

自体窦房结细胞移植治疗心脏传导阻滞的初步研究

张浩¹, 徐志云^{1*}, 段炼¹, 宋智钢¹, 邹毅清², 宗刚军³

(1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433; 2. 长海医院麻醉科; 3. 长海医院心内科)

[摘要] **目的:**将未成年猪窦房结细胞移植到自体右室近心尖部, 探索临床治疗完全性房室传导阻滞的新方法。 **方法:**取健康未成年猪 12 只, 随机分为移植组和对照组, 每组各 6 只。安置临时心外膜起搏导线后, 切取自体窦房结组织进行消化培养并制成细胞悬液, 注射到移植组自体右室近心尖部心肌内, 对照组相同部位注射等量培养液。2 周后射频消融希氏束, 建立完全性房室传导阻滞动物模型。建立模型后对两组动物经股静脉微泵注射异丙肾上腺素(ISO), 观察心律改变。 **结果:**体外分离培养的未成年猪窦房结细胞主要呈梭形, 活细胞率 $\geq 75\%$ 。射频消融希氏束后, 移植组和对照组均表现为完全性房室传导阻滞心电图, 移植组室性自主心律高于对照组($P < 0.05$)。经心内膜起搏标测证实, 移植组室性自主心律起源于细胞移植部位。注射 ISO 后, 移植组室性心律改变明显($P < 0.05$)。 **结论:**分离的未成年猪窦房结细胞移植到自体右室近心尖部, 能够提高完全性房室传导阻滞后的心室率, 且对异丙肾上腺素具有良好的反应性。

[关键词] 窦房结; 移植, 自体; 细胞移植; 心脏传导阻滞

[中图分类号] R 654.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0233-04

Transplantation of autologous sinoatrial nodal cells in treatment of heart block

ZHANG Hao¹, XU Zhi-yun^{1*}, DUAN Lian¹, SONG Zhi-gang¹, ZOU Yi-qing², ZONG Gang-jun³ (1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University; 3. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To develop a novel method for treating complete heart block by transplanting autologous sinoatrial node(SAN) cells to the right ventricle adjacent to heart apex. **Methods:** Twelve young pigs were evenly randomized into transplantation group and control group. The sinoatrial nodes of all pigs were harvested and SAN cells were isolated *in vitro*. Pigs in transplantation group were injected with a cell suspension and those in control group were injected with culture medium into autogeneic right ventricular wall adjacent to heart apex after the temporary myocardial pacing wires were fixed. Two weeks later, all pigs underwent electrophysiology mapping and transcatheter ablation of His bundle to create a complete heart block model. The heart rates of pigs in both groups were observed after isoproterenol (ISO) being injected through femoral vein. **Results:** The isolated cells had good viability and all the pigs showed complete heart block ECG waveforms after ablation. Ventricular autonomic rhythms of pigs in transplantation group were faster than those of pigs in control group ($P < 0.05$). We proved that the rhythms originated from the injected site by endocardial pace mapping. The ventricular rhythms of transplantation group changed remarkably after ISO was administrated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Autogeneic transplantation of SAN cells isolated from young pigs into right ventricular wall adjacent to heart apex can increase the ventricular autonomic rhythm of complete heart block, and this increased rhythm is sensitive to isoproterenol.

[KEY WORDS] sinoatrial node; transplantation, autologous; cell transplantation; heart block

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 233-236]

由于心脏直视手术操作造成的心脏传导束损伤往往导致不同程度的房室传导阻滞, 其中Ⅲ度房室传导阻滞是心脏术后最严重的并发症^[1]。不可逆转的完全性房室传导阻滞只有接受永久性电子心脏起搏器的植入治疗^[2]。此类心脏传导阻滞的损伤部位通常位于房室结或希氏束, 而窦房结等上位起搏点结构和功能均完整良好, 如果能将窦房结中的细胞成分移植到损伤部位以下(如室间隔或左右心室壁), 则有望在下位传导系统建立新的心脏起搏点, 提高患者的心室率, 从而使患者避免接受永久心脏

起搏器的植入。本研究拟将未成年猪窦房结细胞移植到自体右室近心尖部, 探索临床治疗完全性房室传导阻滞的新方法。

[基金项目] 国家自然科学基金(30672075)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30672075)。

