

• 论著 •

不同 CD34⁺干细胞移植途径对缺血性心肌病大鼠 心功能影响的研究

张瑞宏 王岩 李为民 李悦 赵翠萍 井玲

【摘要】 目的 探讨同种异体 CD34⁺干细胞不同移植途径对心肌梗死后心力衰竭大鼠心功能的影响,同时评价干细胞移植的有效途径和安全性。**方法** Wistar 雄性大鼠 64 只被随机分成 3 组:干细胞移植组(30 只);急性心肌梗死模型组(20 只);假手术组(14 只)。移植组和模型组结扎左冠状动脉(冠脉)前降支造成缺血性心肌病模型;假手术组只开胸,不结扎冠脉。另选同种异体大鼠 30 只,将粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员的外周血 CD34⁺干细胞经免疫磁珠法分离纯化后制成干细胞悬液,在冠脉结扎后 7 d 分别经股静脉和心外膜注入到移植组大鼠体内,模型组和假手术组注入等量磷酸盐缓冲液(PBS)。于制模前、干细胞移植术后 1、2 和 4 周分别行心脏超声检查,术后 4 周进行血流动力学测定。**结果** 与模型组比较,心肌梗死后 4 周移植组左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(Δ FS)、左室收缩期末压(LVESP)和左室内压最大上升速率($+dp/dt \max$)明显提高(P 均 <0.01),左室收缩期末直径(LVESD)、左室舒张期末压(LVEDP)、左室内压最大下降速率($-dp/dt \max$)和左室等容舒张时间常数(T_c)均明显减小(P 均 <0.01);股静脉移植和心外膜移植两种途径对心功能的影响差异无统计学意义(P 均 >0.05)。**结论** 经股静脉和心外膜两种途径移植外周血干细胞是安全可行的,二者均能有效地改善心功能,有助于梗死心肌的修复。

【关键词】 造血干细胞; 缺血性心肌病; 粒细胞集落刺激因子; 移植

Effects of different delivery routes of CD34⁺ stem cells on cardiac function in the ischemic cardiomyopathy of rats ZHANG Rui-hong, LI Wei-min, LI Yue, ZHAO Cui-ping, JING Ling. Department of Cardiology, The First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China

【Abstract】 Objective To compare the effects of CD34-positive stem cells delivered by different routes on cardiac function in rats with ischemic cardiomyopathy, and to evaluate the efficacy and safety of stem cell transplantation. **Methods** Sixty-four male Wistar rats were randomized into cell infusion group ($n=30$), acute myocardial infarction (AMI) model group ($n=20$) and sham operation group ($n=14$). AMI model was reproduced by ligation of left anterior descending coronary artery. CD34⁺ stem cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) were purified by immunomagnetic beads in 30 donor rats. Seven days after the injury about $(7-9) \times 10^7$ CD34⁺ stem cells were infused through the femoral vein or through epicardium of recipient rats respectively. Cardiac function was evaluated before AMI, 1, 2 and 4 weeks after cell delivery. Hemodynamic parameters were determined 4 weeks after cell infusion. **Results** Compared with model group, left ventricular ejection fraction (LVEF), fractional shortening (Δ FS), left ventricular end-systolic pressure (LVESP) and maximal positive change in filling pressure versus time ($+dp/dt \max$) were improved significantly (all $P < 0.01$), whereas left ventricular end-systolic dimension (LVESD), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), maximal negative change in filling pressure versus time ($-dp/dt \max$), time constant of left ventricular relaxation (T_c) were lowered in cell infusion groups (all $P < 0.01$). There were no significant differences in cardiac function indexes between intravenous infusion and transepical injection group (all $P > 0.05$). **Conclusion** Intravenous and transepical delivery of hematopoietic stem cells (HSC) can significantly improve cardiac function, and both methods may be safe and effective for the treatment of AMI.

【Key words】 hematopoietic stem cells; ischemic cardiomyopathy; granulocyte-colony stimulatim factor; transplantation

目前,理论上干细胞治疗可能成为替代坏死心肌的理想方法。有研究表明,干细胞能够促进心肌梗

基金项目:黑龙江省教育厅海外学人科研基金资助项目(1053HQ020)

作者单位:150001 黑龙江,哈尔滨医科大学附属第一医院心内科(张瑞宏,李为民,李悦,赵翠萍,井玲);黑龙江省医院骨科(王岩)

作者简介:张瑞宏(1967-),女(汉族),黑龙江省人,博士,副主任医师,主要从事干细胞研究,Email:cici95@sina.com.

