

酶消化联合组织块贴壁法建立大鼠后腔静脉血管干细胞培养体系及其鉴定

马华根¹, 池茗², 信琪琪¹, 缪宇¹, 袁蓉¹, 施伟丽³, 王智涛¹, 陈娟¹, 唐元瑜^{4*}, 丛伟红^{1*}

¹中国中医科学院西苑医院心血管实验室, 北京 100091; ²福建中医药大学中西医结合学院, 福建福州 350122; ³河南中医药大学第二临床医学院, 河南郑州 450002; ⁴福建中医药大学中医学院, 福建福州 350122

[中图分类号] R392.33; R33 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0177.2026.0708

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 马华根, 池茗, 信琪琪, 等. 酶消化联合组织块贴壁法建立大鼠后腔静脉血管干细胞培养体系及其鉴定[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(20): 37-44.

[收稿日期] 2026-01-22

[录用日期] 2026-04-01

[上线日期] 2026-07-08

[摘要] 目的 建立大鼠后腔静脉血管干细胞的体外培养方法, 为血管再生医学的相关研究提供适用的种子细胞。方法 无菌分离1月龄SD大鼠后腔静脉, 采用酶消化结合组织块贴壁法接种培养原代细胞, 其后通过差速消化及低密度传代进一步扩增、纯化目的细胞; 培养期间持续观察记录细胞生长情况。取P8代目的细胞, 流式细胞术分析细胞表面标志物CD90、CD73、CD45、CD44、CD34、CD29和CD11b/c的表达水平; 成脂、成骨、成软骨诱导分化并分别行油红O、茜素红、阿利新蓝染色, 检测细胞多向分化潜能; 划痕实验评估细胞迁移速率, 血管形成实验观测细胞成管能力。结果 倒置显微镜下观察可见, 原代培养3 d后, 静脉组织周围迁出成纤维样细胞, 4 d出现细胞克隆团, 5~8 d细胞团簇逐渐扩大、融合, 单层贴壁生长; 扩增过程中细胞增殖迅速, 分皿接种2~3 d即可再次传代。P8代细胞形态均一, 呈典型的成纤维样梭形, 未见老化或异常分化现象; 其表达间充质标志物CD90、CD73、CD44、CD29的阳性率分别为(99.50±0.10)%、(97.40±0.61)%、(96.23±0.60)%、(99.43±0.06)%, 表达造血及内皮标志物CD45、CD34、CD11b/c的阳性率分别为(1.76±0.25)%、(0.87±0.41)%、(1.57±0.38)%; 成脂、成骨、成软骨诱导后分别出现脂滴、钙结节、软骨球, 染色结果均为阳性; 细胞划痕24 h内完全愈合, 迁移能力良好, 且可在基质胶上形成暂时稳定的管腔结构。结论 本研究成功分离、扩增得到大鼠静脉来源、具有间充质干细胞特性和良好迁移、成管能力的血管干细胞, 可用于静脉疾病的血管再生医学相关研究。

[关键词] 血管干细胞; 静脉; 培养扩增; 表面标志物; 多向分化潜能; 血管再生医学

Establishment and characterization of a culture system for rat posterior vena cava-derived vascular stem cells using enzymatic digestion combined with tissue explant adherence method

Ma Hua-Gen¹, Chi Ming², Xin Qi-Qi¹, Miao Yu¹, Yuan Rong¹, Shi Wei-Li³, Wang Zhi-Tao¹, Chen Juan¹, Tang Yuan-Yu^{4*}, Cong Wei-Hong^{1*}

¹Cardiovascular Laboratory, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

²College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, ³College of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

⁴Second Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450002, China

*Corresponding author, Cong Wei-Hong, E-mail: congcao@188.com; Tang Yuan-Yu, E-mail: 2422198977@qq.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81072714), and the Beijing Natural Science Foundation (7252267)

[Abstract] Objective To establish an *in vitro* culture method for vascular stem cells derived from the posterior vena cava of

[基金项目] 国家自然科学基金(81072714); 北京市自然科学基金(7252267)

[作者简介] 马华根, 博士研究生, 主要从事中医再生医学及中西医结合心血管病的基础研究

[通信作者] 丛伟红, E-mail: congcao@188.com; 唐元瑜, E-mail: 2422198977@qq.com

rats, providing suitable seed cells for studies in vascular regenerative medicine. **Methods** The posterior vena cava was aseptically isolated from 1-month-old Sprague Dawley rats. Primary cells were cultured by enzymatic digestion combined with tissue explant adherence method, which were subsequently expanded and purified through differential digestion and low-density passaging. Cell growth was continuously observed and recorded throughout the culture period. Passage 8 (P8) target cells were analyzed via flow cytometry for the expression levels of surface markers CD90, CD73, CD45, CD44, CD34, CD29, and CD11b/c. Adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation potentials were assessed through induction, followed by Oil Red O, Alizarin Red, and Alcian Blue staining, respectively. A scratch assay was performed to evaluate cell migration rate, and a tube formation assay was conducted to assess tubulogenesis. **Results** Under inverted microscopy, fibroblast-like cells were observed migrating from venous tissue explants 3 days after primary culture, with cell clones appearing by day 4. Between days 5 and 8, cell clusters gradually expanded, fused, and exhibited monolayer growth. During passaging, cells proliferated rapidly, requiring subculturing every 2–3 days. By P8, cells exhibited a homogeneous, typical fibroblast-like spindle morphology without signs of senescence or abnormal differentiation. P8 cells highly expressed mesenchymal markers CD90 ($99.50 \pm 0.10\%$), CD73 ($97.40 \pm 0.61\%$), CD44 ($96.23 \pm 0.60\%$), and CD29 ($99.43 \pm 0.06\%$), while showing low expression of hematopoietic/endothelial markers CD45 ($1.76 \pm 0.25\%$), CD34 ($0.87 \pm 0.41\%$), and CD11b/c ($1.57 \pm 0.38\%$). Following induction, lipid droplets, calcium nodules, and cartilage spheroids were observed in adipogenic, osteogenic, and chondrogenic cultures, respectively, with corresponding positive staining results. Scratch wounds healed completely within 24 hours, indicating efficient migration, and cells formed temporally stable tube-like structures on Matrigel. **Conclusion** Venous-derived vascular stem cells of rat were successfully isolated and expanded, with mesenchymal stem cell characteristics, robust migratory ability, and tube-forming capacity, suitable for vascular regenerative medicine research in venous diseases.

