

· 论 著 ·

骨髓单个核细胞移植对急性心梗大鼠血流动力学的影响

肖海波, 梅 举*, 张宝仁, 陆方林, 黄盛东 (第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 评价局部移植骨髓单个核细胞对急性心梗大鼠缺血心肌血管生成作用及血流动力学的影响。方法: 将 26 只 Lweis 大鼠随机分为移植组($n=14$) 及对照组($n=12$), 结扎大鼠左冠状动脉, 建立急性心肌梗死模型。将新分离的骨髓单个核细胞注射到大鼠的缺血心肌中(对照组大鼠注射等量无菌 PBS), 术后 4 周观察心肌血管数目, 结合心脏血流动力学参数评价心功能的改善情况。结果: 4 周后移植组与对照组相比左室舒张末期压力明显降低($P<0.01$), 压力变化率最大值(dp/dt) 明显升高($P<0.01, P<0.05$)。移植组心肌梗死区有明显血管增生, 移植组和对对照组心肌血管密度分别为(23.1 ± 1.5) 和(10.5 ± 1.8) 个/HPF, 差异有显著性意义($P<0.01$)。结论: 局部移植骨髓单个核细胞能明显促进缺血心肌新生血管生成, 增加缺血区灌注, 并可在一定程度上改善其血流动力学指标。

[关键词] 心肌梗死; 骨髓单个核细胞; 细胞移植; 血流动力学

[中图分类号] R 542.22 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2004)09-0956-03

Transplantation of mononuclear bone marrow cells improves hemodynamics in rat acute myocardial infarction model

XIAO Hai-Bo, MEI Ju*, ZHANG Bao-Ren, LU Fang-Lin, HUANG Sheng-Dong (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Objective: To evaluate the effect of mononuclear bone marrow cells transplantation on angiogenesis and hemodynamics in rat acute myocardial infarction model. Methods: Rat acute myocardial infarction model was created by coronary artery ligation. Bone marrow derived mononuclear cells isolated by Ficoll density gradient centrifugation and PBS were injected into ischemic zone of transplantation ($n=14$) and control ($n=12$) animals, respectively. Index of hemodynamics was inspected 4 weeks after transplantation; angiogenesis was evaluated by vessel count. Results: Four weeks after transplantation, cardiac function of transplanted rats was improved. Systolic and diastolic ventricular functions were better in the transplanted rats than those in control rats. Necropsy examination disclosed that capillary density was significantly greater in the transplanted group than in the control group (23.1 ± 1.5 vs $10.5 \pm 1.8, P<0.01$). Conclusion: Direct local transplantation of mononuclear bone marrow cells promotes angiogenesis and has a favorable impact on the preservation of left ventricular function in acute myocardial infarction.

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

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 956-958]

* 许多促血管生长因子如 VEGF、bFGF、HGF 等, 在动物肢体或心肌缺血模型中能够促进新生血管形成。然而, 生长因子治疗可能引起身体其他部位的病理性血管生长, 同时机体对基因转染载体的免疫反应也限制了生长因子基因治疗的应用。骨髓中含有各种未成熟细胞, 可以分化成造血干细胞和内皮祖细胞等, 骨髓细胞还可以分泌多种生长因子, 从人外周血中分离出来骨髓起源的内皮祖细胞已经被证明可以结合到血管新生部位^[1]。因此, 骨髓细胞移植将成为缺血条件下诱导血管再生的有效手段。本研究利用大鼠急性心梗模型, 观察植入骨髓单个核细胞促血管再生情况以及对血流动力学的影响, 为心肌梗死的临床治疗提供新的有效途径。

Lweis 大鼠 26 只(中国科学院生物化学所提供), 体质量 250 g; Ficoll 淋巴细胞分离液(Pharmacia); 兔抗 VIII 因子单抗、羊抗兔 EnVision 二抗(DAKO); 小动物呼吸机(温州市龙湾医疗器械厂); PowerLab system 8s 生理记录仪(AD Instruments, 澳大利亚); Chart 4.12 软件(AD Instruments)。

1.2 骨髓单个核细胞的分离 成年 Lweis 大鼠颈椎脱臼法处死, 无菌状态下取其四肢长骨。在超净台中将骨髓冲入 4~5 ml PBS 中, 反复吹打以获得单细胞悬液, 将骨髓细胞悬液缓慢置于等量的 Ficoll 淋巴细胞分离液(1.077 g/ml) 之上, 在 400 × g 离心 20 min, 离心后细胞分为 3 层, 吸取位于中层

1 材料和方法

1.1 主要材料 同基因背景成年(12 周)雄性

* [基金项目] 国家自然科学基金(39970735)。

[作者简介] 肖海波(1975-), 男(汉族), 博士生, 主治医师

* Corresponding author. Email: ju-me@sohu.com

的单个核细胞, PBS 重悬, 再离心 $5 \text{ min} \times 2$ 次, 以洗除残余 Fico11 液, 用无菌 PBS 制成细胞悬液并计数, 待移植。