[作者简介] 张浩, 男, 博士生。

E-mail: Zhanghao@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: zhiyunxu@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 材料 健康家猪 12 只,1~1.5 个月龄,雌雄不限,体质量 12~15 kg,购自第二军医大学实验动物中心。弹性蛋白酶(elastase, Worthington),胶原酶 II 型(collagenase, type II, Worthington),嗜热菌蛋白酶(thermolysin, Sigma-aldrich),透明质酸酶(hyaluronidase, Worthington)。异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO, Sigma-aldrich)。

1.2 安置临时心外膜起搏导线 将猪给予肌注氯胺酮(10 mg/kg)诱导后行气管插管,丙泊酚、芬太尼、哌库溴胺维持麻醉,经第 4 肋间右前外侧切口进胸,悬吊心包,安置心外膜起搏导线,连接至体外临时心脏起搏器。

1.3 窦房结组织的定位及取材 显露并牵引右心耳,于上腔静脉与右心耳交界处的外侧,即界沟起始部,用 5-0 Prolene 线缝合标记并牵引。以标记点为中心,用 5-0 Prolene 线沿界沟方向缝 15 mm×10 mm 荷包,收紧荷包后,剪取荷包内组织并立即置于预冷(4℃)的心肌保护液中。体表心电图显示房室结逸搏心律或窦性心律,启用心外膜起搏器,起搏模式设为心室起搏(VVI),起搏频率 80 次/min。术野止血后以盐水纱布覆盖切口。

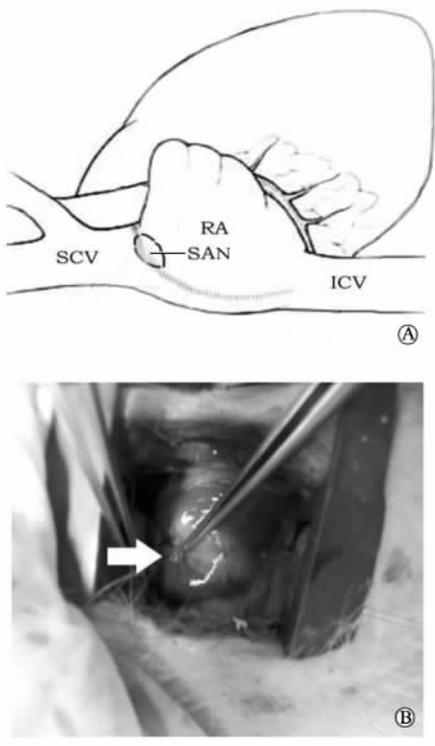


图 1 未成年猪窦房结组织的获取

Fig 1 Harvesting of sino-atrial node(SAN) of young pigs

A; Schematic diagram for harvesting SAN; B; Operation method for harvesting SAN (arrow indicate the harvesting site). SCV; Superior cava vena; RA; Right atrium; ICV; Inferior cava vena

1.4 窦房结细胞的消化分离 将窦房结组织移入无钙台氏液(NaCl 140 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, glucose 10 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, pH 7.4)中洗去血凝块,并用眼科剪将组织剪碎,漂洗后移入含有 8.2 U/ml 弹性蛋白酶、400 U/ml 胶原酶 II 型、10 U/ml 嗜热菌蛋白酶、3.5 U/ml 透明质酸酶的无钙台氏液中,37℃ 消化约 50 min (每 10 min 吹打 1 次),至仅余丝絮状物质。自然沉淀后弃上清。再加入无钙台氏液,离心后弃上清。加入无血清 M199 培养液制成细胞密度为(2~3)×10⁹/L 的细胞悬液,以备细胞移植。

1.5 分离细胞的活性鉴定 将 40 g/L 的锥虫蓝溶液与细胞悬液按照 1:9 混匀,进行染色,3 min 后用血细胞计数板分别计数活细胞和死细胞,计算活细胞率。

1.6 窦房结细胞自体移植 对两组动物均使用 5-0 Prolene 线将钛夹缝合至右室近心尖部作为 X 线标记。对移植组猪,将 0.5 ml 窦房结细胞悬液经自制的心肌内细胞注射器,斜行注入钛夹标记点心外膜下 5 mm 处。对照组于相同部位以等量的 M199 培养液注射。彻底止血后逐层关胸,静脉应用抗生素预防感染。使用弹力绷带固定临时心脏起搏器于猪背部。

1.7 建立完全性房室传导阻滞模型 细胞移植 2 周后以氯胺酮和地西洋(安定)麻醉动物,分离并穿刺右侧股静脉,经 8F 动脉鞘将 7F 可操控四极大头电极送至右心房,停用起搏器。标测定位并射频消融房室束,建立完全性房室传导阻滞猪模型。

