

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00465

转基因间充质干细胞自体移植治疗猪完全性房室传导阻滞

李树春, 张浩, 段炼, 龚德军, 袁扬, 徐志云*

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 将携带人超极化激活环核苷酸门控通道 2(hHCN2)基因的自体间充质干细胞(MSCs)移植入完全性房室传导阻滞(CHB)猪模型的希氏束中,探讨构建自体生物起搏器的可行性。**方法** 构建包含 hHCN2 基因的重组腺病毒, 转染猪 MSCs。构建猪的 CHB 模型。将转基因的 MSCs 移植入希氏束后,观察其心率变化及对儿茶酚胺的反应性。对移植部位的心肌组织学及免疫荧光检查。**结果** 成功构建重组腺病毒 pAd.hHCN2 并转染猪 MSCs。自体移植于 CHB 动物模型希氏束后,与对照组相比,转基因 MSCs 显著提升了实验组的心率($P < 0.01$),且其心律具有儿茶酚胺反应性。移植部位心肌取样检查显示 MSCs 在心肌中存活并且表达 hHCN2 蛋白。**结论** 在猪 CHB 模型中,移植入希氏束的转 hHCN2 基因的自体 MSCs 短期内可以发挥生物起搏器的功能。

[关键词] 间充质干细胞;人超极化激活环核苷酸门控通道 2;自体移植;完全性房室传导阻滞

[中图分类号] R 541.761 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0465-04

Autotransplantation of genetically-altered mesenchymal stem cells in treatment of complete heart block in porcine

LI Shu-chun, ZHANG Hao, DUAN Lian, GONG De-jun, YUAN Yang, XU Zhi-yun*

Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To transplant the autologous mesenchymal stem cells(MSCs) carrying human hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel 2 (hHCN2) gene into the His-bundle in porcine model of complete heart block (CHB), so as to assess the possibility of establishing autologous biological pacing. **Methods** We constructed the recombinant adenovirus containing hHCN2 gene to transfect the porcine MSCs. After autotransplantation into the His-bundle in CHB model, the genetically-altered MSCs were tested for their ability to provide a stable and catecholamine-responsive heart rhythm. Histological and immunofluorescence analyses were also performed for the myocardium of the injection site. **Results** Recombinant adenovirus pAd.hHCN2 was successfully constructed. Porcine MSCs were transfected by the adenovirus. After autotransplantation, transgenic MSCs significantly enhanced the heart rates in porcine CHB model compared with the control group ($P < 0.01$), and the cardiac rhythms in the transgenic MSC group were catecholamine responsive. Tissues obtained from the transplanted heart sites showed that the MSCs survived in the myocardium and overexpressed hHCN2 protein. **Conclusion** Transplantation of autologous genetically-altered MSCs into the His-bundle in porcine CHB model can serve as a short-term catecholamine-responsive biological pacemaker.

[Key words] mesenchymal stem cells; human hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel 2; autologous transplantation; complete atrioventricular block

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(5):465-468]

完全性房室传导阻滞(CHB)是心脏传导系统的严重病变。尽管存在植入异物、需定期更换、缺乏神经体液反应性等缺点^[1],植入永久心脏起搏器仍是当前治疗 CHB 的主流^[2]。近年来,生物起搏研究取得了很大进展,体外和在体实验都已证明表达了人超极化激活环核苷酸门控通道 2(hHCN2)基因的间

充质干细胞(MSCs)可以产生基于 I_h 的内向电流,从而驱动相邻的心肌细胞^[3-4]。然而,因为缺乏长期观察,免疫排斥的可能性无法完全排除;并且,如果要建立面向临床的基因治疗系统,异种移植带来的伦理问题和传播潜在感染性疾病的风险都无法回避。因此,本研究将转染 hHCN2 基因的自体 MSCs

[收稿日期] 2010-12-22 **[接受日期]** 2011-04-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30672075,30700157)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30672075,30700157)。

[作者简介] 李树春,博士生,主治医师。E-mail: leeshuchun@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81874008, E-mail: zhiyunx@hotmail.com

