

·实验研究 Experimental research·

CM-DiI 标记兔内皮祖细胞在腰椎终板下缺血区归巢研究

侯昌龙, 杨建勇, 庄文权, 谭国胜, 许 军

【摘要】 目的 探讨碳花青荧光染料(CM-DiI)标记的自体骨髓内皮祖细胞(EPC)在兔终板下椎体缺血模型归巢和治疗效果。**方法** 分次抽取 48 只模型兔骨髓,分离出 EPC 并以 CM-DiI 标记计数;随机分成两组,A 组($n=24$)经腰动脉途径自体移植 CM-DiI 标记 EPC,B 组($n=24$)经耳缘静脉途径自体移植,每兔移植 EPC 4×10^6 个。C 组($n=18$)模型兔未抽髓,为空白对照。移植术后 7 d、1 个月荧光显微镜下观察 A、B 组 EPC 归巢与血管生成,术后 1、2、3 个月对兔缺血椎体作 MR 检查,分析 3 组椎体缺血区血管计数变化。**结果** A 组移植术后 7 d 红色荧光标记的 EPC 在终板下椎体缺血区归巢,术后 1 个月局部血管形成,术后 1、2、3 个月 MRI 显示缺血区小血管数逐渐增多,缺血区信号逐渐恢复正常,相应椎间盘未见退变表现;B、C 组未见 EPC 归巢,血管计数逐渐减少。单因素方差分析(ANOVA)显示 A 组术后 1、2、3 个月血管计数稳步增加,缺血区血管生成、血管数逐渐增多,均优于 B 组、C 组($P<0.05$);最小显著性差异(LSD)法两两多重比较显示,A 组每一时点血管计数均优于 B 组、C 组($P<0.05$)。**结论** 经腰动脉自体移植 EPC 可在终板下椎体缺血区归巢并使血管形成,预防缺血所致椎间盘退变相关疾病。

【关键词】 兔椎体缺血模型;磁共振成像;内皮祖细胞;腰动脉;归巢;血管生成

中图分类号:R681.53 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2019)-04-0353-05

Experimental study on the homing of CM-DiI-labeled rabbit endothelial progenitor cells in sub-endplate ischemic area of lumbar vertebrae HOU Changlong, YANG Jianyong, ZHUANG Wenquan, TAN Guosheng, XU Jun. Department of Intervention, First Affiliated Hospital, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui Province 230061, China

Corresponding author: HOU Changlong, E-mail: houchangl@163.com

【Abstract】 Objective To explore the homing of autologous bone marrow endothelial progenitor cells (EPC) labeled with CM-DiI in sub-endplate ischemic area of lumbar vertebrae in experimental rabbits, and to assess its curative effect. **Methods** Bone marrow was extracted from 48 rabbit models, EPC was isolated and labeled with CM-DiI, the cells were counted. The rabbits were randomly divided into group A ($n=24$) and group B ($n=24$). Auto-transplantation of CM-DiI-labeled EPC was performed via lumbar artery pathway in the rabbits of group A, and via auricular vein pathway in the rabbits of group B. The amount of transplanted EPC for each rabbit was 4×10^6 cells. Other 18 rabbit models, used as blank control group (group C), didn't receive bone marrow extraction. Seven days and one month after transplantation, the EPC homing and angiogenesis in group A and Group B were examined under fluorescence microscope. One, 2 and 3 months after treatment, MRI was performed to check the ischemic vertebral bodies of experimental rabbits. The changes of blood vessel count within ischemic area of vertebral body in 3 groups were analyzed. **Results** In group A, homing of red fluorescent labeled-EPC to sub-endplate ischemic area was observed 7 days after transplantation, and local vascularization was seen one month after transplantation. One, 2 and 3 months after treatment, MRI revealed that the number of small vessels in ischemic area was increased gradually, the

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2019.04.012

基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2012Z186)

作者单位:230061 合肥 中国科学技术大学附属第一医院(西区)介入科(侯昌龙、许 军);中山大学附属第一医院介入放射科(杨建勇、庄文权、谭国胜)

通信作者:侯昌龙 E-mail: houchangl@163.com

signal of ischemic area gradually returned to normal, while the corresponding discs showed no degeneration changes. In group B and group C, no homing of EPC was observed, and the number of small vessels in ischemic area was decreased gradually. Single factor variance analysis (ANOVA) indicated that in group A the number of blood vessels was increased slowly but surely within 3 months after treatment, in ischemic area angiogenesis was observed and the number of small vessels was gradually increased, all the above manifestations were significantly better than those in both group B and group C ($P<0.05$). Pairwise multiple comparison by using minimum significant difference (LSD) method showed that the blood vessel count determined at each time point in group A was better than that in both group B and group C ($P<0.05$).

