

成熟自体心肌细胞移植到心肌梗死区的实验研究

张浩¹, 徐志云^{1*}, 黄盛东¹, 宗刚军²

(1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 244033; 2. 长海医院心内科)

[摘要] **目的:** 研究成年兔左心耳心肌细胞自体移植到梗死区心肌后的存活情况, 及其对周围血供、心律的影响, 和对左室功能的改善情况。 **方法:** 将成年兔随机分为移植组 ($n=8$) 和对照组 ($n=8$), 所有成年兔均结扎的冠状动脉前降支, 建立心肌梗死模型。4 周后获取自体左心耳组织, 急性消化分离为单细胞后经 DAPI 标记后, 分别将细胞悬液和培养基注射到移植组和对照组梗死区内。4 周后行心电图及超声心动图检查, 并取移植区组织进行组织学观察。 **结果:** 移植 4 周后移植组与对照组兔子全部存活。心电图检查显示, 移植组心率高于对照组 ($P<0.05$), 未见异位心律。超声心动图检查提示, 至移植后第 4 周, 移植组左室功能优于对照组。心肌组织切片见对照组梗死区内为典型心梗后改变, 移植组梗死区内有“细胞岛”形成, 荧光检测证明移植的心耳肌细胞在移植区存活。 **结论:** 急性分离的自体左心耳心肌细胞移植到梗死区心肌内可以存活并能够改善左室功能。

[关键词] 心肌; 细胞移植; 移植, 自体; 心肌梗死**[中图分类号]** R 542.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0004-04

Transplantation of autologous left auricle cardiomyocytes into infarcted myocardium in rabbits

ZHANG Hao¹, XU Zhi-yun^{1*}, HUANG Sheng-dong¹, ZONG Gang-jun² (1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Cardiology, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the survival of rabbits receiving autologous left auricle cardiomyocytes transplantation into the infarcted myocardium and to assess the effect of transplantation on the peripheral blood supply, heart rate, and cardiac function. **Methods:** Healthy adult rabbits were randomly divided into transplantation group ($n=8$) and control group ($n=8$). The myocardial infarction (MI) models were established by ligating the left anterior descending arteries in all rabbits. Four weeks later the left auricles were harvested and the auricle cardiomyocytes were isolated and labelled with DAPI *ex vivo*. Rabbits in the transplantation group were injected with DAPI-labelled cell suspension into the infarcted areas and those in control group received culture medium. All the rabbits were examined by electrocardiogram (ECG) and 2-D ultrasonic cardiogram (UCG) 4 weeks after transplantation. Specimens were harvested from the transplanted areas and observed histologically. **Results:** All rabbits survived 4 weeks after transplantation. ECG showed that the heart rate in transplantation group was faster than that in control group ($P<0.05$), with no ectopic rhythm. UCG showed that the left ventricle function of the transplant group were better than that of the control group. Besides, the infarcted areas in control group showed typical histological changes of myocardial infarction and in the transplantation group there were “cell islands”. Fluorescence detection certified the survival of implanted cells. **Conclusion:** Isolated autologous left auricle cardiomyocytes can survive after grafted into rabbit ventricular myocardium following myocardial infarction and may improve the left ventricular function.

[KEY WORDS] myocardium; cell transplantation; transplantation, autologous; myocardial infarction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 4-7]

由于心肌细胞属于终末分化细胞, 成熟的心肌细胞不能进行有丝分裂, 因而当心肌梗死发生后, 残存的心肌细胞亦不能继续分裂增殖, 导致心肌细胞数量减少, 心脏收缩和舒张功能下降, 临床上出现心功能不全的表现。已有的缺血性心脏病的治疗手段如内科的经皮介入技术、外科的血管桥移植术等, 可不同程度的延缓心力衰竭的进展, 却不能逆转已坏死的心肌。而细胞移植技术则试图将新的细胞移入梗死的心肌组织内, 以改善心脏功能。本实验通过将自体心耳肌细胞移植到梗死区心肌, 并评价其对

