

自体骨髓单个核细胞移植促进移植静脉桥血管再内皮化及抑制内膜增生

高 岩,吴宗贵*,梁 春,肖海军

(第二军医大学长征医院心内科,上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨自体骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNCs)移植对自体静脉移植后静脉桥血管再内皮化及内膜增生的作用。**方法:**抽取成年兔骨髓分离制备 BMMNCs,并用 DAPI 进行体外标记。将成年新西兰大白兔 23 只随机分为细胞移植组($n=13$)和对照组($n=10$)2 组。取左颈外静脉 4~5 cm,上下倒置后移植至颈总动脉,在建模后第 3 天将 100 μ l DAPI 标记的 BMMNCs 液(6×10^8 个细胞)经耳缘静脉注入细胞移植组动物体内,对照组注入等量的 PBS 液。细胞移植 4 周后处死动物,计算机图像分析系统测量并计算静脉移植段血管内皮的完整性及内膜厚度。**结果:**移植静脉血管内皮有 DAPI 标记的细胞;细胞移植后,细胞移植组移植血管内皮细胞覆盖程度明显高于对照组($P < 0.05$),内膜厚度明显低于对照组($P < 0.05$)。**结论:**自体 BMMNCs 的移植可以促进移植静脉桥血管的再内皮化及抑制内膜的过度增生。

[关键词] 骨髓单个核细胞;细胞移植;静脉移植;内皮,血管;细胞内膜

[中图分类号] R 543.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0016-03

Auto-bone marrow mononuclear cells transplantation accelerates reendothelialization and inhibits neointima formation in vein grafts

GAO Yan, WU Zong-gui*, LIANG Chun, XIAO Hai-jun (Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To assess the effect of auto-bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) transplantation on reendothelialization and neointima formation in vein grafts. **Methods:** BMMNCs were extracted from the bone marrows of adult rabbit under sterile environment and were labelled with DAPI before transplanted into vein grafts. Twenty adult rabbits were randomly divided into 2 groups: BMMNCs transplantation group (group I, $n=10$) and PBS transplantation group (group II, $n=10$). The left external jugular vein of 20 rabbits were harvested and transplanted between ipsilateral common carotid artery (AVG). Three days later, animals in group I were transplanted with BMMNCs (6×10^8 cells)/100 μ l via periotic veins and those in group II were injected with 100 μ l PBS. Animals were killed 4 weeks later and graft veins were harvested to observe the reendothelialization and the thickness of vein grafts. **Results:** We found that the transplanted cells survived and were incorporated into the endothelium of vein grafts in group I. The endothelium integrity of the vein grafts in group I was significantly better than that of group II. The intima thickness of vein grafts in group I was significantly thicker than that of group II. **Conclusion:** BMMNCs transplantation therapy may improve reendothelialization of the vein graft and inhibits intimal hyperplasi the vein graft.

[KEY WORDS] bone marrow mononuclear cells; cell transplantation; vein grafts; endothelium, vascular; intracellular membranes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 16-18]

自体静脉移植 (autogenous vein graft, AVG) 是治疗动脉闭塞性疾病的主要方法,但移植静脉内膜增生 (intimal hyperplasia, IH) 导致的再狭窄使远期通畅率仅为 40%~60%,常需再次手术治疗^[1]。静脉移植后再狭窄的原因是血管内皮细胞损伤及内膜的过度增生。最近的研究发现修复移植段血管内皮损伤的细胞来源于循环血中的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs)^[2]。已有研究证明移植 EPCs 可以促进球囊损伤后血管内皮的再内皮化及抑制内膜的增生^[3-4]。骨髓作为巨大的干细胞库, EPCs 的含量明显高于外周血^[5]。骨髓单个核细胞 (bone marrow mononuclear cells, BMMNCs) 移植

是由 EPCs 移植派生出的一种血管治疗新方法^[6],具有技术简单可行性强的优点。本实验拟观察移植自体 BMMNCs 对 AVGs 血管内皮的修复作用及抑制新生内膜增殖作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组与模型制作 新西兰大白兔 23 只 (中国科学院上海实验动物中心) 体质量 2.0~2.5 kg,随机分为细胞移植组 ($n=13$) 和对照组 ($n=10$) 2

[作者简介] 高 岩,博士,主治医师. E-mail: gaoyanmd@126.com

* Corresponding author. E-mail: zgwu@medmail.com.cn

组。3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,颈前正中切口,游离出左侧颈外静脉及颈总动脉,在颈总动脉的上下两端,用无创血管夹阻断血流后,横断血管,取左侧的颈外静脉4~5 cm,上下倒置后,移植于同侧颈总动脉之间,以9-0缝线采用间断外翻法行端端吻合。检查吻合口无渗血后,用青霉素粉撒于创面,缝合伤口。

