

冠脉搭桥术后静脉桥平滑肌细胞模型建立

张 浒¹⁾, 林 玲¹⁾, 杨爱玲¹⁾, 苏 蓉¹⁾, 黄 波²⁾

(1)昆明医科大学第一附属医院老年心脏内科; 2)麻醉手术科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 探索冠脉搭桥静脉桥体外细胞模型的建立。**方法** 体外培养大鼠静脉平滑肌细胞, 正常对照组, 5% 张应力组, 10% 张应力组, 15% 张应力组 4 组, 细胞拉伸装置不同拉伸幅度拉伸细胞, 观察细胞形态变化, CCK-8 检测观察细胞活性变化, Edu 染色观察细胞增殖变化, 划痕实验观察细胞迁移能力变化。**结果** 与正常对照组相比较, 5% 张应力对细胞活度无显著影响($P > 0.05$); 10% 张应力明显促进细胞活力($P < 0.05$); 而 15% 张应力则明显抑制细胞活力($P < 0.01$)。与正常对照组相比, 5% 张应力对细胞增殖无显著影响($P > 0.05$); 10% 张应力明显促进细胞增殖($P < 0.01$); 15% 张应力明显抑制细胞增殖($P < 0.05$)。与正常组对比, 5% 张应力对细胞迁移能力无明显影响($P > 0.05$); 10% 张应力促进细胞迁移能力($P < 0.05$); 15% 张应力明显抑制细胞迁移能力($P < 0.05$)。**结论** 建立模型在频率 1HZ, 拉伸变形幅度 10% 参数设定下, 血管平滑肌细胞与临床静脉桥再狭窄增生细胞生物行为表现一致。

[关键词] 静脉桥; 模型; 体外; 血管平滑肌细胞; 冠脉搭桥术

[中图分类号] R332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X(2024)10 - 0017 - 05

Establishment of a Smooth Muscle Cell Model for Venous Grafts after Coronary Bypass Surgery

ZHANG Hu¹⁾, LIN Ling¹⁾, YANG Ailing¹⁾, SU Rong¹⁾, HUANG Bo²⁾

(1) Dept. of Geriatric Cardiology; 2) Operating Room, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the establishment of in vitro model of coronary artery bypass venous bridge in coronary artery bypass graft (CABG). **Methods** Rat venous smooth muscle cells were cultured in vitro and divided into 4 groups. The cells were stretched by cell stretching device in order to simulate the mechanical environment of vein bridge. The changes of cell morphology were observed by CCK-8 detection, cell activity was observed by Edu staining, and cell migration ability was observed by scratch test. **Results** Compared to the normal control group, 5% tensile stress had no significant effect on cell viability ($P > 0.05$); 10% tensile stress significantly enhanced cell vitality ($P < 0.05$); while 15% tensile stress significantly suppressed cell vitality ($P < 0.01$). In terms of cell proliferation, 5% tensile stress showed no significant effect compared to the normal control group ($P > 0.05$); 10% tensile stress significantly promoted cell proliferation ($P < 0.01$); and 15% tensile stress significantly inhibited cell proliferation ($P < 0.05$). Compared to the normal group, 5% tensile stress had no obvious impact on cell migration capability ($P > 0.05$); 10% tensile stress promoted cell migration ability ($P < 0.05$); and 15% tensile stress significantly inhibited cell migration ability ($P < 0.05$). **Conclusion** Under establishment the parameters of 1 Hz frequency and 10% stretch deformation, the biological behavior of vascular smooth muscle cells is consistent with that of clinical stenosis-restenosis cells.

[Key words] Venous bridge; Model; In vitro; Venous smooth muscle cells; Coronary artery bypass graft

[收稿日期] 2024 - 04 - 08

[基金项目] 云南省科技厅基础研究计划基金资助项目(202201AY070001-067)

