

大鼠骨髓单个核细胞移植治疗心肌梗死

胡国梁¹, 黄佐^{1*}, 侯健², 赵宝珍³, 黄海怡¹, 周智慧³

(1. 第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003; 2. 长征医院血液科; 3. 长海医院超声诊断科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨大鼠骨髓单个核细胞(mononuclear bone marrow cells, MBMCs)移植方法对梗死心肌的治疗效果。方法: 无菌条件下取成年雄性近交系Wistar大鼠股骨和胫骨, 常规抽取骨髓, 分离制备MBMCs悬液。将成年雄性近交系Wistar大鼠46只随机分为空白对照组(组I, $n=10$)、梗死对照组(组II, $n=18$)、细胞移植组(组III, $n=18$)。用结扎冠状动脉左前降支的方法建立大鼠心肌梗死模型, 在建模后2周分别将 $10\ \mu\text{l}$ MBMCs (6×10^6)悬液和等量磷酸盐缓冲液(PBS)植入组II和组III的梗死周边区。用心脏超声观察细胞移植后4周的心脏功能改变, 用免疫荧光和免疫组化及电镜观察移植细胞在心肌梗死区及梗死周边区的存活、增殖和分化情况。结果: MBMCs移植4周后, 移植组超声检查左室功能重建指标如左室射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)、左室前壁厚度(LVAVT)均较梗死对照组改善明显($P < 0.05$); 移植组血流动力学检查指标如左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)和左室舒张压力时间变化最大速率($\pm dp/dt_{\max}$)也优于梗死对照组($P < 0.05$)。MBMCs移植6周后, 大鼠心肌梗死区有移植细胞存活、增殖, 并分化为有心肌细胞特征的细胞。结论: 实验实用MBMCs移植治疗心肌梗死, 可以明显改善梗死后心脏功能。这一效果可能与MBMCs移植相关的心肌再生和新生血管形成有关。

[关键词] 骨髓单个核细胞; 心肌梗死; 细胞移植

[中图分类号] R 542.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)09-0945-05

Mononuclear bone marrow cells transplanting in treatment of myocardial infarction

HU Guo-Liang¹, HUANG Zuo^{1*}, HOU Jian², ZHAO Bao-Zhen³, HUANG Hai-Yi¹, ZHOU Zhi-Hui³ (1. Department of Cardiovascularology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Hematology, Changzheng Hospital; 3. Department of Ultrasonics, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the therapeutic effect of mononuclear bone marrow cells (MBMCs) transplanting in treatment of myocardial infarction. **Methods:** Under sterile environment, the femur and the tibia from adult male Wistar rats (inbreeding line) were obtained, bone marrow was extracted with routine method, and MBMCs were separated and made into suspension. Forty-six adult Wistar rats were divided into 3 groups at random: blank (group I, $n=10$), control (group II, $n=18$) and transplantation (group III, $n=18$). Myocardial infarction was induced by ligation of left anterior descending coronary artery. Group II were injected with $10\ \mu\text{l}$ phosphate buffered saline (PBS) and group III were transplanted with MBMCs (6×10^6)/ $10\ \mu\text{l}$ 2 weeks after myocardial infarction. Four weeks after MBMCs transplantation, echocardiography and hemodynamics examination were performed in all groups to observe the date of ejection fraction (EF), fractional shortening (FS) and left ventricular anterior wall thickness (LVAVT) for evaluation of the cardiac function and left ventricular remodeling. The changes of left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and the maximal ratio of left ventricular diastolic pressure to left ventricular diastolic time ($\pm dp/dt_{\max}$) were also measured for evaluation of hemodynamic changes. The survival, differentiation of transplanted MBMCs and angiogenesis were observed by immunohistochemistry, confocal laser scanning micrography and transmission electron micrography. **Results:** Four weeks after MBMCs transplantation, the curative effects on cardiac function were obvious. The date of EF, FS and LVAVT were improved compared with those of control group ($P < 0.05$) and so were the hemodynamics data, including LVSP, LVEDP and dp/dt_{\max} ($P < 0.05$). Six weeks after MBMCs transplantation, the examinations showed that the transplanted cells survived and proliferated. The hearts with transplanted cells had better cardiac function than the control hearts did ($P < 0.05$). **Conclusion:** Transplantation of MBMCs can improve cardiac function obviously in cardiac infarction, which may be attributed to MBMCs-associated myocardial regeneration and neovascularization.

