

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00282

静脉输注间充质干细胞可稳定动脉粥样硬化易损斑块

王双双¹, 杨升华¹, 王丽丽², 孔根现¹, 高玉龙¹, 蒋知新^{2*}

1. 南方医科大学研究生学院, 广州 510515

2. 解放军 305 医院中心实验室, 北京 100017

[摘要] **目的** 建立动脉粥样硬化易损斑块(VP)模型, 并静脉输注骨髓间充质干细胞(MSCs), 验证 MSCs 对 VP 稳定性的影响。**方法** 雄性新西兰兔 24 只, 随机分为 3 组, VP 组($n=8$)制作 VP 模型; VP+MSCs 组($n=8$)制作 VP 模型后即刻静脉输注 1×10^7 MSCs; SP 组($n=8$)制作稳定斑块模型。12 周末处死所有动物, 取右侧颈总动脉行 H-E 染色和 Masson 染色, 并测量纤维帽厚度和脂核横截面厚度的比值。行免疫组化染色检测斑块内基质金属蛋白酶 2(MMP-2)的含量。**结果** H-E 染色结果: VP 组斑块中心可见大量脂核, 斑块表面覆盖较薄纤维帽, 在斑块肩部可见残存泡沫细胞和大量炎细胞浸润, 部分斑块可见破裂及(或)血栓形成; SP 组镜下可见粥样硬化斑块形态结构完整, 纤维帽较厚, 斑块内炎细胞较少, 未见斑块破裂; VP+MSCs 组形态介于两者之间。帽/核比值 SP 组 > VP+MSCs 组 > VP 组, VP 组与 VP+MSCs 组和 SP 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。Masson 染色结果: SP 组平滑肌细胞和弹力纤维含量高于其他两组, VP+MSCs 组次之, VP 组最少。斑块内 MMP-2 表达水平: VP 组斑块内 MMP-2 大量表达, 主要位于纤维帽和脂质核心; 与 VP 组相比, VP+MSCs 组和 SP 组 MMP-2 的表达减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$); VP+MSCs 组 MMP-2 表达高于 SP 组($P < 0.01$)。**结论** MSCs 静脉输注干预兔 VP 模型, 可降低斑块不稳定性, 其机制可能与减少炎性细胞聚集、降低 MMP-2 含量、减少胶原纤维降解有关。

[关键词] 动脉粥样硬化; 易损斑块; 间质干细胞移植; 基质金属蛋白酶 2

[中图分类号] R 541.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)03-0282-04

Intravenous infusion of mesenchymal stem cells can stabilize vulnerable atherosclerotic plaque

WANG Shuang-shuang¹, YANG Sheng-hua¹, WANG Li-li², KONG Gen-xian¹, GAO Yu-long¹, JIANG Zhi-xin^{2*}

1. Postgraduate School, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

2. Central Laboratory, No. 305 Hospital of PLA, Beijing 100017, China

[Abstract] **Objective** To establish the vulnerable atherosclerotic plaque model with rabbits and treat them with intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), so as to verify the impact of MSCs on the stability of vulnerable plaque (VP). **Methods** Totally 24 healthy male New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups. Carotid vulnerable atherosclerotic plaque models were made with rabbits in VP group ($n=8$) and VP+MSCs group ($n=8$); VP+MSCs group was given intravenous infusion of 1×10^7 MSCs immediately after modeling and VP group was infused with phosphate buffer. Stable atherosclerosis plaque model was made with rabbit in SP group ($n=8$). Animals in all groups were sacrificed at the end of the 12th week, and the right common carotid arteries were collected and subjected to H-E staining and Masson staining, and the cap/core ratio of atherosclerotic plaque was measured. MMP-2 content was examined by immunohistochemistry. **Results** H-E staining. In VP group the plaque showed a large lipid core and thin fibrous cap, remnants of foam cells and many inflammatory cells were seen in the plaque shoulder, and some showed rupture plaques and/or thrombosis. In SP group, the structure of plaque was in integrity, with thick fibrous cap and fewer inflammatory cells, and with no plaque rupture. The plaque structure of VP+MSCs group was between those of the other two groups. The order of cap/core ratio was SP group > VP+MSCs group > VP group, with that of VP group being significantly different from those of the other two groups ($P < 0.01$). Masson staining. The contents of muscle fiber and elastic fiber were the highest in SP group, followed by VP+MSCs group, and then by VP group. The level of MMP-2 in VP group was significantly higher than those in the other two groups ($P < 0.01$), and that in VP+MSCs group was significantly higher than that in SP group ($P < 0.01$).