注射到 CHB 模型猪的希氏束,观察治疗效果,探讨构建更符合生理的自体生物起搏器的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物及自体 MSCs 的分离培养 未成熟家猪,雄性,体质量 20~25 kg,由第二军医大学动物实验中心提供,随机分为实验组($n=8$)和对照组($n=6$)。无菌条件下行骨髓穿刺制备骨髓悬液,采用密度梯度离心法分离骨髓 MSCs 并进行原代培养^[5]。细胞生长至 90% 融合时传代。实验组自体 MSCs 在移植前转染 Ad.hHCN2,而对照组没有转染 Ad.hHCN2,直接自体移植。本实验通过第二军医大学长海医院医学伦理委员会批准。

1.2 病毒载体的制备 按文献[6]的方法构建携带 hHCN2 基因重组腺病毒。以 PCR 技术从 pcDNA1.1/hHCN2 (德国慕尼黑大学 Dr. Andreas Ludwig 惠赠)中扩增 hHCN2 cDNA,并克隆至载体 pShuttle CMV 的多克隆位点(*Sal I*/*Hind III*)。重组 pShuttleCMV.hHCN2 与腺病毒黏粒 pAdEasy1 共转大肠杆菌 BJ5183,经同源重组产生重组黏粒 pAd.hHCN2。后者导入 HEK293 细胞产生重组腺病毒。pShuttle CMV、pAdEasy1 为 Stratagene 公司产品,大肠杆菌 BJ5183、HEK293 细胞由第二军医大学长海医院胸心外科研究所提供。

1.3 基因转染和流式细胞仪分析 实验组 MSCs 传至第 4 或第 5 代后暴露于病毒液(MOI=50)18 h, PBS 漂洗后继续以原培养液培养。实验组细胞在转染后 72 h、对照组细胞在移植前 2 h,取样行流式细胞学检查。实验组细胞在取样后 2 h 内送至手术室行自体移植。所有 MSCs 细胞均取样制成 300 μ l 细胞悬液(包含至少 1.0×10^5 个细胞),以流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson)检测 CD29、CD44、CD34、CD45 (MultiSciences Biotech)和 hHCN2 (Chemicon)的表达。

1.4 建立动物模型和细胞移植 所有动物均采用氯胺酮诱导(8 mg/kg, IM),气管插管机械通气后以普鲁泊福[5 mg/(kg·h), VD]维持麻醉,经右侧第 4 肋间侧切口进胸,切开心包显露心脏,先在心外膜缝上临时起搏导线,连接临时起搏器。在右心房做荷包缝合,当中插入截去远端 50 mm 的 7-F 静脉鞘管(Terumo),自鞘管送入消融导管(Biosense Webster)并在右房室瓣环周围移动,当心电图显示心内膜导联在心房波与心室波之间出现稳定的 h 波时,

采用 30~40 W 射频能量消融靶点,直至心电图显示心房波与心室波完全分离。此时打开临时起搏器调制心率 60 次/min 予以保护。消融结束后保持消融导管位置不变,沿导管推送静脉鞘管使其远端与消融靶点接触,然后保持鞘管位置不变撤出消融导管。接着自静脉鞘管送入 80 mm 21G 不锈钢注射针头至尽头,回抽无回血后注入自体 MSCs 细胞悬液。撤除鞘管,结扎荷包缝线,人工膨肺后逐层关胸。

1.5 心律及儿茶酚胺反应性的观察 术后 1 周,动物均移去临时起搏器,每隔 1 周行 1 次心电图和 24 h Holter 检查,连续 3 周。在实验组术后 2 周时静脉给予异丙肾上腺素[0.1 μ g/(kg·min)]并检测心率的变化。

1.6 组织学及免疫荧光学检查 术后 3 周处死动物,两组均在心脏的注射部位取样并制成 12 μ m 厚的冰冻切片,丙酮固定,行 H-E 染色及免疫荧光染色,一抗为小鼠抗 hHCN2,二抗为藻红蛋白标记的羊抗小鼠 IgG (Santa Cruz)。