Conclusion In experimental rabbits, auto-transplanted EPC via lumbar artery pathway can get homing in the sub-endplate ischemic area of vertebrae and can also promote angiogenesis, which is of value for the prevention of ischemia-caused intervertebral disc degeneration and its related disorders. (J Intervent Radiol, 2019, 28; 353-357)

【Key words】 rabbit vertebral ischemia model; magnetic resonance imaging; endothelial progenitor cell; lumbar artery; homing; angiogenesis

大量研究证实软骨终板弥散功能是椎间盘营养供给的重要途径,软骨终板损伤、终板下微循环障碍是导致椎间盘退变的重要因素^[1-2]。目前椎间盘退变研究多集中于脊柱力学改变模型,对终板下微循环障碍所致缺血性椎间盘退变研究较少^[3-4]。本研究通过构建新西兰大白兔椎体终板下缺血模型分离、培养模型兔血管内皮祖细胞(EPC)并用碳花青荧光染料(CM-DiI)标记后以不同方式自体移植入模型兔体内,采用荧光显像镜观察 EPC 在终板下缺血区归巢、分化及新生血管形成情况,网状纤维染色血管计数及 MRI 评价 EPC 移植对防治椎间盘退变相关疾病的效果。

1 材料与方法

1.1 主要实验器材

新西兰大白兔 66 只,平均体重($3\ 500\pm 20$) g,雌雄不限(中山大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK 粤 2008-0002);胎牛血清(FBS,杭州四季青生物工程材料公司);EGM-2 BulletKit 培养基及生长因子套装(美国 Sigma 公司);CellTracker™CM-DiI(美国 Molecular Probes 公司);BX-51 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);网状纤维染色液(厦门迈威生物科技公司);GE3.0T MRI 扫描仪、DSA 机(美国通用公司)。

1.2 实验动物分组与不同处理

根据本中心前期实验方法^[5]构建兔椎体终板下缺血模型。分次抽取 48 只模型兔骨髓,分离出 EPC 并以 CM-DiI 标记计数;随机分成两组,A 组($n=24$)经腰动脉途径自体移植 CM-DiI 标记 EPC,B 组($n=24$)经耳缘静脉途径自体移植,每兔移植 EPC

4×10^6 个。C 组($n=18$)模型兔未抽髓,为空白对照。

1.3 模型兔 EPC 制备

无菌条件下将 48 只模型兔分次用戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉全身麻醉,15 G 骨髓穿刺针分别穿刺股骨大转子以下 1 cm 和胫骨平台以下 1 cm 处采集骨髓(每只取 5~15 mL),依次标记骨髓样本并与抽骨髓兔对应,模型兔外周血单个核细胞以 Ficoll 密度梯度离心法获得;单个核细胞培养第 7 日和第 14 日分别作细胞计数;培养第 9 日,细胞中加入 CM-DiI 孵育,荧光显微镜下观察细胞生长和染色情况,2 h 内完成细胞移植。

1.4 不同细胞移植途径建立

A 组模型兔禁食 24 h,戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉全身麻醉,仰卧位固定于 DSA 手术台上;Seldinger 技术穿刺股动脉,沿导丝引入球囊导管至腹主动脉下端,球囊导管远端置于双侧髂总动脉分叉上方约 1 cm 处,扩张球囊阻断腹主动脉血流后作造影[碘普罗胺(300 mg I/mL)3 mL,流速 0.5 mL/s,球囊完全扩张压力为 4~5 atm(1 atm=101.325 kPa),球囊阻断时间 60 s],清楚显示腰动脉;球囊导管调整至第 5 腰动脉开口附近,扩张球囊阻断血流后缓慢手推造影,第 5 腰动脉显影而其它血管未显示时即设为 CM-DiI 标记 EPC 注射速度(约 0.1 mL/s),每兔移植 CM-DiI 标记 EPC 4×10^6 个;术中注意观察动物生命体征,术后拔管、缝合,每只兔肌内注射庆大霉素(4 万 U/d)持续 3 d。B 组兔经耳缘静脉注射移植相同数量 CM-DiI 标记 EPC,C 组经耳缘静脉注入相同体积 0.9%氯化钠溶液。

