

# 人脐带间充质干细胞过表达白细胞介素 8 受体可抑制炎症反应和促进血管修复

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2124>

朱兵兵, 何海斌, 邓江华, 王文强, 慕晓玲

2095-4344.2124

投稿日期: 2019-11-01

送审日期: 2019-11-12

采用日期: 2020-01-07

在线日期: 2020-08-10

中图分类号:

R459.9; R364.5; R318

文章编号:

2095-4344(2021)01-00061-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

### 文章特点—

过表达白细胞介素 8 受体的脐带间充质干细胞能够抑制损伤颈动脉的炎症反应, 促进损伤血管的再内皮化并抑制损伤血管新内膜增生。

### 细胞及重组腺病毒转染:

- (1) 培养原代人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) 与脐静脉内皮细胞 (hUVECs);
- (2) 转染含白细胞介素 8 重组腺病毒荧光载体。

### 实验动物分组及干预:

- (1) 建立 SD 大鼠颈动脉损伤模型, 随机分为 4 组: IL-8RA/B-hUCMSCs 组、IL-8RA/B-hUVECs 组、Null-hUCMSCs 组、对照组;
- (2) 术后 1, 3, 5 h 分别从尾静脉输入  $0.5 \times 10^6$  相应细胞 (500  $\mu$ L), 对照组输注同等剂量的生理盐水。

### 主要观察指标:

- (1) 30 min 后观测颈动脉血管内绿色荧光蛋白的表达;
- (2) 24 h 后 ELISA 测定血清中炎症因子和抗炎因子水平;
- (3) 24 h 后免疫组化观察中性粒细胞和单核/巨噬细胞的浸润;
- (4) 14 d 后伊文思蓝染色观察血管再内皮化及纤维化;
- (5) 28 d 后苏木精-伊红染色观察血管新内膜增生。

## 文题释义:

**脐带间充质干细胞:** 具有自我更新和多向分化潜能, 免受异体移植排斥反应, 通过旁分泌和自分泌作用释放多种生物活性因子, 抑制炎症反应, 进行免疫调节, 促进缺血组织的再生和修复。

**白细胞介素 8 受体:** 存在于多种细胞膜表面, 包括内皮细胞、上皮细胞、单核细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞和成纤维细胞等多种细胞, 当球囊损伤颈动脉后释放大量的白细胞介素 8, 白细胞介素 8 受体能够与白细胞介素 8 结合, 继而产生一系列生物学反应。

## 摘要

**背景:** 血管损伤是球囊扩张术后常见的并发症, 脐带间充质干细胞的发展为治疗血管损伤提供了新方法。

**目的:** 探讨转染白细胞介素 8 受体 (IL-8RA/B) 腺病毒的人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 修复损伤血管的机制。

**方法:** 培养原代人脐带间充质干细胞与脐静脉内皮细胞, 转染含白细胞介素 8 重组腺病毒荧光载体。建立大鼠颈动脉损伤模型, 将 SD 大鼠随机分为 4 组: IL-8RA/B-hUCMSCs 组、IL-8RA/B-hUVECs 组、Null-hUCMSCs 组、对照组, 手术后 1, 3, 5 h 分别从尾静脉输入  $0.5 \times 10^6$  相应细胞 (500  $\mu$ L), 对照组输注同等剂量的生理盐水, 30 min 后取颈动脉血管, 观测绿色荧光蛋白的表达; 24 h 后采用 ELISA 测定血清中炎症因子和抗炎因子水平; 24 h 后采用免疫组化观察中性粒细胞和单核/巨噬细胞的浸润; 14 d 后伊文思蓝染色观察血管再内皮化及纤维化; 28 d 后采用苏木精-伊红染色观察血管新内膜增生。

**结果与结论:** ① 移植细胞后 30 min, 观察到损伤血管内膜有绿色荧光蛋白的表达, IL-8RA/B-hUCMSCs 组荧光表达量高于其他 3 组; ② 移植细胞后 24 h, IL-8RA/B-hUCMSCs 组血清中炎症因子水平明显低于其他 3 组, 而抗炎因子白细胞介素 10 水平高于其他 3 组 ( $P < 0.05$ ), 并且 IL-8RA/B-hUCMSCs 组炎症细胞浸润明显减少; ③ 移植细胞后 14 d, 过表达白细胞介素 8 受体的 hUCMSCs 促进损伤血管再内皮化, 减少血管纤维化; ④ 移植细胞后 28 d, IL-8RA/B-hUCMSCs 明显减少损伤血管新内膜增生; ⑤ 结果表明, 白细胞介素 8 受体提高 hUCMSCs 的靶向归巢能力, 使 hUCMSCs 能定向迁移至血管损伤部位, 抑制炎症, 促进血管再内皮化, 减少新内膜增生, 促进血管修复。

**关键词:** 人脐带间充质干细胞; 白细胞介素 8 受体; 血管损伤; 炎症因子; 血管内皮

**缩略语:** 人脐带间充质干细胞: human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs; 人脐静脉内皮细胞: human umbilical vein endothelial cells, hUVECs; 白细胞介素 8: interleukin-8, IL-8

## Human umbilical cord mesenchymal stem cells overexpressing interleukin 8 receptor inhibit inflammation and promote vascular repair

Zhu Bingbing, He Haibin, Deng Jianghua, Wang Wenqiang, Mu Xiaoling

School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Zhu Bingbing, Master candidate, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

**Corresponding author:** Mu Xiaoling, MD, Professor, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

石河子大学医学院, 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

第一作者: 朱兵兵, 女, 1995 年生, 新疆维吾尔自治区沙湾县人, 汉族, 在读硕士, 主要从事干细胞的基础与应用研究。

通讯作者: 慕晓玲, 博士, 教授, 石河子大学医学院, 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

<https://orcid.org/0000-0003-3713-7468> (朱兵兵)

**基金资助:** 新疆兵团社会发展科技攻关与成果转化计划 (2016AD013), 项目负责人: 慕晓玲; 自治区研究生教育创新计划科研创新项目 (XJGRI201604), 项目负责人: 慕晓玲

引用本文: 朱兵兵, 何海斌, 邓江华, 王文强, 慕晓玲. 人脐带间充质干细胞过表达白细胞介素 8 受体可抑制炎症反应和促进血管修复 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(1):61-66.