[KEY WORDS] mononuclear bone marrow cells; myocardial infarction; cell transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 945-949]

* 心肌梗死后, 由于心肌细胞数量的减少, 损伤区不能通过残余心肌细胞的增生进行修复, 而是纤维瘢痕组织增生以替代坏死心肌^[1]。随着病程的进展,

* [基金项目] 上海市科技发展基金(03ZR14029)。

[作者简介] 胡国梁(1972-), 男(汉族), 硕士生。

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

梗死心肌组织纤维化,失去舒缩功能;进而引起心室重构,心脏壁扩张变薄,心肌弹性下降,致使心输出量(CO)、每搏量(SV)下降,最终发展成慢性心力衰竭^[2]。药物、手术治疗以及冠状动脉介入治疗,虽然在一定程度上明显地减少了病死率,改善了心脏功能,但这些治疗方法难以逆转心肌梗死后心室重构和心力衰竭的发生和发展。本实验观察了骨髓单个核细胞(mononuclear bone marrow cells,MBMCs)植入大鼠梗死心肌后的存活、增殖和心功能改善情况,旨在评价BMMCs移植治疗心肌梗死的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 雄性近交系Wistar大鼠46只(中国科学院上海生命科学研究动物中心提供),体质量(270±20)g,随机分为空白对照组(组I,n=10)、梗死对照组(组II,n=18)、细胞移植组(组III,n=18)。

1.2 MBMCs悬液的制备及细胞标记 另取成年雄性近交系Wistar大鼠18只,用腹腔注射氯氨酮麻醉后处死大鼠,无菌条件下取两侧股骨及胫骨。常规方法抽取骨髓,将骨髓液用肝素盐水稀释,用密度为1.077g/ml的Percoll分离液分离单个核细胞,2000r/min离心20min。吸取界面层单个核细胞,用PBS液洗3遍(1500r/min,5min),调整细胞密度为 6×10^8 /ml,细胞活性检测为85%。于骨髓液中加入终浓度为50μg/ml的4',6-二乙酰基-2-苯基吲哚(DAPI,Roche公司),放入37℃、5%CO₂饱和湿度孵箱内孵育1h,然后用PBS液冲洗去未结合的DAPI。

1.3 大鼠心肌梗死模型的制备和细胞移植 模型制备参照文献^[3]将Wistar大鼠用氯氨酮75mg/kg、地西洋(安定)75mg/kg、利多卡因10mg/kg复合腹腔麻醉,气管插管连接呼吸机(江湾I型,第二军医大学基础医学部生理学教研室研制),在胸骨左缘第3、4肋间进胸,在左心耳下缘与肺动脉圆锥间距主动脉根部约3mm处,以左冠状静脉为标志,用7-0眼科无创缝合针穿过左冠状动脉前降支深部,进针深度为0.3~0.5mm,小心打结并观察心电图动态变化。如在两个以上肢体导联出现ST段上抬0.2mV以上并伴有对应导联改变,同时肉眼观察结扎区域心肌变白为结扎成功。空白对照组仅穿线不结扎左冠状动脉前降支。梗死对照组和细胞移植组大鼠在结扎冠状动脉左前降支造模成功后2周再次开胸,将DAPI标记的细胞悬液10μl(含 6×10^6

个细胞)分多点注射到梗死周围区。对照组注射10μlPBS溶液;用缝线标记注射点后,逐层关闭肌层和皮肤。空白对照组仅开胸、关胸,不注射细胞或PBS溶液。术后均给予青霉素40万U肌肉注射。

1.4 心功能测定 3组大鼠均于第2次手术后4周行心功能检测。采用小动物超声探头(7.5MHz,Sonos5500 Hewlett-Packard,惠普公司)在胸骨旁行二维超声和M型超声的心脏形态和功能检测。选择切面包括左室长轴、短轴和四腔切面。重点测量左室射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)、左室前壁厚度(LVAVT)。所有指标均在3个连续的心动周期中检测并取平均值。

