

## · 论著 ·

## 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心功能的影响

杨国勋 刘唐威 钟国强 巫相宏 邓燕

**【摘要】** 目的 探讨移植同种异体骨髓间充质干细胞(MSCs)是否具有改善家兔心肌梗死后心功能、缩小梗死面积的作用以及两者间的相关关系。方法 将 24 只大白兔随机分为急性心肌梗死(AMI)组和 MSCs 组,每组 12 只。采用局部注射法,将 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)标记的 MSCs 移植到兔梗死心肌边缘带和中心区。通过超声心动图测定两组手术前和术后 6 周心功能指标。取心脏标本用免疫组化法鉴定植入细胞,病理组织学测定梗死面积。分析心功能与梗死面积的关系。结果 MSCs 组梗死心肌边缘带和中心区可见 BrdU 阳性细胞,AMI 组未见 BrdU 阳性细胞。与 AMI 组比较,MSCs 组术后 6 周左室舒张末期内径(LVEDD)、左室收缩末期内径(LVESD)均明显缩小( $P$  均 $<0.05$ ),左室射血分数(LVEF)、短轴缩短率( $\Delta FS\%$ )明显增大( $P$  均 $<0.05$ ),组织学测量梗死面积明显缩小( $P<0.05$ )。两组 LVEF 与梗死面积均成显著负相关( $P$  均 $<0.01$ )。结论 MSCs 移植可能通过缩小心肌梗死面积改善心功能,可用于心肌梗死的治疗。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞; 心肌梗死,急性; 细胞移植; 心功能

## Effect of mesenchymal stem cells transplantation on heart function after acute myocardial infarction

YANG Guo-xun, LIU Tang-wei, ZHONG Guo-qiang, WU Xiang-hong, DENG Yan. The Institute of Cardiovascular Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate whether mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation after acute myocardial infarction (AMI) can improve heart function and decrease infarct size in rabbits and their correlation. **Methods** Twenty-four rabbits were randomly divided into AMI group and MSCs group, each  $n=12$ . Exogenous MSCs labeled with bromodeoxyuridine (BrdU) were injected into the border and central area of the ischemic myocardium. Heart function was assessed with echocardiography before transplantation of MSCs and in 6th week after the transplantation. Surviving MSCs in infarcted myocardium were identified by immunohistochemistry. Infarct size was measured histologically. Correlation of heart function and infarct size were analysed. **Results** Immunohistochemical stain revealed that BrdU-positive cells were seen in the infarcted myocardium in MSCs group but not in AMI group. Transplantation of MSCs was associated with a significant diminution of left ventricular end-diastolic dimension (LVEDD), and left ventricular end-systolic dimension (LVESD, both  $P<0.05$ ), and left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening ( $\Delta FS\%$ ) increased (both  $P<0.05$ ) as compared with AMI group. Infarct size as measured histologically was significant smaller in MSCs group than AMI group ( $P<0.05$ ). There were negative correlations between LVEF and infarct size in two groups (both  $P<0.01$ ). **Conclusion** Exogenous MSCs transplantation can improve heart function by decreasing infarct size and therefore it might be beneficial in the treatment of AMI.

**【Key words】** mesenchymal stem cells; acute myocardial infarction; cells transplantation; heart function

急性心肌梗死(AMI)是冠心病的主要死亡原因。由于心肌细胞缺乏足够的再生能力,移植具有心肌再生能力的外源性干细胞来替代梗死心肌的技术已显示出了其巨大的治疗潜能。骨髓间充质干细胞(MSCs)具有分化为心肌、骨、软骨等多种细胞的潜能,是细胞移植修复梗死心肌理想的种子细胞之一,近年来已成为心血管领域新的研究热点<sup>[1]</sup>。本研

基金项目:广西医疗卫生重点科研课题(桂卫重 200301);广西自然科学基金资助项目(桂科回 0448014)

作者单位:530021 广西南宁,广西医科大学第一附属医院心血管病研究所

作者简介:杨国勋(1968-),男(壮族),广西壮族自治区人,医学硕士,主治医师,主要从事心内科和急诊医学临床工作。

究拟探讨同种异体 MSCs 移植家兔梗死心肌后对心功能、梗死面积的影响,分析它们之间是否存在相关关系,以期进一步探讨 MSCs 移植对心功能影响的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物和分组:**日本大白兔 24 只,雌雄各半,体重 1.4~2.0 kg,按随机数字表法分为 AMI 组和 MSCs 组,每组 12 只。另取 20 日龄健康雄性日本大白兔,体重 0.15~0.20 kg,以供取骨髓进行细胞培养用。以上动物均由广西医科大学实验动物中心提供(许可证号:SYXK 桂 2003-0005)。