1.8 室性心律的观察 建立动物模型后 10~30 min,待室性逸搏心律出现并稳定后,对每只猪分别于 30 min、1 h、2 h 时记录心率,取 3 次平均值。对细胞移植区(钛夹标记处)应用大头电极进行心内起搏标测以证实室性心律是否起源于心肌细胞移植区。射频消融前、后均行常规 6 导联体表心电图检查。

1.9 神经递质对室性心律的影响 对建立完全性房室传导阻滞模型后存活猪,经股静脉微泵注射 ISO[0.1 μg/(kg·min)],观察并记录两组动物心律变化情况。

1.10 统计学处理 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SAS 9.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 分离细胞的形态学观察及细胞活性 对用酶消化法分离获得的未成年猪窦房结细胞进行形态学

观察,倒置显微镜下可见窦房结细胞主要呈梭形(图2),部分呈球形,边缘清楚,胞质清亮,自发性搏动的频率较快。镜下也可见呈杆状的心房肌细胞,胞质丰富,透光性差,可见横纹,搏动频率慢但收缩有力。经锥虫蓝染色,计算活细胞率为75%以上。



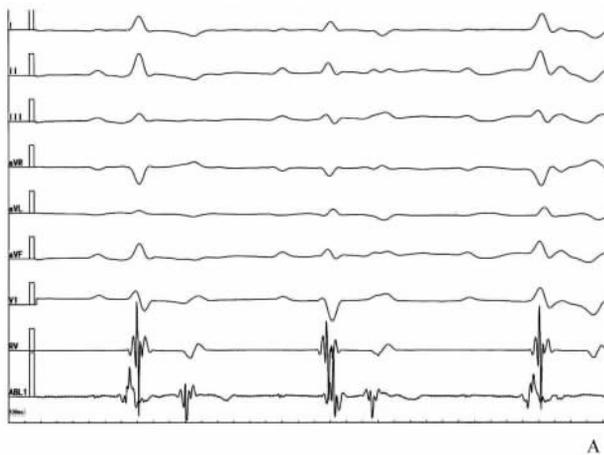
图2 倒置显微镜下观察分离未成年猪窦房结获得的长梭形细胞

Fig 2 Isolated long-spindle cells from SAN of young pigs by inverted microscope ($\times 400$)

2.2 室性心律的观察 细胞移植2周后,移植组与对照组动物均存活。射频消融希氏束建立完全性房室传导阻滞的动物模型后,停用心外膜起搏器,移植组与对照组均表现为完全性房室传导阻滞的心电图,对照组中2只猪因迅速发生的室颤而死亡。

停用起搏器30 min后,两组动物自主室性心律趋于稳定,移植组的平均心率为(95±21)次/min($n=6$),对照组存活猪的平均心率为(43±12)次/min($n=4$)。移植组的平均心率高于对照组($t=4.437, P<0.05$)。对移植组猪使用7F可操控标测电极于细胞移植部位(X线下所见钛夹标记点)行心内膜起搏标测,结合体表心电图证实,起搏的QRS波形与对应导联的体表心电图波形相似,提示此室性自主心律起源于细胞移植部位。见图3。

图3 建立完全性房室传导阻滞模型后室性自主心律(走纸速率50 mm/s)
Ventricular autonomic rhythm in complete heart block model (ECG paper speed 50 mm/s)
A: ECG from transplant group; B: ECG from control group



2.3 对神经递质的反应 对建立完全性房室传导阻滞模型后存活猪,经微泵注射ISO [0.1 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$],移植组心率由(92±15)次/min增加至(115±17)次/min($n=6; t=2.485, P<0.05$),对照组心率由(44±15)次/min增加至(63±16)次/min($n=4; t=1.732, P>0.05$)。

2.4 预后 对照组由于心率过慢,尽管间断给予心外膜起搏,仍在建立模型当天发生室颤而死亡。移植组除1只因心率偏低于术后当天死亡外,其余5只在观察期内室性心律基本保持稳定。

3 讨论

心脏直视术后发生的Ⅲ度房室传导阻滞是婴幼

儿心脏外科最为严重手术并发症之一^[3],通常认为术后4周仍不能恢复窦性心律,应考虑为永久性损害,患儿只能接受永久电子心脏起搏器的植入治疗,不仅费用昂贵,且由于患儿身体发育,往往在其成年后,尚需再次手术更换起搏导线及相应起搏器,给患儿及其家庭造成巨大的痛苦,也给社会留下沉重的负担。