## Abstract

**BACKGROUND:** Vascular injury is a common complication after balloon dilatation. The development of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) provides a new method for treating vascular injury.

**OBJECTIVE:** To investigate the mechanism underlying the repair of damaged blood vessels by human UC-MSCs (hUC-MSCs) transfected with interleukin-8RA/B (IL-8RA/B) adenovirus.

**METHODS:** hUC-MSCs and human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) were collected and transfected with adenovirus vectors containing human IL-8RA and/or IL-8RB cDNAs and green fluorescent protein. A rat model of carotid artery injury was established. Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: IL-8RA/B-hUCMSCs group, IL-8ra/B-hUVECs group, Null-hUCMSCs group, and control group, followed by injection of  $0.5 \times 10^6$  corresponding cells (500  $\mu$ L) and same volume of normal saline via the tail vein respectively at 1, 3, and 5 hours post-surgery. After 30 minutes of injection, the carotid artery was taken and the expression of green fluorescent protein was observed. After 24 hours, the serum levels of inflammatory and anti-inflammatory factors were measured by ELISA; and the infiltration of neutrophil cells and mononuclear macrophages was observed by immunohistochemistry. After 14 days, Evans blue staining was used to observe vascular endothelialization and fibrosis. After 28 days, the neointimal hyperplasia was observed by hematoxylin-eosin staining.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) After 30 minutes of IL-8RA/B-hUC-MSCs infusion, the expression of green fluorescent protein was observed in the injured vascular intima, and the fluorescence expression was higher than that of the other three groups. (2) After 24 hours of IL-8RA/B-hUC-MSCs infusion, the expression of inflammatory factors in the serum was significantly lower than that of the other three groups, while the expression of anti-inflammatory factor interleukin-10 was higher than that of the other three groups ( $P < 0.05$ ). In addition, inflammatory cell infiltration in the IL-8RA/B-hUC-MSCs group decreased significantly. (3) hUC-MSCs overexpressing interleukin-8 receptor promoted re-endothelialization of injured vessels and reduced vascular fibrosis after 14 days of infusion. (4) IL-8RA/B-hUC-MSCs reduced vascular neointimal hyperplasia after 28 days of infusion. (5) Interleukin-8 receptor enhances the targeted homing ability of hUC-MSCs, allowing MSCs to migrate to the site of vascular injury, inhibit inflammation, reduce neointimal hyperplasia, and promote vascular repair.

**Key words:** human umbilical cord mesenchymal stem cells; interleukin-8RA/B; vascular injury; inflammatory factor; vascular endothelium

**Funding:** the Social Development Research and Achievement Transformation Program of the Xinjiang Corps, No. 2016AD013 (to MXL); Graduate Education Innovation Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. XJGRI201604 (to MXL)

**How to cite this article:** ZHU BB, HE HB, DENG JH, WANG WQ, MU XL. Human umbilical cord mesenchymal stem cells overexpressing interleukin 8 receptor inhibit inflammation and promote vascular repair. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(1):61-66.

## 0 引言 Introduction

心血管疾病的发病率逐年升高, 成为中国居民死亡的主要原因<sup>[1]</sup>, 多种因素造成血管内皮损伤, 引发炎症, 导致血管再狭窄及血管功能障碍, 诱发心血管疾病, 包括心脑血管病变和血管栓塞性病变<sup>[2]</sup>, 因此抑制损伤介导的炎症反应是防止血管疾病发展的关键, 也是治疗损伤的根源。现如今, 药物治疗如他汀类、阿司匹林等药物不能从根本上治疗血管损伤<sup>[3]</sup>; 手术方法如经皮冠状动脉成形术和血管支架术等创伤性治疗虽成为主要的治疗手段, 但会造成血管内膜再次损伤及血管过度增生导致管腔进一步狭窄。干细胞移植是抑制炎症、治疗内皮损伤最有前景的方案。

间充质干细胞被认为是再生医学领域最有潜力的细胞<sup>[4]</sup>。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)具备许多优点, 例如来源广泛、容易获取、成本低廉、低免疫原性<sup>[5]</sup>、无排斥反应、无伦理争议、体外增殖和分化能力强, 参与血管形成及多种组织的修复, 具有免疫调节作用<sup>[6-7]</sup>。移植到体内的间充质干细胞可以分泌大量的细胞因子, 加速细胞迁移到损伤部位, 促使细胞的增殖和分化, 加快伤口愈合。

白细胞介素 8(Interleukin-8, IL-8)属于炎症因子, 由多种细胞产生, 包括成纤维细胞、内皮细胞、血单核细胞等<sup>[8]</sup>。在组织损伤早期, 会产生大量的 IL-8 因子, IL-8 与其受体结合可以产生特异性的生物学功能, 包括促进炎症细胞迁移、黏附, 引发炎症反应, 影响损伤血管的愈合。中性粒细胞是进行免疫应答最早的细胞, 其膜表面含有大量的 IL-8 受体, 当血管损伤时, 释放大量的 IL-8, 诱导中性粒细胞向损伤处迁移、浸润, 产生炎症<sup>[9]</sup>。研究表明, 过表达 IL-8RA/B 的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVECs)可以模仿中性粒细胞, 浸润到损伤血管, 与中性粒细胞竞争性结合损伤部位的 IL-8, 从而减少中性粒细胞浸润和局部炎症反应, 促进血管内皮再生和组织修复<sup>[10]</sup>。过表达 IL-8RA/B 的细胞可以抑制损伤区域的炎症反应, 减少炎症细胞的分泌, 抑制血管纤维化增生, 维持血管内皮的完