**1.2 主要试剂:**L-Dulbecco 改良的 Eagle 培养基

(DMEM, Gibco 公司), 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青公司), Percoll 密度梯度分离液 (天津 TBD 公司), 5-溴脱氧尿核苷 (BrdU, Sigma 公司), 鼠抗 BrdU 单克隆抗体 (单抗, Sigma 公司), 一步法辣根过氧化物酶标记的单抗鼠免疫组化试剂盒 (MaxVision™ HRP - Polymer anti - Mouse IHC Kit, 福州迈新生物技术开发有限公司)。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 MSCs 分离培养和扩增标记:** 用引颈法处死动物, 置于体积分数为 75% 的乙醇中消毒 5 min, 无菌条件下采集双侧股骨骨髓, 用 DMEM 反复冲洗, 制成细胞悬液, 加入含密度为 1.073 的 Percoll 细胞分离液的试管中, 经反复离心、洗涤后加入含体积分数为 10% FBS 的 L - DMEM 培养基悬浮沉淀细胞, 按  $1 \times 10^7$ /ml 的密度接种于培养瓶, 放入 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 3 d 换液 1 次。当细胞生长至约 80% 融合时, 用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化, 按 1 : 2 传代。取第一代细胞在移植前 48 h 用 BrdU 标记。

**1.3.2 兔 AMI 模型建立和 MSCs 移植:** 用质量分数为 1% 的戊巴比妥钠 (30~40 mg/kg) 经耳缘静脉注射麻醉动物, 固定于手术台, 备皮。取胸骨左缘切口, 打开胸腔, 暴露心脏, 剪开心包。于左心耳缘下方约 2 mm 处心大静脉附近, 用 6-0 医用无损伤缝线进行结扎, 可见结扎远端心肌变苍白, 心电图检查见 ST 段明显抬高者即认为制模成功。MSCs 组在左冠状动脉前降支结扎后 1 h, 直视下用微量注射器把 BrdU 标记的 MSCs 200 μl ( $1 \times 10^7$ ) 分多点注射到梗死心肌的边缘带和中心区。AMI 组用同样的方法注射等量培养基。术后分笼饲养, 每笼 2 只, 每日肌肉注射青霉素 800 kU, 连用 3 d。

**1.3.3 心功能检测:** 于术前、术后 6 周无麻醉清醒状态下测定左室舒张末期内径 (LVEDD)、左室收缩末期内径 (LVESD)、左室射血分数 (LVEF) 以及短轴缩短率 ( $\Delta$ FS%) 等心功能指标, 取连续 3 个心动周期测量的平均值。同时观察室壁局部运动情况。

**1.3.4 左室梗死面积测定:** 术后 6 周取出心脏, 用

体积分数为 10% 的甲醛固定, 沿左室长轴中点横切取材, 常规行苏木素-伊红 (HE) 染色制成病理切片, 光学显微镜下观察病理学改变, 用病理图像分析系统测量左室截面积和瘢痕面积, 计算瘢痕面积占左室截面积的百分比, 即梗死面积 (%) = 瘢痕面积 / 左室截面积  $\times$  100%。

**1.3.5 免疫组化方法对 MSCs 的鉴定:** 取术后 6 周动物心肌组织, 常规方法制片, 用 0.01 mol/L 的枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 高压抗原修复; 工作浓度为 1 : 500 鼠抗 BrdU 单抗, 4 °C 过夜; 甩干后加二抗 (MaxVision™ HRP - Polymer anti - Mouse IHC Kit) 37 °C 20 min; 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色; 苏木素衬染; 自来水冲, 晾干后常规树脂封片。阴性对照除了用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替鼠抗 BrdU 单抗外, 余同上。病理图像分析仪观察并拍照。

**1.4 统计学分析:** 运用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 所有计量资料用均数士标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用两样本均数比较双侧 *t* 检验, 组内比较采用配对 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 体外原代培养的 MSCs 特征 (彩色插页图 1):** 倒置相差显微镜下观察原代培养的 MSCs 呈贴壁生长, 为均匀一致的纺锤形、梭形或纤维细胞形态, 呈放射状排列, 立体感强, 折光性好。