左室功能的影响, 从而为临床应用细胞移植技术治疗缺血性心脏病提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康新西兰白兔 16 只, 雄性, 体重 2.5~3.0 kg, 购自第二军医大学实验动物中心。小牛血清、DMEM 高糖培养基、弹性蛋白酶 (Worth-

[作者简介] 张浩, 博士生, E-mail: Zhanghao@hotmail.com

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

ington), 胶原酶 II 型 (Worthington), 嗜热菌蛋白酶 (Sigma-aldrich), 4, 6-二脒基-2-苯茚二酮 (DAPI, Sigma-aldrich), 异硫氰酸荧光素 (FITC, Amresco)。

1.2 动物心肌梗死模型的建立及自体左心耳心肌组织的取材 取成年兔经耳缘静脉注射戊巴比妥钠 (30 mg/kg), 左侧胸骨旁切口, 切断第 4 肋骨进胸, 剪开心包, 显露冠状动脉前降支, 距离其根部大约 0.5 cm, 用 5-0 涤纶线直接缝扎, 根据心电图改变和左室前壁心肌颜色改变, 确定心肌梗死模型的建立。4 周后经原切口进胸, 分离粘连组织, 显露并牵引左心耳, 用 4 号丝线结扎心耳基底部, 剪取左心耳, 置于预冷 (4℃) 的普通台式液中。使用盐水纱布覆盖伤口。

1.3 左心耳心肌细胞的消化分离与标记 在无钙台式液 (NaCl 140 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, pH 7.4) 中洗去左心耳组织内的红细胞和血凝块, 用眼科剪将心耳组织剪碎, 移入含有 6.8 U/ml 弹性蛋白酶、320 U/ml 胶原酶 II 型、8 U/ml 嗜热菌蛋白酶的无钙台式液中, 37℃ 消化 10 min。轻柔吹打, 自然沉淀后弃去上清。再次消化 10 min, 轻吹打后, 吸取上清, 移入等体积含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中。重复消化 2~3 次至基本不可见有形组织。将收集的细胞悬液离心 (1 000 r/min, r=12.5 cm, 5 min), 弃上清, 调整细胞密度为 2×10^6 /ml, 锥虫蓝染色法检测活细胞率 90%。加入 0.02% 的 DAPI 于孵箱内 (37℃) 避光标记细胞 30 min。用普通台式液 (NaCl 140 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, pH 7.4) 漂洗以去除未结合的 DAPI。离心后收集细胞, 加入无血清 DMEM 培养液制成细胞悬液 (细胞密度为 2×10^6 /ml), 用于细胞移植。

1.4 分离细胞的观察 心肌细胞移植术前, 动态观察分离的心肌细胞, 荧光显微镜观察用 DAPI 标记好的心肌细胞。

1.5 心肌细胞移植 将动物随机分为移植组 ($n=8$) 和对照组 ($n=8$)。使用钛夹标记心肌梗死区, 移植组将 1 ml 心肌细胞悬液 (2×10^6 /ml) 经特制的微量注射器于钛夹标记上方 5 mm 处, 斜行注入左室前壁心外膜下 2 mm 处 (单点注射)。对照组以相同量的 DMEM 培养液注射。逐层关胸, 应用抗生素

预防感染。

1.6 心率、心律及心功能的观察 细胞移植后每周对移植组兔行心电图检查, 观察并记录心率及心律情况。心肌细胞移植术后 4 周, 将兔全身麻醉后平放于操作台上, 心电图电极连接到针灸针并刺入兔四肢, 比较移植术后移植组与对照组心率及心律的差异; 使用二维超声心动图 (Hewlett Packard, 5500) 进行左室功能评价, 测量射血分数、短轴缩短率、每搏输出量、每分输出量。