整性, 促进组织修复。内皮细胞是血管内的单层细胞, 呈扁平短梭形, 促进相邻细胞之间的连接, 从而将血管及血液分隔, 并在血管内进行物质信息交流。当血管发生损伤、炎症、衰老、心血管疾病等病理生理过程时, 内皮细胞的屏障功能发生障碍, 促炎递质表达增多, 提高毛细血管的通透性, 延缓组织愈合<sup>[11]</sup>。血管修复依赖内皮细胞的增殖和迁移, 但是内皮细胞来源局限, 体内移植存活率低, 迁移能力弱, 不能有效治疗血管损伤, 影响血管修复。因此推测 hUCMSCs 装载 IL-8 受体后能促进向损伤血管的归巢和加速血管内皮的修复。

该实验将 hUCMSCs 装载 IL-8 受体, 静脉输注给血管损伤动物, 研究 IL-8 受体对 hUCMSCs 生物活性及修复血管内皮功能的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物体内实验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 9 月至 2019 年 9 月在石河子大学医学院重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性健康 SD 大鼠 100 只, 购买于新疆医科大学动物实验中心, 10-12 周龄, 体质量为 (300±50) g, 适应性饲养 7-10 d。

1.3.2 实验试剂和仪器 DMEM 低糖培养基、胎牛血清、II 型胶原酶(美国 Gibco 公司); 青霉素和链霉素、ECM 培养基(上海索莱宝生物科技有限公司); MPM 6 酶标仪(美国 Bio-RAD 公司); 普通离心机(中国飞鸽牌系列)。

1.4 方法

1.4.1 hUCMSCs 的分离和培养 脐带来源于石河子大学第一附属医院产科健康剖宫产产妇, 获得石河子大学第一附属医院伦理委员会批准和产妇的知情同意。取新鲜脐带, 剔除中间的 3 根血管, 取中间的华通胶组织(Wharton jelly), 剪碎成 1.0-2.0 mm<sup>3</sup> 的小块, 放置于培养皿中, 将皿倒置放入 37℃、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 恒温箱培养 24 h, 组织块附着在皿底, 添

加含体积分数为 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基, 培养 4 d 进行首次换液, 待细胞长至 85% 左右, 用 0.125% 胰蛋白酶消化传代, 取第 3 代细胞备用。

#### 人脐带间充质干细胞及人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定

项目	人脐带间充质干细胞	人脐静脉内皮细胞
细胞来源:	人脐带华通胶组织	人脐静脉
培养基:	DMEM/F12 培养基	ECM 培养基
添加材料:	体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素、1% 生长因子	体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素、1% 生长因子
培养时间:	原代培养 10-14 d	原代培养 3-5 d
细胞传代:	待细胞长至 85% 左右, 用 0.125% 胰蛋白酶消化传代, 取第 3 代细胞备用	待细胞长至 85% 左右, 用胰酶按 1:2 或 1:3 进行消化传代, 取第 3 代细胞备用
细胞鉴定:	细胞形态	细胞形态
伦理学批准:	经石河子大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 2016-086-03	

**1.4.2 hUVECs 的分离和培养** 将 10-20 cm 的脐带放入 PBS 中清洗, 找到脐静脉, 注入 II 型胶原酶消化 12 min, 加入内皮细胞培养基终止反应, 900 r/min 离心 5 min, 将细胞沉淀吹打混匀后, 收集到细胞培养瓶, 37 °C、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 恒温箱培养, 待细胞长至 85% 左右, 用胰酶按 1:2 或 1:3 进行消化传代, 取第 3 代细胞备用。

**1.4.3 重腺病毒转染细胞** 重组腺病毒由美国阿拉巴马大学医学院赠送。取第 3 代 hUCMSCs 和 hUVECs, 按 1×10<sup>6</sup> 密度接种 6 孔板中, 细胞长至 65%-75% 时, 将 IL-8 受体荧光腺病毒 (pAd-IL-8RA-GFP、pAd-IL-8RB-GFP) 和空载体荧光腺病毒 (pAd-Null-GFP) 分别与细胞共培养 (病毒的滴度为 1.58×10<sup>10</sup> PFU/mL), 加入无血清 DMEM 培养基, 培养过夜, 换液后再加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基继续培养 48 h, 在荧光显微镜下观测 GFP 的表达。

**1.4.4 颈动脉内膜损伤模型制备及细胞移植** 实验前大鼠空腹 8 h, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 无菌操作剥离出颈总、颈内和颈外动脉, 在距离血管分叉 0.5 cm 处结扎颈外动脉, 同时颈内动脉和颈总动脉用大鼠动脉夹固定, 在颈外剪一小口, 插入 2F(直径 2.0 cm) 球囊导管至颈总动脉, 给予 2 个大气压后反复牵拉, 之后缓慢放气 10 s, 重复 3 次, 造成血管内膜损伤。