[收稿日期] 2012-12-08

[接受日期] 2013-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30971235). Supported by National Natural Science Foundation of China (30971235).

[作者简介] 王双双, 博士生. E-mail: huaizhenwang@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 010-63096367, E-mail: 658jsx@163.com

Conclusion Intravenous infusion of MSCs can improve the stability of plaques in VP rabbit model, which may be associated with the reduction of inflammatory cells and MMP-2 level, and the subsequent reduction of collagen fiber degradation.

[Key words] atherosclerosis; vulnerable plaques; mesenchymal stem cell transplantation; matrix metalloproteinase protease 2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(3): 282-285]

急性心脑血管事件包括急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)与缺血性脑卒中,已经成为中老年人致死率及致残率最高的疾病。动脉粥样硬化易损斑块(vulnerable plaque, VP)的破裂及继发血栓形成是其最根本的始动因素^[1]。而VP可能存在于身体各个部位,不可能完全依赖昂贵且局部的介入方法进行干预。骨髓间充质干细胞(MSCs)广泛存在于多种成体组织中,相对其他干细胞具有低免疫原性、多分化性、体外易培养等优点,已用于心肌梗死^[2]、肾移植^[3]、角膜损伤^[4]等多种疾病的治疗。本实验旨在研究静脉输注MSCs对VP稳定性的影响,并进一步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂 SPF级雄性新西兰大白兔购于北京绿洲动物中心。Masson染色试剂盒购于上海江莱生物科技有限公司,基质金属蛋白酶2(MMP-2)鼠抗兔抗体购于Millipore公司,SP超敏试剂盒购自北京康为世纪生物科技公司;高脂饲料(含1%胆固醇、3%猪油、15%蛋黄和81%普通饲料)购自北京科澳协力饲料有限公司;胎牛血清(FBS)、低糖细胞培养基(L-DMEM)购自Gibco公司。

1.2 MSCs的获取及培养 1个月龄兔麻醉后无菌条件下行股骨穿刺,以含肝素的注射器抽取骨髓5 mL,加入含15%FBS的L-DMEM完全培养基10 mL,混匀后置于37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱中培养。48 h后首次换液,以后每2~3 d换液一次,细胞融合率达80%~90%时,用适量0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化2 min,按1:2传代。选用生长状况良好的P3代细胞进行静脉移植。

1.3 动物分组及模型复制 新西兰雄兔24只(体重2~2.5 kg),随机分为3组,VP组($n=8$)和VP+MSCs组($n=8$)参照文献^[5]制作VP模型,兔适应性喂养1周后给予第1次右颈总动脉液氮冻伤术,随后高脂喂养8周,随即实施第2次右颈总动脉液氮冻伤术,VP+MSCs组术后即刻静脉输注 1×10^7 MSCs,VP组术后即刻静脉输注等容积PBS,之后2组均改为普通饲料喂养4周;SP组($n=8$)制作稳定斑块模型:兔首次液氮冻伤术后,再高脂喂养

8周,最后普通饲料喂养4周。

1.4 斑块H-E染色及帽/核比值测量 12周末处死所有动物,结束后将动物麻醉,取右侧颈总动脉约3.0 cm,置于生理盐水内轻轻漂洗,以10%中性甲醛溶液固定48 h,常规石蜡包埋,血管横截面作4 μ m厚连续切片,行H-E染色,光镜下观察斑块的组织结构形态。应用Image-Pro Plus图像分析软件采集分析图像,每个斑块至少取10处测量纤维帽厚度,取平均值,测量处包括最厚与最薄处,计算帽/核比值,即每个斑块纤维帽厚度与脂核横截面厚度的比值。

