

· 论 著 ·

经皮穿刺经心外膜骨髓单个核细胞移植治疗犬严重缺血性心力衰竭

高连如^{1*}, 王志国¹, 贺 声², 张宁坤¹, 朱智明¹, 张云山², 费宇行¹, 徐洪涛¹, 丁青艾³, 杨 晔¹

(1. 海军总医院心血管内科, 北京 100037; 2. 海军总医院超声科; 3. 海军后勤部卫生部, 北京 100037)

[摘要] 目的: 探讨超声引导下, 在犬缺血性心力衰竭模型经皮穿刺心外膜下心肌自体骨髓单个核细胞移植, 修复心肌, 再生血管, 改善心功能的可能性, 安全性及效果。方法: 成年雄性家犬, 体质量 20~ 30 kg, 经皮穿刺球囊封堵前降支建立犬心肌梗死模型手术后 10 d, 行超声心动图检查确立 EF < 40% 为严重缺血性心力衰竭(共 14 条)。随机实验分组: 细胞移植组 (n= 6) 及生理盐水注入组(对照组, n= 8)。细胞移植术前 1 d 分离骨髓单个核细胞, 以 DAPI 标记。23G 超声引导穿刺针尾部连接电极, 穿刺入心外膜下心肌, 监测电极显示 ST 段抬高, 即注入细胞悬液 $1.3 \times 10^6/m.l$, 改变方向, 每一点分别注射 0.2 ml, 共 10 点。于术前及术后 3 个月行超声心动图及组织学检查。结果: 荧光显微镜下可见大量新生细胞, 并可见发出绿色荧光的丝状肌丝肌管。光镜下见大量移植的单个核细胞生长, 移植细胞间及与宿主细胞间均有闰盘连结。细胞移植组心肌梗死区域肉眼可见大量血管, 小血管数量明显增加, 心功能明显改善, 与术前相比, 每博输出量增加 16.7 ml, EF 增加 14.7%, 左室内径缩小 6%。而对照组 3 个月后, 梗死区室壁变薄, 仅见纤维瘢痕组织, 心腔扩大, 心功能明显恶化。移植细胞组术中及术后均安全。结论: 犬严重缺血性心力衰竭模型在超声引导下, 经皮穿刺, 经心外膜自体骨髓单个核细胞移植修复心肌, 再生血管, 改善心功能是可行、安全、有效的。

[关键词] 骨髓单个核细胞; 细胞移植; 缺血性心力衰竭; 经心外膜

[中图分类号] R 541.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)09-0940-05

Percutaneous transextracardial autologous mononuclear bone marrow cell transplantation for severe ischemic heart failure in dog models

GAO Lian-Ru^{1*}, WANG Zhi-Guo¹, HE Sheng², ZHANG Ning-Kun¹, ZHU Zhi-Ming¹, ZHANG Yun-Shan², FEI Yu-Xing¹, XU Hong-Tao¹, DENG Qing-Ai³, YANG Ye¹ (1. Department of Cardiology, Navy General Hospital, Beijing 100037, China; 2. Department of Ultrasonics, Navy General Hospital; 3. Health Division, Navy Logistic Department, Beijing 100037)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the possibility, safety, and effects of repairing infarcted myocardium and angiogenesis with autologous mononuclear bone marrow cells (MBMC) transplantation by echocardiography-guided percutaneous trans-extracardial injection in dogs with severe ischemic heart failure. **Methods:** Permanent left anterior descendant coronary arteries occlusion was performed in 20 male dogs by balloon to establish ischemic heart failure and extensive myocardial infarction (MI) models. Ten days after MI, echocardiography was performed and EF < 40% was considered as severe ischemic heart failure models. Fourteen dogs were divided into 2 groups: cell transplantation group (n= 6) and control group (n= 8). One day before cell transplantation, MBMC were harvested, isolated, washed, labelled with 4', 6-dimidino-2-phenylindone (DAPI). Echocardiography guiding was used to identify infarcted myocardium area percutaneous trans-extracardial injection with 23G ultrasonically guided needle. Control group was injected with saline only (10 injections of 0.2 ml each). Echocardiography study was performed before and 3 months after cells graft. **Results:** Fluorescent labelled MBMC with green color were found in cell transplantation group 3 months later, but not in control group. Light microscopy revealed the presences of engrafted MBMC and the presence of nascent intercalated disks connecting the engrafted cell and the host myocardium. Many new blood vessels were formed in the infarct-bed. There was a significant improvement in cardiac function. Compared with those before cells transplantation, the stroke volume increased by 16.7 ml, ejection fraction increased by 14.7%, and left ventricular diameter decreased by 6%. **Conclusion:** It is feasible, safe, and effective to use echocardiography-guided percutaneous trans-extracardial injection of MBMC in repairing infarcted myocardium, which might provide a new approach for treatment of severe ischemic heart failure patients who are not suitable for percutaneous coronary intervention and bypass surgery.