[作者简介] 张浒(1978~), 男, 重庆人, 医学博士, 副教授, 主要从事临床心血管疾病治疗和教学工作。

[通信作者] 黄波, E-mail: 1036496536@qq.com

冠脉搭桥术是临床治疗冠心病的主要手段,但最常选用的静脉桥血管容易发生再狭窄,严重影响冠脉搭桥术预后。既往的研究显示静脉桥再狭窄是静脉移植到动脉系统后,应力环境改变引起血管内膜增厚所致,而血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖和迁移能力的改变是静脉桥内膜增厚导致再狭窄的细胞学基础^[1-2]。因此,模拟静脉桥移植到动脉系统的力学环境,观察 VSMC 的细胞活性变化,建立冠脉搭桥静脉桥体外细胞模型对于攻克静脉桥再狭窄这一临床难题就有非常主要的意义。

1 材料与方法

1.1 VSMC 分离培养

选取 100 ~ 200 g SD 雄性大鼠,10% 水合氯醛按 0.3 mL/100 g 腹腔注射,并腹部皮下注射肝素 25 μ g/100 g 抗凝。待大鼠麻醉后取仰卧位固定,备皮后常规碘伏消毒,先作左侧颈部纵切口,钝性分离显露左侧颈外静脉约 1.5 cm,8-0 棉纶线先结扎静脉近心端至颈内外静脉分叉处,后结扎远心端,眼科剪迅速剪断远心端及近心端,将剪下的颈外静脉条移至超净工作台,用 D-Hank's 液将颈外静脉条冲洗 2 ~ 3 遍,洗去组织上的血污及破损细胞,沿纵轴剪开颈外静脉,内膜面向上,用手术刀片小心刮去内膜, D-Hank's 液冲洗,从内面用眼科镊小心剥下中膜,剪成约 1 \times 1 mm 的正方形组织块,放在经组织培养液处理的培养瓶上,加入培养基。再以上述方法对右侧颈外静脉进行同样处理。一旦细胞从组织中迁移出来,将组织块取出并丢弃。通过用抗平滑肌肌动蛋白抗体进行免疫细胞化学染色证实了平滑肌细胞表型,使用第 3 ~ 8 代的平滑肌细胞完成细胞实验。过量麻醉法处死大鼠。实验经昆明医科大学动物实验伦理审查委员会批准(kmmu20230350)。

1.2 VSMC 细胞形态鉴定

对原代培养的 VSMC 细胞进行白光拍照。

1.3 VSMC 细胞免疫荧光鉴定

(1)吸去细胞培养液, PBS 溶液浸洗 3 次,吸去 PBS 溶液, 4% 多聚甲醛固定细胞爬片, 室温 30 min; (2)0.01 mol/L PBS 溶液浸洗, 5 min \times 3 次; (3)0.2% Triton X-100(PBS 配制)室温通透 20 min; (4)0.01 mol/L PBS 溶液浸洗, 5 min \times 3 次; (5)5% 羊血清溶液封闭, 37 $^{\circ}$ C 恒温烘箱孵育 1 h; (6)吸去多余的封闭液, 滴加已配好的一

抗(稀释液为 2% 羊血清溶液)于细胞爬片上, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜; (7)0.01 mol/L PBST 溶液浸洗, 5 min \times 4 次; (8)吸去 PBST 溶液, 滴加已配好的荧光二抗(稀释液为 PBST 溶液)于细胞爬片上, 37 $^{\circ}$ C 恒温烘箱避光孵育 1 h; (9)0.01 mol PBST 溶液浸洗, 5 min \times 3 次; (10)吸取多余的溶液, 每张细胞爬片上滴加 50 μ L 的抗淬灭封片剂(含 DAPI)封片, 荧光显微镜下观察并采集图片。

DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发光下为蓝色, 一抗 α -SMA、smMHC、CD31 对应的荧光二抗 Affinity purified Antibody Daylight 488 Labeled Goat anti-Mouse IgG(H+L)在紫外的激发光下为绿色, 即阳性表达呈现颜色为绿色, 其中 α -SMA、smMHC 抗体阳性表达定位在胞质, CD31 无表达。

