

· 基础研究 ·

自体外周血内皮祖细胞移植联合非诺贝特改善急性心肌梗死大鼠心功能的研究

杨建峰¹, 朱志勇², 魏经汉²

(1. 郑州大学第五附属医院心内科, 郑州 450052; 2. 郑州大学第一附属医院心内科, 郑州 450052)

摘要:目的 探讨自体大鼠内皮祖细胞(EPCs)移植联合非诺贝特治疗对急性心肌梗死(AMI)大鼠心功能的影响。方法 分离培养 EPCs; 将雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 分别为 AMI 组(A 组)、单纯 EPCs 移植组(B 组)、EPCs 移植联合非诺贝特组(C 组), 每组 10 只。8 周后观察每组大鼠心功能及血流动力学指标的改变。免疫组织化学法检测心肌梗死区域内带有 5'-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU)标记的 EPCs 及大鼠心肌修复情况。结果 8 周后 C 组心功能及血流动力学指标改善情况明显好于 A、B 组($P < 0.05$); 心肌梗死区域内带有 5-BrdU 标记的 EPCs 部分分化为血管内皮细胞。结论 EPCs 移植联合非诺贝特治疗 AMI 可以更好地保护和改善大鼠梗死后心脏功能, 其效果优于单独 EPCs 移植。

关键词:干细胞; 心肌梗死; 普鲁脂芬; 内皮祖细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.31.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)31-3157-03

The improvement of cardiac function on transplantation of autologous endothelial progenitor cells plus fenofibrate treatment in acute myocardial infarction rat

Yang Jianfeng¹, Zhu Zhiyong², Wei Jinghan²

(1. Department of Cardiology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China;

2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect on heart function of transplantation of autologous endothelial progenitor cells (EPCs) plus fenofibrate treatment rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** The EPCs were purified by culture and expanded in vitro. Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divide into three groups, the AMI control group (group A, $n = 10$), EPCs transplantation group (group B, $n = 10$), EPCs transplantation plus Fenofibrate group (group C, $n = 10$). After eight weeks, changes on heart function and dynamic index were detected, 5-fluorouracil (5-BrdU) marked EPCs and cardiac repair were examined in myocardial infarction area by immunohistochemical staining. **Results** After eight weeks, heart function and dynamic index in group C were significantly improved than group A and group B ($P < 0.05$), some of transplanted 5-BrdU marked EPCs differentiated into vascular endothelial. **Conclusion** EPCs transplantation plus fenofibrate can significantly protect and improve the heart function of rats with AMI. The effect is priors to EPCs transplantation alone.

Key words: stem cells; myocardial infarction; procetofen; endothelial progenitor cells

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)在修复心肌缺血损伤方面发挥着重要作用^[1]。EPCs 是血管内皮的前体细胞, 亦称为成血管细胞(angioblast), 在维持血管内皮完整、内皮再生以及心血管形成上具有重要作用^[2], 大量实验表明移植 EPCs 能够增加缺血心肌的血供, 减少缺血面积, 改善左心室功能^[3-4]。过氧化物酶体增殖激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是一类由配体激活的核转录因子, 属核受体超家族成员之一, 分为 PPAR α 、PPAR β (或 δ)和 PPAR γ 3 种亚型^[5]。近年来研究认为 PPAR α 和 PPAR γ 的激动剂——贝特类降脂药物可通过调节全身脂质代谢, 稳定内皮功能, 抑制巨噬细胞在血管壁的聚集及抑制炎症反应来发挥抗动脉粥样硬化的作用。本研究旨在观察自体外周血 EPCs 移植联合非诺贝特对急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)大鼠心功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 非诺贝特由法国利博福尼制药有限公司惠赠; 胎牛血清、血管内皮生长因子(VEGF)及纤维连接蛋白均购自 Sigma 公司; M199 培养基购自 Gibco 公司; 兔抗大鼠 CD31、CD34、fms 样酪氨酸激酶 1(fms-like tyrosine kinase 1, Flk-1)、血管性血友病因子(vWF)抗体, 羊抗兔 IgG-FITC 二抗均购自 Santa Cruz 公司; 5'-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU)、SABC 免疫组织化学试剂盒均购自武汉博士德公司; 淋巴细胞分离液购

自上海试剂二厂。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量(250 $\pm$ 20)g。随机分为 3 组, 分别为 AMI 组(A 组)、单纯 EPCs 移植组(B 组)、EPCs 移植联合非诺贝特组(C 组), 每组 10 只。

1.2.2 大鼠外周血 EPCs 的分离和培养 B 和 C 组大鼠在无菌条件下, 心脏采血 3 mL, 肝素抗凝, 用磷酸二氢盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)稀释 1 倍, 置于淋巴细胞分离液之上, 密度梯度离心法收集单个核细胞, PBS 洗涤 2 次, 按 5×10^6 个/孔接种于纤维连接蛋白包被的 24 孔培养板上, 加入含 20% 胎牛血清、30 μ g/mL VEGF、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 M199 培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱内培养, 3 d 后换液, 弃去未贴壁细胞, 以后每 3~4 天换液一次。