1.3 大鼠心梗模型的建立及细胞移植 参照 Tom ita 等的方法^[2], Lweis 大鼠 26 只随机分为移植组 14 只和对照组 12 只。乙醚诱导麻醉, 气管插管, 接小动物呼吸机, 异氟醚吸入维持。于胸骨左侧第 4~5 肋间进胸, 剪开心包, 显露心脏, 于左冠状动脉前降支根部(肺动脉圆锥和左心耳连线中点与心尖的连线为标志)下 2 mm 处用 6-0 丙烯线贯穿缝扎。观察 3~5 min, 以缝线下方心肌颜色变暗红色为梗死成功, 心电图可见相应导联 ST 段抬高, 微量注射器吸取 $50 \mu\text{l}$ 细胞悬液(含 6×10^6 个细胞), 注射至梗死区与正常心肌交界处的心外膜下心肌内, 对照组注射等量无菌 PBS, 进针处 U 字缝合防止外渗。移植成功后胀肺, 待循环稳定后逐层关胸。自主呼吸完全恢复且平稳时, 拔除气管插管。

1.4 血流动力学指标检测 细胞移植后 4 周, 大鼠以 20% 乌拉坦(1.2 g/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧固定于手术台, 分离左侧股动脉, 向心方向插入带有压力换能器的导管, 监测血压(BP), 分离右侧颈总动脉, 逆行插入心导管穿过主动脉瓣至左心室, 监测左心室压(LVP); 四肢皮下插入针形电极监测标准 II 导联心电图。上述各项指标同步连接到 Pow erLab

system 8s 生理记录仪, 再连入计算机经 Chart4 12 软件进行实时监测和记录分析。通过分析可得到所需各项指标: HR、MAP、LVSP、+ LV dp/d_{max} 及 - LV dp/d_{max} 等。连续测取 3 次数据, 每次间隔 2 min, 每一类数据中取平均值作为测定结果。

1.5 组织学检测 检测血流动力学指标后, 麻醉状态下取出大鼠心脏, 生理盐水冲洗后, 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 心尖至心底按短轴平面连续切片(厚 $4 \mu\text{m}$)。组织切片行 VIII 因子免疫组化染色(EnV ision 法), 每张切片随机选取 5 个 $400 \times$ 视野(HPF)进行血管计数, 计算每个视野内 VIII 因子阳性内皮细胞的平均数。

1.6 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理, 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 心脏标本大体观察 移植组与对照组均形成透壁瘢痕, 室壁变薄。移植组梗死区室壁厚度略大于对照组, 瘢痕内有部分残留心肌纤维。

2.2 血流动力学测定结果 移植组 LV EDP 明显低于对照组($P < 0.01$); + dp/d_{max} 与 - dp/d_{max} 明显高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 其余各项指标在移植组与对照组间比较无显著差异。见表 1。

2.3 组织学检测 术后 28 d, 移植组心肌梗死区有

表 1 移植组与对照组心脏血流动力学指标比较

Tab 1 Comparison of hemodynamics indices between transplantation group and control group

Group	<i>n</i>	MAP (p/kPa)	HR (f/min ⁻¹)	LVSP (p/kPa)	LVDP (p/kPa)	LV EDP (p/kPa)	+ dp/d _{max} (kPa/s)	- dp/d _{max} (kPa/s)
Transplantation	14	13.2 ± 1.8	388 ± 26	16.9 ± 2.2	2.0 ± 0.4	2.2 ± 0.4**	554 ± 56**	445 ± 58*
Control	12	12.9 ± 1.9	392 ± 24	15.6 ± 2.1	2.2 ± 0.3	2.6 ± 0.5	479 ± 43	389 ± 45

MAP: Mean arterial pressure; HR: Heart rate; LVSP: Left ventricle systolic pressure; LVDP: Left ventricle diastolic pressure; LV EDP: Left ventricle end-diastolic pressure; dp/d_{max}: Maximum pressure change rate; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

明显血管增生, 可见大量 VIII 因子染色阳性的新生血管内皮细胞和部分残存的心肌细胞, 对照组为纤维组织所替代, 新生血管数量较少(图 1)。

移植组毛细血管密度显著高于对照组[(23.1 ± 1.5)个/HPF vs (10.5 ± 1.8)个/HPF, $P < 0.01$], 新生血管多分布于梗死边缘区, 而梗死中心区血管增生不明显, 与对照组相比无明显差异[(3.6 ± 1.3)个/HPF vs (3.3 ± 1.7)个/HPF]。

3 讨论

自从在成人的骨髓和外周血中发现内皮祖细胞

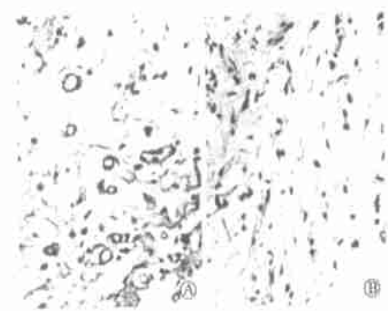


图 1 移植组(A)和对照组(B) VIII 因子染色照片
Fig 1 Factor VIII immunohistochemical staining of ischemic myocardium in transplantation group (A) and control group (B) ($\times 200$)