[KEY WORDS] mononuclear bone marrow cell; cell transplantation; ischemic heart failure; transextracardial

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 940-944]

* 心肌被认为是终末化组织, 心肌梗死后坏死的心肌必然被纤维组织代替^[1]。当前内科药物、介入及冠状动脉(冠脉)旁路移植手术均不能修复及逆转已经坏死的心肌, 受损的心脏经过组织重构, 最终发展

* [基金项目] 海军科研基金(00-3322)。

[作者简介] 高连如(1946-), 女(汉族), 博士, 教授, 主任医师 6951490; 军线 0201951490

* Corresponding author. E-mail: lianru@yahoo.com.cn



为缺血性心力衰竭。而缺血性心力衰竭5年生存率不到50%^[1,2]。近年来,许多研究者试图应用细胞移植代替心脏移植,来解决心肌细胞数量减少这一心衰的根本原因^[3-7]。随着分子生物学的发展,尤其是“干细胞生物工程”的蓬勃展开,含有多向分化潜能和自我复制的骨髓基质干细胞(MSC),为细胞移植重建坏死心肌提供了理想的修复材料^[7]。然而, MSC并非纯一的细胞群体,而是由不同发育等级(hierarchy)或具有不同分化潜能的干细胞群组成^[8]。人们曾应用体外分离、培养、扩增MSC某一组分进行细胞移植,但体外长期培养带来的细胞趋于分化、易受污染等缺陷限制了其广泛应用。骨髓单个核细胞(mononuclear bone marrow cells, MBMC)是含有原始基质干细胞/多系祖细胞及基质细胞的混合细胞群体,不仅可提供具有多分化潜能的细胞,还可提供多细胞间相互依赖分化生存的诱导微环境,且不需要体外扩增。

细胞植入方法亦是当今细胞移植研究焦点。心肌直接注入法的基础与临床研究已显示良好效果,但是需开胸手术,因创伤较大而限制了其应用前景。内科介入方法,即经冠脉移植或用旋转注射器通过心内膜多点穿刺注射法,均适合于心功能可承受导管手术或冠脉介入治疗者。以上方法对于那些最需要从细胞移植中获益的大量缺血性心肌病晚期心衰患者以及心肌梗死后血管不能重建的缺血性心肌病患者而言,其应用则受到了限制。本研究试图选用创伤性既小又可确保细胞移植在梗死心肌部位的植入方法,即在超声引导下经皮穿刺行心外膜下心肌MBMC移植,观察其对心肌梗死后严重的缺血性心力衰竭犬模型坏死心肌的修复作用,并评价移植的效果及安全性。

