

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.06.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220110.1019.002.html\(2022-01-10\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220110.1019.002.html(2022-01-10))

细胞直接接触对新生血管生成调控作用的研究*

余 杨,吴洪坤,罗永金,喻鹏凌,何 勇,陈 灏[△]

(中国科学院大学附属重庆医院/重庆市人民医院心血管外科 401121)

[摘要] **目的** 研究并探讨血管内皮细胞增殖、交联形成新生血管网的相关机制,以促进缺血性心脏病患者的心肌再血管化。**方法** 体外分离原代小鼠内皮细胞、心肌细胞及心肌成纤维细胞,分别进行相应各组的三维细胞培养,引入血管内皮生长因子,建立体外血管生成的三维模型并行免疫荧光染色检测,观察了解血管网状结构的形成情况。**结果** 内皮细胞+血管内皮生长因子体外三维培养,内皮细胞增殖,且相互交联形成明显的血管网状结构;内皮细胞独立体外三维培养,内皮细胞无明显增殖,血管网状结构不明显;内皮细胞+心肌细胞和内皮细胞+心肌成纤维细胞分别体外三维共培养,其内皮细胞增殖、交联形成血管网状结构的情况与内皮细胞+血管内皮生长因子组相似。**结论** 内皮细胞和周围细胞(包括成纤维细胞和心肌细胞)间的直接接触是促血管生成的重要机制之一。

[关键词] 内皮细胞;心肌细胞;心肌成纤维细胞;血管生成;三维细胞培养**[中图分类号]** R654.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)06-0920-04

Study on regulatory effect of direct cell contact on neovascularization*

YU Yang, WU Hongkun, LUO Yongjin, YU Pengling, HE Yong, CHEN Hao[△]

(Department of Cardiovascular Surgery, Chongqing Hospital Affiliated to University of Chinese Academy of Sciences/Chongqing General Hospital, Chongqing 401121, China)

[Abstract] **Objective** To study the related mechanism of re-establishing collateral networks by vascular endothelial cell proliferation and crosslinking, so as to promote the myocardium's revascularization in ischemic heart disease patients. **Methods** Three-dimensional cultures of endothelial cells, cardiomyocytes and cardiac fibroblasts isolated from primary mice were performed in vitro. Vascular endothelial growth factor was introduced to establish a three-dimensional model of angiogenesis in vitro and detected by immunofluorescence staining to observe the formation of vascular reticular structure. **Results** In the three-dimensional culture of endothelial cells+vascular endothelial growth factor, there was obvious cellular proliferation and crosslinking to form vascular networks. In the endothelial cells alone culture, there was no obvious cellular proliferation and formation of vascular network structure. In the three-dimensional co-culture of endothelial cells+cardiomyocytes and endothelial cells+cardiac fibroblasts, the situation of cells and neovascularization was similar to the endothelial cells+vascular endothelial growth factor culture group. **Conclusion** Direct contact between endothelial cells and surrounding cells (including cardiac fibroblasts and cardiomyocytes) is one of the important mechanisms of angiogenesis.

[Key words] endothelial cells; cardiomyocytes; cardiac fibroblasts; angiogenesis; three-dimensional culture

缺血性心脏病是目前全球范围内主要的致死性疾病之一^[1]。梗死心脏的功能性恢复主要依赖于侧枝血管网的重建,以供给足够的含氧血液^[2]。尽管缺

血早期的再灌注治疗(如外科手术、安装支架)明显降低了致死率,但要恢复并维持心肌正常功能仍然依赖于血管的再生,这也是促血管化治疗缺血性心脏疾病

* 基金项目:重庆市中青年医学高端人才工作室项目(ZQNYXGDRCGZS2019005)。 作者简介:余杨(1978—),副主任医师,博士,主要从事人心脏瓣膜疾病及冠心病的临床诊治及相关基础研究。 [△] 通信作者, E-mail: cqchenhao@aliyun.com。

的主要策略和目标^[3]。虽然血管生成和血管生成相关因子已被广泛研究,但促血管生成机制及通路十分复杂,仍未得到完全阐明^[4]。故本研究拟建立有效的体外三维细胞培养模型,探寻再血管化的具体调控机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)实验动物:6~8周龄雄性 C57BL/6 小鼠 10 只及 1~2 d 新生雄性 C57BL/6 小鼠 20 只,由陆军军医大学实验动物中心提供。(2)细胞:雄性 C57BL/6 小鼠肺脏分离、纯化出的肺微血管内皮细胞及由其心脏分离出的心肌细胞和心肌成纤维细胞。(3)主要试剂:胰蛋白酶、DMEM/H 完全培养基、10%胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胶原酶 II 购自美国 Worthington 公司;多肽水凝胶购自上海翌圣公司;四甲基罗丹明异硫氰酸酯(TMRITC)购自北京百灵威公司;山羊抗兔 IgG 抗体购自美国 Sigma 公司;兔抗鼠特异性 CD31 抗体购自美国 BD 公司。(4)主要仪器:荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞分离