1.5 斑块Masson染色 切片厚度3 μ m,60~65℃烤片2 h;脱蜡,水化,Masson复合染色液染色5 min后冲洗;磷钼酸染色5 min,甩干;苯胺蓝染色5 min后蒸馏水稍冲;分化液分化2次后脱水,透明,封固。

1.6 免疫组化染色检测斑块内MMP-2含量 采用SP法,DAB显色,并设阴性对照(以PBS代替一抗),具体步骤参照SP超敏试剂盒说明书进行。以棕黄色颗粒状产物为阳性标记,每张切片在200倍光镜下,在斑块的肩部、基底部和纤维帽各随机选取2个视野并拍照,用Image-Pro Plus软件进行灰度扫描,分别测定抗MMP-2免疫沉淀物积分光密度值,取其平均值。

1.7 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对实验数据进行one-way ANOVA分析及LSD两两比较,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 形态学观察 24只兔子全部完成实验。VP组斑块中心可见大量脂核,斑块表面覆盖较薄纤维帽,在斑块肩部可见残存泡沫细胞和大量炎细胞浸润,部分斑块可见破裂及(或)血栓形成。SP组镜下可见粥样硬化斑块形态结构完整,纤维帽较厚,斑块内炎细胞较少,未见斑块破裂。VP+MSCs组形态介于两者之间。见图1A~1C。

2.2 斑块帽/核比值的变化 VP组斑块帽/核比值 $[(0.153 \pm 0.021)]$ 小于VP+MSCs组 $[(0.219 \pm 0.027)]$ 和SP组 $[(0.238 \pm 0.045)]$,差异有统计学意义($P < 0.01$);VP+MSCs组略低于SP组,但差异无统计学意义。