1 材料和方法

1.1 犬心肌梗死模型的建立 成年雄性家犬20条(体质量20~30 kg),经肌内注射氯胺酮(5 mg/kg)和速眠新(0.08 ml/kg)诱导麻醉,将动物平卧于设有大型X线机手术台上,右腹股沟部备皮,碘伏消毒,铺无菌巾,右腹股沟韧带下1 cm穿刺股动脉,常规消毒铺巾,经右侧股动脉穿刺置入6F动脉鞘管,经股动脉弹丸式注入肝素钠2500 U,后每隔1 h追加肝素钠1250 U。用冠脉指引导管行冠脉造影,造影后置入PTCA球囊导丝,在导丝指引下置入2.5 mm × 20 mm Mewerik球囊至前降支前中段交界处以2~4 atm(1 atm = 1.01 × 10⁵ Pa)充盈球囊,经缺血预适应3~4次,每次球囊充盈20 s,间隔3~

5 min,以4~6 atm打开球囊堵塞冠脉,造影示球囊远端血流中断。球囊保持充盈90 min,此间持续监测压力及电活动。术中根据肢体运动情况每隔1 h左右重复肌内注射氯胺酮2 ml+速眠新1.5 ml剂量的1/3。使犬保持麻醉状态,注意犬的呼吸情况,根据心律及心率经肌内或静脉给予阿托品或利多卡因等药物。术后每天肌内注射青霉素160万U,持续3 d。6条犬于AMI术中或术后24 h内死于室颤、泵衰竭。

1.2 MBMC悬液的制备 犬心肌梗死模型手术后1周(细胞移植前1 d下午),再次经肌内注射氯胺酮(5 mg/kg)和速眠新(0.08 ml/kg)诱导麻醉,将动物平卧于动物实验台上,在无菌条件下于髂后上嵴处行骨髓穿刺,分2~3个点共抽取15 ml骨髓。动物继续饲养。MBMC分离:将骨髓(在试管上部)与淋巴细胞分离液(在试管下部)等比例分装,骨髓贴壁流入,封口。离心:先低速(500 r/min)5 min,再1500 r/min × 15 min。弃1/3上清液,取其下面的白细胞层,加入培养液(RMPI 1640)3 ml,混匀离心(1500 r/min × 10 min)。弃上清加入3 ml培养液,离心(1500 r/min × 15 min)。弃上清,混匀,加培养液,再混匀,1500 r/min × 15 min离心。计数以1 × 10⁶/ml密度置培养瓶中。再以0.02%的4',6-二乙酰基-2-苯基吲哚(DAPI, Sigma)的染色浓度加入荧光标记物(用生理盐水1 mg/ml浓度溶解的DAPI 37、5% CO₂过夜。次日收集细胞,漂洗3次去除未结合的DAPI及培养液,悬于2 ml肝素盐水中用于细胞移植,检测活细胞数占94.6%。细胞数目为(2.6~2.8) × 10⁷/2 ml。

1.3 实验分组及经皮穿刺超声引导下经心外膜MBMC心肌移植 犬心肌梗死模型建立后10 d,动物麻醉同上,行超声心动图检查,确立心肌梗死EF < 40%者入选缺血性心力衰竭模型。共14条犬入选(另有6条于AMI模型建立术中或术后24 h内死于室颤、泵衰竭)。动物随机分为细胞移植组(n = 6)、生理盐水注入组(对照组, n = 8)。于次日行细胞移植术,同上常规麻醉,左心前区皮肤消毒,铺无菌巾,二维超声心动图指引下,23G超声引导穿刺针尾部连接电极,穿刺入心外膜下心肌,监测电极显示ST段抬高,即注入细胞悬液0.2 ml,改变不同方向,每一点分别注射0.2 ml生理盐水或DAPI标记的MBMC悬液(1.3 × 10⁶/ml),共10点。注射中均可见室性期前收缩及短阵室速,注射停止则期前收缩消失。

1.4 超声心动图检查 于细胞移植术前及术后3

个月行超声心动图检查,应用美国 Sonosite 超声仪,探头频率为 3.5 MHz,可同步进行 M 型、2D 动态显示。扫描速度为 100 mm/s。测量左室前后径、左室短轴缩短百分率、梗死部位厚度、每搏输出量、EF (%)。