后,“细胞介导的血管再生”^[3]这一观念被迅速推广。近年来研究发现,血管内皮祖细胞不仅参与胚胎期的血管发育,也存在于成年机体的骨髓及外周血,在出生后的血管发育中起重要作用。研究表明,骨髓单个核细胞中的内皮祖细胞含量丰富,约为外周血的10倍^[4]。由此我们推断,将骨髓单个核细胞进行梗死局部区域注射可能改善心肌供血,挽救缺血心肌,保护心功能。

本研究采用同基因背景的Lewis大鼠骨髓分离单个核细胞,进行梗死区域心肌内注射,避免了因移植排斥反应引起的移植细胞死亡。毛细血管密度是局部血管再生的解剖学表现,本实验中缺血区血管数量移植组显著高于对照组,而梗死瘢痕区两组无明显差别,其原因可能是梗死区无血流灌注,移植细胞难以存活。应用血流动力学研究发现,骨髓单个核细胞移植可明显改善缺血心肌的功能。结果显示与对照组相比,移植组LV EDP明显低于对照组,有显著性差异,反映收缩功能的指标 dp/dt_{max} 和反映舒张功能的指标 $-dp/dt_{max}$ 明显高于对照组,有显著性差异。本实验结果证明骨髓单个核细胞移植不但具有促血管再生作用,而且能够改善缺血组织的功能。目前骨髓单个核细胞容易获取,局部植入自体骨髓细胞与其他治疗性血管再生方法相比,操作简单,低风险、低毒、无免疫反应且对全身情况影响小^[5-7]。

细胞移植的最佳数量、时机和移植区域对于术后心功能的改善程度非常重要。根据Tomita等^[2]研究和预实验的结果,我们选择了50 μ l细胞悬液(含 6×10^6 个细胞),注入液体过多会引起广泛心腔水肿,导致急性左心衰竭甚至心脏骤停,死亡率较高;移植细胞的数量关系到心功能的改善程度,因此应给予尽可能多的细胞,一般应在 10^6 数量级。然而总的治疗效果还受到许多其他因素的影响,如移植细胞存活数量、分化能力以及移植区域残留心肌细胞状态等。本实验选择在结扎左冠状动脉后10 min注入细胞悬液,注射部位选择梗死边缘区,是为了模拟急性心梗的治疗过程。一方面,结扎左冠状动脉后约5~10 min才能确定梗死区的范围;另一方面,梗死早期移植细胞所释放的细胞因子可加快血管再生过程,改善梗死边缘区冬眠心肌的存活状态,对心功能的改善更有意义。对心功能改善的评价时机选择在移植后4周,因为心梗后1~2周为急性炎症期,2~4周为左室重构期,4周左右左室重构已完成,心功能基本趋于稳定。

心梗后骨髓单个核细胞移植促进血管新生可能的机制目前认为有3种:(1)骨髓细胞分泌多种促血

管生长因子和细胞因子(如VEGF、FGF、ANG等)刺激梗死区域内血管生成^[5,6];(2)骨髓中含有的内皮祖细胞分化为内皮细胞直接参与心肌内血管发生^[8,9];(3)移植细胞引起的局部炎症反应刺激血管再生^[10]。骨髓单个核细胞移植改善心梗后左室功能的精确机制有待于进一步研究。改善缺血区灌注,挽救冬眠心肌可能是改善生理功能的原因之一;另外临床和实验研究证明,梗死区血管床的晚期再灌注可以防止梗死区瘢痕的进一步扩大,减轻左室重构,降低心肌纤维化^[7,8]。因此,骨髓单个核细胞移植可能通过改善心梗后心肌血流灌注来抑制左室重构,保护心功能。

本实验结果表明,骨髓单个核细胞易于获取,局部植入骨髓单个核细胞可以促进缺血心肌的血管再生,有效保护左室功能,为临床开展心肌梗死患者骨髓单个核细胞移植提供了初步的实验依据。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [2] Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function[J]. *Circulation*, 1999, 100(19 Suppl): 247-256.
- [3] Moore MA. Putting the neo into neoangiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(3): 313-315.
- [4] Isner JM, Kalka C, Kawamoto A, et al. Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 953: 75-84.
- [5] Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation[J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73(4): 1210-1215.
- [6] Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines[J]. *Circulation*, 2001, 104(9): 1046-1052.
- [7] Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model[J]. *J Surg Res*, 2001, 96(2): 277-283.
- [8] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation[J]. *Circulation*, 2001, 103(6): 897-903.
- [9] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. *Circ Res*, 1999, 85(3): 221-228.
- [10] Kobayashi T, Hamano K, Li TS, et al. Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model[J]. *J Surg Res*, 2000, 89(2): 189-195.

[收稿日期] 2004-01-08

[修回日期] 2004-05-12

[本文编辑] 曹静