6~8周雄性 C57BL/6 小鼠断髓法处死,暴露胸腔,迅速取出肺脏并切碎,在 JAVED 等^[5]实验的基础上,采用酶消化及免疫磁珠分选法分离、纯化小鼠肺微血管内皮细胞,保存备用。

1~2 d 新生雄性 C57BL/6 小鼠断髓法处死,取心脏,充分绞碎,室温下分别依次置于 0.1%胰蛋白酶及 0.08%胶原酶 II 中约 7 h,彻底消化。吸出细胞悬液,于细胞培养皿中静置约 2 h,以便于非心肌细胞黏附贴壁^[6]。剩余细胞悬液(含心肌细胞)吸出保存备用。

1~2 d 新生雄性 C57BL/6 小鼠断髓法处死,解剖暴露心脏,将其取出,磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)反复清洗后,剪成碎末,室温下于 0.25%胰蛋白酶中充分混匀、消化,并静置后吸出上清液,加入 20% DMEM/H 完全培养基,终止胰蛋白酶反应,置于细胞培养箱(37℃, 50% CO₂)孵育 40 min。滤网过滤,弃去未消化的组织碎粒,1 500 g 超速离心机离心 5

min,弃去上清液,加入适量 PBS,反复吹打后,再次离心,由此 2~3 次,最后将分离并富集的心肌成纤维细胞加入培养基中孵育并保存备用^[7]。

1.2.2 三维细胞培养

各类细胞按以下方式分组:内皮细胞+血管内皮生长因子组、内皮细胞组、内皮细胞+心肌细胞组和内皮细胞+心肌成纤维细胞组。

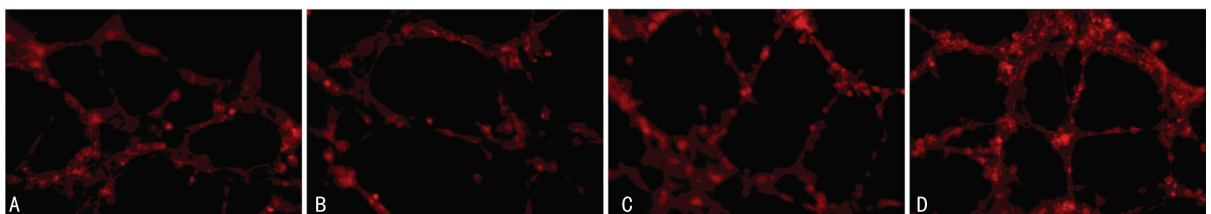
具体三维培养方法如下:各组细胞分别接种在置于培养皿中的 1%多肽水凝胶支架(多肽序列:AcN-RARADADARARADADA-CNH₂)上^[8]。内皮细胞+血管内皮生长因子组及内皮细胞组内皮细胞接种密度为 $1.4 \times 10^6 / \text{cm}^2$;内皮细胞+心肌细胞组及内皮细胞+心肌成纤维细胞组两种细胞按 1:1 接种,各细胞接种密度均为 $0.7 \times 10^6 / \text{cm}^2$ 。将 10%胎牛血清加入接种于多肽水凝胶支架的各组细胞中(内皮细胞+血管内皮生长因子组中胎牛血清含血管内皮生长因子),置于细胞培养箱中孵育 7 d,每 2 天更换 1 次细胞培养基。

1.2.3 免疫荧光细胞染色

于细胞培养箱中取出上述 4 组经三维培养的细胞培养皿,弃去剩余培养基,0.01 mmol/L pH 7.4 的 PBS 反复清洗 3 次,吸去残留液体。加入 100%冷丙醛 37℃下固定 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。再加入兔抗鼠特异性 CD31 抗体(1:100), 37℃下作用 30 min,弃去残留一抗, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,最后加入四甲基罗丹明异硫氰酸酯(tetramethylrhodamine isothiocyanate, TMRITC)标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:200), 37℃下作用 30 min,弃去残留二抗, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。滴加甘油缓冲液后,直接于荧光显微镜下镜检,并摄片记录^[9],呈红色荧光为阳性表达。