1.5 血流动力学指标的测定 在超声心动图检测完毕后,将3组大鼠用氯氨酮75mg/kg、地西洋75mg/kg麻醉,分离右颈动脉,置入微压力传感器导管,调整至左室腔,微压力传感器连接传递控制器以标定压力,应用MPA200QM多道生物信号采样分析系统(上海奥尔科特生物科技有限公司)记录左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张末期压力(LVEDP)及左室舒张压力时间变化最大速率($\pm dp/dt_{max}$)。每只大鼠记录5次,取平均值。

1.6 免疫组织化学检查 在细胞移植6周后,取梗死对照组和细胞移植组大鼠各4只,处死后取注射部位心肌,固定,脱水,石蜡包埋,制作厚度为4μm的连续切片,分别进行H-E常规染色和免疫组化染色。后者包括用抗VIII因子抗体(丹麦DaKo公司,1:50)进行新生血管标志物检测(DAB显色),用心肌细胞特异性肌动蛋白(美国Neomarkers公司,1:30)检测细胞存活和增殖情况。高倍镜(×200)下观察细胞移植组和梗死对照组梗死区及梗死边缘区内形态学特点,并参照Weinder^[4]微血管密度计数方法,随机取5个视野,计数梗死区及梗死边缘区内微血管密度。

1.7 免疫荧光检查 在细胞移植6周后,取梗死对照组和MBMCs移植组大鼠各4只,处死后取出心脏,将缝线标记处的心肌制成4μm厚的连续冰冻切片标本,用丙酮固定30min后,PBS液冲洗(0.01mol/L,pH7.3);加入抗心肌肌动蛋白(A-actin,美国Neomarkers公司,1:30)作为一抗,然后滴加异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗鼠IgG(美国Zymed公司,1:60)作为二抗,置于暗处室温4h,PBS洗3min×3后用蒸馏水甘油封片。进行激光共聚焦显微镜(美国LeicaTCS SP2)检查,观察DAPI标记细胞是否具有心肌细胞特异性肌动蛋白表达。另一部分冰冻切片加入兔抗人VIII因子相关抗原多克隆抗体

作为一抗, FITC 标记的山羊抗兔 IgG(北京中山公司)作为二抗, 检测移植细胞是否分化为具有微血管特异性标记的内皮细胞。

1.8 透射电镜检查 取缝线标记的心肌组织 1 mm^3 , 用 4% 多聚甲醛固定 4 h (4 冰箱), PBS 液 (0.1 mol/L) 漂洗 30 min $\times 5$; 放在 4 冰箱 PBS 液中过夜, 2% 锇酸固定; 双蒸水洗 10 min, 30%、50%、70%、90% 乙醇各洗 10 min, 90% 丙酮脱水 10 min, 无水丙酮 10 min $\times 3$ 脱水, Epon812 浸透包埋, 然后经过修块、定位、切片、聚合, 用醋酸铀、硝酸铅染色, 置于铜网上, 在透射电镜(H800 HITACHI, 日本)下 100 kV 加速电压, 观察心肌组织超微结构变化, 选取典型区域进行细胞摄片。

1.9 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠存活情况 空白对照组存活 8 只(在血流动力学检查中因血管破裂和心脏骤停死亡 2 只), 梗死对照组存活 10 只(术中因心脏停搏和失血性休克死亡 3 只, 术后因心力衰竭死亡 2 只, 在血流动力学检查中因血管破裂和心脏骤停死亡 3 只), 细胞移植组存活 9 只(术中因心脏停搏死亡 3 只, 术后

因心力衰竭死亡 2 只, 在血流动力学检查中因血管破裂和心脏骤停死亡 4 只)。

2.2 标记的 MBMCs 在梗死心肌内生长情况 MBMCs 植入梗死心肌后 6 周, 在激光共聚焦扫描显微镜下观察, 可见梗死对照组仅有纤维瘢痕形成(图 1A); 细胞移植组有 DAPI 标记的细胞浸润, 细胞核呈蓝色, 并有细胞迁移至梗死区及梗死周边区(图 1B、1C)。DAPI 标记的细胞同时有 Actin 抗体阳性表现(胞质呈绿色荧光), 提示移植细胞在受体梗死区附近心肌组织中得以存活并向心肌细胞分化。在细胞植入部位的微血管内皮中同样可以见到 DAPI 示踪的植入细胞存活、分化(图 1D)。