1.5 椎体冷冻切片制作和荧光观察

空气栓塞法处死模型兔,取出缺血模型 L5 椎

体,修剪成 2 cm×2 cm×1 cm 大小;冷冻切片后,镜下观察感兴趣区移植细胞荧光显示情况。

1.6 MRI 检查和网状纤维染色

模型兔 EPC 移植术后 1、2、3 个月对兔缺血椎体作 MR 检查(T1WI;TE 12 ms,TR 540 ms,FOV 200 mm,层厚 2~3 mm;T2WI;TE 100 ms,TR 1 900 ms)。每次检查每组随机取 6 只兔处死,血管网状纤维染色后,2 位经验丰富的病理科医师高倍镜下作小血管(毛细血管、微动脉)计数评估。

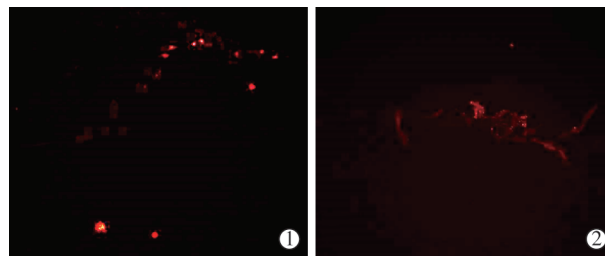
1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件统计分析实验数据。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性多个样本均数间比较用单因素方差分析(ANOVA),组间总体方差检验有显著性差异时以最小显著性差异(LSD)法进一步作组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 椎体冷冻切片 CM-DiI 荧光检测

CM-DiI 标记 EPC 移植后椎体冰冻切片荧光观察显示,A 组术后 7 d 可见缺血椎体中散在荧光显示,1 个月时红色荧光开始弥散,局部形成小管腔样结构(图 1);相同时点在 A 组其它椎体及 B 组均未见荧光显示。



①移植术后 7 d,EPC 在终板下缺血区归巢呈散在荧光(200×);②术后 30 d,EPC 在缺血区形成血管结构(200×)

图 1 EPC 移植后体内荧光检测

2.2 网状纤维血管计数检测

EPC 移植术后不同时点(1、2、3 个月)血管计数结果见表 1。A 组术后缺血终板下椎体中小血管计数随时间延长逐渐增多,B 组、C 组椎体中小血管计数逐渐减少,至术后 3 个月椎体管腔内和管壁细胞进一步减少、消失(图 2)。表 2、表 3 分别显示 3 组间各时点血管计数比较、各组内不同时点血管计数比较。

表 1 各组血管计数组间和组内 ANOVA 结果 $n=12, \bar{x} \pm s$

组别	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月	F 值	P 值
A 组	7.80±1.03	9.30±0.68	10.90±0.74	34.887	<0.05
B 组	5.10±0.74	4.30±0.83	3.20±1.03	16.914	<0.05
C 组	4.80±0.63	4.30±0.68	3.00±0.82	22.638	<0.05
F 值	40.724	157.343	267.234		
P 值	<0.05	<0.05	<0.05		

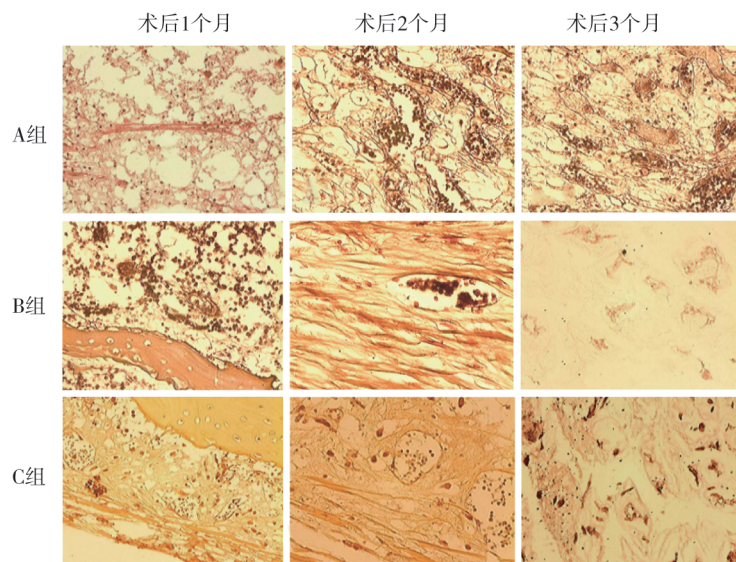


图 2 EPC 移植术后 3 组血管网状纤维染色计数图(200×)