死(心梗)后心肌和血管的再生,缩小梗死面积,改善心功能^[1-2]。我们通过比较经股静脉和心外膜两种不同途径移植同种异体 CD34⁺干细胞对心梗大鼠心功能的影响,评价干细胞移植的有效性和安全性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),抗小鼠磁珠 IgG(美国 Coulter

公司),重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF,麒麟鲲鹏生物药业有限公司)。

1.2 动物分组及急性心肌梗死(AMI)模型制备: Wistar 雄性大鼠 64 只,体重 220~250 g 购自哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心。按照随机数字表法分成干细胞移植组(30 只)、AMI 模型组(20 只)和假手术组(14 只)。另选取 30 只体重为 180~200 g 的同种异体大鼠作为干细胞供体。采用 Olivetti 等^[3]介绍的方法结扎冠状动脉(冠脉)建立 AMI 动物模型。将受体大鼠用体积分数为 10% 的水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉,气管插管,呼吸机正压辅助呼吸,心电监护下在左前第 4~5 肋间隙开胸,距左心耳下方 2~3 mm 处用 5-0 缝线结扎左冠脉前降支,心电监护如见到肢体导联和胸前导联 R 波升高变宽、T 波倒置,证明制模成功。

1.3 实验方法

1.3.1 外周血干细胞(PBSC)动员: 随机选取 30 只供体大鼠,皮下注射 rhG-CSF $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (用生理盐水稀释),连用 5 d。6 d 予 10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉,在无菌条件下经颈动脉采血 10 ml,肝素抗凝备用。

1.3.2 CD34⁺干细胞分离、纯化及细胞数检测: 在肝素抗凝血中加小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体充分混匀后室温放置,加抗小鼠磁珠 IgG,充分混匀后磁性分离架放置,吸出血液弃掉,加入磷酸盐缓冲液(PBS),静置、弃上清液,加 PBS 混匀即制成 CD34⁺ 干细胞悬液。用流式细胞仪分析检测并计数细胞悬液中的 CD34⁺ 数。

1.3.3 CD34⁺干细胞移植: 制模后 7 d 将 CD34⁺ 干细胞悬液 0.5 ml [平均含 $(7\sim 9) \times 10^7$ 个细胞] 注入移植组大鼠体内,其中经股静脉注射 12 只,再次开胸经心外膜在梗死周边注射 13 只;模型组和假手术组分别注入等量 PBS。

1.3.4 超声心动图检查: 分别于制模前及干细胞移植后 1、2 和 4 周对大鼠进行超声心动图检查,以评价左室形态和左心功能改变,所测指标均取 5 个连续心动周期的平均值;测量左室舒张期末直径(LVEDD)、左室收缩期末直径(LVESD)、室间隔厚度(IVS)和左室后壁厚度(LVPWD),并计算左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(ΔFS)。

1.3.5 血流动力学测定: 干细胞移植后 4 周,用压力记录设备测定左室压力变化情况,所得到的数据用 Spectrum 软件分析处理,分析左室舒张期末压(LVEDP)、左室收缩期末压(LVESP)、左室内压最

大上升和下降速率($\pm \text{dp}/\text{dt max}$)及左室等容舒张时间常数(Tc)的变化。

1.4 统计学分析: 应用 SPSS 10.0 软件进行分析,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验、方差分析及 *q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD34⁺干细胞移植前后大鼠存活情况: 制模后 1 周内死亡及超声心动图检查显示 LVEF < 0.50 者不计入本研究;共 57 只制模成功存活大鼠。干细胞移植组 25 只,其中股静脉注射 12 只,心外膜注射 13 只;模型组 18 只,股静脉和心外膜注射各 9 只;假手术组 14 只,股静脉和心外膜注射各 7 只。干细胞移植组股静脉注射后即刻死亡 2 只,其余 10 只在各个时间点均存活,心外膜注射后即刻死亡 3 只,术后 4 周内死亡 1 只,存活 9 只;模型组死亡 2 只,存活 16 只;假手术组无死亡。两种移植途径之间及干细胞移植组和 AMI 模型组之间存活率差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.2 CD34⁺干细胞活性测定: 锥虫蓝染色后,置于显微镜下观察,100% 拒染,说明细胞全部存活。

2.3 流式细胞仪检测和细胞计数: 造血干细胞表达 CD34 阳性率为 98.4%,同时表达 CD31 和 AC133,不表达白细胞表面抗原 CD45。CD34⁺ 造血干细胞(HSC)占外周血有核细胞数的 1.29%~1.32%,约 $(7\sim 9) \times 10^7$ 个细胞。