1.2 兔BMMNCs标记和移植 细胞移植组于血管移植术后3 d抽取兔骨髓4~6 ml,以骨髓:PBS为1:2体积稀释。先将密度为 1.077 淋巴细胞分离液(购自奇康公司)加入无菌试管,再将稀释的骨髓沿管壁缓慢注入该试管使骨髓浮于淋巴细胞分离液液面之上,二者体积比为5:3,以 $2\ 000\ \text{r/min}$ ($r=20\ \text{cm}$)水平离心20 min。离心后管内液体分为4层,吸取中间白雾状细胞层即为单个核细胞层,再用PBS反复洗涤两次,吹匀制成细胞悬液。将终浓度为 $50\ \mu\text{g/ml}$ 的DAPI(DAPI是一种荧光染料,可与BMMNCs内DNA双链及微管蛋白结合发出蓝色荧光;购自奇康公司),加入细胞悬液, 37°C 培养箱中温育45 min。再用PBS反复洗涤2次,冲洗去未结合的DAPI。荧光显微镜下观察细胞染色率95%,制成细胞悬液 $100\ \mu\text{l}$ (6×10^8 个细胞),经耳缘静脉注入体内。对照组经耳缘静脉注入 $100\ \mu\text{l}$ PBS液。

1.3 移植细胞的示踪 于细胞移植后28 d,空气栓塞法处死。在细胞移植组随机取3只动物,取移植段的血管液氮固定后作 $5\ \mu\text{m}$ 厚的连续冰冻切片,室温下丙酮固定10 min,PBS冲洗置片于湿盒内分别加抗兔Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体(购自福州迈新公司), 37°C ,30 min以PBS洗切片,分别加FITC标记的山羊抗鼠IgG(购自北京中山公司), 37°C 30 min以PBS洗切片缓冲甘油封片,荧光共聚焦显微镜下观察。移植入的骨髓来源的细胞为细胞核蓝色荧光染色,血管内皮细胞胞质为绿色荧光染色。

1.4 移植血管内皮完整性测定 细胞植入后28 d同样方法处死动物,每组分别随机取5只动物,游离出移植血管,并向管腔内灌注1%伊文斯蓝(Sigma公司)后,用生理盐水灌注冲洗干净。处死动物,取出移植血管纵行切开、铺平固定后,蓝染色为内皮脱落部分,用黑色墨水在透明纸上仔细描出移植血管内皮伊文斯蓝染色部分和血管轮廓后,置于计算机图像分析系统测量内皮脱落部分面积,并计算出内皮脱落部分面积占血管腔内总面积的百分比。

1.5 移植血管内膜厚度检测 于细胞植入后28 d,同样方法处死动物,每组分别随机取5只动物分离左侧颈总动脉为留取移植中段血管(因AVG术后移植

静脉狭窄主要因静脉血管处于动脉环境导致血管内皮损伤所致内膜过度增生,为了避免制作模型中因手术操作损伤吻合口血管内皮产生的影响因素,故取移植血管中段)。生理盐水冲洗干净后,常规石蜡包埋。切片,H-E染色。拍片后经计算机图像分析系统测量内膜厚度,同时计算内膜/中膜比值。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 11.0软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 细胞移植的示踪 细胞移植组移植静脉桥血管内皮细胞与Ⅷ因子抗原多克隆抗体特异性结合并与有FITC标记的二抗结合在荧光显微镜下胞质呈绿色荧光,在呈绿色荧光染色的血管内皮中可见分布不均匀的散发蓝色荧光(DAPI标记细胞的细胞核),说明移植静脉的血管内皮中有移植入的DAPI标记的细胞表达(图1)。

2.2 移植段血管的内皮细胞覆盖程度 伊文斯蓝染色结果表明:细胞移植组内皮细胞覆盖率为(85.67 ± 11.58)%,明显高于对照组的(52.86 ± 7.89)%($P<0.05$)。

2.3 移植血管内膜的厚度 两组静脉移植术的血管均出现内膜增厚(图2),细胞移植组的内膜厚度、中膜厚度及内/中膜比值分别为(54.85 ± 12.18) μm 、(73.09 ± 9.43) μm 、(0.76 ± 0.24),对照组分别为(132.21 ± 69.47) μm 、(89.06 ± 13.24) μm 、(1.43 ± 0.57),细胞移植组内膜厚度和内/中膜比值明显低于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

以往研究表明,AVG术后移植静脉桥血管内皮早期及时有效的修复对抑制移植血管内膜增生及防止再狭窄有重要意义^[7]。目前防治AVG术后再狭窄多采用药物治疗的方法,效果并不令人满意。现很多实验研究通过移植自体或异体的EPCs促进机械损伤的血管内皮的再内皮化,从而达到抑制内膜过度增生,提高血管内皮功能及防治再狭窄的治疗目的^[4,8]。而应用干细胞移植防治AVG术后再狭窄目前未见相关报道。