1.5 组织学检查 实验动物饲养 3 个月后放血处死,MBMC 移植组和对照组均取心脏前壁和下壁制成 5 μm 厚的冰冻切片标本,进行荧光显微镜观察并照相。余组织 10% 甲醛固定,石蜡切片,光镜检查。

1.6 统计学处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 *t* 检验和配对 *t* 检验进行组间分析。

2 结果

2.1 动物存活情况 细胞移植组 6 条犬全部存活;对照组 8 条犬于生理盐水注入术后 1 个月内死亡 2 条,2 个月死亡 1 条,余 5 条存活。

2.2 MBMC 移植对心室结构的影响 心脏外观:对照组左室前壁塌陷,呈灰白色,全部为纤维瘢痕。而细胞移植组左室前壁增厚,并肉眼可见大量红色的血管。超声心动图所见细胞移植组梗死部位室壁厚度较移植前增加 17.6% ($P < 0.05$);而对照组梗死区室壁明显变薄,梗死部位室壁厚度较 3 个月前减少 4.8% (表 1)。

2.3 MBMC 移植对再生心肌的效应 大体解剖肉眼所见对照组 3 条犬左室前壁室壁瘤形成,而细胞移植组犬无 1 条室壁瘤形成。细胞移植犬前壁心肌组织冰冻切片荧光显微镜下观察,可见到大量细胞核发亮绿色阳性染色新生细胞存在,也可见发出绿色荧光的丝状肌丝肌管,排列方向大体一致。对照组的前壁仅见浅淡的自发黄绿色荧光,而均未发现有带绿色荧光的丝状肌丝肌管(图 1)。左室壁石蜡切片 H-E 染色,光镜下观察,细胞移植组左室前壁在瘢痕组织中可见密集的梭形、单个核、略不同于宿主细胞的新生细胞生长,胞质可见短的肌丝片断,并形成丝状肌管,细胞排列成束(图 2)。而对照组左室前壁心肌梗死区仅为纤维组织,无新生细胞及心肌组织存在。左室壁连续切片低倍镜下观察,细胞移植组可见有密集的细胞代替纤维组织,左室前壁梗死瘢痕区室壁明显增厚;而对照对照组左室前壁薄,仅 1 层纤维组织(图 1C、1D)。移植组可清晰观察到移植细胞间有闰盘连接,及移植细胞与宿主细胞间闰盘相连(图 2)。

2.4 MBMC 移植对再生血管的效应 心肌小血管密度(心肌小血管数/10 个 200 倍视野),细胞移植组为 10.16 ± 1.21 ;对照组为 4.97 ± 1.11 ,两组比较有显著差异($P < 0.01$),表明细胞移植有明显增加小血管数量的作用。

2.5 MBMC 移植对心功能的效应 两组犬经前降支球囊阻塞,建立前壁心肌梗死模型后 10~14 d,经超声心动图检查,明确左室腔扩大、射血分数减低,确立缺血心力衰竭模型 14 条,移植前两组心功能显示无差异(表 1)。术后 3 个月比较,细胞移植组心功能明显改善,每搏输出量 EF 增加,左室内径缩小($P < 0.05$)。而对照组 3 个月后心功能明显恶化。

3 讨论

3.1 供体细胞的选择 1968 年, Friedenstein^[9] 进行骨髓培养中,发现一种贴壁的成纤维样细胞。此后研究发现这种细胞可以分化为骨、软骨、脂肪、肌肉等多种间质细胞,提出了这种具有自我更新、多向分化潜能的细胞群体为间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)^[10]。现研究已证实:移植的 MSC 可在梗死瘢痕区域存活、分化、成熟为心肌样细胞,并具备成熟心肌细胞特异的肌球蛋白重