[Key words] vascular stem cells; vein; culture and expansion; surface markers; multidirectional differentiation potential; vascular regenerative medicine

血管再生医学旨在通过促进血管新生与修复, 为心血管及缺血性疾病提供有效治疗策略^[1]; 在这一领域中, 获取具有适配性再生、分化和旁分泌功能的种子细胞是其关键。血管干细胞(vascular stem cells, VSCs)作为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的重要前体细胞来源, 体外培养的VSCs不仅稳定表达典型MSCs标志物, 还具备成脂、成骨、成软骨等多向分化潜能; 基于此, VSCs被认为是体内真实存在、具有明确解剖定位(血管壁)的细胞群体, 而MSCs则更多被视为这些前体细胞在体外培养过程中所展现的功能表型^[2-3]。同时, 既往研究显示, VSCs可定向分化为其他血管细胞组分, 并能分泌促血管与组织保护因子, 因而被视为血管再生医学研究的理想种子细胞来源^[4-6]。

然而, 既往VSCs研究大部分聚焦于动脉, 静脉来源的VSCs则鲜有报道^[7]。2024年一项高质量人体血管细胞器官图谱研究显示, 血管细胞的表型主要与血管类型(动脉、静脉、毛细血管)相关, 而非其器官来源^[8]; 且相关研究发现成体干细胞的功能倾向受其固有表观遗传记忆的深刻影响, 这种由原生微环境塑造的记忆具有长期稳定性, 即使细胞脱离原生微环境, 其特定的表观遗传特征与功能倾向仍得以保留^[9-10]。因此, 对于静脉疾病的血管再生医学研究, 有必要建立一种稳定、高效的静脉VSCs体外培养体系, 以满足静脉微环境对种子细胞表型和功能的适配性需求。

目前成体循环系统静脉VSCs的体外培养尚未广

泛开展, 且均局限于采用单一的酶消化法或组织块贴壁法, 缺乏方法学上的整合与优化^[11-13]: 酶消化法细胞得率高, 培养周期短, 但操作耗时长、成本较高, 且长时间化学酶消化易损伤细胞活性; 组织块贴壁法操作简便、成本较低, 但生长周期缓慢、易受杂细胞影响, 且大多数细胞聚集于组织周边而分布不均, 易造成营养梯度失衡、细胞接触抑制及分化信号紊乱。鉴于上述问题, 本研究拟结合酶消化法和组织块贴壁法分离原代大鼠后腔静脉VSCs (posterior vena cava-derived VSCs, PVC-VSCs), 以兼顾培养效率和细胞质量; 其后基于VSCs贴壁性强、增殖速度快的特点, 通过差速消化及低密度传代进一步扩增、纯化目的细胞, 并对其形态学特征、表面标志物、多向分化潜能、迁移及成管能力等生物学特征进行评估; 旨在为静脉疾病的血管再生医学研究提供适用的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 实验动物 1月龄雄性Sprague Dawley(SD)大鼠3只, 购自上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2022-0004]。本研究严格遵守国际兽医编辑协会制定的动物伦理与福利指南, 研究方案获河南中医药大学第二附属医院动物伦理学委员会审批(PZ-HNSZYY-2020-001)。

1.2 主要试剂及仪器 高糖型DMEM培养液购自深圳逗点生物技术有限公司; 胎牛血清购自美国Gibco公司; 大鼠MSCs专用培养液购自厦门生物角科技有

限公司; II型胶原酶、油红O异丙醇饱和染色液购自北京鼎国昌盛生物有限公司; 胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、茜素红染色液购自北京索莱宝生物有限公司; 阿利新蓝染色液、PBS缓冲液购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 大鼠MSCs表面标记检测试剂盒购自苏州赛业生物科技有限公司; Matrigel Matrix基质胶购自美国康宁公司。超净工作台购自苏州安泰净化设备有限公司; 水平多功能离心机购自美国Beckman Coulter公司; 细胞培养箱购自上海力康有限公司; 倒置显微镜购自德国Leica公司; 流式细胞仪购自美国Becton Dickinson公司。

1.3 大鼠PVC-VSCs的原代培养及扩增 取1月龄雄性SD大鼠3只, 分别进行3次独立生物学重复实验。操作步骤如下: 大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)并颈椎脱臼处死后, 浸泡于75%乙醇中消毒5 min。超净台内无菌操作, 沿腹正中线逐层剪开腹腔, 钝性分离腹膜内组织, 取出后腔静脉腹段(自髂总静脉汇合处至肾静脉汇入处, 长约1.5 cm)。剔除血管外脂肪结缔组织, 预冷PBS液反复冲洗至无血渍后, 将血管段剪碎成约1 mm³的组织小块, 0.1% II型胶原酶(DMEM培养液配制)37℃消化20 min, 其间每5 min轻晃摇匀1次; 300×g离心3 min, 弃上清。沉淀用2 ml MSCs专用培养液漂洗1次后, 再次添加2 ml新鲜MSCs专用培养液混匀重悬, 均匀接种于直径6 cm的塑料培养皿内, 转移至37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中静置培养, 每3 d半量换液1次。

