

间充质干细胞对血管痉挛的干预效果研究

左 杨 潘 瑾

西安医学院 陕西西安 710021

摘要: **目的:** 探究间充质干细胞对血管痉挛的干预效果。**方法:** 分离MSCs, 构建体外损伤血管模型, 据培养时间设24h、48h、72h三组, 每组均将MARs分别与MSCs、干细胞培养基和低糖培养基共培养, 比较各组及新鲜制取的MARs对KPSS溶液和PE的收缩反应差异判断干预效果。**结果:** 与MSCs共培养的MARs活性72h内均良好, 显著高于以另两种方式干预的MARs; PE浓度相同时与MSCs共培养72h内的MARs对过度收缩的反应性明显低于新鲜制取及以另两种方式培养的MARs。**结论:** MSCs对SD大鼠肠系膜动脉具有一定的活性保护及抗过度收缩作用。

关键词: 间充质干细胞; 肠系膜动脉; 血管痉挛

一、前言

血管痉挛主要表现为多因素作用下血管平滑肌的过度收缩, 各种代偿反应常引发血管痉挛性心绞痛等高风险并发症。

现阶段治疗血管痉挛性疾病的方法主要是给予适当的扩血管药物改善微循环, 一般只能暂时缓解症状, 长期用药还面临耐药性及副作用等问题。当前研究认为病理条件下血管过度收缩与管壁损伤^[1]有关, 因此亟需开发从修复组织损伤层面进行治疗的方法。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)能向损伤部位归巢和募集并参与血管内膜修复^[2], 这些特性使应用MSCs针对病灶的病理特征进行治疗成为可能。

本研究将SD大鼠肠系膜动脉制成血管环(mesenteric arterial rings, MARs)构建体外血管模型, 将MARs以与MSCs、干细胞培养基和低糖培养基共培养三种方式干预后, 比较各组MARs对KPSS溶液和苯肾上腺素所致收缩反应的差异来探究MSCs的干预效果。

二、材料与方法

1. 材料

干细胞培养基、低糖培养基、苯肾上腺素(PE)和Triton x-100购自普诺赛生命科技有限公司, PSS和KPSS溶液为本实验室使用购自南京化学试剂股份有限公司分析纯试剂配制。

SD大鼠, 雌雄各半, 体重 300 ± 50 g, 健康状况良好, 由西安交通大学实验动物中心提供, 所有实验程序

已获得西安医学院动物保护和使用委员会许可。

2. 药品配制

2.2.1 PSS溶液

NaCl 13.908g、KCl 0.686g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3744g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.488g、 NaHCO_3 2.52g、葡萄糖2.18g及氯化钙溶液3mL, 溶于2L去离子水。

2.2.2 KPSS溶液

NaCl 3.717g、KCl 4.47g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1872g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.244g、 NaHCO_3 1.26g、葡萄糖1.09g及氯化钙溶液3mL, 溶于2L去离子水。

3. 方法

(1) MSCs分离培养

暴露大鼠股骨, 两端钻孔暴露骨髓腔。冲出腔内细胞, 200目细胞筛过滤, 1000 rpm离心5min, 弃上清, 以 1×10^5 个/mL接种于10cm培养皿, 于5% CO_2 37℃培养48h后换液, 每2天换液除去未贴壁细胞, 细胞密度达80%后传代。

观察细胞生长过程中的形态变化, 取第五代细胞鉴定CD44和CD34抗体表达情况。

(2) 体外血管模型构建

剥离大鼠肠系膜动脉, 以0.1% Triton X-100冲洗管腔去除内皮并损伤内壁, 迅速用PSS溶液冲洗管腔, 将血管剪成3mm血管环。

(3) 分组及体外培养

设24h、48h、72h三组, 每组均设置三种培养方式, 包括将MARs分别与MSCs(干细胞培养基1mL, MSCs 1×10^5 个)、干细胞培养基(1mL)及低糖培养基(1mL)共培养, 每种均配置2段MARs, 进行干预效果检测时每组增设2段新鲜制取的MARs作为对照。

依分组将材料加入24孔板中, 5% CO_2 37℃培养至

基金项目: 西安医学院大学生创新创业计划训练项目; 项目编号: S202011840410

作者简介: 左杨, 男, 湖北黄石人, 就读于西安医学院, 专业: 药学

24h、48h和72h后取出各组MARs进行实验。

(4) 干预效果检测

将MARs挂于微血管张力仪传感器上, 恒温37℃, 通入95% O₂和5% CO₂, 记录血管张力。

在PSS溶液中稳定40min, 待基线稳定, 以0.5mN为步进给予预张力至2.0mN。以KPSS溶液预收缩检测活性, KPSS溶液引起MARs收缩张力超过4.0mN即说明活性良好。