表 1 细胞移植对心功能的影响

Tab 1 Effect of cell transplantation in heart function

Index	Transplantation group	Control group
LVESD (d/mm)		
Pre-transplantation	30.4 ± 2.5	34.4 ± 0.2
Post-transplantation	28.6 ± 2.0*	36.4 ± 0.2
LVESV (V/ml)		
Pre-transplantation	32.1 ± 5.5	49.5 ± 5.2
Post-transplantation	31.2 ± 3.3	57.0 ± 7.2
SV (V/ml)		
Pre-transplantation	20.6 ± 3.5	33.1 ± 3.1
Post-transplantation	37.3 ± 4.8*	33.0 ± 4.6
EF (%)		
Pre-transplantation	39.9 ± 4.5	40.4 ± 3.7
Post-transplantation	54.6 ± 5.3*	37.3 ± 6.0
FS (%)		
Pre-transplantation	21.2 ± 1.5	19.6 ± 2.0
Post-transplantation	25.9 ± 3.0*	18.2 ± 3.3
M II (d/mm)		
Pre-transplantation	6.2 ± 0.7	6.2 ± 0.3
Post-transplantation	7.3 ± 0.5*	5.9 ± 0.4

LVESD: Left ventricular end-systolic diameter; LVESV: Left ventricular end-systolic volume; SV: Stroke volume; EF: Ejection fraction; FS: Fractional shortening; M II: Thickness of myocardial infarction area; * $P < 0.05$ vs pre-transplantation; $P < 0.05$, $P < 0.01$ vs control group

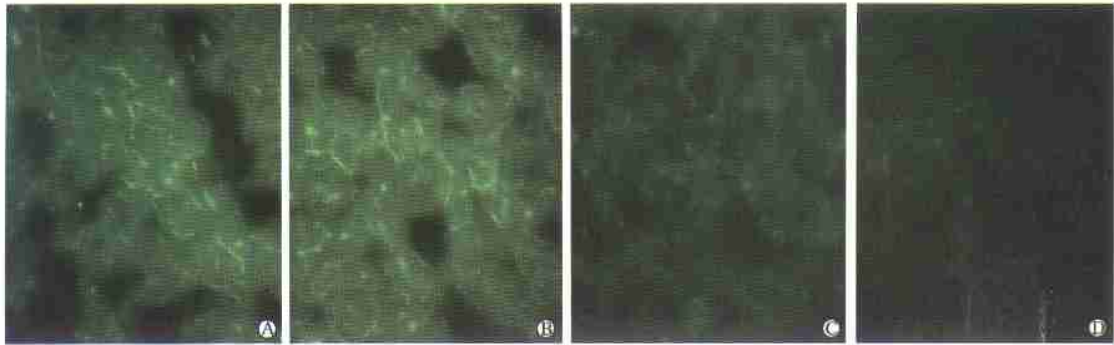


图1 MBMC移植后犬前壁心肌组织冰冻切片的荧光照片

Fig 1 Fluorescent photos of cardiac anterior wall frozen section after MBMC transplantation (× 280)

A, B: Anterior wall of transplantation group;