1.2.3 大鼠外周血 EPCs 的鉴定 以免疫荧光法鉴定贴壁 EPCs 的标志物 CD31、CD34、Flk-1、vWF。操作步骤如下: 将培养的细胞用 4% 多聚甲醛固定, 0.5% 牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)阻断非特异性结合, 在不同的孔中滴加兔抗大鼠 CD31、CD34、Flk-1 和 vWF 抗体, 抗体稀释比例为 1:200, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 漂洗后, 加入 1:100 羊抗兔 IgG-FITC 二抗, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。用 PBS 漂洗后, 在荧光显微镜下观察结果。显示绿色荧光的为阳性细胞。阴性对照以 PBS

代替一抗。

1.2.4 大鼠外周血 EPCs 的标记 培养 6 d 的原代贴壁细胞用于移植。移植前 1 d, 配制 20 g/L 5-BrdU, 过滤除菌, 取 20 μ L 加入培养板标记过夜。移植当天用 PBS 洗去非贴壁细胞, 消化、收集贴壁细胞, 重悬于 M199 培养基, 按每 50 μ L 含有 1×10^6 个细胞的浓度, 用于移植。

1.2.5 AMI 模型的建立及细胞移植 实验动物以 10% 水合氯醛麻醉, 气管插管连接呼吸机, 开胸暴露心脏, 打开心包, 于左心耳下 2 mm 左右用 5-0 号缝线结扎前降支。实验前、后进行心电图监测, 结扎后观察前壁心肌变白情况, 除去前壁心肌无变白及胸前导联无 ST 段弓背向上抬高和无异常 Q 波的大鼠。B、C 组在 AMI 模型制备后, 于梗死周边区(心肌颜色苍白区周边)分 6 处注射 EPCs, 每处 50 μ L, A 组只注射等量培养液。C 组在完成上述步骤 24 h 后, 以非诺贝特(20 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹)灌胃直至处死。

1.2.6 超声心动图检测 8 周后进行超声心动图检测, 仪器为美国 GE 公司 vivid 7 型彩色多普勒超声心动图仪, 12 L 变频探头。探头置于乳头肌水平胸骨旁, 测量长轴切面左室舒张末期内径(end-diastolic diameter, Dd)、左室收缩末期内径(end-systolic diameter, Ds)及短轴切面左室舒张末期面积(end-diastolic area, Ad)、左室收缩末期面积(end-systolic area, As)并计算左室短轴缩短率(FS)及射血分数(EF)。EF=(Ad-As)/Ad, FS=(Dd-Ds)/Dd。

1.2.7 血流动力学指标的检测 超声心动图检测完毕后, 用 8 导生理记录仪测定血流动力学指标。所有动物经 3% 戊巴比妥钠麻醉, 右颈总动脉插管进入左心室, 记录左心室收缩压(left ventricle systolic pressure, LVSP), 左心室舒张末压(left ventricle end-diastolic pressure, LVEDP) 及压力变化速率最大值(dp/dt max)。

1.2.8 免疫组织化学检测 麻醉状态下取出大鼠心脏, 剪取梗死区及周围心肌组织, 甲醛溶液固定, 脱水, 石蜡包埋, 制作 5 μ m 厚连续切片。然后行免疫组织化学染色(SABC 法), 用于检测 5-BrdU 阳性细胞。

1.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EPCs 形态观察结果 刚分离出来的细胞小而圆, 随后细胞逐渐增大, 随着培养时间的延长, 逐渐成为纺锤样细胞, 生长到第 6 天呈现出内皮样细胞的形态特征, 见封 3 图 1。

2.2 EPCs 免疫荧光鉴定结果 经培养获得的细胞 CD31、CD34、Flk-1、vWF 免疫荧光染色均为阳性, 见封 3 图 2。

2.3 大鼠血流动力学及超声心动图的检测结果 B、C 组与 A 组相比, LVSP 与 dp/dt max 均明显升高($P < 0.05$), 而 LVEDP 明显降低($P < 0.05$)。B 组与 C 组相比, LVSP、LVEDP、dp/dt max 均明显升高($P < 0.05$), 见表 1。超声心动图分析发现 B、C 组大鼠心室腔明显缩小, 前壁出现搏动或波动增强, FS 值明显增加, 心功能得到明显改善。B 组与 C 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