2.3 术后 MRI 表现

术后 1 个月时,A 组实验兔压脂(FS)-T1WI 椎体终板下低信号有所增高,接近正常椎体信号,FS-T2WI 椎体终板下高信号减低,但仍高于正常椎体,相应椎间盘未见异常信号(图 3);B 组、C 组 FS-T1WI

椎体终板下低信号区未见明显改变,FS-T2WI 椎体终板下仍呈高信号,相应椎间盘开始出现异常信号。移植术后 2 个月时,A 组 FS-T1WI 椎体终板下低信号基本消失,与同层面正常椎体相近,FS-T2WI 椎体终板下高信号亦减低至等信号,相应椎间盘未

表 2 术后组间各时点血管计数 LSD 法多重比较 $n=12$

时间	组别 (I)	组别 (J)	均值差 (I-J)	标准误	P 值	95%CI
术后 1 个月	A 组	B 组	2.70	0.36	<0.05	1.95~3.45
		C 组	3.00	0.37	<0.05	2.25~3.75
	B 组	C 组	0.30	0.36	0.42	-0.45~1.05
术后 2 个月	A 组	B 组	5.00	0.33	<0.05	4.33~5.67
		C 组	5.00	0.32	<0.05	4.33~5.67
	B 组	C 组	0.00	0.32	1.00	-0.67~0.67
术后 3 个月	A 组	B 组	7.70	0.39	<0.05	6.90~8.50
		C 组	7.90	0.39	<0.05	7.10~8.70
	B 组	C 组	0.20	0.39	0.61	-0.60~1.00

表 3 术后组内各时点血管计数 LSD 法多重比较 $n=12$

组别	月数(I)	月数(J)	均值差 (I-J)	标准误	P 值	95%CI
A 组	1 个月	2 个月	-1.50	0.37	<0.05	-2.26~-0.74
		3 个月	-3.10	0.37	<0.05	-3.86~-2.34
	2 个月	3 个月	-1.60	0.37	<0.05	-2.36~-0.84
B 组	1 个月	2 个月	0.20	0.35	0.58	-0.54~0.94
		3 个月	1.90	0.35	<0.05	1.16~2.64
	2 个月	3 个月	1.70	0.35	<0.05	0.96~2.44
C 组	1 个月	2 个月	-0.20	0.31	0.53	-0.84~0.44
		3 个月	1.70	0.31	<0.05	1.06~2.34
	2 个月	3 个月	1.90	0.31	<0.05	1.26~2.54

见退变异常信号(图 3);B 组、C 组 FS-T1WI 椎体终板下低信号存在,FS-T2WI 椎体终板下仍为高信号,相应椎间盘退变异常信号更明显。移植术后 3 个月时,A 组实验兔 FS-T1WI 椎体终板下低信号完全消失,FS-T2WI 椎体终板下原高信号区恢复至与相邻