C: Anterior wall of control group; D: Posterior wall of transplantation group

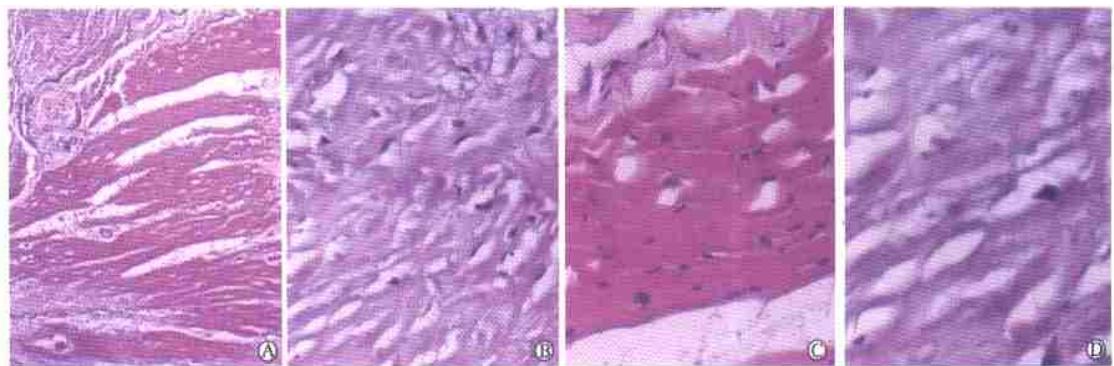


图2 MBMC移植后犬左心室前壁心肌组织石蜡切片光镜观察

Fig 2 H-E staining of left ventricle anterior wall paraffin section after MBMC transplantation (A, B × 40; C, D × 100)

A, C: Anterior wall of transplantation group; B, D: Anterior wall of control group

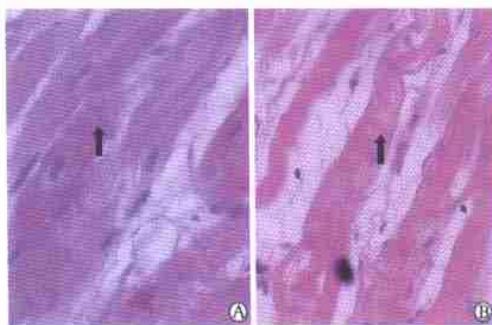


图3 MBMC移植后犬左心室前壁心肌组织连续切片光镜观察

Fig 3 H-E staining of left ventricle anterior wall serial section after MBMC transplantation (× 200)

A: A row showing intercalary disc between transplanted cells; B: A row showing intercalary disc between transplanted cells and host cells

链的表达, 心肌细胞转录因子4的表达, 及代表心肌电兴奋偶联特性的连接蛋白-43表达, 完全符合心肌重建要求^[7]。近年来, 尽管MSC特征的研究迅速发展, 但是在人类, 至今还没有鉴定出MSC上惟一

特异的表面抗原及真正检测MSC的方法。目前所采用的分离MSC方法, 常为干细胞中某1种或2种抗原组分细胞, 作为移植供体细胞, 其缺乏多细胞间相互依赖分化的诱导微环境, 且提纯细胞数量少常需体外长时间扩增, 而这一过程大大降低了MSC的多向分化潜能^[11]。因此本研究选择含有骨髓间充质干细胞/多系祖细胞、定向祖细胞及基质细胞的MBMC。MSC的分化不仅需要基质细胞的依托, 更需要基质细胞与MSC在相互作用基础上产生的调控功能。所以当MSC到达一个特殊区域, 通过与宿主细胞间通讯网络, 分泌调节因子, 诱导细胞使其适应环境的细胞核反应, 编码、转录、表达改变, 使之MSC分化中产生细胞表型及功能的改变^[7-11]。因此MBMC作为供体细胞不仅提供了重建心肌的细胞物质基础, 而且提供了MSC分化所必需的细胞因子, MSC分化依赖的诱导微环境。新鲜抽取的MBMC不需体外扩增, 更好的保留了MSC多向分化潜能和自动迁移特性, 而且避免了体外长期培养的污染机会。

3.2 移植方法的选择 英国外科医生 Galinanes 等^[12]给 14 例严重冠心病患者进行旁路移植术时,从患者胸骨中抽取骨髓,注入梗死心肌瘢痕组织中;德国医生 Strauer 等^[11]给 10 例急性心肌梗死患者经冠脉移植自体 MBMC; Perin 等^[13]对 14 例慢性缺血性心力衰竭患者,应用旋转注射器,在 NOGA 感知标记系统标记残活心肌区域行点状心内膜下心肌直接注入细胞移植。虽然以上方法均显示明显改善心功能及预后,但是,以上选用的方法中 3 组患者均未包括那些不具备导管介入、外科搭桥手术条件的、药物治疗无效的晚期缺血性心衰患者。而本研究建立了犬典型心肌梗死后缺血性心力衰竭模型,首次在二维超声心动图引导下,应用微小创伤仅 23G 直径超声引导穿刺针,在心外膜下心电图监测下,将细胞注入梗死心肌瘢痕组织中是安全的,注射中仅出现室早或短阵室速,均为自限性,亦无其他不良反应。细胞移植组 6 条犬均存活,术后 2 次监测心电图无心律失常发现。这对于那些不能耐受开胸搭桥手术、内科导管介入手术、药物治疗无效的终末期缺血性心力衰竭患者,无疑是一种全新的治疗方法。