待细胞培养至融合状态时(约第8 d), 吸取旧培养液, 添加2 ml预热的0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA溶液(PBS液配制)于37℃预消化2 min, 弃去消化液, 再添加2 ml新鲜酶液消化5~8 min, 镜下见大部分细胞圆缩时添加旧培养液终止消化, 轻柔振摇、吹打皿底促进细胞脱壁, 将悬液转移至离心管中, 300×g离心3 min, 沉淀以6 ml专用培养液混匀, 静置约10 s, 吸取上层的细胞悬液(尽量避免吸到质重沉底的残余组织块)接种于3个新的培养皿中, 作“十”字摇晃使细胞分布均匀, 记为P1代细胞; 后续细胞融合度达80%~90%时, 按同法进行低密度传代扩增。

1.4 大鼠PVC-VSCs的生长情况观察 于倒置显微镜下持续观察原代培养及传代扩增过程中的细胞形态、贴壁、分布、融合程度等生长情况, 并拍摄记录。

1.5 大鼠PVC-VSCs的表面标志物流式分析 取对数生长期的P8代细胞, 采用0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA溶液消化制备成单细胞悬液, 以3×10⁵个细胞/管分装成8管, 4℃、300×g离心3 min, 弃上清;

100 μl PBS液重悬, 分别加入即用型CD90、CD73、CD45、CD44、CD34、CD29、CD11b/c一抗各2 μl (留1管细胞不加一抗作为空白对照), 4℃孵育30 min; 洗涤2次后, 100 μl PBS液重悬, 分别加入FITC标记的即用型二抗2 μl, 4℃避光孵育30 min; 洗涤2次后, 300 μl PBS液重悬, 流式细胞仪检测各CD分子的表达水平(每例样本采集1×10⁴个细胞, 重复检测3次)。

1.6 大鼠PVC-VSCs的多向分化诱导 取生长密度达90%、状态良好的P8代细胞, 全量置换原培养液为2 ml成脂诱导分化液(由高糖型DMEM培养液、胎牛血清、胰岛素、吡啶美辛、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、地塞米松组成)或成骨诱导分化液(由高糖型DMEM培养液、胎牛血清、维生素C、β-甘油磷酸钠、地塞米松组成); 另取对数生长期的P8代细胞, 消化成单细胞悬液后以4×10⁵个细胞/管离心, 弃上清, 以0.5 ml成软骨诱导分化液(由高糖型DMEM培养液、胎牛血清、维生素C、转化生长因子-β1、胰岛素、亚硒酸钠、丙酮酸钠、牛血清白蛋白、地塞米松组成)重悬后再次离心, 弃上清, 缓慢加入0.5 ml成软骨定向诱导分化液, 避免冲散细胞沉淀。将各诱导分化的细胞平稳转移至培养箱中, 并每72 h半量更换相应新鲜诱导液1次。于诱导第14 d行油红O染色检测脂滴积聚; 第21 d行茜素红染色检测钙结节沉积; 第25 d行石蜡切片及阿利新蓝染色检测酸性黏多糖表达。

1.7 大鼠PVC-VSCs的迁移能力检测 将P8代细胞以5×10⁵个/孔接种于6孔板中, 培养至融合状态时用200 μl无菌枪头划垂直线, PBS液漂洗去除脱落细胞, 添加新鲜培养液继续培养。分别于划痕0 h、14 h、24 h在倒置显微镜同一视野下拍摄记录。

1.8 大鼠PVC-VSCs的血管形成实验 以50 μl/孔Matrigel Matrix基质胶包被96孔培养板, 铺平后静置于37℃培养箱中聚合45 min。取对数生长期的P8代细胞, 消化制备成单细胞悬液后, 以每孔100 μl、5×10³个细胞接种至96孔板中, 放入培养箱内; 于不同时间段在倒置显微镜下观察记录细胞的管腔结构形成情况。

1.9 统计学处理方式 采用SPSS 25.0软件进行统计分析, GraphPad Prism 10.0软件作图。计量资料均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用非配对t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠PVC-VSCs的生长情况观察 后腔静脉组织接种3 d后, 周围迁出长梭形或纺锤形的成纤维样细胞, 排列较为松散; 4 d时出现细胞克隆团; 5 d后

组织周围的细胞进一步向外迁移扩大,长势旺盛;6~8 d细胞团簇逐渐融合,单层贴壁生长;同时并存在少量不规则或多边形的杂细胞集落,以及较多漂浮死亡的细胞(图1A)。传代中刚接种的细胞呈圆缩状态,折光性较强,均匀悬浮于培养液中,未见较大细胞团块。P1—P8代漂浮死亡的细胞逐渐减少,形态趋于均一,为典型的成纤维样梭形,贴壁良好,融合密集后呈涡旋状分布,未见明显细胞老化或异常分化现象;且细胞增殖能力较强,每2~3 d即可生长至80%~90%融合,进行再次传代(图1B)。