2.4 心脏超定结果(表 1): 经股静脉和心外膜移植干细胞后 2 周和 4 周,LVEF 和 ΔFS 均明显高于 AMI 模型组和移植后 1 周(P 均 < 0.01),但两种方式肝移植间差异无统计学意义(P 均 > 0.05);移植组的 LVESD 较 AMI 模型组明显减少($P < 0.01$),AMI 模型组在移植后各时间点心功能无显著变化,干细胞移植组和 AMI 模型组间及两种移植途径间 LVEDD 差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.5 术后 4 周血流动力学结果(表 2): 与模型组比较,移植组 LVEDP、 $-\text{dp}/\text{dt max}$ 、Tc 均显著降低,LVESP、 $+\text{dp}/\text{dt max}$ 显著增加(P 均 < 0.01);两种移植途径间比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

3 讨论

HSC 为具有多分化潜能和自我复制功能的早期未分化细胞,在特定的条件下可分化成为不同功能的细胞,形成多种组织和器官。由于目前还不能从形态上识别骨髓来源的干细胞,对其鉴定、分离和纯化是通过其表面标志进行的。与多数研究一样,我们将 CD34⁺ 单个核细胞视为 HSC 细胞。

表 1 各组大鼠心脏超声测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	移植途径	动物数	LVEF				ΔFS			
			梗死前	移植后 1 周	移植后 2 周	移植后 4 周	梗死前	移植后 1 周	移植后 2 周	移植后 4 周
假手术组	股静脉	7	0.723±0.027	0.701±0.028	0.724±0.023	0.725±0.019	56.9±0.8	58.4±1.2	59.0±0.2	57.9±1.1
	心外膜	7	0.717±0.028	0.715±0.019	0.720±0.018	0.719±0.020	57.4±1.0	58.1±0.7	57.3±1.0	57.6±0.8
模型组	股静脉	9	0.721±0.028	0.413±0.023	0.415±0.018	0.424±0.019	57.3±1.0	31.9±0.7	32.1±1.0	33.5±0.9
	心外膜	9	0.728±0.030	0.421±0.025	0.425±0.021	0.435±0.020	56.8±0.7	32.3±1.0	31.5±0.8	32.8±0.7
移植组	股静脉	12	0.725±0.031	0.432±0.018	0.521±0.023	0.543±0.018 ^{ab}	57.7±0.8	35.1±1.2	43.9±1.2 ^{ab}	45.0±1.1 ^{ab}
	心外膜	13	0.714±0.029	0.423±0.020	0.539±0.015 ^{ab}	0.552±0.017 ^{ab}	57.3±0.6	36.8±0.9	45.1±0.8 ^{ab}	46.5±0.9 ^{ab}

组别	移植途径	动物数	LVEDD(mm)				LVESD(mm)			
			梗死前	移植后 1 周	移植后 2 周	移植后 4 周	梗死前	移植后 1 周	移植后 2 周	移植后 4 周
假手术组	股静脉	7	6.0±0.2	6.1±0.2	6.1±0.3	5.9±0.3	2.6±0.1	2.5±0.6	2.5±0.2	2.5±0.3
	心外膜	7	5.9±0.3	5.9±0.3	6.0±0.2	5.9±0.3	2.5±0.3	2.4±0.7	2.5±0.6	2.5±0.4
模型组	股静脉	9	5.9±0.2	6.9±0.2	6.8±0.3	6.9±0.2	2.5±0.2	4.6±0.3	4.6±0.2	4.6±0.2
	心外膜	9	6.0±0.2	7.1±0.2	7.0±0.2	6.9±0.3	2.6±0.2	4.8±0.2	4.8±0.3	4.6±0.3
移植组	股静脉	12	6.1±0.2	6.8±0.4	7.0±0.2	6.0±0.3	2.6±0.2	4.4±0.2	4.0±0.2 ^{ab}	3.8±0.3 ^{ab}
	心外膜	13	5.9±0.3	6.7±0.3	6.9±0.3	6.8±0.2	2.5±0.3	4.2±0.4	3.8±0.4 ^{ab}	3.6±0.4 ^{ab}