1.4 体外细胞模型建立

本研究采用 Flexcell 细胞拉伸系统(FL4000)对 VSMC 细胞拉伸, FL4000 由监视器, 计算机, 控制模块和底板组成。将特殊制造的 6 孔组织培养板(柔性底板, 底部由硅制成)倒入位于 CO₂ 培养箱中的底板垫片中。控制模块可调节底部和底部的 Flexcell 培养板下方的空气压力和抽气速率。在负压模式下, 培养孔底以大体均匀的方式向下拉, 在正压模式下, 将孔底向上推, 从而在整个培养板表面上产生更均匀的双轴应变场。排空速率和压力调节单次形变拉伸的性质。重复变形会产生细胞拉伸的频率。可以通过计算机编程不同的变形参数以匹配体内组织的变形参数。通过调节施加于柔性底板的压力和时间, 可以在体外模拟人体动脉相同的频率, 振幅和持续时间。从而模拟静脉桥 VSMC 的动脉力学环境。

1.5 实验分组

实验分 4 组, 正常对照组(对细胞不施加任何拉伸), 5% 张应力组(对细胞施加频率为 1 Hz, 应力拉伸变形幅度为 5%), 10% 张应力组(对细胞施加频率为 1 Hz, 应力拉伸变形幅度为 10%), 15% 张应力组(对细胞施加频率为 1 Hz, 应力拉伸变形幅度为 15%)。

以上实验分组, 作用 24 h 后, 进行以下检测或实验。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 软件进行统计学分析, 所有数据符合正态分布和方差齐性, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 显微镜下观察

加力后细胞状态变差, 速度缓慢, 且随着拉伸变形幅度变大, 生长越慢, 见图 1。

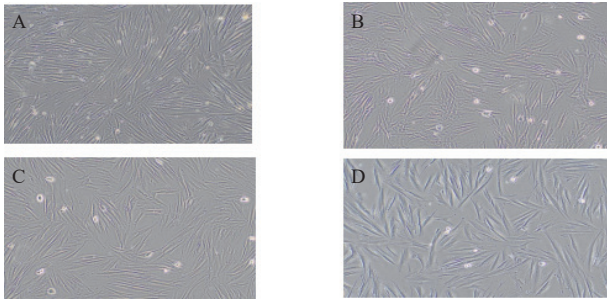


图 1 各组 VSMC 形态观察 (×25)

Fig. 1 Morphology in each group of VSMC (×25)

A: 正常对照组; B: 5% 张应力组; C: 10% 张应力组; D: 15% 张应力组。

2.2 免疫荧光染色结果性显示

标志性物 α -SMA、smMHC 表达呈阳性, 而内皮标志物 CD31 表达呈阴性, 见图 2。

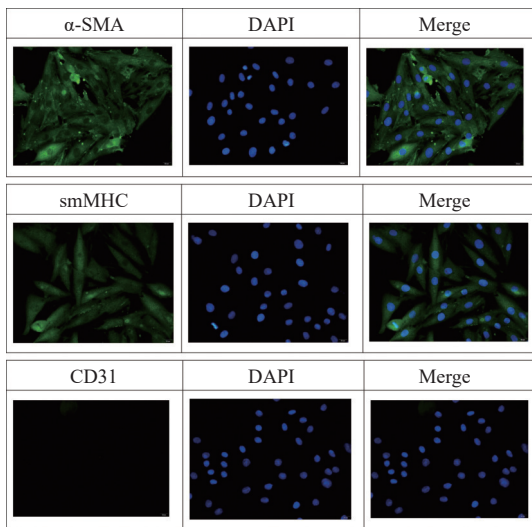


图 2 各组免疫荧光染色结果

Fig. 2 Immunofluorescence staining in each group of VSMC

2.3 细胞活力检测试剂盒 (CCK-8) 检测结果显示

与正常对照组相比较, 5% 张应力组细胞活力变化无统计学意义 ($P > 0.05$); 10% 张应力组细胞活力率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 15% 张应力组细胞活力率显著低于对照组 ($P < 0.01$), 见图 3。