2.2 大鼠PVC-VSCs的表面标志物表达 流式分析结果显示,P8代细胞表达间充质标志物CD90、CD73、CD44、CD29的阳性率分别为 $(99.50 \pm 0.10)\%$ 、 $(97.40 \pm 0.61)\%$ 、 $(96.23 \pm 0.60)\%$ 、 $(99.43 \pm 0.06)\%$,平均阳性率为 $(98.14 \pm 1.50)\%$;P8代细胞表达造血及内皮标志物CD45、CD34、CD11b/c的阳性率分别为 $(1.76 \pm 0.25)\%$ 、 $(0.87 \pm 0.41)\%$ 、 $(1.57 \pm 0.38)\%$,平均阳性率为 $(1.40 \pm 0.51)\%$,明显低于间充质标志物的阳性率($P < 0.05$,图2)。

2.3 大鼠PVC-VSCs的成脂、成骨和成软骨分化 在成脂诱导的第14 d,可见P8代细胞胞质中出现两阶段的脂质沉积:早期的前脂滴以细小颗粒形式出现,呈环状排列在细胞核周围;而晚期的成熟脂滴相互融合,形成大型囊泡,将细胞核推向一侧。油红O染色结果显示,中性脂质被特异性染成猩红色,其中前脂滴呈散在的红色小点,而成熟脂滴则色泽鲜艳、边界清晰且具立体感。

在成骨诱导的第21 d,可见P8代细胞层中出现大量大小不等、形态各异的类球形钙结节,呈散在或簇状分布,且边界分明。茜素红染色结果显示,钙盐沉积区域被染成深红色,与周围未着色基质形成鲜明对比,清晰勾勒出矿化结节轮廓。

在成软骨诱导的第25 d,可见P8代细胞自发聚集成外形规整且质地紧密的立体软骨球,轻晃培养皿软骨球仍保持完整而不散开。阿利新蓝染色结果显示,软骨球内部呈亮蓝色,提示细胞分化为软骨细胞并合成酸性黏多糖基质(图3)。

2.4 大鼠PVC-VSCs的划痕迁移和血管形成 P8代PVC-VSCs迁移实验显示,0 h细胞划痕边界清晰,间隙宽阔;14 h细胞已向中央大幅迁移,边缘呈不规则推进,划痕区域明显缩窄;24 h划痕已完全融合(图4A)。

P8代PVC-VSCs在Matrigel Matrix基质胶上6 h内初步形成管腔结构,并呈网状形态;在10 h时,管腔结构趋于稳定,分支数量显著增加,且未见明显的断裂或不连续现象;22 h后,管腔结构已崩解,细胞缩聚成团(图4B)。

3 讨论

静脉系统在解剖结构、血流动力学及微环境等方面均与动脉、微循环系统存在显著差异;其在慢性静脉功能不全、静脉瓣膜退变及静脉血栓形成等病理过程中亦具有独特表现^[14]。特异性的原生微环境赋予了静脉驻留VSCs特殊的功能倾向,使其适配于低血流状态下的血管稳态维持与损伤修复;静脉VSCs与骨髓、脂肪、脐带等非血管组织来源的MSCs存在本质区别,后者功能特征由各自的原生微环境塑造,未必能完全适配静脉系统的再生需求^[15-16]。因此,建立一种充分适配静脉微环境特性的VSCs体外培养体系,对于深入理解静脉疾病机制、推动静脉再生医学发展具有重要意义。

目前成体循环系统的静脉VSCs体外培养报道较少,且现有文献的提取组织多为人源大隐静脉^[11-13];因其来源受限、伦理审批严格,难以满足大规模实验需求。相比之下,大鼠具有成本低、繁殖快、体型适中、取材简便且伦理限制少等优势,是提取原代组织细胞的理想动物模型。故本研究选用大鼠作为取材对象,结合酶消化法与组织块贴壁法的双重优势^[17],并通过差速消化及低密度传代以纯化目的细胞,建立大鼠PVC-VSCs的原代培养、扩增体系。

在原代培养中,为规避衰老相关的干细胞功能衰退并获得活力更佳的目的细胞^[18-20],本研究选取1月龄幼年期SD大鼠,并以其体内最大的静脉主干——后腔静脉作为组织来源;该段血管解剖位置明确、取材简便,单只大鼠即可提供充足的组织量,可兼顾样本需求与实验动物福利。后续采用“Ⅱ型胶原酶消化—组织块贴壁”两步法:先以低浓度Ⅱ型胶原酶短时、温和地破坏细胞外基质,促进VSCs释放,再保留微小组织块作为细胞贴壁与迁移的“锚定基质”,为细胞的初始附着和后续增殖提供必要的结构支持,从而协同促进细胞生长。该策略可减少单一酶消化法易致的细胞膜损伤、活力下降,以及传统组织块贴壁法培养周期长、杂细胞污染多等缺陷,可显著提高目的细胞的得率及纯度。同时,鉴于VSCs在血管壁外膜、中膜、内膜的3层结构中均有分布^[6],本研究将后腔静脉组织剪切成约1 mm³的均匀小块,既扩大有效表面积、提高组织利用率,又可优化其在培养体系中的空间分布,减少组织聚集所致的局部微环境异质性,从而提升细胞释放效率、获取产量及培养稳定性。本研究结果显示,组织接种3 d即有细胞贴壁长出,明显早于传统组织块贴壁法7 d后才见少量细胞迁出的报道^[11]。