组别	移植途径	动物数	IVS(mm)				LVPWD(mm)			
			梗死前	移植后 1 周	移植后 2 周	移植后 4 周	梗死前	移植后 1 周	移植后 2 周	移植后 4 周
假手术组	股静脉	7	1.6±0.3	1.7±0.1	1.6±0.3	1.6±0.3	1.7±0.2	1.7±0.6	1.6±0.2	1.6±0.3
	心外膜	7	1.7±0.1	1.6±0.3	1.6±0.2	1.6±0.3	1.6±0.3	1.7±0.3	1.6±0.6	1.6±0.4
模型组	股静脉	9	1.7±0.1	1.4±0.2	1.4±0.3	1.3±0.2	1.7±0.2	1.4±0.3	1.4±0.2	1.5±0.2
	心外膜	9	1.6±0.2	1.4±0.3	1.4±0.2	1.3±0.3	1.7±0.3	1.4±0.2	1.4±0.3	1.5±0.3
移植组	股静脉	12	1.6±0.3	1.4±0.1	1.5±0.2	1.5±0.3	1.7±0.2	1.4±0.2	1.5±0.2	1.6±0.3
	心外膜	13	1.6±0.2	1.4±0.3	1.5±0.3	1.5±0.2	1.7±0.3	1.4±0.4	1.5±0.4	1.6±0.1

注:与模型组比较,* $P < 0.01$;与本组移植后 1 周比较,^b $P < 0.01$

表 2 术后 4 周各组大鼠血流动力学测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	移植途径	动物数	HR(次/min)	LVESP(mm Hg)	LVEDP(mm Hg)	+dp/dt max(mm Hg/s)	-dp/dt max(mm Hg/s)	Tc(ms)
假手术组	股静脉	7	250±16	110.2±3.8	2.5±0.6	11 310±823	-8 174±702	13.1±0.5
	心外膜	7	252±14	112.5±4.0	2.6±0.8	11 295±793	-7 958±395	14.6±0.2
模型组	股静脉	9	255±15	98.2±4.6	5.8±0.4	6 987±612	-5 019±412	21.5±0.2
	心外膜	7	253±13	102.3±3.6	6.1±0.7	7 015±740	-5 180±308	21.6±0.3
移植组	股静脉	10	246±15	104.2±3.8 ^a	3.7±0.3 ^a	8 290±811 ^a	-7 185±604 ^a	15.5±0.7 ^a
	心外膜	9	250±16	105.4±2.3 ^a	3.6±0.5 ^a	8 158±745 ^a	-6 903±713 ^a	15.6±0.3 ^a

注:与模型组比较,* $P < 0.01$;HR 为心率;1 mm Hg=0.133 kPa

Jackson 等^[4]第一个证明骨髓源性 HSC 在体内可能参与心肌再生。Orlic 等^[5]研究显示,向 AMI 鼠心梗周边区域直接注入 HSC,供体细胞不仅能分化为心肌细胞,也能分化成血管内皮细胞和成纤维细胞,小鼠生存时间延长,心功能改善,进一步证明存在心肌修复。Yeh 等^[6]报道人外周血 CD34⁺细胞可在小鼠心梗模型体内分化成心肌细胞、成熟内皮细胞和平滑肌细胞,而且这种分化在损伤组织局部明显增强,在正常对照组中这种分化很少,认为应用 HSC 治疗损伤的心肌可简化干细胞的获取过程。

虽然很多实验证实了干细胞存在可塑性,但仍有许多学者对此提出质疑^[7]。到目前为止,HSC 在心肌再生中的形态学和生理作用尚不清楚,其在治

疗 AMI 时的技术和安全性仍无定论。本研究发现,与心外膜直接注射相比,静脉移植的 CD34⁺干细胞同样能够达到改善心功能的目的,2 周时 LVEF 和 ΔFS 明显提高,但干细胞移植对 LVEDD 的改善不明显,这与 Chen 等^[8]的研究结果不同。因此,HSC 移植对左室重构的影响尚有待进一步观察。我们还发现 CD34⁺干细胞同时表达 CD31 和 AC133,二者均为血管内皮祖细胞的表面标志,这提示 HSC 和内皮祖细胞可能来自共同的干细胞,即成血管祖细胞。为此我们推测 CD34⁺干细胞改善心功能的机制可能与新生血管的形成有关。