2.3 免疫组织化学检查结果 在普通光学显微镜下观察发现, 同正常心肌(图 2A)相比, MBMCs 移植区域可见到植入细胞胞核相对较大, 呈长梭形, 胞质内 Actin 染色阳性, 胞质黄褐色, 类似胎心或新生心肌细胞, 细胞与心肌细胞排列方向一致。心肌细胞的纤维化被有效抑制(图 2B)。VIII 因子染色后正常心肌无毛细血管增生(图 2C), MBMCs 移植组心肌梗死周边区毛细血管密度明显增加(图 2D)。H-E 染色检查发现 MBMCs 在植入区存活、增殖(图 3A), 放大后可见细胞胞核梭形, 并向横纹肌分化(图 3B)。正常心肌无此表现(图 3C)。

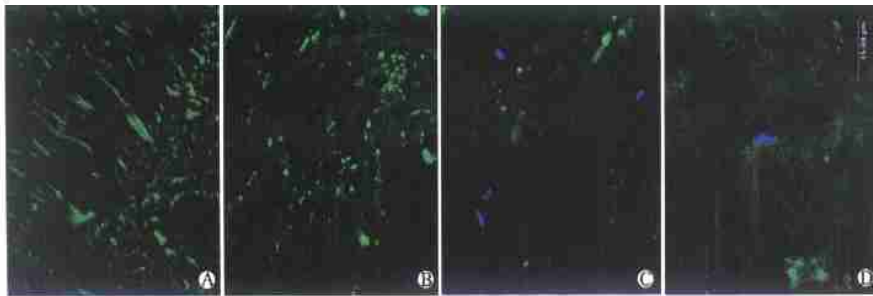


图 1 梗死心肌和移植细胞的激光共聚焦扫描显微镜检查

Fig 1 Confocal laser microscopy of infarcted myocardium and transplanted cells

A: Junctional zone between the infarction scar and the periphery; B, C: The MBMCs labelled with DAPI survived in the infarction zone; D: The MBMCs labelled with DAPI survived in the vessel wall

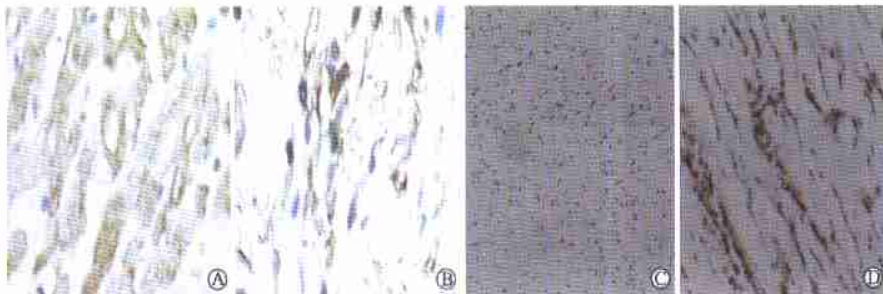


图 2 心肌免疫组化染色

Fig 2 Immunohistochemistry staining of myocardium

A: Actin staining of normal myocardium ($\times 400$); B: Actin staining of MBMCs transplanted myocardium ($\times 400$); C: Factor VIII staining of normal myocardium ($\times 40$); D: Factor VIII staining of MBMCs transplanted myocardium ($\times 40$)

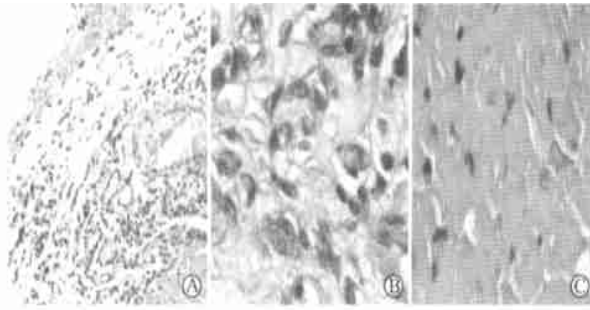


图3 心肌H-E染色结果

Fig 3 H-E staining of myocardium

A: H-E staining of MBMCs transplanted myocardium (×40); B: H-E staining of MBMCs transplanted myocardium magnified from A (×400); C: H-E staining of normal myocardium (×400)

高倍镜下可见,血管均匀分布于移植细胞和残存细胞之间,边缘区密度为(13.45±1.84)/0.2 mm²,高于梗死区的(8.37±1.58)/0.2 mm²,梗死对照组相应血管密度分别为(6.36±1.94)/0.2 mm²和(5.19±1.72)/0.2 mm²。细胞移植组新生血管较梗死对照组显著增多(P<0.05),而正常心肌内无新生血管。