**2.2 宿主心肌 MSCs 的鉴定 (彩色插页图 2):** 免疫组化检查显示, MSCs 组梗死心肌边缘带和中心区可见棕黄色的 BrdU 阳性细胞。阴性对照和 AMI 组未见 BrdU 阳性细胞。

**2.3 超声心动图各指标测量结果 (表 1):** AMI 组术后左室腔增大, 前间隔、前壁变薄, 活动减弱, 内回声增强, 部分可见血栓形成; MSCs 组表现相似, 但比 AMI 组轻。两组 LVEDD、LVESD 较术前均显著增加,  $\Delta$ FS%、LVEF 显著缩小 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 且两组术后 6 周比较差异也有显著性 ( $P$  均  $< 0.05$ )。

**2.4 梗死面积测定:** 组织学测量分析结果表明, MSCs 组左室梗死面积 [(27.80  $\pm$  8.71)%] 明显小于 AMI 组 [(38.01  $\pm$  9.28)%],  $P < 0.05$ 。

表 1 超声心动图测定两组心功能指标的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Comparison of heart function indexes assessed with echocardiography between two groups ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	术前				术后 6 周			
	LVEDD(cm)	LVESD(cm)	$\Delta$ FS% (%)	LVEF	LVEDD(cm)	LVESD(cm)	$\Delta$ FS% (%)	LVEF
AMI 组	1.28 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.07	39.58 $\pm$ 4.00	0.75 $\pm$ 0.05	1.77 $\pm$ 0.20*	1.34 $\pm$ 0.28*	21.79 $\pm$ 7.90*	0.42 $\pm$ 0.15*
MSCs 组	1.26 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.06	39.44 $\pm$ 4.45	0.73 $\pm$ 0.06	1.58 $\pm$ 0.18* $\Delta$	1.12 $\pm$ 0.19* $\Delta$	29.23 $\pm$ 6.55* $\Delta$	0.55 $\pm$ 0.12* $\Delta$

注: 与本组术前比较: \*  $P < 0.01$ ; 与 AMI 组比较:  $\Delta P < 0.05$

2.5 心功能与左室梗死面积的关系(图 3):AMI 组和 MSCs 组 LVEF 都与左室梗死面积呈显著负相关( $r_{AMI} = -0.89, r_{MSCs} = -0.88, P$  均  $< 0.01$ )。

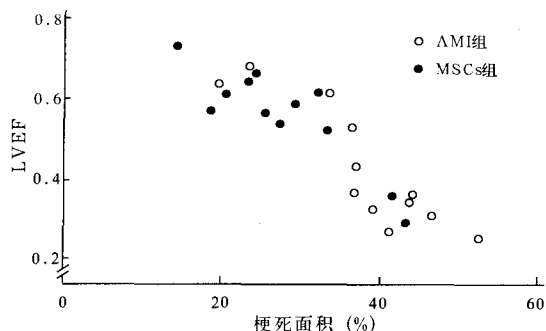


图 3 LVEF 与梗死面积的相关关系

Figure 3 Correlation between LVEF and infarct size

### 3 讨论

既往研究认为, MSCs 移植可以显著提高心肌梗死后的心功能,其主要机制是: MSCs 分化为具有收缩功能的心肌细胞,参与宿主心脏的同步收缩; MSCs 本身分化为血管内皮细胞或通过旁分泌机制分泌各种细胞活素类物质,如通过血管内皮生长因子来增加新生毛细血管生成,改善侧支循环,增加心肌灌注;增加心脏黏蛋白的表达和神经的萌生以及心房交感神经的过度分布;通过调节细胞外基质减少有害的心室重塑,缓解梗死壁变薄,改善舒张期松弛;抑制心肌细胞凋亡,缩小梗死面积<sup>[2-5]</sup>。对于这些机制之间以及与心功能改善之间的关系,目前只是一种推测, Tang 等<sup>[6]</sup>认为, MSCs 移植通过血管发生增加局部血流量、保护受累心肌细胞来提高心功能;但也有研究认为,细胞移植后增加的血管并不能提高心功能,而对于移植细胞在梗死区的存活可能是有用的<sup>[7]</sup>。 Dai 等<sup>[8]</sup>亦发现,虽然 MSCs 可以促进瘢痕区毛细血管的生长,但没有提高小动脉的密度和局部血流灌注,因此认为,由 MSCs 介导的血管发生在提高心肌梗死后的心功能方面是不确定的。