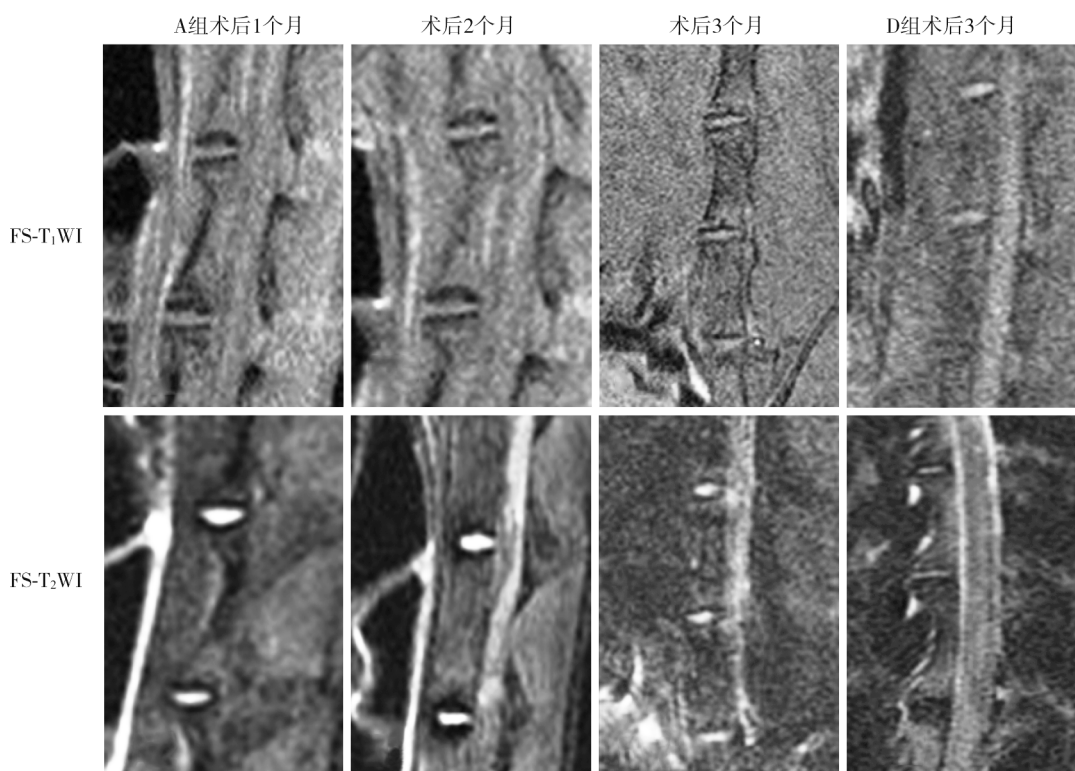
椎体基本一致的等信号,相应椎间盘未见退变异常信号,与同层面椎间盘信号基本一致,B 组、C 组实验 FS-T1WI 椎体终板下低信号、FS-T2WI 椎体终板下原高信号存在,对应椎间盘 FS-T1WI 和 FS-T2WI 均为更明显低信号(图 3)。

2.4 统计学分析结果

ANOVA 分析显示 A 组术后 1、2、3 月血管计数稳步增加,缺血区血管生成、血管数逐渐增多,均优于 B 组、C 组($P<0.05$);LSD 法两两多重比较显示,A 组每一时点血管计数均优于 B 组、C 组($P<0.05$)。

3 讨论

Asahara 等^[6]1997 年首次报道体外分离血管 EPC 成功,同时体内证实其血管生成能力。此后 EPC 研究受到国内外学者普遍关注^[7-8]。有研究证实缺血性椎间盘退变模型中通过移植骨髓或外周血单个核细胞可明显增强椎体内血管再生,主要机制是其中含有的 EPC 能直接参与血管再生^[9]。EPC 可分化成不同的内皮系细胞,参与新血管生成,疗效与其数量和纯度呈正相关^[10]。本研究在兔缺血性椎间盘退变模型中移植体外培养的自体 CM-DiI 标记的 EPC,以促进终板下缺血椎体内微血管生长,取得了良好结果。首先,采用兔骨髓源 EPC 并在体外分离、培养和鉴定,可明显增加 EPC 细胞数量,同时大幅

**图 3** A 组、B 组 EPC 移植术后 MR 影像

度提高细胞纯度,从而满足移植治疗需要;其次,EPC 细胞在体外作 CM-DiI 标记,移植后可清楚地示踪细胞在椎体内归巢部位,有效证实 EPC 在终板下缺血椎体内直接参与微血管再生。

体内 EPC 在细胞因子作用下运动至特定部位的现象称为归巢,其机制目前尚不明确。有研究显示归巢可能与组织缺血致体内细胞因子和趋化因子如血管内皮细胞生长因子(VEGF)等释放增多有关^[11]。