实验造模成功 96 只大鼠分为 4 组, 分别为过表达 IL-8 受体的 hUCMSCs 组 (IL-8RA/B-hUCMSCs), 过表达 IL-8 受体的 hUVECs 组 (IL-8RA/B-hUVECs), 转染空载体的 hUCMSCs 组 (Null-GFP-hUCMSCs) 和对照组 (生理盐水), 每组 24 只。手术后 1, 3, 5 h 分别从尾静脉输入 0.5×10<sup>6</sup> 相应细胞 (500 μL), 共 1.5 mL, 对照组输注同等剂量的生理盐水, 分别于 3 次输注细胞完成后 30 min, 24 h, 14 d 和 28 d 取材, 每个时间点每组 6 只大鼠。

**1.4.5 苏木精-伊红染色** 造模手术后取损伤血管, 石蜡切片, 脱蜡, 乙醇脱水, 二甲苯脱蜡, 苏木精蓝染两三分种, 伊红染液染 1 min, 中性树胶封固, 在显微镜下查看血管内膜损伤程度, 采集图像观察造模是否成功。在移植细胞后 28 d, 通过苏木精-伊红染色观察血管新内膜增生情况。

伤程度, 采集图像观察造模是否成功。在移植细胞后 28 d, 通过苏木精-伊红染色观察血管新内膜增生情况。

**1.4.6 观察血管损伤处的荧光表达** 在 3 次输注细胞完成后 30 min, 处死大鼠, 取下损伤颈动脉, 用 PBS 和肝素冲洗残余血液, 浸泡在生理盐水中, 在荧光显微镜下观察过表达 IL-8 受体的细胞迁移、黏附情况。

**1.4.7 酶联免疫吸附实验** 在 3 次输注细胞完成后 24 h, 采集大鼠腹主动脉血, 在常温中静置 20-30 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离出上层血清, 检测炎症因子诱导的中性粒细胞趋化因子 2β(neutrophil chemotactic factor-2β, CINC-2β)、P-选择素 (P-selectin)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素 1β(Interleukin-1β, IL-1β)、单核细胞趋化因子 (monocyte chemotactic factor, MCP-1)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 及核糖体蛋白 S9(Ribosomal protein-S9, RPS9) 的表达水平, 按照试剂盒 (上海恒远) 说明书进行。

**1.4.8 免疫组化染色** 在 3 次输注细胞完成后 24 h 和 14 d, 取损伤颈动脉, 进行包埋, 切片, 脱蜡, 孵育一抗 [髓过氧化物酶 (MPO) 浓度为 1:200, ED1 浓度为 1:100, 纤维连接蛋白 (FN) 浓度为 1:200], 4 °C 冰箱过夜, 第 2 天复温 30 min, 孵育二抗, 进行 DAB 染色, 在显微镜下观察并拍照, 采用 Image Pro Plus 软件进行定量分析。

**1.4.9 伊文思蓝染色** 移植细胞后 14 d, 在处死大鼠前 30 min, 经大鼠尾静脉注入 2% 伊文思蓝染料, 再从左心耳输注生理盐水进行冲洗, 取下颈动脉进行分析。将蓝染血管浸泡甲酰胺溶液中, 放入 60 °C 水浴锅内 24 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 使用酶标仪检测 620 nm 波长处的吸光度值。

**1.5 主要观察指标** ①荧光细胞靶向定位表达; ②免疫组化染色结果; ③伊文思蓝染色结果; ④苏木精-伊红染色结果。

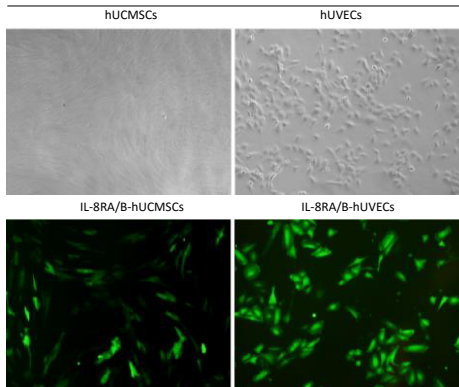
**1.6 统计学分析** 应用 SPSS 16.0 和 Image ProPlus、Microsoft excel 2003、Graphpad prism 6 统计软件进行数据统计和图形分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), Bonferron's 或 Dunnett's T3 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 随机选取 100 只雄性大鼠, 4 只造模失败, 96 只大鼠造模成功。

**2.2 原代 hUCMSCs 和 hUVECs 及过表达 IL-8 受体的细胞形态** 原代 hUCMSCs 在培养 14 d 后开始贴壁生长, 第 3 代细胞呈长梭形, 排列紧密, 典型集落生长, 增殖能力旺盛, 待 3-5 d 融合生长至 80%-90% 时可用于实验。hUVECs 呈贴壁生长, 扁平短梭形。细胞转染 IL-8RA/B 腺病毒 (MOI=100) 后, 在倒置荧光显微镜下观测发现 85% 左右的细胞表达 GFP, 见图 1。

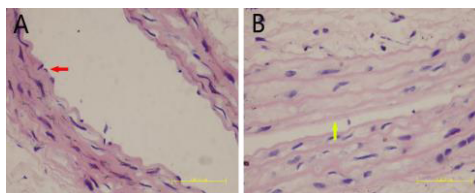
**2.3 构建颈动脉内膜损伤模型** 正常颈动脉内膜凹凸不平, 内膜呈“波浪形”, 有内皮细胞单层排列。颈动脉球囊扩张术后颈动脉内膜剥脱, 大部分内皮细胞丢失, 提示成功构建颈动脉损伤模型, 见图 2。



图注: hUCMSCs 呈长梭形, hUVECs 呈短梭形。IL-8: 白细胞介素 8

图 1 | 转染腺病毒前后的人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) 和人脐静脉内皮细胞 (hUVECs) (×200)