2.4 EDU 染色结果显示

与正常对照组相比较, 5% 张应力组, EDU

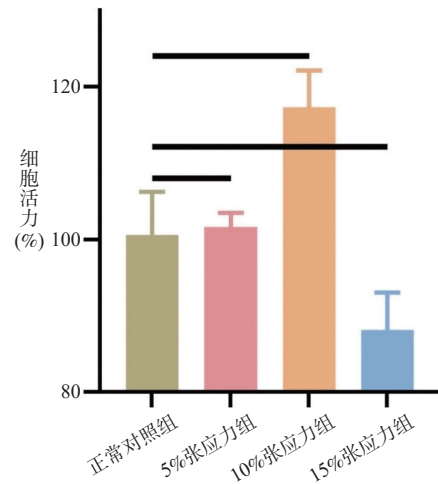


图 3 各组细胞活力统计分析结果

Fig. 3 Statistical analysis of CCK-8 in each group of VSMC

阳性细胞变化无统计学意义 ($P > 0.05$); 10% 张应力组, EDU 阳性细胞数量显著增多 ($P < 0.01$); 15% 张应力组, EDU 阳性细胞数量显著减少 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.5 细胞划痕实验结果显示

与正常组比较, 5% 张应力组划痕愈合率改变无统计学意义 ($P > 0.05$); 10% 张应力组划痕愈合率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 15% 张应力组划痕愈合率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论

3.1 冠心病搭桥术治疗现状

冠心病是全球首位死亡原因^[3]。根据国内 2022 年的心血管疾病报告推算, 在城市和农村居民中, 冠心病的死亡率分别为 121.59/10 万和 130.14/10 万^[4]。通过移植自体血管恢复冠心病患者心肌灌注 (再血管化) 的冠脉搭桥术 (coronary artery bypass graft, CABG) 是临床上广泛应用的治疗手段^[5]。2021 年我国完成 CABG 手术近 6 万例, 占心脏总手术量的 21.5%^[6]。大隐静脉是 80% 的 CABG 再血管化中选用的桥血管^[7]。但静脉桥容易发生狭窄或闭塞, 会增加患者发生心绞痛、心肌梗死、再次血运重建甚至死亡的风险, 严重制约了 CABG 的疗效^[8]。

3.2 静脉桥再狭窄研究成果

目前针对静脉桥再狭窄临床主要采用抗血小板治疗及他汀类降脂药, 但效果有限, 1 项 Meta 分析显示, 只服用阿司匹林的患者有 20% 的静脉桥闭塞, 服用阿司匹林加替格瑞洛的患者依然有

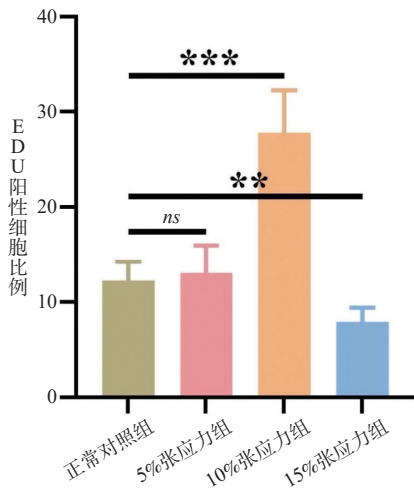
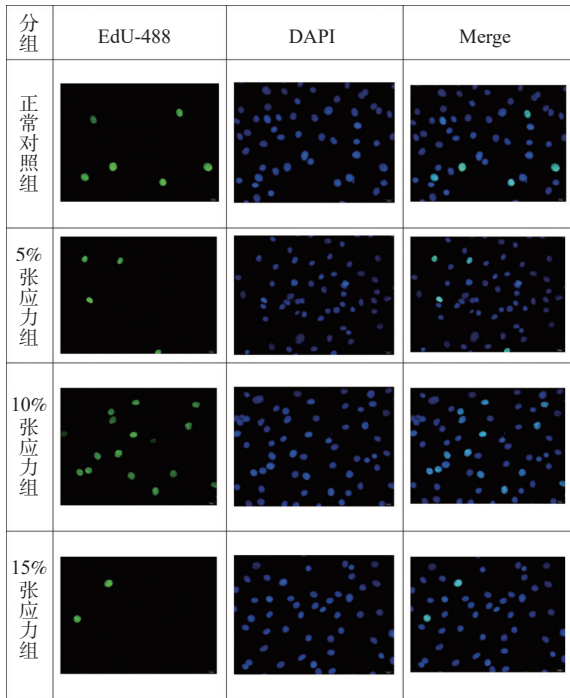