3.3 MBMC 移植效果评价 本研究发现,超声引导下经皮穿刺心外膜下心肌 MBMC 移植术后 3 个月,无论大体解剖,还是病理组织学微观检查,均显示 MBMC 移植可在心肌坏死瘢痕中存活、分化、成熟心肌样细胞,明显增厚梗死区域室壁,限制、缩小了瘢痕,有效阻止和逆转了心室重构。移植的 MBMC 同时分化成血管内皮细胞而形成心肌小血管,移植细胞通过自分泌、旁分泌,分泌大量血管活性物质、生长因子、细胞因子,促进新生血管形成,有效改善了损伤区心肌灌注,超声心动图显示心功能得到了明显改善。我们认为 MBMC 移植可能通过以下机制改善心功能: (1) 移植后新生的心肌细胞维持了缺血梗死心肌的相对完整性,限制了心室特别是瘢痕区的扩张,改善了心脏重构; (2) 移植后新生心肌细胞增加了心脏的顺应性和弹性,致舒张功能改善; (3) 移植后新生的心肌组织于舒张期被动拉长,收缩期弹性回缩,参与了收缩功能的改善; (4) 新生的心肌细胞可能分泌某些血管生长因子、生长因子、细胞因子等物质; (5) 同时又提供了内皮及平滑

肌细胞的前体细胞,促进了小动脉、毛细血管再生; (6) 新生细胞参与宿主心肌的同步收缩,具备心肌细胞生理特性^[11-13]。

[参考文献]

- [1] Mann DL. Mechanisms and models in heart failure: a combinatorial approach[J]. *Circulation*, 1999, 100(9): 999-1008
 - [2] Colucci WS. Molecular and cellular mechanism of myocardial failure[J]. *Am J Cardiol*, 1997, 80(11A): 15L-25L.
 - [3] Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure[J]. *Lancet*, 2001, 357(9252): 279-280
 - [4] Soonpaa MH, Koh GK, Klug MG, et al. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium[J]. *Science*, 1994, 264(5155): 98-101.
 - [5] 高连如, 王志国, 张宁坤, 等. 胎儿心肌细胞移植重建大鼠梗死心肌[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(20): 1818-1822
Gao LR, Wang ZG, Zhang NK, et al. Transplantation of fetal cardiomyocyte regenerates infarcted myocardium in rats[J]. *Zhonghua Yixue Zazhi (Nat Med J China)*, 2003, 83(20): 1818-1822
 - [6] Li RK, Jin ZQ, Weisel RD, et al. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function[J]. *J Med Cell Cardiol*, 1999, 31(3): 513-522
 - [7] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cell regenerate infarcted myocardium[J]. *Nature*, 2001, 410(6829): 701-705.
 - [8] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.
 - [9] Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes[J]. *Int Rev Cytol*, 1976, 47: 327-335.
 - [10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
 - [11] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans[J]. *Circulation*, 2002, 106(15): 1913-1918
 - [12] Galinanes M, Loubani M, Davies J, et al. Safety and efficacy of transplantation of autologous bone marrow into scarred myocardium for the enhancement of cardiac function in man[J]. *Circulation (Suppl)*, 2002, 106: 460-463
 - [13] Perin EC, Dohmann HF, Boroevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure[J]. *Circulation*, 2003, 107(18): 2294-2302
- [收稿日期] 2004-07-02 [修回日期] 2004-08-11
[本文编辑] 尹 茶