11] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability[J]. J Cell Sci, 2008, 121: 2115-2122.
- [12] Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, et al. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 2286-2297.
- [13] Bobryshev YV, Cherian SM, Inder SJ, et al. Neovascular expression of VE-cadherin in human atherosclerotic arteries and its relation to intimal inflammation[J]. Cardiovasc Res, 1999, 43: 1003-1017.
- [14] Liu J, Wang W, Qi Y, et al. Association between the lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and the progression of subclinical atherosclerosis[J]. J Atheroscler Thromb, 2014, 21: 532-542.
- [15] 潘春仰,邱建平,陆林,等. 冠状动脉介入治疗后支架内再狭窄相关因素[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 467-471.

(收稿日期:2015-10-26)

(本文编辑:边伟)