图 4 各组 EDU 染色结果

Fig. 4 EDU staining in each group of VSMC

与正常对照组比较, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ 。

11.2%的静脉桥闭塞, 但出血风险增加^[9]。临床对于静脉桥再狭窄的治疗遇到了瓶颈。

研究显示静脉桥再狭窄是静脉移植到动脉系统后, 应力环境改变引起血管内膜增厚所致, 血管平滑肌细胞增殖和迁移是内膜增厚的细胞学基础。研究显示由动脉搏动引起的周期性拉伸增加在内膜增生中起重要作用^[10-11]。周期性拉伸, 其定义为血管壁随着血压有节奏地扩张和松弛而引起的细胞反复变形, 这是静脉桥再狭窄的关键病理因素。静脉桥再狭窄, 可以看作静脉所处血流应力环境改变后(动脉压力和动脉搏动血流), 移植静脉为了适应新应力环境发生“动脉化”的过程^[12-14]。而抗血小板药物和他汀类稳斑药对血管

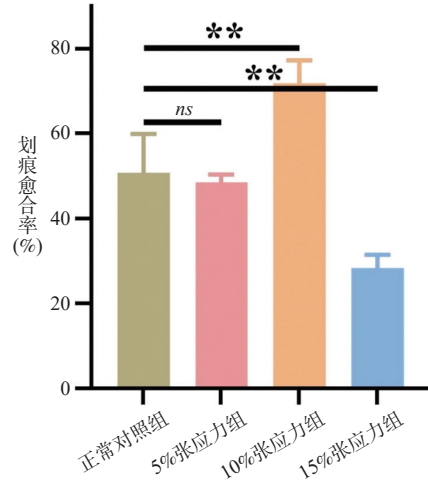
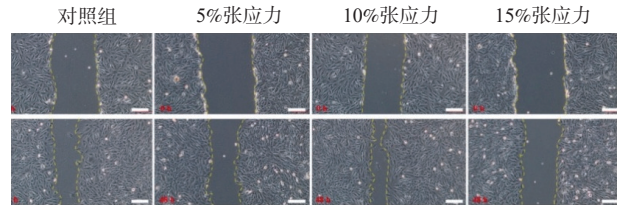


图 5 各组划痕愈合率的统计分析结果

Fig. 5 Statistical analysis of the proportion of wound healing in each group of VSMC

与正常对照组比较, ns $P > 0.05$, ** $P < 0.05$ 。

平滑肌细胞增殖和迁移无效, 这也许就是目前 CABG 术后临床药物治疗静脉桥再狭窄的瓶颈所在, 笔者前期研究发现, 在 CABG 动物模型上, 静脉桥再狭窄机制与血管平滑肌细胞增殖有关^[15]。

3.3 建立冠脉搭桥静脉桥体外平滑肌细胞模型的意义及依据

未来针对 CABG 静脉桥再狭窄预防的药物研究要聚焦于血管平滑肌细胞增殖和迁移的作用, 能否成功建立 CABG 静脉桥体外血管平滑肌细胞模型成为此类研究的基础。

笔者体外培养静脉血管平滑肌细胞, 通过免疫鉴定, 确定培养的是平滑肌细胞而不是内皮细胞。本研究中, 免疫荧光检测 VSMC 标志性物 α -SMA 和 smMHC 及内皮标志物 CD31 的荧光强度。DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发光下为蓝色, 一抗 α -SMA、smMHC、CD31 对应的荧光二抗 affinity purified antibody daylight 488 labeled goat anti-mouse IgG(H+L)在紫外的激发光下为绿色, 即阳性表达呈现颜色为绿色。免疫荧光染色结果性显示: 培养细胞标志性物 α -SMA、smMHC 表达呈阳性, 而内皮标志物 CD31 表达呈阴性, 以此证明笔者培养的是血管平滑肌细胞。