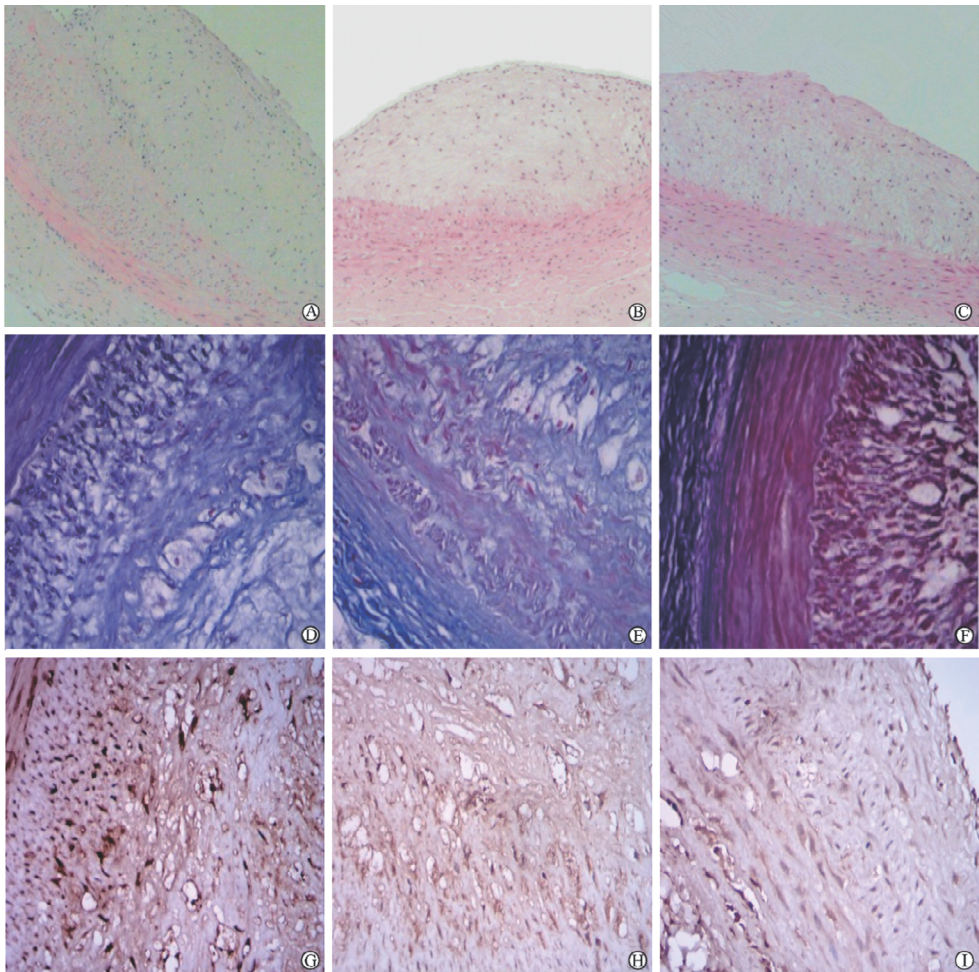


图 1 各组动脉粥样硬化斑块 H-E 染色(A-C)、Masson 染色(D-F)结果及斑块内 MMP-2 表达(G-I)

Fig 1 H-E staining (A-C), Masson staining (D-F) and MMP-2 expression (G-I) of atherosclerotic plaque in each group

MMP-2: Matrix metal proteinase 2. A,D,G: Vulnerable plaque (VP) group; B,E,H: VP+mesenchymal stem cells (MSCs) group; C,F,I: Stable plaque (SP) group. Original magnification: $\times 100$ (A-C); $\times 200$ (G-I); $\times 400$ (D-F)

2.3 斑块 Masson 染色结果 VP 组斑块内平滑肌细胞、弹力纤维量明显减少,胶原纤维排列紊乱;VP+MSCs 组斑块内平滑肌细胞和弹力纤维含量有所减少,胶原纤维含量较多;SP 组斑块内含有大量的平滑肌细胞和弹力纤维(图 1D~1F)。

2.4 各组斑块内 MMP-2 含量 VP 组斑块内大量表达 MMP-2,主要位于纤维帽和脂质核心;与 VP 组相比,VP+MSCs 组和 SP 两组 MMP-2 的表达减少,差异均有统计学意义(VP 组: 213.83 ± 40.24 , VP+MSCs 组: 138.79 ± 25.37 ; SP 组: 114.27 ± 21.49 ; $P < 0.01$);VP+MSCs 组 MMP-2 表达高于 SP 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1G~1I。

3 讨论

动脉粥样硬化斑块受到侵蚀或者激发可发生破裂,并继发血栓形成,从而导致临床心脑血管疾病

突发事件的发生。大量临床及病理资料表明,大部分的 ACS 是由 VP 的破裂而继发血栓引起。而炎症反应贯穿于 ACS 发生发展的各个过程。斑块内的炎症细胞及其分泌的促炎症因子可使斑块纤维帽变薄、脂核变大,导致 VP 表型的形成。其中, MMPs 被认为在斑块破裂过程中起着非常重要的作用^[6]。MMPs 是一类锌依赖性肽内切酶家族,几乎可以降解所有蛋白质和细胞外基质。在斑块内其主要由巨噬细胞和平滑肌细胞分泌,可特异降解动脉壁基膜的主要成分——IV 型胶原,从而导致斑块纤维帽变薄,进而破裂导致 ACS 发生。

近年来, MSCs 由于其多分化性、低免疫原性、易于体外分离培养而成为新的研究热点。MSCs 在体内主要通过分泌多种细胞因子发挥其生物学作用^[2,4],并在心肌梗死、肺损伤、腹膜炎等多种疾病的治疗中取得了突破性的进展^[7]。研究显示 MSCs

可以在损伤部位聚集并分化为受损细胞,进而发挥组织修复及疾病治疗作用^[8]。但最新研究显示,静脉移植 MSCs 的归巢及分化作用十分有限^[9]。因而,本实验通过静脉输注 MSCs 研究其对 VP 稳定性的影响,并探讨其作用机制。