研究者们尝试利用干细胞构建生物起搏器治疗各类缓慢型心律失常,如成人骨髓间充质干细胞和胚胎干细胞等^[4-5]。但这些干细胞尚存在着分化调控的困难、肿瘤形成的风险,以及伦理问题的制约,并且由于干细胞分化的不确定性,有导致严重心律失常可能^[6]等,使其应用受到明显的制约。因此,有

必要探寻一种更为理想的、不受以上问题制约的方法以实现起搏心室的目的。

由于心脏手术导致的Ⅲ度房室传导阻滞的特殊性,即尽管房室传导系统中断,但窦房结功能完好无损,我们在研究中尝试将完好的窦房结细胞移植到自体心脏传导系统下游,以期实现在心室起搏的治疗目的。我们获取的移植细胞来源于自体,不存在免疫排斥及伦理学问题,亦无需分化增殖调控,无致畸致癌或传染可能,并且直视手术获取窦房结定位准确,获取方便。因此,自体窦房结细胞是一种理想的移植细胞来源,且国内外尚未见相关报道。

心脏手术导致的Ⅲ度房室传导阻滞多发生于先天性心脏畸形的患儿,而现有研究表明,未成熟心肌内胶原含量较低,易于消化和分离。故本实验中,我们采用未成年猪作为研究对象,采用四种酶联合消化法,获得了活性良好并在体外自发搏动的窦房结细胞。

我们的研究结果显示:将未成年猪窦房结细胞移植到自体的右室近心尖部心外膜下,射频消融希氏束后,移植组室性自主心律高于对照组,且移植组的室性心律起源于细胞移植部位。这一结果提示将窦房结细胞自体移植到下位心肌后,能够与心肌细胞形成功能性的电耦联,从而可以发放冲动并起搏心室。但形成的电耦联结构是何种连接蛋白及其表达情况,尚有待于免疫组织化学研究加以证实。

本研究中移植组心率虽然高于对照组,但仍明显低于其术前正常心率(150~200次/min),可能是由于移植到心肌内的窦房结细胞虽然能够发放冲动,但其原有的细胞间缝隙连接被破坏,直接暴露在超极化水平更低的心肌细胞当中而抑制了其去极化速度^[7],导致其起搏频率降低。

我们的研究还发现,外源性 ISO 对于室性自主心律具有明显的正性变时性调节效应,提示这种室性心律对于神经体液的调节具有良好的反应性。至于对于细胞移植部位的选择,以及移植细胞起搏心室的远期效果等问题尚有待于更进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Nicholas T, Eugene H, Donald B, et al. Kirklin/Barratt-Boyes cardiac surgery[M]. 3 ed. New York: Churchill Livingstone, 2003.
- [2] Gregoratos G, Abrams J, Epstein A E, et al. ACC/AHA/NASPE 2002 guideline update for implantation of cardiac pacemakers and antiarrhythmia devices[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 40: 1703-1719.
- [3] Bonatti V, Agnetti A, Squarcia U. Early and late postoperative complete heart block in pediatric patients submitted open-heart surgery for congenital heart disease[J]. Pediatr Med Chir, 1998, 20: 181-186.
- [4] Xue T, Cho H C, Akar F G, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers[J]. Circulation, 2005, 111: 11-20.
- [5] Kolossov E, Lu Z, Drobinskaya I, et al. Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes[J]. FASEB J, 2005, 19: 577-579.
- [6] Zhang Y M, Hartzell C, Narlow M, et al. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential[J]. Circulation, 2002, 106: 1294-1299.
- [7] Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers [J]. Circ Res, 2004, 94: 952-959.

[收稿日期] 2007-01-16

[修回日期] 2007-02-10

[本文编辑] 曹 静

· 书 讯 ·

《肾脏病诊疗和病理图解》已出版

傅淑霞、杨林编著,2006年12月由人民军医出版社出版,大32开,精装,421页,35.4万字。作者具有丰富的临床实践经验,在本书中重点介绍了各类肾脏病的病理表现,并配以大量原始肾活检图片;同时对肾功能衰竭、各种原发性和继发性肾小球疾病的病因、病理、临床表现、诊断和治疗进行详细论述;还介绍了肾组织活检病理制片技术和肾功能不全患者用药须知。本书作为一部科学性与实用性兼有的学术著作,适合各级各类医院病理科、肾内科医生、医学生以及肾病患者阅读。定价:79.00元。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市100036信箱188分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168。E-mail: wanglan@pmmmp.com.cn