目前常用的干细胞移植途径有经血管途径(包括冠状动脉和外周静脉)和经心肌途径(包括心

外膜注射和心内膜注射)。心外膜移植法因其操作简便,适合外科手术时作辅助治疗,被大部分研究所采用。但注射后细胞可能出现渗漏,而且移植细胞分布局限,可能造成心室的不协调运动,影响移植的治疗效果,严重者可能造成坏死心肌穿孔,甚至死亡,因而限制了其临床应用。静脉内移植也有其局限性。病灶局部的微环境是细胞停留的最关键因素,它将影响移植细胞的黏附、迁移和定植功能及长期存活^[9]。因此在心肌病损区域植入足够数量的干细胞是实现组织修复的前提。与心脏局部注射相比,干细胞在心脏以外器官的停留导致到达缺血心肌的干细胞数量减少,因此,要达到同等的疗效可能需要更多的移植细胞,但植入过多的细胞又可能导致不良的后果。Vulliet 等^[10] 研究结果显示:给狗的冠脉内输注骨髓干细胞后发生了微栓塞。我们在静脉注射干细胞即刻有 2 只大鼠死亡,推测可能是由于输注的干细胞浓度过高,可能在其他器官的动脉系统形成了微栓塞(如肺栓塞)所致。

本实验表明:应用 G-CSF 动员 HSC 不仅无骨髓穿刺获取干细胞的缺点,而且安全、简便;经静脉和心外膜两种途径移植 HSC 是安全可行的,二者均能有效地改善心功能,有助于梗死心肌的修复。

参考文献

[1] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and sur-

- vival[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(18):10344-10349.
- [2] 杨国勋,刘唐威,钟国强,等.骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心功能的影响[J].中国危重病急救医学,2007,19(7):428-430.
- [3] Olivetti G, Capasso J M, Meggs L G, et al. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats[J]. Circ Res, 1991, 68(3):856-869.
- [4] Jackson K A, Majka S M, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells[J]. J Clin Invest, 2001, 107(11):1395-1402.
- [5] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. Nature, 2001, 410(6829):701-705.
- [6] Yeh E T, Zhang S, Wu H D, et al. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo[J]. Circulation, 2003, 108(17):2070-2073.
- [7] 李海红,付小兵.干细胞可塑性和细胞融合[J].中国危重病急救医学,2006,18(4):255-256.
- [8] Chen S L, Fang W W, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2004, 94(1):92-95.
- [9] Wollert K C, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart[J]. Circ Res, 2005, 96(2):151-163.
- [10] Vulliet P R, Greeley M, Halloran S M, et al. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs[J]. Lancet, 2004, 363(9411):783-784.

(收稿日期:2007-10-10 修回日期:2007-12-10)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

2008 年度全国内科急危重病医学学术研讨会征文与报名通知

为进一步推动危重病医学学科的发展,交流各地先进经验,中华医学会继续教育部决定于 2008 年 5 月下旬在辽宁省大连市召开 2008 年度全国内科急危重病医学学术研讨会。欢迎有关人员参加征文与报名参会。国家级继教项目编号:2008-10-00-056,10 学分。

1 报到日期:5 月 23 日;会议日期:5 月 24-28 日;会议地点:邮政宾馆(大连市中山区长江路 271 号,火车站南广场西侧,三星级);电话:0411-83661388,83661488(总台)。

2 会议期间举办高级学习班,拟邀请国内知名专家进行专题报告。主要内容如下:ARDS 与机械通气进展;心肺脑复苏最新进展;严重感染的诊疗策略;细菌耐药监测与药物选择、医院获得性肺炎治疗对策;休克与循环功能支持新理论;液体复苏;脓毒症诊疗策略;MOF 救治的有关进展;出、凝血障碍诊疗进展;危重患者的合理营养与免疫调理;血流动力学监测与循环功能支持;肾脏替代治疗在危重病中的应用;各类中毒的诊疗进展;心脑血管、呼吸、消化、神经、内分泌等系统急危重病的热点、难点问题等。

3 征文内容:有关急诊、ICU 及内科各专科各类急危重病诊断与治疗等相关内容。

4 征文要求:2 000 字左右论文 1 份,或只寄 600 字左右摘要 1 份,征文请打印,论文题目下注明省市、工作单位、科室、姓名及邮编。自留底稿,恕不退回。来稿请寄:100710 北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“大连危重病会议”梁鸿同志收。Email:jxjy@vip.163.com(Email 发稿时务必注明“大连危重病会议”字样)。征文截止期:邮局寄稿为 5 月 5 日前,Email 为 5 月 14 日前。

5 每位参会代表需交纳会务费 980 元,住宿费每人每天 120 元左右。

6 联系人及电话:桂杨芳 010-51798200(带传真),88820399;梁鸿 010-85158402

(中华医学会继续教育部)