换用PSS溶液稳定5min后加入PE, 使PE的终浓度为 1.0×10^{-7} mol/L, 比较各组MARs的张力变化及差异。张力稳定后重复以上操作使终浓度依次为 1.0×10^{-6} mol/L和 1.0×10^{-5} mol/L, 观察各组MARs的张力变化及差异。

换用PSS溶液稳定5min后使用KPSS溶液验证MARs活性。

三、结果

1. MSCs分离培养

形态学观察: 原代细胞大小不一, 48h后贴壁细胞增多, 呈短棒状。4天后部分细胞长轴化。10天后传代, 消化后约4h贴壁, 呈梭形。培养五代后细胞螺旋状排列生长, 大小形态均一, 呈长梭形。

抗体鉴定: 阴性对照组无着色, 实验组CD44表达水平高, CD34表达水平极低, 符合鼠MSCs的特征。

2. 体外血管模型构建

以KPSS溶液刺激, 新鲜制取的MARs张力为10.5mN左右; 24h组中, 与MSCs和干细胞培养基共培养的MARs张力为10.0mN左右, 与低糖培养基共培养的MARs张力为7.0mN左右; 48h组中, 与MSCs共培养的MARs的张力为10.0mN左右, 与干细胞培养共培养的MARs张力为8.5mN左右, 与低糖培养基共培养的MARs张力为4.5mN左右; 72h组中, 与MSCs共培养的MARs张力为9.5mN左右, 与干细胞培养基共培养的MARs张力为7.0mN左右, 与低糖培养基共培养的MARs张力无变化。该结果表明构建的血管模型活性满足要求。

3. 干预效果

与MSCs共培养MARs活性在72h内均与新鲜制取的相近; 与低糖培养基共培养的MARs体外培养至24h时活性明显低于前述二者, 72h后活性完全丧失; 与干细胞培养基共培养的MARs活性在24h内与新鲜制取的MARs相近, 培养至48h和72h后活性呈明显降低趋势。

PE浓度为 1.0×10^{-7} mol/L时, 均不发生收缩。PE浓度为 1.0×10^{-6} mol/L时, 新鲜制取的MARs张力曲线发生无规则起伏; 与MSCs共培养的MARs无明显反应; 与干细胞培养基共培养的MARs发生无规则收缩且较新鲜制取的MARs明显; 与低糖培养基共培养24h和48h

的MARs均发生与上述相似的无规则收缩。PE浓度为 1.0×10^{-5} mol/L时, 新鲜制取的MARs发生无规则收缩, 其幅度和频率较PE浓度为 1.0×10^{-6} mol/L时显著; 与MSCs共培养的MARs均发生无规则性收缩, 幅度和频率显著低于新鲜制取的MARs, 且24h组MARs的收缩幅度和频率与48h组相近, 弱于72h组; 以另两种方式培养24h和48h的MARs均发生无规则性收缩, 且幅度和频率相近, 较新鲜制取的MARs明显。

该结果表明本实验条件下MSCs对SD大鼠肠系膜动脉有一定活性保护和抗过度收缩作用, 且不依赖于干细胞培养基。

四、讨论

本研究成功分离培养MSCs并构建满足实验要求的血管模型, 加入PE后新鲜制取的MARs的张力变化证明本实验有效模拟了痉挛状态。PE通过激活磷酸肌醇-Ca²⁺信号系统产生IP₃分子, 动员Ca²⁺内流发挥缩血管作用。由于植物神经未深入肠系膜动脉的中层平滑肌, 其舒缩调节主要依赖平滑肌细胞间缝隙连接的完整性^[3], IP₃分子和Ca²⁺均经其发挥作用, 且缝隙连接阻断剂可浓度依赖性抑制PE收缩MARs的作用^[4]。本研究结果表明, 与MSCs共培养72h内的MARs活性与新鲜制取的MARs相近, 明显高于以另两种方式培养的MARs; PE浓度相同时, 与MSCs共培养72h内的MARs对过度收缩的反应性明显低于新鲜制取的和以另两种方式培养的MARs。因此本实验条件下MSCs对SD大鼠肠系膜动脉有一定活性保护和抗过度收缩所致痉挛的作用。

综上所述, 本研究初步验证了MSCs对损伤血管的活性具有一定的保护作用并可有效缓解平滑肌过度收缩所致血管痉挛, 这种干预效果可能与MSCs或其细胞产物对GJ构成了一定的影响有关。

参考文献:

[1]Rothoerl RD, Ringel F. Molecular mechanisms of cerebral vasospasm following aneurysmal SAH[J]. *Neurological Research*. 2007, 29(7):636-642.

[2]Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair[J]. *Nature Reviews Neurology*. 2015, 11(1):56-64.

[3]Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries[J]. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 1999, 128(8): 1788-1794.

[4]蒋丽萍, 韩小建, 卢慧敏, 洪涛. 缝隙连接在苯肾上腺素缩血管中的作用[J]. *中国药理学报*, 2003(12): 1358-1361.