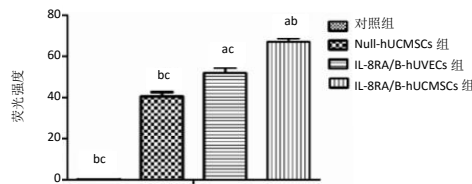
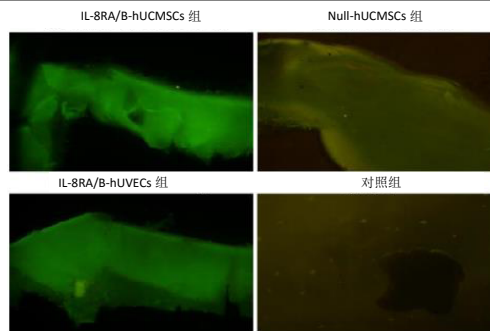
Figure 1 | Human umbilical cord mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells before and after adenovirus transfection (×200)



图注: 图中 A 为正常血管 (红色箭头指的是血管内皮细胞); B 为损伤血管 (黄色箭头指的是内皮细胞缺失)

图 2 | 颈动脉的苏木精-伊红染色 (×400)

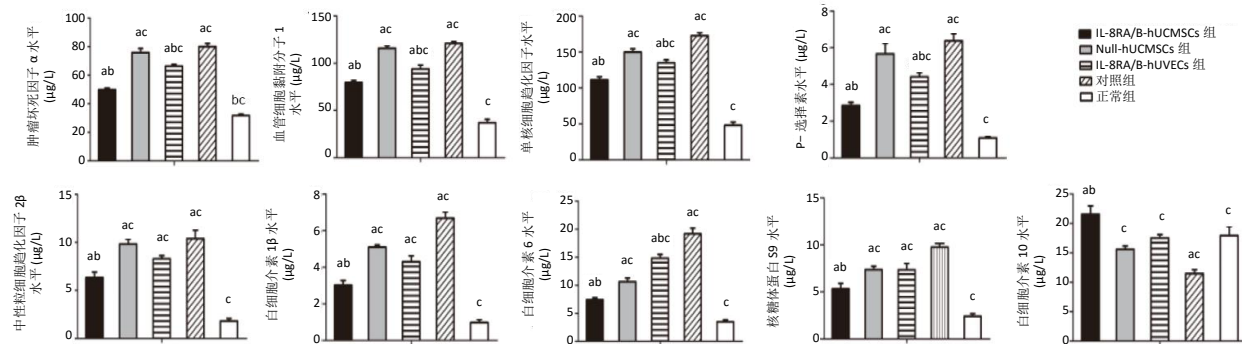
Figure 2 | Hematoxylin-eosin staining of the carotid artery (×400)



图注: IL-8RA/B-hUCMSCs 组血管荧光最亮, IL-8RA/B-hUVECs 组血管荧光较亮, Null-hUCMSCs 血管荧光暗, 对照组血管无荧光。与对照组和 Null-hUCMSCs 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与 IL-8RA/B-hUVECs 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , 与 IL-8RA/B-hUCMSCs 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ,  $n=6$ 。IL-8: 白细胞介素 8; hUCMSCs: 人脐带间充质干细胞; hUVECs: 人脐静脉内皮细胞

图 3 | 移植细胞在损伤血管中的表达 (×400)

Figure 3 | Expression of transplanted cells in injured blood vessels (×400)



图注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与对照组和 Null-hUCMSCs 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , 与 IL-8RA/B-hUCMSCs 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; IL-8: 白细胞介素 8; hUCMSCs: 人脐带间充质干细胞; hUVECs: 人脐静脉内皮细胞

图 4 | 炎症因子在各组损伤血管中的表达

Figure 4 | Expression of inflammatory factors in injured blood vessels

2.4 过表达 IL-8 受体促进 hUCMSCs 向损伤血管的归巢 移植细胞后 30 min, IL-8RA/B-hUCMSCs 组颈动脉中绿色荧光表达最多, 为  $(67.04 \pm 2.97)\%$ , IL-8RA/B-hUVECs 组和 Null-hUCMSCs 组荧光表达较低, 分别为  $(51.88 \pm 4.37)\%$  和  $(40.43 \pm 3.76)\%$ , 对照组未发现绿色荧光表达, 各组之间差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

2.5 过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 抑制炎症因子的表达 通过 ELISA 检测腹主动脉血中炎症因子水平。与对照组比较, 3 个细胞治疗组炎症因子白细胞介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、血管细胞黏附分子 1、P-选择素、白细胞介素  $1\beta$ 、中性粒细胞趋化因子 2 $\beta$ 、核糖体蛋白 S9 和单核细胞趋化因子水平均明显降低, 其中 IL-8RA/B-hUCMSCs 组最低。IL-8RA/B-hUCMSCs 组抗炎因子白细胞介素 10 水平最高。结果表明 IL-8RA/B-hUCMSCs 能够显著抑制炎症反应, 见图 4。

2.6 过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 减少损伤血管炎症细胞的浸润 在移植细胞后 24 h, 对照组中性粒细胞和单核/巨噬细胞浸

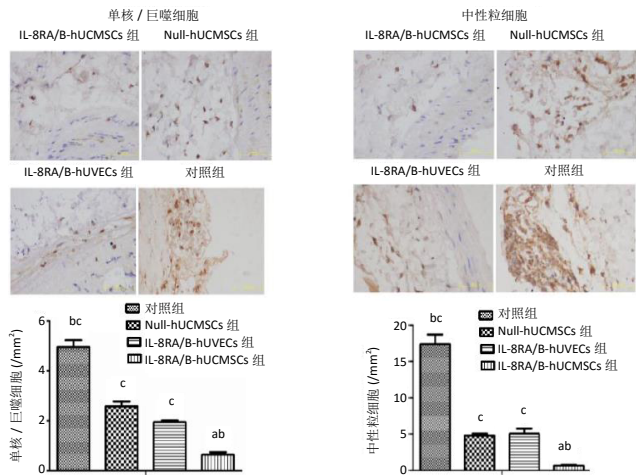
润明显增多, IL-8RA/B-hUVECs 组和 Null-hUCMSCs 组比较无明显差异。过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 组中性粒细胞和单核/巨噬细胞浸润最少, 见图 5。