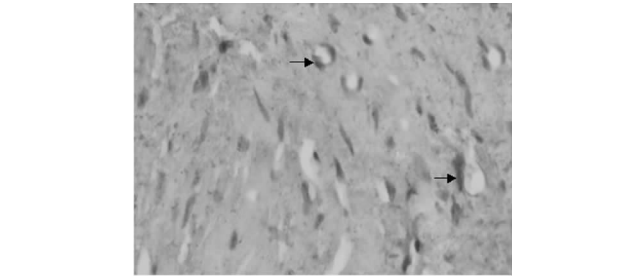
表 1 各组血流动力学指标的检测结果($\bar{x} \pm s$)			
组别	LVSP(mm Hg)	LVEDP(mm Hg)	dp/dt max(mm Hg/s)
A 组	70.31 $\pm$ 2.32	21.53 $\pm$ 2.67	355 3.30 $\pm$ 221.03
B 组	93.57 $\pm$ 2.30*	15.77 $\pm$ 1.59*	501 1.10 $\pm$ 316.64*
C 组	111.85 $\pm$ 2.57* ^Δ	12.06 $\pm$ 1.35* ^Δ	547 9.70 $\pm$ 305.33* ^Δ

*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^Δ: $P < 0.05$, 与 B 组比较。

表 2 各组超声心动图的检测结果($\bar{x} \pm s, \%$)		
组别	EF	FS
A 组	18.07 $\pm$ 3.02	14.58 $\pm$ 2.59
B 组	42.15 $\pm$ 4.34*	24.67 $\pm$ 3.98*
C 组	55.15 $\pm$ 3.53* ^Δ	35.97 $\pm$ 3.90* ^Δ

*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^Δ: $P < 0.05$, 与 B 组比较。

2.4 免疫组织化学检测结果 B、C 组的梗死区域内可见 5-BrdU 阳性细胞分布, 见图 3。



箭头示 5-BrdU 阳性细胞, 可见细胞核染色的阳性细胞嵌顿于梗死区内及梗死区边缘, 部分细胞已结合到新生的血管壁上。

图 3 免疫组织化学染色检测结果($\times 1\ 000$)

3 讨 论

心肌梗死导致了心肌细胞的缺血、坏死, 其数量和功能将受到永久性损伤, 而替代的是无收缩、舒张功能的成纤维细胞和瘢痕组织, 心室发生重塑, 因而梗死后的心功能将随时间的推移而逐步恶化, 可进一步导致心力衰竭。严重影响患者的生活质量。

近年来干细胞的研究使人们看到了治疗心肌梗死的新希望, 目前国内外多采用骨髓穿刺获得骨髓间充质干细胞(MSC)进行移植, 外周血中也存在少量的干细胞^[1], 但由于其数量较少, 不足以对损伤的心肌细胞进行修复作用。研究发现经动员的外周血中的干细胞与正常骨髓中数量相当, 甚至高于骨髓。因此, 外周血干细胞移植治疗 AMI, 已成为一种新的治疗途径^[6]。

EPCs 是具有增殖、迁移能力, 并能分化为不同类型成熟细胞的原始骨髓细胞, 存在于骨髓、脐血及外周血中, EPCs 在维持内皮完整、内皮再生及新血管形成上具有重要作用。Vasa 等^[7]研究发现, 外周血中 EPCs 数量以及其迁移活性与冠心病的危险因素呈负相关, 如吸烟、家族史、高脂血症、糖尿病和高龄等。干细胞的移植与再生促进 AMI 区的心肌修复(transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction, TOPCARE-AMI)研究是一项关于冠状动脉内移植骨髓来源或外周血来源的 EPCs 治疗 AMI 患者并随访 4 个月和 1 年的临床研究。结果提示, 两种来源的 EPCs 疗效相似, 提高 LVEF 程度随观察时间延长而增加, 随访至 4 个月时增加 2.5%~5.0%, 随访 1 年时可增加 8%以上, 并减少梗死面积, 未观察到有炎症反应和心律失常^[8]。有研究显示 EPCs 可以横向分化为有功能活性的心肌细胞^[9], 因此移植 EPCs 可能有助于梗死后心肌的再生, 生成新生血管以增加梗死区血供并改善心功能。本实验通过分离鉴定外周血中的 EPCs 并在体外扩增到一定数目后用 5-BrdU 进行标记并移植到大鼠梗死区域。8 周后, 梗死区域内可见 5-BrdU 阳性细胞存活, 血流动力学及超声心动图均显示 B、C 组较 A 组可以明显改善左室收缩及舒张功能($P < 0.05$), 阻止左室重构进程, 缩小心室腔, FS 和 EF 明显增加($P < 0.05$)。