2.4 心功能和室壁节段性运动功能 MBMCs移植4周后的心脏超声检查结果(表1)表明,梗死对

照组和移植组同空白对照组相比 EF、FS 均明显降低(P<0.05),LVAWT 明显变薄(P<0.05)。但移植组 FS、EF、LVAWT 检测值均高于梗死对照组(P<0.05),且室壁节段性运动也优于梗死对照组(资料未显示)。

表1 各组间左室功能重建指标的比较

Tab 1 Comparison of left ventricular remodeling among different groups

Group	n	FS (%)	LVAWT (l/mm)	EF (%)
I (Blank)	10	49±4	1.84±0.21	85.71±5.02
II (Control)	13	17±2*	1.30±0.10*	51.12±4.89*
III (Transplantation)	13	29±4*	1.66±0.13*	71.85±7.48*

FS: Fractional shortening; LVAWT: Left ventricular anterior wall thickness; EF: Ejection fraction; *P<0.05 vs group I; P<0.05 vs group II

2.5 血流动力学检测结果 与空白对照组相比,梗死对照组和细胞移植组LVSP、±dp/dt_{max}明显降低(P<0.05),而LVEDP明显升高(P<0.05),提示心肌梗死后,左室收缩、舒张功能显著受损。同梗死对照组相比,细胞移植组LVSP、±dp/dt_{max}明显升高(P<0.05),而LVEDP明显降低(P<0.05,表2)。

表2 各组间血流动力学指标的比较

Tab 2 Comparison of hemodynamic data among different groups

Group	n	LVSP (p/mmHg)	LVEDP (p/mmHg)	±dp/dt _{max} (mmHg·s ⁻¹)
I (Blank)	8	134.9±5.7	5.15±0.96	8.20±0.72±326.61
II (Control)	10	80.9±4.9*	40.13±2.68*	4.18±0.31±310.68*
III (Transplantation)	9	114.6±9.0*	16.87±1.49*	5.03±0.97±384.55*

LVSP: Left ventricular systolic pressure; LVEDP: Left ventricular end-diastolic pressure; ±dp/dt_{max}: The maximal ratio of left ventricular diastolic pressure to left ventricular diastolic time; 1 mmHg= 0.133 kPa, *P<0.05 vs group I; P<0.05 vs group II

2.6 透射电镜观察结果 梗死对照组可见梗死区周围心肌组织水肿,闰盘断裂(图4A)。细胞移植组上述病理改变较少,梗死周围心肌组织中可见分化不成熟的心肌细胞,核形态幼稚,胞质电子密度低,合成代谢旺盛,有肌膜和吞饮泡,细胞浆中可见散在的肌丝中心粒垂直排列(图4B)。

3 讨论

目前,用于移植治疗心肌梗死的细胞主要有: MBMCs、骨髓干细胞、胚胎干细胞、和胎儿干细胞。其中MBMCs可取自患者自身,不存在免疫排斥反应,易于采集和分离,不存在伦理道德上的争议,并且在心脏微环境中可以诱导分化形成心肌样

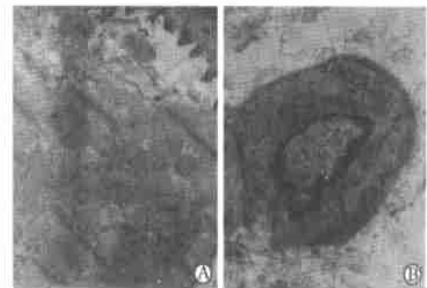


图4 梗死对照组和细胞移植组的心肌透射电子显微镜表现

Fig 4 Transmission electron microscopy of peri-infarction myocardium and transplanted cells (×1000)

A: Peri-infarction myocardium; B: Transplanted MBMCs

细胞和血管内皮细胞,与原有正常心肌组织形成机械耦联改善心脏功能^[5,6]。本实验发现MBMCs可以在梗死的心肌组织及其周围存活,并增殖分化为有心肌细胞特点的细胞,梗死区周围毛细血管密度也明显增高,心脏功能和血流动力学得到显著改善。这一结果与文献^[7-9]类似。