我们将同种异体 MSCs 移植至兔心肌梗死区, 6 周后仍可在宿主心肌内存活、定居,未发生明显的移植排斥反应;超声心动图检查结果表明,与 AMI 组比较, MSCs 组左室重构减轻, LVEDD、LVESD 明显缩小,  $\Delta FS\%$ 、LVEF 明显增大,提示心功能明显提高;组织学测量梗死面积明显缩小,与文献<sup>[2,9]</sup>报道的结果一致。

我们分析了梗死面积与心功能的关系,发现心功能与梗死面积呈显著负相关,不受 MSCs 移植的影响。在 AMI 组和 MSCs 组, LVEF 都随着梗死面积的增加而下降。由此可以推断, MSCs 移植通过减

少梗死面积达到提高心功能的效果是有意义的。 Kinnaird 等<sup>[10]</sup>报道, MSCs 移植通过分泌一系列细胞因子,改善侧支循环重塑; Gneccchi 等<sup>[11]</sup>研究证实, MSCs 通过旁分泌作用促进心肌细胞在缺氧条件下的抗凋亡作用。我们推测 MSCs 移植缩小梗死面积的可能机制: MSCs 在体内微环境诱导下直接分化为心肌样细胞;通过毛细血管新生,调节局部微循环,减少心肌细胞凋亡,促进内源性的再生修复; MSCs 通过旁分泌作用分泌多种细胞活素类物质拮抗心肌细胞凋亡; MSCs 有可能通过改变细胞间的缝隙连接,调节凋亡有关信号在细胞间的交换。

免疫组化鉴定 MSCs 在体内存活结果表明, 6 周时 MSCs 在体内存活很少,仅散在分布于梗死边缘带和中心区,依靠这些稀少的 MSCs 分化为具有收缩功能的心肌细胞来提高心功能似乎比较困难,而对于减少梗死面积可能有一定的作用。

### 参考文献:

- 1 都义日,付小兵,李存保. 骨髓间充质干细胞的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(8): 499-501.
- 2 Tomita S, Mickle D A, Weisel R D, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 123(6): 1132-1140.
- 3 Tang Y L, Zhao Q, Qin X, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction [J]. Ann Thorac Surg, 2005, 80(1): 229-236.
- 4 Pak H N, Qayyum M, Kim D T, et al. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a swine model of myocardial infarction [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2003, 14(8): 841-848.
- 5 Xu X, Xu Z, Xu Y, et al. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats [J]. Coron Artery Dis, 2005, 16(4): 245-255.
- 6 Tang Y L, Zhao Q, Zhang Y C, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium [J]. Regul Pept, 2004, 117(1): 3-10.
- 7 Kim E J, Li R K, Weisel R D, et al. Angiogenesis by endothelial cell transplantation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 122(5): 963-971.
- 8 Dai W, Hale S L, Martin B J, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects [J]. Circulation, 2005, 112(2): 214-223.
- 9 Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(6): H2670-2676.
- 10 Kinnaird T, Stabile E, Burnett M S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms [J]. Circulation, 2004, 109(12): 1543-1549.
- 11 Gneccchi M, He H, Liang O D, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells [J]. Nat Med, 2005, 11(4): 367-368.

(收稿日期: 2007-10-03 修回日期: 2007-06-27)

(本文编辑: 李银平)

## 乌司他丁对肝脏冷保存损伤的保护作用研究

(正文见398页)