2.7 过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 促进血管的再内皮化 移植细胞后 14 d 进行伊文思蓝染色, IL-8RA/B-hUCMSCs 组  $(2.34 \pm 0.29)$  染色最浅, 对照组  $(6.98 \pm 0.38)$  蓝色最深, 而 IL-8RA/B-hUVECs 组  $(3.37 \pm 0.41)$  和 Null-hUCMSCs 组  $(4.92 \pm 0.96)$  之间差异无显著性意义, 见图 6。

2.8 过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 减少损伤血管纤维化 移植细胞后 14 d, 纤维粘连蛋白在 IL-8RA/B-hUCMSCs 组表达明显减少, 对照组表达最多, 而 IL-8RA/B-hUVECs 组和 Null-hUCMSCs 组之间差异无显著性意义, 见图 7。

2.9 过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 减少血管新内膜的增生 在大鼠输注细胞后 28 d 进行苏木精-伊红染色, 与对照组  $(58.09 \pm 0.74)$  比较, Null-hUCMSCs 组  $(14.73 \pm 1.08)$ 、IL-8RA/B-hUVECs 组  $(10.83 \pm 1.93)$ 、过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 组

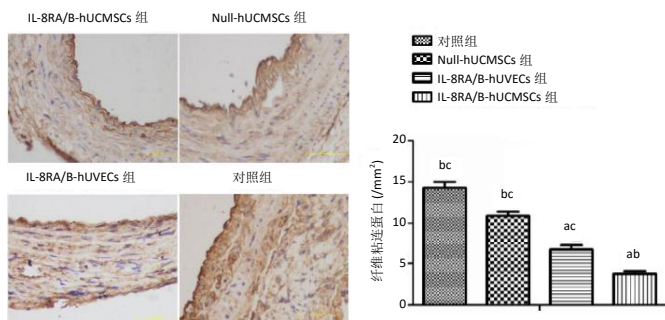




图注：与对照组和 Null-hUCMSCs 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，与 IL-8RA/B-hUVECs 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，与 IL-8RA/B-hUCMSCs 组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ， $n=6$ ；IL-8：白细胞介素 8；hUCMSCs：人脐带间充质干细胞；hUVECs：人脐静脉内皮细胞

图 5 | 各组损伤血管中单核 / 巨噬细胞和中性粒细胞数 ( $\times 400$ )

Figure 5 | Monocyte/macrophage and neutrophil counts in injured blood vessels ( $\times 400$ )



图注：与对照组和 Null-hUCMSCs 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，与 IL-8RA/B-hUVECs 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，与 IL-8RA/B-hUCMSCs 组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ， $n=6$ ；IL-8：白细胞介素 8；hUCMSCs：人脐带间充质干细胞；hUVECs：人脐静脉内皮细胞

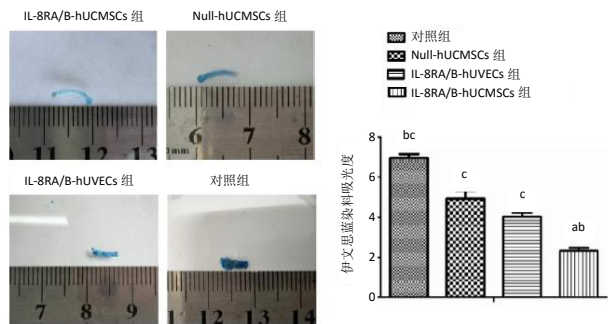
图 7 | 纤维粘连蛋白在各组损伤血管的表达 ( $\times 400$ )

Figure 7 | Expression of fibronectin in injured blood vessels ( $\times 400$ )

( $3.75 \pm 1.70$ ) 新内膜 / 中膜 (I/M) 面积分别减少了 71.6%，78.3% 和 88.3%，过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 组明显减少新内膜增生，其他组内膜纤维化明显，见图 8。

### 3 讨论 Discussion

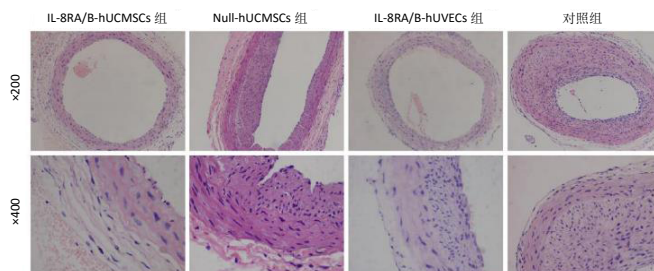
hUCMSCs 具有自我更新和多向分化能力，在组织损伤或炎症反应区域聚集，可抑制炎症反应、加速组织再生<sup>[12]</sup>。研究表明，hUCMSCs 可以靶向归巢、迁移至损伤组织，参与修复<sup>[13-14]</sup>。内皮细胞具有许多缺点，移植到体内具有免疫排斥和成瘤特性，移植率降低，甚至出现细胞死亡。该实验将过表达 IL-8 受体的 hUCMSCs 对损伤颈动脉进行治疗，结果显示：通过尾静脉输注细胞后 30 min，发现损伤颈动脉有 GFP 的表达，表明 IL-8 受体促进了 hUCMSCs 靶向归巢到损伤颈动脉，这为预防和治疗心血管疾病提供了新策略。IL-8RA/B-hUVECs 也能靶向迁移至损伤血管，但迁移细胞数量减少，相对 IL-8RA/B-hUCMSCs 荧光表达弱。在血管内皮损伤时，白细胞会大量聚集，如中性粒细胞、单核 / 巨噬细胞，也会导致炎症因子表达升高，如白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、