研究显示 CM-DiI 标记 EPC 在组织内可清楚地示踪显示长达 3 个月^[12],本研究选择 CM-DiI 作为 EPC 在体内的荧光标记物。本研究显示移植相同 EPC 细胞数(4×10^6 个)时,A 组术后 7 d 时可见 EPC 在椎体缺血区归巢,1 个月时即可形成新生血管结构,B 组未见此现象,表明不同移植途径影响 EPC 归巢和血管形成。其原因可能在于经腰动脉途径移植时椎体缺血区局部 EPC 浓度高,终板下椎体缺血区分泌促归巢相关细胞因子对 EPC 作用强度明显高于经静脉途径移植时,相应地 A 组模型兔单个 EPC 受到作用次数也会多于 B 组(EPC 二次循环),易于归巢。本研究网状纤维染色血管计数结果进一步证实 A 组模型兔终板下椎体缺血区内血管计数在术后 1~3 个月内稳步增加,提示缺血区血管生成,而 B 组、C 组终板下缺血椎体血管数逐渐减少,血管结构逐渐破坏,甚至消失;LSD 法组间两两时点血管计数比较结果显示,A 组椎体缺血区内血管计数在相同时点均明显优于 B 组、C 组($P < 0.05$);单因素方差分析进一步证实,A 组不同时点血管计数总体差异有统计学意义($F = 34.887, P < 0.05$),表明经腰动脉途径移植 EPC 可在短时间内促进椎体缺血区新生血管生成。

本研究在每次血管计数处死动物前作椎体和椎间盘 MR 检查,结果显示 A 组终板下缺血区 FS-T1WI、FS-T2WI 信号随 EPC 在终板下缺血区归巢和血管形成而逐渐恢复正常,表明 EPC 经腰动脉移植后于终板下椎体缺血区归巢、分化可促进微血管生成,改善终板下椎体和椎间盘血供,防止椎间盘退变发生;B 组、C 组终板下椎体缺血症状逐渐加重,术后 2 个月时椎间盘呈现典型退变表现,并随时间延长进一步加重,表明 EPC 经耳缘静脉移植可能不适宜于椎体终板下缺血所致椎间盘退变治疗。

综上所述,经腰动脉自体移植 EPC 可在终板下椎体缺血区归巢并使血管形成,预防缺血所致椎间盘退变相关疾病。经耳缘静脉移植相同数量 EPC 未

显示对兔椎体终板下缺血有治疗效果,椎间盘退变程度与空白对照组无差异。本研究将 EPC 治疗缺血性疾病领域拓展到终板下椎体缺血治疗,为腰椎退变的终板下缺血机制和 EPC 移植疗效作了探索性初步研究,期望为临床治疗椎间盘退变后相关疾病提供新途径。

[参 考 文 献]

- [1] Zhu Q, Gao X, Levene HB, et al. Influences of nutrition supply and pathways on the degenerative patterns in human intervertebral disc[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2016, 41: 568-576.
- [2] Elabd C, Centeno CJ, Schultz JR, et al. Intra-discal injection of autologous, hypoxic cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in five patients with chronic lower back pain: a long-term safety and feasibility study[J]. J Transl Med, 2016, 14: 253.
- [3] Martin JT, Gorth DJ, Beattie EE, et al. Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration[J]. J Orthop Res, 2013, 31: 1276-1282.
- [4] 王伟,盛娜萍,江永焰,等. X 线引导下针刺诱导兔椎间盘退行改变的研究[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 1021-1026.
- [5] 侯昌龙,杨建勇,庄文权,等. 制作兔腰终板下缺血模型 MRI 与病理学变化验证的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14: 280-284.
- [6] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275: 964-967.
- [7] Lanuti P, Rotta G, Almic C, et al. Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood[J]. Cytometry A, 2016, 89: 259-270.
- [8] Scacciatella P, D'Amico M, Pennone M, et al. Effects of EPC capture stent and CD34⁺ mobilization in acute myocardial infarction[J]. Minerva Cardioangiol, 2013, 61: 211-219.
- [9] Tilling L, Chowienzyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells[J]. Br J Clin Pharmacol, 2009, 68: 484-492.
- [10] 陈立强,蒙仲猛,陈应明,等. 新西兰兔终板下椎骨注射平阳霉素后椎骨及椎间盘病理学研究[J]. 影像诊断与介入放射学, 2018, 37: 52-59.
- [11] Zhu Z, Chen G, Li X, et al. Endothelial progenitor cells homing to the orthotopic implanted liver tumor of nude mice[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32: 675-679.
- [12] 赵春松,邹海强,李晓波,等. CM-DiI 标记人骨髓间充质干细胞并检测其移植后产生脑源性神经营养因子的实验研究[J]. 首都医科大学学报, 2017, 38: 423-430.

(收稿日期:2018-07-31)

(本文编辑:边 皓)