1.7 统计学处理 用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,所有数据均以($\bar{x} \pm s_x$)表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多样本均数及重复测量数据的比较采用方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 细胞鉴定及基因转染 实验组 MSCs 表达 CD29、CD44、CD34、CD45 的比例分别为(90.9 \pm 1.0)%、(92.4 \pm 0.9)%、(4.3 \pm 0.7)%、(4.0 \pm 0.4)%、对照组分别为(92.5 \pm 1.6)%、(94.1 \pm 0.8)%、(4.2 \pm 0.6)%、(3.9 \pm 0.7)%、两组间相比差异无统计学意义。两组表达 hHCN2 的比例分别为(72.2 \pm 3.8)%、(2.2 \pm 0.7)%、差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 动物模型和细胞移植 射频消融结束后,所有动物的心电图均表现出完全性房室分离,并呈现稳定的交界性心律。心率波动于 32~55 次/min。两组间心率差异无统计学意义(46.6 \pm 2.5 vs 45.5 \pm 2.1, $P=0.744$)。随后自体 MSCs 被注射到消融区域,两组心律均无变化。在临时心脏起搏器的保护下,所有动物均成活。

2.3 心电图及 Holter 检查 移去临时起搏器后 24 h 内,对照组 1 头动物死亡。两组均未观察到 1:1 房室传导恢复(图 1)。实验组平均心率显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),数据分别为:

1 周后 (62.9 ± 1.2) vs (46.6 ± 1.5) 次/min, 2 周后 (63.1 ± 1.2) vs (47.2 ± 1.5) 次/min, 3 周后 (54.0 ± 1.7) vs (47.0 ± 2.1) 次/min。在 3 个时间观察点上, 对照组的心率变化不大, 而实验组在第 3 周出现明显的心率下降 ($P < 0.05$, 图 2)。

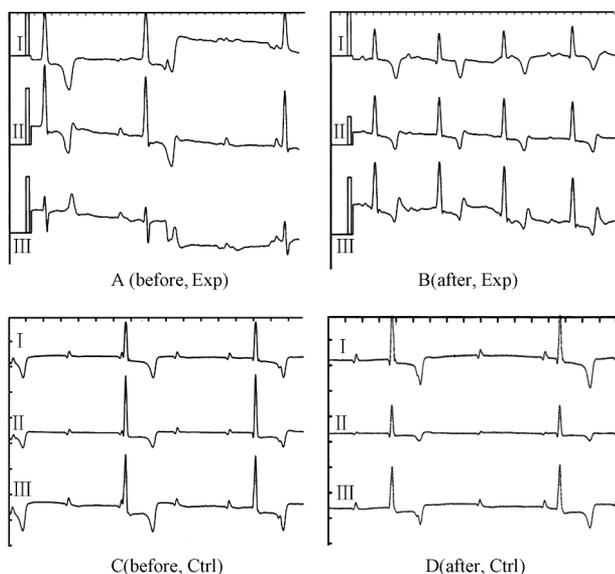


图 1 细胞移植前后两组的心电图

Fig 1 Electrocardiograms (ECGs) before and after cell transplantation in two groups

A and B: ECG of the experimental group; C and D: ECG of the control group

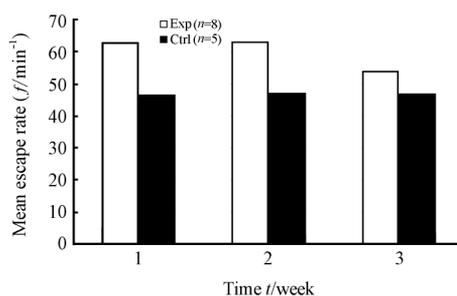


图 2 移植后两组在 3 个时间观察点的平均心率变化

Fig 2 Mean escape rates at three different time points in two groups

2.4 儿茶酚胺反应性 静脉输注异丙肾上腺素时, 实验组平均心率由 (55.8 ± 1.3) 次/min 提高到 (90.6 ± 0.9) 次/min, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 且心电图向量无变化。心率 62.4% 的提高说明起搏细胞具有良好的神经体液反应性。在 3 头动物上试用了更大剂量的异丙肾上腺素 [$0.12 \sim 0.15 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$], 均因发生室性心动过速而放弃。