图注：与对照组和 Null-hUCMSCs 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，与 IL-8RA/B-hUVECs 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，与 IL-8RA/B-hUCMSCs 组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ， $n=6$ ；IL-8：白细胞介素 8；hUCMSCs：人脐带间充质干细胞；hUVECs：人脐静脉内皮细胞

图 6 | 伊文思蓝在各组损伤血管中的表达

Figure 6 | Expression of Evans Blue in injured blood vessels



图注：与对照组和 Null-hUCMSCs 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，与 IL-8RA/B-hUVECs 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，与 IL-8RA/B-hUCMSCs 组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ， $n=6$ ；IL-8：白细胞介素 8；hUCMSCs：人脐带间充质干细胞；hUVECs：人脐静脉内皮细胞

图 8 | 过表达 IL-8 受体的细胞对损伤血管新内膜的影响

Figure 8 | Effect of the cells overexpressing interleukin-8 receptor on neointimal injury

白细胞介素 8 等；增加细胞黏附分子及趋化因子的表达，促进炎症细胞浸润到血管内膜，使损伤加重，从而促进动脉粥样硬化的形成和发展<sup>[15-18]</sup>。在氧化应激模型中，核糖体蛋白 S9 表达增多<sup>[19]</sup>，诱发炎症反应，延缓损伤修复。白细胞介素 10 是一种有效的抗炎因子，能够治疗血管功能障碍和阻止炎症发生，参与免疫调节<sup>[16]</sup>；其与 hUCMSCs 联合治疗，可在一定程度上治疗肝损伤<sup>[20]</sup>。犬脐带间充质干细胞可以归巢到损伤部位，抑制炎症<sup>[21]</sup>，促进皮肤愈合和血管再生，减少纤维细胞的增殖，从而修复损伤<sup>[22]</sup>。这与作者的研究结果一致，与 IL-8RA/B-hUVECs 相比，IL-8RA/B-hUCMSCs 能够快速迁移到血管损伤部位，提高抗炎因子白细胞介素 10 表达，抑制炎症因子的产生，进一步证实了 hUCMSCs 装载 IL-8 受体后具有抑制损伤血管炎症的作用。实验结果表明，在输注细胞后 14 d，过表达 IL-8 受体的 hUCMSCs 促进血管再内皮化，加速损伤修复。在 IL-8RA/B-hUCMSCs 治疗后，免疫组化发现纤维蛋白染色表达明显减少，抑制血管的纤维化，IL-8RA/B-hUVECs 治疗效果相对较差，伤口修复延迟。研究表明，内皮细胞因血液湍流而减少在损伤血管的黏附，细胞存活率较低，减少血管再内皮化<sup>[22]</sup>。在输注细胞后 28 d，过表达 IL-8RA/B 的 hUCMSCs 能够明显减少新内膜增生，减少血

管再狭窄。过表达 IL-8RA/B 的 hUCMSCs 模拟靶向和黏附于受损组织中中性粒细胞的行为,与游离的 IL-8 结合,抑制损伤部位的炎症反应,加速血管的再内皮化并减少新内皮的形成。研究表明, hUCMSCs 能治疗血管内皮功能障碍,抑制损伤组织局部炎症的级联反应,修复损伤内皮,并分化为结缔组织细胞类型,改善损伤区域血管重建,加快损伤修复<sup>[23-25]</sup>,进一步证实过表达 IL-8 受体可以抑制炎症,加速损伤内皮的修复。所以,通过旁分泌途径辅助抗炎是 hUCMSCs 的重要特性<sup>[26]</sup>。

内皮修复方法有很多,药物治疗如他汀类,不仅可以降低胆固醇<sup>[27]</sup>,预防冠状动脉疾病,改善血管受损的内皮功能,减少氧化应激,还具有抗炎作用<sup>[28]</sup>,但是并不能改善四肢外周血管疾病;阿司匹林对心脏具有保护功能,可能与抗血小板有关,但不是直接发挥抗炎作用。因此,药物治疗无法从根本上治疗血管损伤,抑制炎症。目前,临床上多采用细胞移植进行干细胞疗法,从而促进损伤血管内皮的修复,维持内皮结构的完整性,从而抑制炎症和氧化应激。实验结果显示, IL-8RA/B 能够促进 hUCMSCs 定向迁移并黏附到血管损伤部位,抑制炎症反应,减弱损伤部位的氧化应激,减少新内皮增生,从而加快 hUCMSCs 增殖,修复血管内皮。实验结果还表明过表达 IL-8RA/B 的 hUCMSCs 比 hUVECs 治疗损伤血管效果更明显。通过体内移植过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs,与中性粒细胞竞争性结合损伤部位的 IL-8,抑制损伤部位的炎症应答,减少炎症因子的释放和炎性细胞的表达,促进损伤组织愈合及血管再生。hUCMSCs 异体移植免疫排斥低,输注安全,不良反应小。装载 IL-8RA/B 受体可以加快 hUCMSCs 靶向迁移至损伤血管,更容易发挥细胞的生物学效应,促进血管修复。

综上所述,过表达 IL-8RA/B-hUCMSCs 可以靶向迁移至血管损伤部位,抑制损伤组织的炎症反应,减少新内皮增生,抑制血管纤维化,促进血管修复,但其中具体机制尚不清楚,需要进一步研究。