其后在传代扩增过程中,本研究利用差速消化法及干细胞生长优势进一步纯化目的细胞。差速消

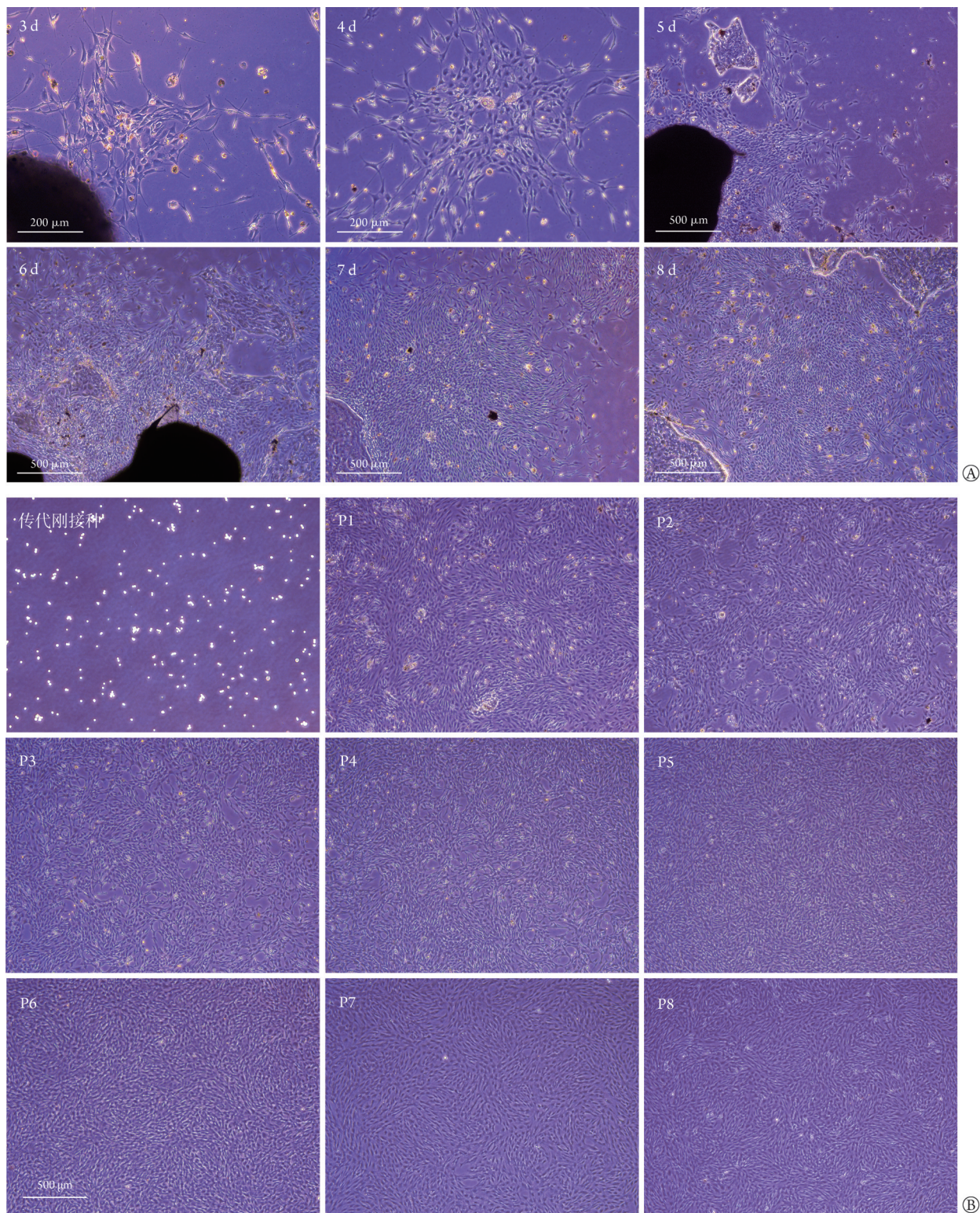


图1 原代及P1—P8代大鼠后腔静脉血管干细胞(PVC-VSCs)生长情况观察

Fig.1 Observation of growth characteristics for primary and P1-P8 posterior vena cava-derived vascular stem cells (PVC-VSCs) of rat

A. 原代PVC-VSCs生长情况, 接种3 d后, 成纤维样细胞从静脉组织(呈黑色斑块)周围迁出; 第4 d出现细胞克隆团; 第5 d时, 细胞进一步迁移扩展; 从第6 d到第8 d, 细胞逐渐融合, 单层贴壁生长, 其间散布着较多杂细胞团与漂浮细胞。B. P1—P8代PVC-VSCs生长情况, 传代刚接种下的细胞呈圆缩状态, 未见明显聚团; 从P1至P8代, 漂浮死亡的细胞逐渐减少, 细胞形态趋于均一, 呈典型的成纤维样梭形, 单层贴壁生长

化法基于不同细胞对胰蛋白酶消化的敏感性差异实现细胞纯化: VSCs通常具有较强的贴壁能力, 而其他杂细胞(如血管内皮细胞)对胰蛋白酶较敏感, 短时消化即可脱落^[21]; 故每次传代时, 先以0.05%胰蛋