笔者再通过周期性拉伸血管平滑肌细胞模拟静脉桥移植到冠状动脉后的血管平滑肌细胞生存

的力学环境。通过设定好细胞拉伸系统装置的参数模拟动脉搏动, 在不同牵张幅度下观察血管平滑肌细胞的生物学特性。细胞活力检测试剂盒 (CCK-8) 检测结果显示, 与正常对照组相比较, 5% 张应力组细胞活力改变无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 5% 张应力组对细胞活度无明显影响; 10% 张应力组细胞活力率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 提示 10% 张应力明显促进细胞活力; 15% 张应力组细胞活力率显著低于对照组 ($P < 0.01$), 提示 15% 张应力则明显抑制细胞活力。EDU 染色结果显示, 与正常对照组相比较, 5% 张应力组, EDU 阳性细胞变化无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 5% 应力对细胞增殖无明显影响; 10% 张应力组 EDU 阳性细胞数量显著增多 ($P < 0.01$), 提示 10% 张应力明显促进 VSMC 增殖; 15% 张应力组 EDU 阳性细胞数量显著减少 ($P < 0.05$), 提示 15% 应力明显抑制 VSMC 增殖。细胞划痕实验结果显示, 与正常组对比, 5% 张应力组划痕愈合率变化无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 5% 张应力对细胞迁移无明显影响; 10% 张应力组划痕愈合率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 提示 10% 张应力明显促进细胞迁移能力; 15% 张应力组划痕愈合率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 提示 15% 张应力明显抑制细胞迁移能力。

本研究发现频率为 1 Hz, 应力拉伸变形幅度 10% 时血管静脉平滑肌细胞细胞活力增加, 细胞增殖能力提高, 细胞迁移能力提高, 与临床上静脉桥再狭窄增生细胞生物行为表现一致, 冠脉搭桥静脉桥体外血管平滑肌细胞模型建立成功。

[参考文献]

- [1] Guida G A, Angelini G D. Pathophysiology and mechanisms of saphenous vein graft failure[J]. *Braz J Cardiovasc Surg*, 2022, 37(Spec 1): 32-37.
- [2] Kang L, Jia H, Huang B, et al. Identification of differently expressed mRNAs in atherosclerosis reveals CDK6 is regulated by circHIPK3/miR-637 axis and promotes cell growth in human vascular smooth muscle cells[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 596169-596181.
- [3] Duggan J P, Peters A S, Trachiotis G D, et al. Epidemiology of coronary artery disease[J]. *Surg Clin North Am*, 2022, 102(3): 499-516.
- [4] 胡盛寿. 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2022, 37(6): 553-578.
- [5] 中国生物医学工程学会体外循环分会, 赵举, 黑飞龙, 等. 2021 年中国心外科手术和体外循环数据白皮书 [J]. *中国体外循环杂志*, 2022, 20(4): 196-199.
- [6] Caldonazo T, Kirov H, Riedel L L, et al. Comparing CABG and PCI across the globe based on current regional registry evidence[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 22164-22174.
- [7] Audisio K, Halbreiner M S, Chadow D, et al. Radial artery or saphenous vein for coronary artery bypass grafting[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2022, 32(8): 479-484.
- [8] Caliskan E, de Souza D R, Böning A, et al. Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(3): 155-169.
- [9] Sandner S, Redfors B, Angiolillo D J, et al. Association of dual antiplatelet therapy with ticagrelor with vein graft failure after coronary artery bypass graft surgery: A systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA*, 2022, 328(6): 554-562.
- [10] Hosseini V, Mallone A, Nasrollahi F, et al. Healthy and diseased in vitro models of vascular systems[J]. *Lab Chip*, 2021, 21(4): 641-659.
- [11] Abutaleb N O, Truskey G A. Differentiation and characterization of human iPSC-derived vascular endothelial cells under physiological shear stress[J]. *STAR Protoc*, 2021, 2(2): 100394.
- [12] Jackson M L, Bond A R, George S J. Mechanobiology of the endothelium in vascular health and disease: In vitro shear stress models[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2023, 37(5): 997-1010.
- [13] Urschel K, Tauchi M, Achenbach S, et al. Investigation of wall shear stress in cardiovascular research and in clinical practice—from bench to bedside[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5635-5654.
- [14] 贾丹, 曹伟丽, 黄立娟. microRNA 调节血管平滑肌细胞在动脉粥样硬化中的作用 [J]. *国际免疫学杂志*, 2023, 46(3): 341-345.
- [15] 张许, 钟佳冀, 黄宏波, 等. 灯盏花素对冠脉搭桥术移植静脉保护作用的实验 [J]. *昆明医科大学学报*, 2019, 40(11): 26-29.