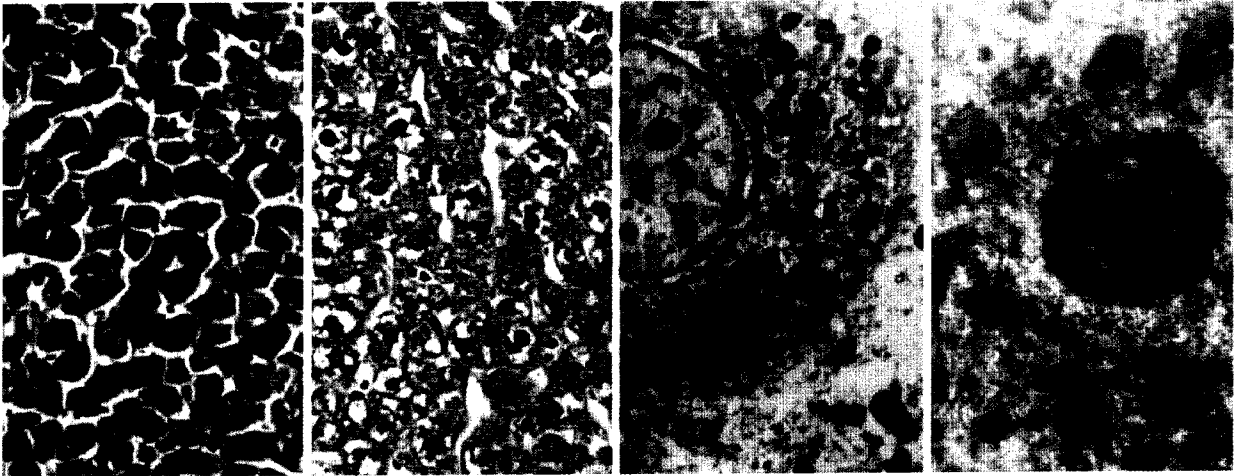


图1 实验组肝组织病理学变化 (HE, × 400)

Figure 1 Pathological change of liver tissues in test group(HE, × 400)

图2 对照组肝组织病理学变化 (HE, × 400)

Figure 2 Pathological change of liver tissues in control group (HE, × 400)

图3 实验组电镜下肝超微结构 (TEM, × 10 000)

Figure 3 Ultrastructure of liver tissues in test group(TEM, × 10 000)

图4 对照组电镜下肝超微结构 (TEM, × 10 000)

Figure 4 Ultrastructure of liver tissues in control group (TEM, × 10 000)

## 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心功能的影响

(正文见428页)

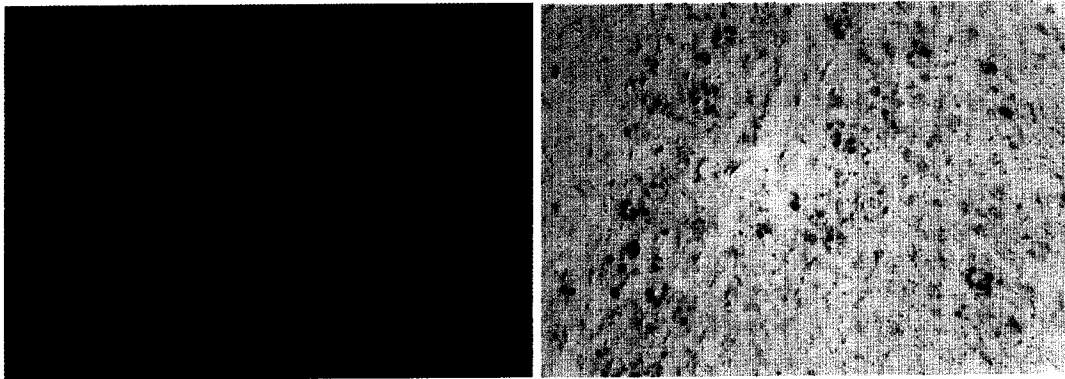


图1 体外原代培养的MSCs(× 100)

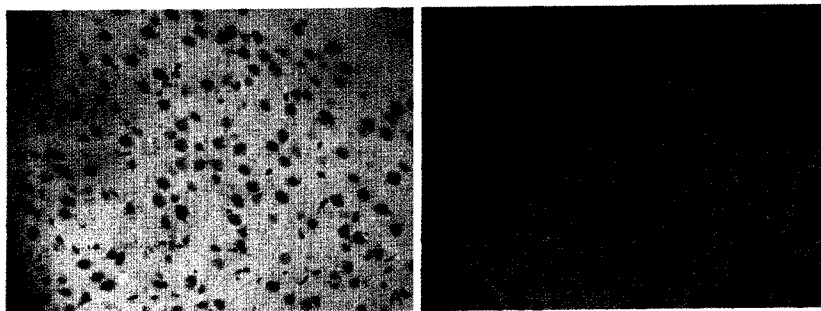
Figure 1 Primary culture of MSCs in vitro (× 100)

图2 MSCs组心肌细胞阳性表达(免疫组化, × 400)

Figure 2 Positive expression of cardiac muscle cell in MSCs labeled with BrdU (immunohistochemistry, × 400)

## 大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤后早期生长反应基因-1 mRNA的表达

(正文见436页)



A:假手术组; B:I/R组2 h

图1 各组脑组织Egr-1mRNA阳性表达(原位杂交, × 400)

Figure 1 Positive expression of Egr-1 mRNA in brain tissue in each group (In situ hybridization, × 400)

ym=21