2 结果

内皮细胞组内皮细胞和细胞间相互交联无明显增生,无明显血管网状结构形成;内皮细胞+血管内皮生长因子组、内皮细胞+心肌细胞组及内皮细胞+心肌成纤维细胞组内皮细胞明显增生,细胞间相互交联增多,形成了较多的血管网状结构,见图 1。



A:内皮细胞+血管内皮生长因子组;B:内皮细胞组;C:内皮细胞+心肌细胞组;D:内皮细胞+心肌成纤维细胞组。

图1 各组三维培养细胞的特异性 CD31 免疫荧光染色(×400)

3 讨 论

缺血性心脏病是由于冠状动脉粥样硬化性改变引起血管管腔狭窄或闭塞,造成冠状动脉血流供应与心肌需求间失衡,从而导致缺血性心肌损伤的一大类疾病总称^[10]。心肌缺血会导致心绞痛、心肌梗死、心力衰竭、恶性心律失常,甚至猝死^[11]。且长期缺血、缺氧会导致心肌弥漫性纤维化,可造成心肌收缩和舒张功能障碍,此时即使心肌血运恢复,其疾病进程也无法逆转^[12]。MORAN 等^[13]通过研究指出,自 20 世纪 90 年代开始,全球年龄标准化的心肌梗死发病率、心绞痛患病率、全球大部分地区年龄标准化缺血性心脏病死亡率有所降低,缺血性心力衰竭患病率则升高,但由于人口增长和老龄化的影响,近年来全球缺血性心脏病的疾病负担明显增加,现已占据全球死亡原因的第 1 位。因此,研究心肌重塑过程中血管生成的分子机制,促进早期间质血管网再生,对有效延缓并逆转该类疾病有重大的实际临床意义。

血管生成是在促进因子和抑制因子的共同作用下,内皮细胞激活、增殖、迁移,最终形成新生血管和血管网的过程^[14]。已发现的血管生成促进因子主要包括血管内皮细胞生长因子家族、成纤维细胞生长因子家族及转移生长因子家族等 20 多种^[15],而抑制因子包括凝血酶敏感蛋白 1、干扰素 α/β 、血管抑素、 16×10^3 泌乳素、血小板因子 4 等 300 种^[16]。在正常生理条件下,此过程的调控是由这两种因子之间的平衡实现的,通常抑制因子的作用要强于促进因子。当心肌组织在物理的(压力或容量超负荷)、化学的(缺血或缺氧)及代谢的(多种代谢产物)因素作用下,这一平衡被打破,血管生成因子启动,通过众多细胞信号通路,如 Notch 信号通路、Netrin1-CD146 信号通路、转移生长因子- β 信号通路等,以及其一系列复杂的分子生物学反应而使细胞外基质降解,内皮细胞激活、增殖、迁移形成管腔,最后结合相应平滑肌细胞和周围细胞构成完整的血管网状结构,以使病变组织的微血管密度增加、改善,甚至恢复其氧气和营养供应^[17]。

综上所述,虽然血管生成的分子机制及其通路被广泛研究,且很多已被证实^[18],但具体调节过程十分复杂,该领域仍需进一步的研究探讨。本实验另辟蹊径,通过血管内皮细胞、心肌细胞、心肌成纤维细胞的体外三维培养,结果发现:在内皮细胞与心肌细胞、内皮细胞与心肌成纤维细胞共培养的条件下,去除血管内皮生长因子依然能促进内皮细胞增殖并交联形成完整的血管网络。该研究揭示了细胞间直接接触的促血管化功能,解答了血管生成调节领域内的又一个疑问,为进一步探讨细胞间相互作用在血管生成及其

他生理和病理环境下的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] SEVERINO P, D'AMATO A, PUCCI M, et al. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8118.
- [2] JENCA D, MELENOVSKY V, STEHLIK J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors [J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8(1):222-237.
- [3] LOPES R D, ALEXANDER K P, STEVENS S R, et al. Initial invasive versus conservative management of stable ischemic heart disease in patients with a history of heart failure or left ventricular dysfunction: insights from the IS-CHEMIA trial[J]. *Circulation*, 2020, 142(18):1725-1735.
- [4] PULKKINEN H H, KIEMA M, LAPPALAINEN J P, et al. BMP6/TAZ-Hippo signaling modulates angiogenesis and endothelial cell response to VEGF [J]. *Angiogenesis*, 2021, 24(1):129-144.
- [5] JAVED S, MITCHELL K, SIDSWORTH D, et al. Inonotus obliquus attenuates histamine-induced microvascular inflammation [J]. *PLoS One*, 2019, 14(8):e0220776.
- [6] ROSENBERG M, LUTZ M, KÜHL C, et al. Coculture with hematopoietic stem cells protects cardiomyocytes against apoptosis via paracrine activation of AKT[J]. *J Transl Med*, 2012, 10:115.
- [7] XU H, YI B A, WU H, et al. Highly efficient derivation of ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells with a distinct epigenetic signature[J]. *Cell Res*, 2012, 22(1):142-154.
- [8] CHO H, BALAJI S, SHEIKH A Q, et al. Regulation of endothelial cell activation and angiogenesis by injectable peptide nanofibers[J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(1):154-164.
- [9] KARAMANOLIS G, DELLADETSIMA I, KOULOULIAS V, et al. Increased expression of VEGF and CD31 in postradiation rectal tissue: implications for radiation proctitis[J]. *Mediators Inflamm*,