本实验 H-E 染色结果可见 SP 组镜下粥样硬化斑块形态结构完整,有较厚纤维帽和较少炎细胞,斑块处于稳定状态。而 VP 组有较薄纤维帽和较大的脂核,平滑肌细胞及胶原含量较少,炎性细胞较多,斑块相对不稳定。与 VP 组相比,VP+MSCs 组斑块纤维帽较厚,斑块内炎细胞较少,斑块形态结构较完整,且未见斑块破裂或血栓形成,斑块处于相对稳定状态。炎性细胞含量是斑块稳定性的标志之一,静脉输注 MSCs 后可见 VP+MSCs 组斑块内炎性细胞含量明显减少,可能是 MSCs 通过分泌某些细胞因子抑制了炎性细胞的聚集,从而增加了斑块的稳定性,VP+MSCs 组和 SP 组帽/核比值均高于 VP 组。另外 Masson 染色进一步证实 VP 组斑块内平滑肌细胞和弹力纤维含量明显减少,胶原纤维形态较散乱,斑块相对易损;VP+MSCs 组斑块内平滑肌细胞和弹力纤维含量有所减少,胶原纤维含量较多,斑块处于较稳定状态;SP 组斑块内含有较多的平滑肌细胞和弹力纤维。提示 VP 模型静脉输注 MSCs 后可降低斑块破裂导致血管闭塞的可能性。

本实验显示 SP 组斑块内有少量 MMP-2 的表达,散在于斑块各处;VP 组的斑块内有大量 MMP-2 表达,主要集中于纤维帽及脂质核心,而 MSCs 静脉输注后 MMP-2 表达明显降低,这可能是 MSCs 稳定 VP 斑块的可能机制之一。大量研究表明 MSCs 在机体内可降低 MMPs 的合成及表达,Dixon 等^[10]发现在心肌梗死后应用 MSCs 可通过降低 MMPs 的合成从而抑制心室重构,Oh 等^[4]也发现角膜损伤后局部应用 MSCs 可降低 MMP-2 的表达从而产生抗血管增生作用,Lozito 等^[11]发现 MSCs 可通过分泌金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)抑制内源性及外源性 MMPs 的表达。而本实验中我们发现,静脉输注 MSCs 可降低不稳定斑块内 MMP-2 的表达,其机制可能是通过减少斑块局部炎性细胞的聚集及分泌,从而减少 MMP-2 的来源,也可能为 MSCs 进入机体后分泌 TIMPs 从而抑制 MMP-2 的表达,其具体机制有待进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Virmani R, Kolodgie F D, Burke A P, Farb A, Schwartz S M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 1262-1275.
- [2] Guo J, Lin G S, Bao C Y, Hu Z M, Hu M Y. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction [J]. *Inflammation*, 2007, 30(3-4): 97-104.
- [3] Seifert M, Stolk M, Polenz D, Volk H D. Detrimental effects of rat mesenchymal stromal cell pre-treatment in a model of acute kidney rejection [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 202.
- [4] Oh J Y, Kim M K, Shin M S, Lee H J, Ko J H, Wee W R, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury [J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 1047-1055.
- [5] Fang S M, Zhang Q H, Jiang Z X. Developing a novel rabbit model of atherosclerotic plaque rupture and thrombosis by cold-induced endothelial injury [J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 39.
- [6] Mountain D J, Freeman M B, Kirkpatrick S S, Cook R B, Chalk J E, Stevens S L, et al. Effect of hormone replacement therapy in matrix metalloproteinase expression and intimal hyperplasia development after vascular injury [J]. *Ann Vasc Surg*, 2012, pii: S0890-5096 (12) 00332-9.
- [7] Lee R H, Pulin A A, Seo M J, Kota D J, Ylostalo J, Larson B L, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 54-63.
- [8] Wang T, Sun S, Wan Z, Weil M H, Tang W. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction [J]. *Resuscitation*, 2012, 83: 1391-1396.
- [9] Prockop D J, Oh J Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation [J]. *Mol Ther*, 2012, 20: 14-20.
- [10] Dixon J A, Gorman R C, Stroud R E, Bouges S, Hirotsugu H, Gorman J H 3rd, et al. Mesenchymal cell transplantation and myocardial remodeling after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2009, 120: S220-S229.
- [11] Lozito T P, Tuan R S. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 385-396.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