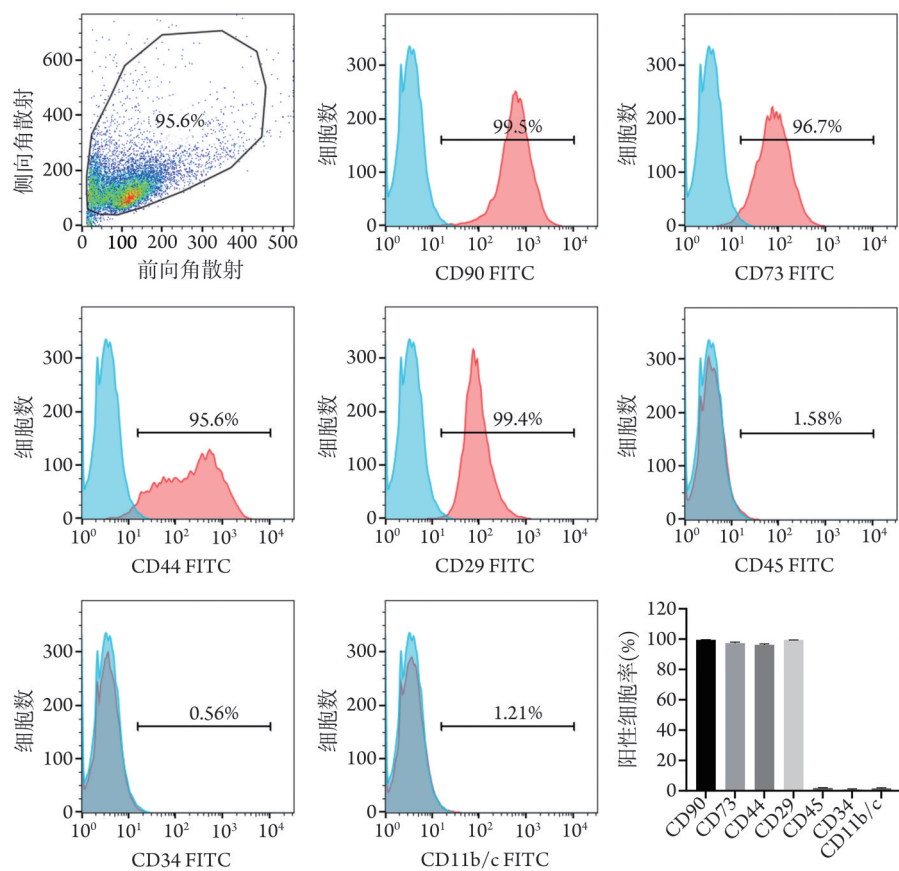


图2 P8代大鼠后腔静脉血管干细胞(PVC-VSCs)表面标志物流式分析

Fig.2 Flow cytometry analysis of surface markers in P8 posterior vena cava-derived vascular stem cells (PVC-VSCs) of rat

P8代大鼠PVC-VSCs细胞表达CD90、CD73、CD44和CD29等间充质标志物的阳性率 $[(98.14 \pm 1.50)\%]$ 较高,而表达CD45、CD34和CD11b/c等造血/内皮标志物的阳性率较低 $[(1.40 \pm 0.51)\%]$

白酶-0.02% EDTA溶液于37℃预消化2 min后弃去消化液,再以新鲜酶液重新消化,可优先去除脱壁较早的杂细胞,而保留黏附性强的VSCs。同时,VSCs的增殖活力旺盛且对生长密度的依赖性较低,可在低密度培养下保持高效增殖,进而在多次扩增过程中逐渐占据主导地位;故低密度传代不仅为VSCs提供了更充裕的生长空间,提高扩增效率,也进一步增强了纯化力度^[22-23]。这与既往纯化常采用的流式细胞分选术^[11]和免疫磁珠吸附法^[12]相比,可降低实验成本,简化操作,避免VSCs过多损失。

本研究结果显示,体外培养的PVC-VSCs呈成纤维样梭形、单层贴壁生长,稳定传代扩增至P8代时,细胞群体高表达CD90、CD73、CD44、CD29等间充质标志物,阳性率达 $(98.14 \pm 1.50)\%$;低表达CD45、CD34、CD11b/c等造血/内皮标志物,阳性率仅 $(1.40 \pm 0.51)\%$;且同时具备成脂、成骨及成软骨分化潜能,符合国际细胞与基因治疗学会对MSCs的基本定义^[24]。这也与MSCs从最初的骨髓贴壁多能干细胞,拓展至泛指存在于血管周及间质壁龛中、具有类似表型与多能性的一类干细胞的概念演变相

符^[25]。值得注意的是,本研究大鼠PVC-VSCs在体外表现出良好的增殖、迁移、成管能力,提示其具有参与血管修复的潜力。静脉系统血流缓慢、壁薄易扩张,且偏于体表,易受外界物理损伤,故对损伤修复的依赖性较高^[26];驻留其中的VSCs或可通过维持血管稳态、参与损伤应答发挥修复功能^[27]。

综上,本研究成功建立并鉴定了大鼠PVC-VSCs的体外培养体系,可为血管再生医学相关研究提供可行的细胞来源。未来研究可从以下几个方面深入:(1)探索精确的细胞产量,为标准化应用提供依据;(2)评估更高代次细胞的衰老特征及多能性维持情况,明确其有效扩增极限;(3)通过与动脉来源VSCs、骨髓MSCs等的系统比较,揭示静脉来源VSCs的独特表型与功能倾向;(4)探究PVC-VSCs在基质胶上形成暂时性管腔结构的分子机制,并检测内皮谱系分化潜能,以明确其血管形成功能的生物学基础;(5)借助静脉损伤等体内模型,验证PVC-VSCs在病理环境中的实际修复能力;(6)借鉴中医再生的多学科融合理念,以中药活性成分调控VSCs功能及微环境^[28-30],为中西医结合心血管病研