2013,2013;515048.

- [10] SEVERINO P, D'AMATO A, PUCCI M, et al. Ischemic heart disease and heart failure: role of coronary ion channels[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9):3167.
- [11] RUEL M, SUN L Y, FARKOUH M E, et al. Implications of the ISCHEMIA trial on the practice of surgical myocardial revascularization [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2021, 162(1): 90-99.
- [12] DÍEZ J, GONZÁLEZ A, KOVACIC J C. Myocardial interstitial fibrosis in nonischemic heart disease, part 3/4: JACC focus seminar[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(17):2204-2218.
- [13] MORAN A E, FOROUZANFAR M H, ROTH G A, et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980—2010; the Global Burden of Disease 2010 Study [J]. *Circulation*, 2014, 129(14):1483-1492.
- [14] MA Q, REITER R J, CHEN Y. Role of melatonin in controlling angiogenesis under physiological and pathological conditions[J]. *Angiogenesis*, 2020, 23(2):91-104.
- [15] TAN S, ZANG G, WANG Y, et al. Differences of angiogenesis factors in tumor and diabetes mellitus[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14:3375-3388.
- [16] TZENG H E, CHEN P C, LIN K W, et al. Basic fibroblast growth factor induces VEGF expression in chondrosarcoma cells and subsequently promotes endothelial progenitor cells-primed angiogenesis[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129(2):147-158.
- [17] OLEJARZ W, KUBIAK-TOMASZEWSKA G, CHRZANOWSKA A, et al. Exosomes in angiogenesis and anti-angiogenic therapy in cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16):5840.
- [18] XI Y, HAO M, LIANG Q, et al. Dynamic resistance exercise increases skeletal muscle-derived FSTL1 inducing cardiac angiogenesis via DIP2A-Smad2/3 in rats following myocardial infarction[J]. *J Sport Health Sci*, 2021, 10(5): 594-603.

(收稿日期:2021-08-28 修回日期:2021-11-22)

(上接第 919 页)

- [5] WANG J R, YAU L F, GAO W, et al. Quantitative comparison and metabolite profiling of saponins in different parts of the root of panax notoginseng[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 10, 62(36):9024-9034.
- [6] RAMZY M M, ABDALLA A M, ZENHOM N M, et al. Therapeutic effect of liraglutide on expression of CTGF and BMP-7 in induced diabetic nephropathy[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10):17512-17519.
- [7] ASCHAUER C, PERCO P, HEINZEL A, et al. Positioning of tacrolimus for the treatment of diabetic nephropathy based on computational network analysis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169518.
- [8] LEE S Y, HSIN L W, SU M J, et al. A novel isoquinoline derivative exhibits anti-inflammatory properties and improves the outcomes of endotoxemia[J]. *Pharmacol Rep*, 2019, 71(6): 1281-1288.
- [9] LIU W, CHEN X, WANG Y, et al. Micheliolide ameliorates diabetic kidney disease by inhibiting Mtdh-mediated renal inflammation in type 2 diabetic db/db mice[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 24(150):104506.
- [10] HONDA T, INAGAWA H. Usefulness of monocytes/macrophages activated with low-dose lipopolysaccharide in tumor tissue and adipose tissue of obesity[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(8): 4475-4478.
- [11] SONG C H, JOO H M, HAN S H, et al. Low-dose ionizing radiation attenuates mast cell migration through suppression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by Nr4a2[J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(11):1498-1506.
- [12] UNGVARI Z, VALCARCEL-ARES M N, TARANTINI S, et al. Connective tissue growth factor (CTGF) in age-related vascular pathologies[J]. *Geroscience*, 2017, 39(5):491-498.

(收稿日期:2021-06-11 修回日期:2021-10-01)