本实验采用了移植BMMNCs的方法,在AVG术后早期植入BMMNCs,结果表明AVG早期移植BMMNCs能够对损伤部位的血管内皮的修复有促进作用并起到了抑制血管新生内膜过度增生的作用;而且在BMMNCs植入后28 d,移植静脉血管内皮中仍有植入细胞的表达。证实了AVG术后早期

移植 BMMNCs 对损伤部位的血管内皮的修复有促进作用并起到了抑制血管新生内膜过度增生的作

用,为进一步研究防治 AVG 术后再狭窄的治疗方法提供了新思路。

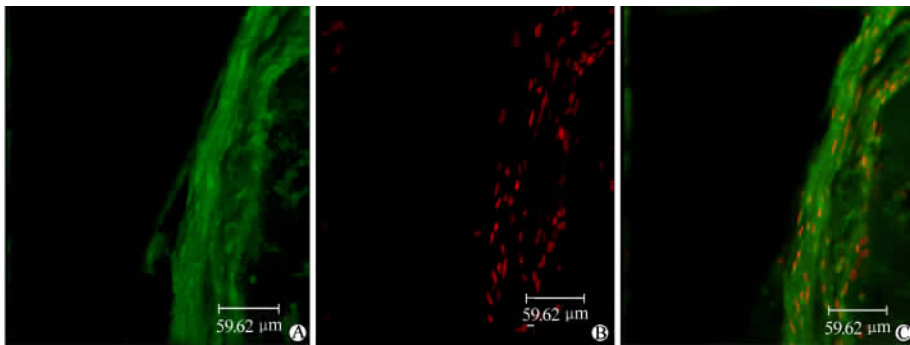


图 1 血管内皮细胞的免疫荧光染色

Fig 1 Immunofluorescent staining of vein grafts

A:Endothelial cells of vein grafts of rabbits in BMMNCs transplantation group with FITC-anti-Ⅷ factor;B:BMMNCs stained with DAPI in vein grafts;C:BMMNCs stained with DAPI were found in vein grafts

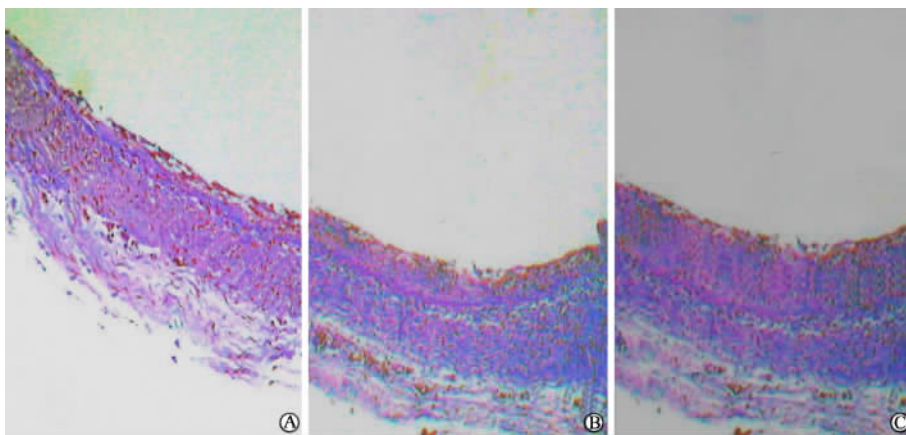


图 2 移植血管内膜光镜检测

Fig 2 Light micrograph of vein grafts intima(H-E, ×100)

A:Normal intima,before graft; B:The vein grafts of control group; C:The vein grafts of BMMNCs transplantation group

[参考文献]

[1] Motwani J G, Topol E G. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention[J]. Circulation, 1998, 97: 916-931.

[2] Xu Q, Zhang Z, Davison F, et al. Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in apoe-deficient mice[J]. Circ Res, 2003, 93: e76-e86.

[3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275: 964-967.

[4] 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.

[5] Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium en-

hances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines[J]. Circulation, 2001, 104: 1046-1052.

[6] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of post-natal neovascularization with autologous bone marrow transplantation[J]. Circulation, 2001, 103: 897-903.

[7] 张福先, 金英姬, 马佐田, 等. 自体静脉移植血管内皮细胞动态变化的研究[J]. 中华普通外科杂志, 2000, 15: 550-552.

[8] Fujiyama S, Amano K, Uehira K, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells[J]. Circ Res, 2003, 93: 980-989.

[收稿日期] 2006-09-27

[修回日期] 2006-12-06

[本文编辑] 孙岩