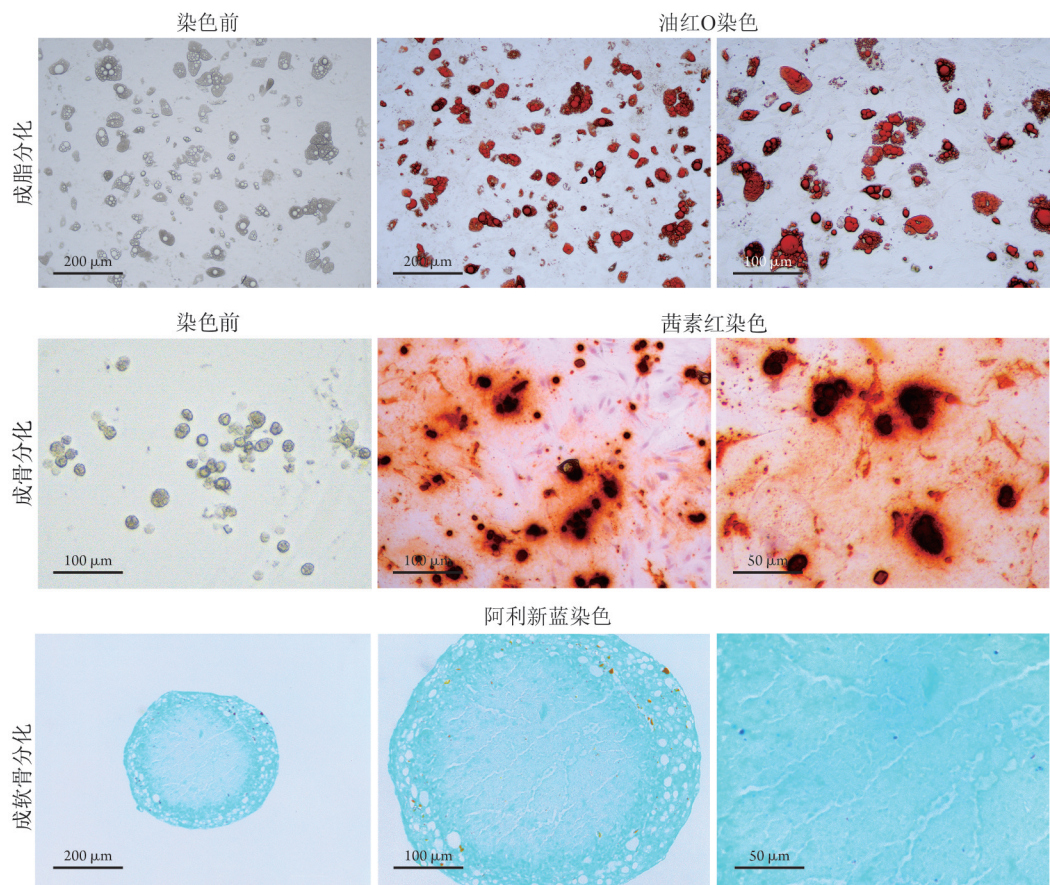


图3 P8代大鼠后腔静脉血管干细胞(PVC-VSCs)的成脂、成骨和成软骨分化

Fig.3 Adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation of P8 posterior vena cava-derived vascular stem cells (PVC-VSCs) of rat
成脂诱导 14 d 后, P8 代细胞胞质内出现大量脂质沉积; 油红 O 染色显示, 前脂滴呈红色小点, 而成熟脂滴着色鲜艳、边界清晰且立体感强。成骨诱导 21 d 后, P8 代细胞出现大量类球形钙结节; 茜素红染色显示, 钙盐沉积区域呈深红色。成软骨诱导 25 d 后, P8 代细胞自发聚集成形态规整、质地致密的三维软骨球; 阿利新蓝染色显示, 软骨球内部呈亮蓝色

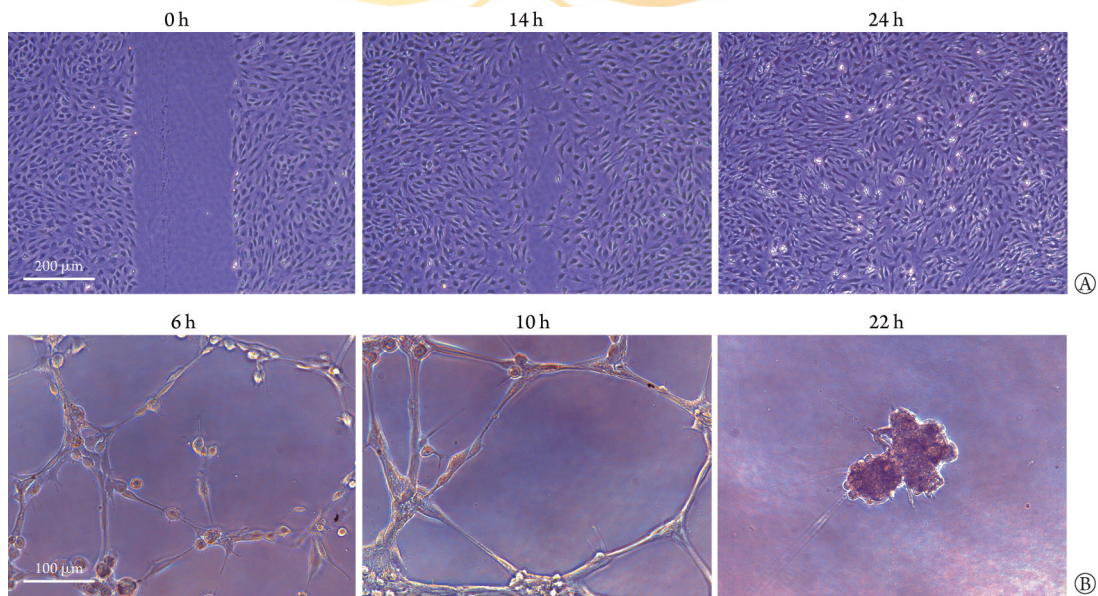


图4 P8代大鼠后腔静脉血管干细胞(PVC-VSCs)迁移、成管实验

Fig.4 Migration assay and tube formation assay of P8 posterior vena cava-derived vascular stem cells (PVC-VSCs) of rat
A. P8 代 PVC-VSCs 划痕区域在 24 h 内完全融合; B. P8 代 PVC-VSCs 可形成暂时稳定的管腔结构