实验所选用MBMCs包含了间质干细胞和内皮前体细胞、造血前体细胞和中胚层前体细胞等不同成分。已经证实这些成分分别参与了心肌细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和血管的新生;目前多数细胞成分还没有特异的细胞表面因子,体外分离困难,本研究采用MBMCs作为整体进行移植,而不是移植其中的一个亚群。

本研究没有对细胞进行体外诱导分化和扩增,因为有实验证明经体外扩增的造血干细胞和前体细胞的归巢能力明显下降^[10]。在细胞移植方式上没有采用外周静脉注射移植。因为经外周静脉注射移植时,只有非常少的一部分能到达心肌梗死区。而且,长时间的循环和再循环过程中,有部分移植细胞会发生向肺、脾、肝等脏器归巢的现象^[11]。采用直接开胸心肌注射,可以使移植细胞在注射后首先在梗死区及梗死周边区停留,因而能使细胞移植效果表现最明显。在心肌梗死后的病理过程中存在急性炎症反应期和瘢痕形成期。在心肌梗死的最初48h,是恢复阶段前的清创和纤维素为主的临时基质形成为主的阶段。已有实验证实大鼠的心肌损伤炎症反应在1周时最强烈,损伤心肌处有大量炎性细胞浸润,通过释放蛋白水解酶或反应性氧化物直接损伤周围心肌细胞^[12],并可以将移植细胞和坏死细胞不加区别的一起清除掉,因而不能形成功能性的心肌和血管。这一反应在2周内完全结束^[13]。而心肌梗死后4周瘢痕形成后有明显的肌性血管壁形成,不利于细胞穿过内皮向组织间隙迁移^[14]。实验中将移植时间点选在梗死后14d,考虑到此时梗死急性炎症反应期已过,而心室扩张尚未发生。因而,可以减少炎症反应和瘢痕形成对移植细胞的不利影响,获得最好的治疗效果。

实验心肌梗死模型制作在参考文献^[1]的基础上进行了改进,采用氯氨酮75mg/kg、地西洋75mg/kg、利多卡因10mg/kg复合腹腔麻醉的方法,麻醉效果满意,术后即刻苏醒,无麻醉意外发生。采用直接经口气管插管的方法,避免了气管切开插管引起的术中和术后气道阻塞和肺部感染,提高了术后生存率。

[参考文献]

- [1] Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, et al Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart[J]. *Circ Res*, 1990, 67(7): 871-875.
- [2] Massie BM, Shah NB. Evolving trends in the epidemiologic factors of heart failure: rationale for preventive strategies and comprehensive disease management[J]. *Am Heart J*, 1997, 133(5): 703-712.
- [3] 刘元生,陈运贞.慢性心肌梗塞大鼠实验模型[J].重庆医科大学学报,2002,27(2): 153-155.
Liu YS, Chen YZ. Experiment model of chronic myocardial infarction in rats [J]. *Chongqing Yike Daxue Xuebao (J Chongqing Med Univ)*, 2002, 27(2): 153-155.
- [4] Weinder N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1): 9-14.
- [5] Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123(7): 1132-1135.
- [6] Tomita C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart [J]. *Circulation*, 2002, 105(1): 93-98.
- [7] Kocher AA, Schuster MD, Szabo MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function [J]. *Nat Med*, 2001, 7(4): 430-436.
- [8] Birgit A, Volker S, Claudius T, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI) [J]. *Circulation*, 2002, 106(12): 3009-3017.
- [9] 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(10): 1913-1918.
- [10] Szilvassy SJ, Bass MJ, Van Zant G, et al. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by *ex vivo* expansion [J]. *Blood*, 1999, 93(5): 1557-1566.
- [11] Hendriks PJ, Martens CM, Hagenbeek A, et al. Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells [J]. *Exp Hematol*, 1996, 24(1): 129-140.
- [12] Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury [J]. *J Leukoc Biol*, 1997, 67(7): 647-653.
- [13] Jugdutt BT, Amy RWM. Healing after myocardial infarction in the dog: changes in infarct hydroxyproline and topography [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1986, 7(1): 91-102.
- [14] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function [J]. *Ann Thorac Surg*, 1996, 62(4): 654-661.

[收稿日期] 2004-06-02

[修回日期] 2004-07-19

[本文编辑] 邓晓群