1.7 组织学研究 4 周后用过量麻醉剂处死动物, 取左室前壁缝线标记点上方梗死区心肌组织, 行常规 H-E 染色, 使用荧光显微镜观察。

1.8 免疫荧光检测 取细胞移植区心肌组织进行冰冻切片 (10 μm), 4% 多聚甲醛固定, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗, 血清封闭后加入鼠抗兔连接蛋白 43 (Connexin-43) 抗体于 4℃ 孵育过夜, 再用 FITC 标记的山羊抗鼠抗体室温下孵育 1 h, 使用荧光倒置相差显微镜观察。

1.9 统计学处理 数据处理采用 SPSS 11.5, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间进行 t 检验。

2 结果

2.1 心耳肌细胞的形态学观察 对用酶消化法分离获得的成年兔左心耳心肌细胞进行形态学观察, DAPI 标记后在显微镜下可见细胞大部分呈杆状, 边缘清楚, 胞质丰富, 细胞核大, 细胞为单核或多核, 荧光显微镜下可见染成蓝色的细胞核 (图 1)。

2.2 细胞移植后对心律的影响 建立心梗模型后, 心电图显示移植组与对照组均出现病理性 Q 波及 ST 段改变。观测期内移植组兔心电图检查为窦性心律, 未观察到异位心律的形成。观测至细胞移植术后第 4 周, 移植组与对照组均为正常窦性心律, 移植组心率 (267 ± 7) 次/min, 对照组为 (255 ± 11) 次/min ($P < 0.05$)。

2.3 细胞移植后对心功能的影响

2.3.1 左室功能评价 超声心动图显示, 行微注射法细胞移植术后第 4 周, 移植组射血分数明显高于对照组 ($P < 0.01$), 短轴缩短率稍高于对照组 ($P < 0.05$), 每搏输出量与对照组差异无显著性, 每分输出量高于对照组 ($P < 0.01$)。

2.3.2 M 型超声观察室壁运动 根据 Blatt 等^[1]的方法, 即在左室短轴乳头肌水平切面设置取样线, M 型超声显示结扎前降支前移植组与对照组左室

前壁局部心肌动度及增厚率均正常。结扎前降支后4 h,两组心肌收缩期向心运动幅度和增厚率均明显减低。移植术后第4周,移植组的局部心肌动度及增厚率基本恢复正常,而对照组未恢复。

2.4 移植细胞在移植部位的存活情况 光镜下可以观察到移植组心肌瘢痕组织内有心肌组织形成(图2A),而对照组瘢痕组织内无心肌样结构。心肌组织切片进行H-E染色后,在相差荧光显微镜下可以观察到移植组标本中带有蓝色荧光的细胞核(图2B),证实移植的心耳肌细胞在心肌瘢痕组织内存活。在移植细胞周围没有观察到淋巴细胞浸润,说明自体心肌细胞移植不会产生免疫排斥相关的炎症反应。

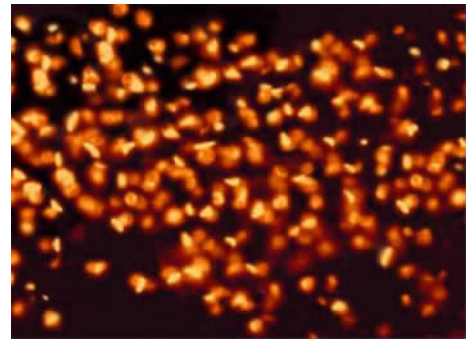


图1 经DAPI标记的急性分离的左心耳心肌细胞于荧光显微镜下观察

Fig 1 Isolated left auricle myocytes labelled with DAPI(×200)

表1 左室功能评价

Tab 1 Left ventricular function evaluation

(n=8, x̄±s)

Group	EF(%)	FS(%)	SV(V/ml)	CO(ml/min)
Transplantation	57.2±2.8	25.7±2.2	1.6±0.4	391.5±5.6
Control	49.8±3.7	24.8±1.3	1.3±0.3	306.0±7.3
t	4.509	2.647	1.852	26.000
P	<0.01	<0.05	>0.05	<0.01