究提供实验基础。

【参考文献】

- [1] Aghazadeh Y, Khan ST, Nkenkor B, *et al.* Cell-based therapies for vascular regeneration: past, present and future[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 231: 107976.
- [2] Crisan M, Yap S, Casteilla L, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 301-313.
- [3] Yang TT, Ma J, Zhang SQ, *et al.* Human muscle-derived vascular stem cells can support hematopoietic stem/progenitor cells *in vitro* [J]. *Stem Cells Int*, 2025, 2025: 4451561.
- [4] Tang J, Wang HX, Huang XZ, *et al.* Arterial Sca1⁺ vascular stem cells generate *de novo* smooth muscle for artery repair and regeneration[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 81-96. e4.
- [5] Huang CW, Hsueh YY, Huang WC, *et al.* Multipotent vascular stem cells contribute to neurovascular regeneration of peripheral nerve [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 234.
- [6] Zhang L, Issa Bhaloo S, Chen T, *et al.* Role of resident stem cells in vessel formation and arteriosclerosis[J]. *Circ Res*, 2018, 122(11): 1608-1624.
- [7] Jiang LJ, Sun XL, Deng JC, *et al.* Different roles of stem/progenitor cells in vascular remodeling[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(3): 192-203.
- [8] Barnett SN, Cujba AM, Yang L, *et al.* An organotypic atlas of human vascular cells[J]. *Nat Med*, 2024, 30(12): 3468-3481.
- [9] Yu VWC, Yusuf RZ, Oki T, *et al.* Epigenetic memory underlies cell-autonomous heterogeneous behavior of hematopoietic stem cells [J]. *Cell*, 2017, 168(5): 944-945.
- [10] Gonzales KAU, Polak L, Matos I, *et al.* Stem cells expand potency and alter tissue fitness by accumulating diverse epigenetic memories [J]. *Science*, 2021, 374(6571): eabh2444.
- [11] 凌思英, 张柏杨, 滕勇, 等. 人大隐静脉干细胞原代培养方法的改良[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(6): 973-982.
- [12] Campagnolo P, Cesselli D, Al Haj Zen A, *et al.* Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential[J]. *Circulation*, 2010, 121(15): 1735-1745.
- [13] Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, *et al.* Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 309(2): 340-344.
- [14] Costa D, Andreucci M, Ielapi N, *et al.* Molecular determinants of chronic venous disease: a comprehensive review[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1928.
- [15] Wang Z, Chai C, Wang R, *et al.* Single-cell transcriptome atlas of human mesenchymal stem cells exploring cellular heterogeneity[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(12): e650.
- [16] Lee MJ, Park K, Won S, *et al.* Comparative transcriptomic profiling of mesenchymal stem cells from distinct tissue origins and isolation methods highlights the stability and immunomodulatory signature of umbilical cord-derived smumf cells[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2026, 23(1): 157-173.
- [17] 许欣荣, 侯晓敏, 邢晔, 等. 磁性分离法高效快速培养原代 C57BL/6J 小鼠眼动脉平滑肌细胞[J]. *海军军医大学学报*, 2023, 44(5): 551-557.
- [18] Shimizu S, Iba T, Naito H, *et al.* Aging impairs the ability of vascular endothelial stem cells to generate endothelial cells in mice[J]. *Angiogenesis*, 2023, 26(4): 567-580.
- [19] Goyal D, Limesand SW, Goyal R. Vascular stem cells and the role of B-Raf kinase in survival, proliferation, and apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7483.
- [20] 李媛, 钟海英, 董世访, 等. 不同年龄小鼠骨来源间充质干细胞衰老相关特性与成骨分化能力的比较研究[J]. *陆军军医大学学报*, 2024, 46(13): 1512-1522.
- [21] 唐元瑜, 刘海琴, 马华根. 原代 SD 大鼠主动脉内皮细胞培养方法的建立及其鉴定[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(4): 1038-1042.
- [22] Wang J, Qiao QC, Sun YX, *et al.* Osteogenic differentiation effect of human periodontal ligament stem-cell initial cell density on autologous cells and human bone marrow stromal cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7133.
- [23] Greuel S, Hanci G, Böhme M, *et al.* Effect of inoculum density on human-induced pluripotent stem cell expansion in 3D bioreactors [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(4): e12604.
- [24] Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, *et al.* Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature[J]. *Cytherapy*, 2019, 21(10): 1019-1024.
- [25] Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(6): 1445-1451.
- [26] 赵渝, 赵纪春, 张岚, 等. 老年人慢性静脉疾病诊治中国专家共识[J]. *中国普通外科杂志*, 2025, 34(6): 1097-1108.
- [27] Tao JP, Cao XJ, Yu BQ, *et al.* Vascular stem/progenitor cells in vessel injury and repair[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 845070.
- [28] 李红梅. 临床科研融合模式下中医再生医学的机遇与挑战[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(10): 5558-5563.
- [29] Bi Z, Tang H, Wang E, *et al.* Chinese medicine boosts regenerative medicine in stem cell-based therapy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 499.
- [30] 黎彦, 冀帅飞, 付小兵, 等. 小分子化合物对间充质干细胞复制性衰老的逆转作用[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(7): 643-650.

(责任编辑: 蒋铭敏, 张小利)