2.5 组织学及免疫荧光学检查 两组注射部位心肌样本 H-E 染色切片均可见成簇分布的 MSCs。实

验组心肌冰冻切片经免疫荧光染色后在免疫荧光显微镜下观察可见散在分布的红色荧光(图 3)。

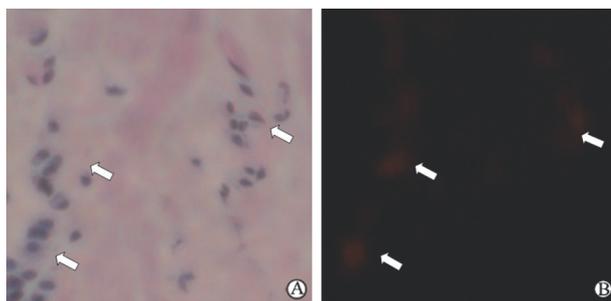


图 3 实验组心肌注射部位组织学及免疫荧光染色切片

Fig 3 Histological and immunofluorescent sections of myocardium from injected sites in transgenic MSC group

A: Clusters (arrows) of MSCs labeled with H-E; B: Red fluorescence (arrows) from the MSCs overexpressing hHCN2. MSC: Mesenchymal stem cell. Original magnification: $\times 400$

3 讨论

MSCs 一直被认为具有低免疫原性并且具有免疫调节功能^[7], 在已有的应用异种 MSCs 构建生物起搏器的实验研究中, 未有报道发现明确的排斥反应^[3-4]。但这些研究均未设定对照组来评估异种细胞移植后的免疫排斥情况。近期 Westrich 等^[8]发现, 在移植入大鼠心肌后, 同源 MSCs 比同种异体移植的 MSCs 存活情况要好, 提示 MSCs 的免疫特惠性并不能使其完全逃离宿主免疫系统的作用; 在大鼠脊髓损伤模型中, 长期免疫抑制治疗改善了同种异体 MSCs 移植物的存活^[9]。并且, 由于 MSCs 多能干细胞本质, 在长期实验中移植细胞丢失和延迟性排斥反应发生的可能性始终存在。MSCs 具有多向分化潜能^[10], 一旦分化为成熟细胞, 免疫耐受可能会被逆转。本研究应用自体 MSCs 进行移植, 完全避免了免疫排斥发生的可能性。

与已有方法^[11-13]不同, 本研究采用了经胸射频消融术建立动物模型, 完全避免了 X 线透视装置的使用, 可以节约实验经费、简化实验过程。同时, 该方法有利于必要时对动物进行抢救, 在消融过程中, 累计有 3 头猪出现 5 次心室颤动, 均未行电复律, 而是在直视下心脏按摩后恢复。

至于细胞的注射部位, 我们认为希氏束是较心室游离壁更好的选择。直到目前国内外尚无在心脏传导束中以 MSCs 构建生物起搏器的报道。传导系统的心肌细胞具有天然的起搏电流, 较普通心肌细胞易于达到除极阈值。而且, 在此处起搏会带来更符合生理规律的心肌顺序激动和收缩。移植后实验

组的心电图显示为较快的窄 QRS 波交界性心律,印证了此想法。

实验组动物在 3 个时间点的平均心率显著高于对照组,提示过表达 hHCN2 的 MSCs 发挥了生物起搏作用。在第 3 周,实验组心率已明显下降,可能与腺病毒载体的表达时限有关^[14]。有报道称将 MSCs 注入 CHB 动物模型的传导系统受损区域可以恢复其房室传导^[15]。本研究中未观察到此现象,我们推测,他们实验中 CHB 模型系药物注射入房室结区构建而成,随后注入的 MSCs 通过免疫调节和抗纤维化的旁分泌发挥作用减轻了传导束的损伤。本研究中,希氏束在精确定位后消融损毁,失去了恢复传导的可能性。我们认为,注射入心肌的细胞不会与体外实验报道^[16]的一样:排列整齐在受损伤区域中,从一端把动作电位传到另一端;相反,由于注射时压力和随后的细胞迁移,MSCs 会分散存在于局部组织间隙。成簇分布的 MSCs 可与不同位置的心肌细胞偶合,形成多个起搏点。由于起搏细胞的内在起搏频率大于房室结节区心率而小于窦房结细胞心率,只有与远端传导束相连的起搏点可以决定心率,其余起搏点将被超速抑制。