EF: Ejection fraction; FS: Fractional shortening; SV: Stroke volume; CO: Cardiac output

2.5 免疫荧光检测 在移植细胞(DAPI标记细胞核,呈蓝色荧光)之间,以及移植细胞与原位心室肌细胞(非DAPI标记,无显示)之间均可见Connexin-43表达,表明移植细胞之间以及移植细胞与原有心室肌细胞之间均形成了电-机械耦联(图3),而对照组未见蓝色荧光的细胞核。

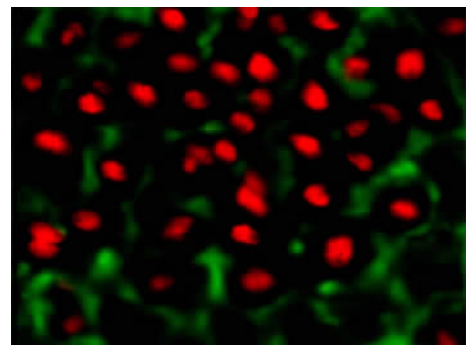


图3 移植组标本内细胞间形成的缝隙连接

Fig 3 Gap junctions between cells in transplantation group(×400)

Blue fluorescence was cell nuclei labeled by DAPI and green fluorescence was Connexin-43 of FITC in cell gap junctions(duble exposure)

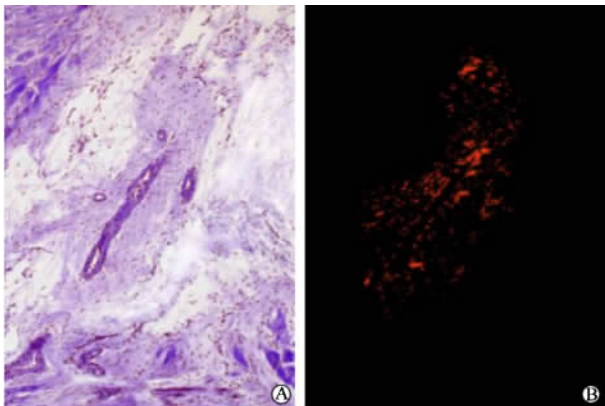


图2 4周后移植组心肌梗死区内“细胞岛”状心肌组织(A)和带蓝色荧光的细胞核(B)

Fig 2 “Cell island”(A) and cell nuclei with blue fluorescence(B, fluorescence) in infarcted areas in

transplantation group 4 weeks after transplantation (×100)

3 讨论

目前治疗缺血性心脏病的主要方法包括内科的药物和介入治疗、外科的冠状动脉旁路移植手术等,其治疗目标均为延缓心力衰竭的进展,并不能逆转已坏死的心肌。正在研究中的细胞移植技术试图将新的细胞移入梗死的心肌组织内,以改善心脏功能。

目前用于移植的细胞主要为胚胎心肌细胞、自体骨髓干细胞、骨骼肌成肌细胞等,但这些细胞用于移植后均存在一定的缺陷,如异体或异种细胞的伦理道德以及免疫排斥问题;骨髓干细胞、骨骼肌成肌细胞在胚胎起源、电生理机制、兴奋-收缩偶联、对损伤反应等方面与心肌细胞的差异问题等^[2-5],使得移植效果不够理想。相比而言,自体心肌细胞移植不仅具备以上细胞的优点,而且可以避免上述缺点和不足,具有更加光明的临床应用前景。因此,我们进行了自体心肌细胞移植的研究。

本实验中,我们通过永久结扎左冠状动脉前降支,建立成年兔心肌梗模型。与冰冻损伤或者暂时阻断冠状动脉的方法相比,这一技术更接近心肌梗死发生的病理生理过程,并且不会发生缺血再灌注时更为严重和广泛的心肌梗死。我们选用左心耳作为细胞来源,因其取材简便,且取材后对心功能影响不明显。同时考虑到成年心肌细胞不能继续分裂,因而未进行体外培养,而是选择分离标记后进行细胞移植。