**作者贡献:** 实验设计为慕晓玲、朱兵兵,实验实施为朱兵兵、何海斌,实验评估为朱兵兵、王文强,资料收集为朱兵兵、邓江华。

**经费支持:** 该文章接受了“新疆兵团社会发展科技攻关与成果转化计划(2016AD013)”“自治区研究生教育创新计划科研创新项目(XJGR201604)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经石河子大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准,批准号为 2016-086-03。实验过程遵循了国际兽医医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**知情同意问题:** 脐带来源于石河子大学第一附属医院产科健康剖宫产产妇,经过石河子大学第一附属医院伦理委员会批准和产妇的知情同意。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过石河子大学统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J].中国循环杂志,2018,33(1):1-8.
- [2] HANSSON GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-1695.
- [3] SEMENKOVICH CF. We Know More Than We Can Tell About Diabetes and Vascular Disease: The 2016 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes.* 2017; 66(7):1735-1741.
- [4] 刘焯凯,张伟.脐带间充质干细胞治疗烧伤的研究进展[J].中国美容医学,2017,26(5):134-137.
- [5] HASSAN WU, GREISER U, WANG W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22(3):313-325.
- [6] 张涛,耿壮,刘方超,等.人脐带间充质干细胞对 1 型糖尿病小鼠皮肤组织 AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B 信号通路影响的研究[J].中国糖尿病杂志,2019, 27(3):224-228.
- [7] 冯可欣,詹昱,曲佳,等.脐带间充质干细胞培养的研究进展[J].中国现代药物应用,2017,11(13):197-198.
- [8] DOMINGUEZ C, DAVID JM, PALENA C. Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor. *Semin Cancer Biol.* 2017;47: 177-184.
- [9] WU B, MOTTOLA G, SCHALLER M, et al. Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications. *Mol Aspects Med.* 2017;58:72-82.
- [10] XING D, LI P, GONG K, et al. Endothelial cells overexpressing interleukin-8 receptors reduce inflammatory and neointimal responses to arterial injury. *Circulation.* 2012;125(12):1533-1541.
- [11] 罗靖莹,郭阳,黄玮玮,等.间充质干细胞传递线粒体对肺微血管内皮细胞的修复作用[J].医学研究生学报,2019,32(9):931-936.
- [12] NAGAMURA-INOUE T, HE H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells.* 2014; 6(2):195-202.
- [13] COLLINS E, GU F, QI M, et al. Differential efficacy of human mesenchymal stem cells based on source of origin. *J Immunol.* 2014; 193(9):4381-4390.
- [14] LI X, BAI J, JI X, et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med.* 2014;34(3): 695-704.
- [15] MOREIRA DM, DA SILVA RL, VIEIRA JL, et al. Role of vascular inflammation in coronary artery disease: potential of anti-inflammatory drugs in the prevention of atherothrombosis. Inflammation and anti-inflammatory drugs in coronary artery disease. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2015;15(1):1-11.
- [16] 王成,李霞,刘振,等.间充质干细胞过表达 IL-10 对心肌梗死模型大鼠心功能的影响[J].实用医学杂志,2018,34(4):556-561.
- [17] 公绪合,王国干.间充质干细胞旁分泌作用在心血管疾病治疗中的研究进展[J].中国循环杂志,2019,34(2):201-204.
- [18] 姜丹,宫丽鸿.稳斑汤联合体外反搏治疗冠心病经皮冠状动脉介入治疗后患者的临床疗效及对血清血栓素 A<sub>2</sub>、前列腺素 I<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ 、单核细胞趋化蛋白-1 的影响[J].世界中医药,2018,13(6):1439-1443.
- [19] KIM SY, LEE MY, CHO KC, et al. Alterations in mRNA expression of ribosomal protein S9 in hydrogen peroxide-treated neurotumor cells and in rat hippocampus after transient ischemia. *Neurochem Res.* 2003;28(6):925-931.
- [20] 张英杰,禹丽,郝晓娜,等.间充质干细胞与白细胞介素 10 对四氯化碳诱发的肝纤维化大鼠的治疗作用[J].中国免疫学杂志,2016,32(1):23-28.
- [21] PAPAGEORGIOU N, ZACHARIA E, ANDROULAKIS E, et al. HDL as a prognostic biomarker for coronary atherosclerosis: the role of inflammation. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(8):907-921.
- [22] 李茂,游成东,黄文.人脐带间充质干细胞移植治疗小鼠皮肤溃疡[J].中国组织工程研究,2018,22(33):5315-5320.
- [23] 李佳,辛毅,崔巍,等.人脐带间充质干细胞外泌体保护缺氧氧损伤的心肌细胞[J].中国病理生理杂志,2016,32(4):577-583.
- [24] WANG ZX, WANG CQ, LI XY, et al. Mesenchymal stem cells alleviate atherosclerosis by elevating number and function of CD4(+)/CD25(+)FOXP3(+) regulatory T-cells and inhibiting macrophage foam cell formation. *Mol Cell Biochem.* 2015;400(1-2):163-172.
- [25] ZHANG J, WU Y, CHEN A, et al. Mesenchymal stem cells promote cardiac muscle repair via enhanced neovascularization. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 35(3):1219-1229.
- [26] SHENG G. The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *BMC Dev Biol.* 2015;15:44.
- [27] DIAMANTIS E, KYRIAKOS G, QUILES-SANCHEZ LV, et al. The Anti-Inflammatory Effects of Statins on Coronary Artery Disease: An Updated Review of the Literature. *Curr Cardiol Rev.* 2017;13(3):209-216.
- [28] TALEB S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2016; 109(12): 708-715.