目前许多研究结果表明心肌梗死后脂质代谢异常, 细胞因

子过度表达,血管紧张素和醛固酮过度激活等与心肌梗死后心室重塑有密切的关系,且均能抑制心脏功能。PPAR α 被认为是一种细胞内及细胞外的脂肪代谢的调节剂,其人工合成激动剂——贝特类药物可以增加血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平,降低极低密度脂蛋白(VLDL)的合成和分泌,降低血清三酰甘油水平^[10]。研究显示激活的 PPAR α 能有效地抑制动脉平滑肌细胞内白细胞介素-1(IL-1)诱导的白细胞介素-6(IL-6)和前列腺素的产生,并且通过负性调节核因子- κ B(NF- κ B)和活化蛋白-1(AP-1)来发挥作用,降低血浆 C 反应蛋白^[11],激活的 PPAR α 还有调节心肌细胞的炎症、氧化应激反应,调节心肌细胞外基质重构及心肌细胞肥大的生物学作用^[12]。本研究发现,EPCs 联合非诺贝特进行干预 8 周后,C 组大鼠心功能均较 B 组有显著改善($P<0.05$),可能是通过改善动脉血管内皮功能、调节脂类代谢、抗炎、抑制是肾素-血管紧张素系统激活等一系列机制来发挥作用的,并可以改善梗死区域局部的微环境,更加有利于所移植的 EPCs 发挥作用。

参考文献:

- [1] Asahara T,Murohara T,Sullivan A,et al. Isolation of putative progenitor endothelial angiogenesis [J]. Science, 1997,275(5302):964-967.
- [2] Hur J,Yoon CH,Kim HS,et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2004,24(2):288-293.
- [3] Kawamoto A,Heon-cheol G,Hideki I,et al. Therapeutic potential of exvivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia[J]. Circulation, 2001, 103 (5): 634-637.
- [4] Jackson KA,Majka SM,Wang H,et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells[J]. J Clin Invest,2001,107(11):1395-1402.
- [5] Isseemann I,Green S. Activation of a member of the ster-

- oid hormon-e receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. Nature,1990,347(6294):645-650.
- [6] Pettengell R,Luft T,Henschler R,et al. Direct comparison by limiting dilution analysis of long term culture-initiating cells in human bone marrow,umbilical cord blood, and blood stem cells[J]. Blood,1994,84:3653-3659.
- [7] Vasa M,Fichtlscherer S,Aicher A,et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease[J]. Circ Res,2001,89(1):E1-7.
- [8] Schächinger V,Assmus B,Britten MB,et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction; final one-year results of the TOPCARE-AMI trial [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44 (8):1690-1699.
- [9] Menaschè P,Hagège AA,Scorsin M,et al. Myoblast transplantation for heart failure[J]. Lancet,2001,357 (9252):279-280.
- [10] Pineda Torra T,Gervois P,Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease,inflammation,atherosclerosis and aging[J]. Curr Opin Lipidol, 1999,10(2):151-159.
- [11] Staels B,Koenig W,Habib A,et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha,but not by PPARgamma activations [J]. Nature, 1998, 393 (6687):790-793.
- [12] Lockyer P,Schisler JC,Patterson C,et al. Minireview: Won't get fooled again;the nonmetabolic roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the heart[J]. Mol Endocrinol,2010,24(6):1111-1119.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-06-13)

(上接第 3156 页)

- [15] 吴立明,习温瑜,管正红,等. 壳聚糖纳米粒制备的研究进展[J]. 齐鲁药事,2008,27(11):682-685.
- [16] 王增寿,张华,朱光辉,等. 脑用表阿霉素壳聚糖微球的制备及其特性考察[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(2):148-152.
- [17] Kaya AO,Buyukberber S,Dane F,et al. Cisplatin plus docetaxel combination in the first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer [J]. Tumori, 2010, 96 (3):400-404.
- [18] Vasey PA,Jayson GC,Gordon A,et al. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. [J]. J Natl Cancer Inst,2004,96(22):1682-1691.
- [19] Schneeweiss A,Marme F,Ruiz A,et al. A randomized phase II trial of doxorubicin plus pemetrexed followed by docetaxel versus doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel as neoadjuvant treatment of early breast cancer[J]. Ann Oncol,2011,22(3):609-617.
- [20] Petrioli R,Paoletti L,Francini E,et al. Weekly docetaxel

- and epirubicin in treatment of advanced hormone-refractory prostate cancer[J]. Urology,2007,69(1):142-146.
- [21] 项颖,李启英,邵江河. 多西紫杉醇联合顺铂治疗 37 例晚期非小细胞肺癌临床分析[J]. 重庆医学,2008(15):1723-1724.
- [22] Hanna N,Shepherd FA,Fossella FV,et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy[J]. J Clin Oncol,2004,22(9):1589-1597.
- [23] Maeda Y,Kimura Y. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice[J]. J Nutr,2004,134(4):945-950.
- [24] Qi L,Fau XZ,Xu Z,et al. In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles[J]. Eur J Cancer,2007,43(1):184-193.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-12)