成熟心肌细胞的分离技术是目前各种细胞的分离技术中的一个难点和热点问题,我们根据随年龄增长,心肌组织中细胞外基质含量变化的特点^[6],采用胶原酶II型、弹性蛋白酶及嗜热菌蛋白酶的联合消化方法,并避免使用传统的胰蛋白酶,以防止其对心肌细胞的损伤,初步结果显示此法消化效率高,获得的细胞活性较好,在以后的实验中,我们将进一步摸索各种酶的最佳消化浓度,以获得更好的消化效果。

我们将分离的兔自体心肌细胞移植到梗死区心肌,4周后荧光检测可以发现心肌标本中有带荧光的细胞核,说明移植的心肌细胞在梗死区内存活,同时我们还观察到梗死区内有血管形成。这提示移植的心肌细胞在移植部位可能分泌一些生长因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等^[7-9],促进梗死区心肌侧支循环的形成,使得移植的心肌细胞在梗死区内存活,并进一步改善心室功能。

在对左室功能进行评价时,我们利用二维超声心动图,并选择测量左室射血分数、短轴缩短率、每搏输出量、每分输出量这4个指标反映移植术后4周时移植组与对照组左室功能的差异。在本实验中,每次检查均由两名经验丰富的超声科医生采用盲法实施,再将各自的评分取平均值作为最终的数

据。结果显示,至移植术后第4周移植组左室功能优于对照组。说明自体左心耳心肌细胞移植到左室心肌梗死区内可以改善左室功能。

由于目前使用的细胞示踪技术(荧光标记物)的标记时限较短(4~6周),故本实验选择在移植后4周获取组织标本,而未进行更长时间的观测,对于移植细胞远期存活率的研究还需要进一步选择标记时效更长的示踪技术加以证实,如转基因表达绿色荧光蛋白(GFP)或性染色体标记技术等。

自体心肌细胞移植技术用于治疗缺血性心脏病具有较为明显的技术优势。自体细胞移植后不存在免疫排斥问题,术后无需应用免疫抑制剂,在避免免疫抑制药物各种毒副作用的同时,也能够减轻患者的经济负担;由于不需要进行体外培养,可以只进行一次手术而完成取材和移植的全部过程,减轻患者的痛苦和减少各种临床并发症的发生,因此这一研究具有较好的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] Blatt A, Robinson D, Cotter G, et al. Improved regional left ventricular function after successful satellite cell grafting in rabbits with myocardial infarction[J]. *Eur J Heart Fail*, 2003, 5:751-757.
- [2] Weisel R D, Li R K, Mickle D A G, et al. Cell transplantation comes of age [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 121: 835-836.
- [3] Li R K, Mickle D A G, Weisel R D, et al. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue[J]. *Circulation*, 1997, 96(Suppl 2):179-187.
- [4] 高连如. 细胞移植能修复梗死的心肌吗[J]? *中华医学杂志*, 2004, 84:1332-1333.
- [5] Menasche P. Cell transplantation in myocardium[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75:S20-S28.
- [6] Corda S, Samuel J L, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth[J]. *Heart Fail Rev*, 2000, 5:119-130.
- [7] Angoulvant D, Fazel S, Li R K. Neovascularization derived from cell transplantation in ischemic myocardium[J]. *Mol Cell Biochem*. 2004, 264(1-2):133-142.
- [8] Li R K, Jia Z Q, Weisel R D, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function [J]. *Ann Thorac Surg*, 1996, 62: 654-661.
- [9] Redaelli G, Malhotra A, Li B S, et al. Effects of constitutive overexpression of insulin 2 like growth factor21 of the mechanical characteristics and molecular properties of ventricular myocytes [J]. *Circ Res*, 1998, 82:594-603.

[收稿日期] 2006-05-25

[修回日期] 2006-09-19

[本文编辑] 曹静