本研究仍存在着不足:首先,由于腺病毒载体介导的 hHCN2 基因表达时限的限制,无法观察到转基因 MSCs 的远期起搏效果,有待于采取新的基因转染方法以进行长期实验。在长期实验中,自体细胞的优越性也许更明显。其次,自体 MSCs 的制备方法仍有改进的空间,细胞纯度和转染率远不及单克隆细胞株。混杂的其他细胞尽管不会引起排斥反应,但对实验结果产生的影响仍然未知。

总之,本研究证实,转染了 hHCN2 基因的自体 MSCs 可以表达 hHCN2 蛋白。在移植入 CHB 模型的希氏束后,这些细胞可以存活并在短期内提供稳定的、较符合生理的心律,从而发挥自体生物起搏器的功能。

[参考文献]

[1] Epstein A E, DiMarco J P, Ellenbogen K A, Estes N A 3rd, Freedman R A, Gettes L S, et al. ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices) developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51: e1-e62.

[2] Zivin A. Cardiac pacemakers[M]// Spooner P M, Rosen M R,

eds. Foundations of cardiac arrhythmias. New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2001: 571-576.

[3] Plotnikov A N, Shlapakova I, Szabolcs M J, Danilo P Jr, Lorell B H, Potapova I A, et al. Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart[J]. Circulation, 2007, 116: 706-713.

[4] Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P Jr, Valiunas V, Qu J, et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers[J]. Circ Res, 2004, 94: 952-959.

[5] Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, Cocchini B, Zini N, Fini M, et al. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure[J]. Connect Tissue Res, 2001, 42: 49-58.

[6] Luo J, Deng Z L, Luo X, Tang N, Song W X, Chen J, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2: 1236-1247.

[7] Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation[J]. Cytotherapy, 2006, 8: 559-561.

[8] Westrich J, Yaeger P, He C, Stewart J, Chen R, Seleznik G, et al. Factors affecting residence time of mesenchymal stromal cells (MSC) injected into the myocardium[J]. Cell Transplant, 2010, 19: 937-948.

[9] Swanger S A, Neuhuber B, Himes B T, Bakshi A, Fischer I. Analysis of allogeneic and syngeneic bone marrow stromal cell graft survival in the spinal cord[J]. Cell Transplant, 2005, 14: 775-786.

[10] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, Schwartz R E, Keene C D, Ortiz-Gonzalez X R, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418: 41-49.

[11] Lee R J, Sievers R E, Gallinghouse G J, Ursell P C. Development of a model of complete heart block in rats[J]. J Appl Physiol, 1998, 85: 758-763.

[12] Maciver R H, Stewart R D, Backer C L, Tsao S, Harrington D A, Mavroudis C. An improved *in vivo* method for atrioventricular node ablation via thoracotomy[J]. Braz J Med Biol Res, 2010, 43: 206-210.

[13] Suto F, Cahill S A, Wilson G J, Hamilton R M, Greenwald I, Gross G J. A novel rabbit model of variably compensated complete heart block[J]. J Appl Physiol, 2002, 92: 1199-1204.

[14] Nász I, Adám E. Recombinant adenovirus vectors for gene therapy and clinical trials[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2001, 48(3-4): 323-348.

[15] Yokokawa M, Ohnishi S, Ishibashi-Ueda H, Obata H, Otani K, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves atrioventricular conduction in a rat model of complete atrioventricular block[J]. Cell Transplant, 2008, 17(10-11): 1145-1155.

[16] Beeres S L, Atsma D E, van der Laarse A, Pijnappels D A, van Tuyn J, Fibbe W E, et al. Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures[J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 46: 1943-1952.

[本文编辑] 贾泽军