

经冠状动脉移植同种异体脐带间充质干细胞治疗猪心肌梗死的实验研究

刘房春,张健[△],陈卫强,王永德,王一凡,齐向前,刘晓程

(天津医科大学心血管病临床学院泰达国际心血管病医院心内科 300457)

[摘要] 目的 探讨经冠状动脉移植同种异体脐带间充质干细胞治疗急性心肌梗死(AMI)的可行性及疗效。方法 采用经皮球囊封堵法制备 AMI 模型,AMI 后 2 周将 GFP 标记的脐带间充质干细胞经冠状动脉移植入小型猪心肌梗死区域(移植组),对照组注射等量生理盐水。分别于干细胞移植前、移植后 6 周行心脏超声和核素门控心肌灌注显像检查,观察心肌灌注的改善及心功能的变化情况。取心肌梗死区组织作冰冻切片,vWF 免疫组织化学法染色观察梗死区毛细血管新生情况。结果 (1)对照组:心肌梗死后 8 周和心肌梗死后 2 周比较,各项指标均无显著改善($P>0.05$)。移植组:干细胞移植后 6 周左室射血分数、左室收缩期末内径、左室舒张期末内径、左室短轴缩短率及左室心肌梗死面积均较移植前有明显改善($P<0.05$)。与对照组比较,移植组各项指标均明显改善($P<0.05$)。(2)vWF 免疫组织化学法染色显示移植组新生毛细血管密度高于对照组。结论 经冠状动脉移植的同种异体脐带间充质干细胞能够在梗死心肌内存活,增加梗死区血管新生,缩小梗死面积,改善心功能。

[关键词] 脐带间充质干细胞;急性心肌梗死;移植;毛细血管**[中图分类号]** R654.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)07-0891-02

Allograftic umbilical cord mesenchymal stem cells for treating porcine acute myocardial infarction through coronary artery transplantation

Liu Fangchun, Zhang Jian[△], Chen Weiqiang, Wang Yongde, Wang Yifan, Qi Xiangqian, Liu Xiaocheng

(Department of Cardiology, TEDA International Cardiovascular Hospital,

Tianjin Medical University, Tianjin 300457, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the possibility that using intracoronary delivery of allograftic umbilical cord mesenchymal stem cells to improve the cardiac function after acute myocardial infarction(AMI) in pigs. **Methods** An AMI model was established by percutaneous balloon occlusion. After 2 weeks, GFP-labeled umbilical cord mesenchymal stem cells were transplanted into each host heart's AMI area through intracoronary way. The same volume of the saline was injected into the AMI area of the control group. Myocardial perfusion and cardiac function were evaluated before transplantation, 6 weeks after infusion by gate cardiac perfusion imaging and echocardiography. The infarcted area was sectioned and capillary was sectioned for immunohistochemical stain of vWF. **Results** (1)No significant difference was detected in each indice 8 weeks and 2 weeks following myocardial infarction. Left ventricular function, left ventricular end-systolic dimension, left ventricular end-diastole dimension, left ventricular shortening fraction and left ventricular infarcted area were significantly improved after 6 weeks in the transplantation group. Compared with the control group, each indice of the transplantation group was improved significantly. (2)In contrast with control group, more capillary were visible in the infarcted area of transplantation group. **Conclusion** Allograftic umbilical cord mesenchymal stem cells are transplanted by intracoronary way can survive in AMI region, promote angiogenesis in the infarcted area of myocardium, narrow the infarcted area, and improve the heart function.

[Key words] umbilical cord mesenchymal stem cells; acute myocardial infarction; transplantation; capillaries

近年来,随着介入技术的不断发展,急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者的救治效果获得显著提高,但是,介入治疗方法无法逆转坏死的心肌,对终末期心力衰竭的疗效差。而干细胞具有活跃的增殖能力及多向分化潜能,可能替代、修复或改善受损的心肌组织的生物学功能,成为心肌梗死治疗的“捷径”,显示出了良好的应用前景^[1-2]。脐带间充质干细胞作为一种多潜能干细胞,已经进行很多基础和临床研究^[3-4]。本实验选用同种异体脐带间充质干细胞作为种子细胞,用导管法经冠状动脉移植,观察其治疗猪心肌梗死的效果。

1 材料与方

1.1 实验动物及主要仪器、试剂 非啮齿类动物巴马猪 16 只,雌雄不拘,体质量 25~35 kg,巴马猪由泰达国际心血管病医院实验室提供[动物合格证号:SCXK(沪)2010-0028]。实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[5]。主要试剂和仪器:博奥森公司兔抗 vWF 抗体(bs-4754R),SABC 免疫组织化学染色试剂盒

(SA1022)及 DAB 显色试剂盒(AR1022),数字减影血管造影机(Philips),7500 超声心动图仪(Philips sonos),Datex-ohmeda 7000 呼吸机(美国),6FJL4.0 造影导管及指引导管,导丝,OTW 球囊导管(RyujinPlus)。

1.2 同种异体脐带间充质干细胞的培养、分离及标记 由天津昂赛细胞基因工程有限公司提供。

1.3 心肌梗死模型的制备 术前 8 h 禁食水,称体质量,按 0.1 mL/kg 陆眠宁 II 号联合 0.6 mg/kg 地西洋腹腔注射诱导麻醉,予以丙泊酚(IV)维持麻醉,气管插管,呼吸机正压辅助呼吸,潮气量 120~224 mL·kg⁻¹·min⁻¹,持续心电图及血氧饱和度监护。无菌条件下穿刺右股动脉,置入动脉鞘管,注入肝素 3 000 U,送入 2.0×20 mm 的球囊至前降支中段第一或第二对角支远端,预适应 3~5 次(如出现室性心律失常,可适当延长预适应时间),每次 5~10 min 后,如无异常,则以 2~4 个大气压打开球囊堵塞前降支,造影示球囊远端血流中断,持续 90 min 后,缓慢释放球囊。堵塞后心电图示有心肌缺血或梗

表 1 冠状动脉组和对照组各项指标移植前、后比较($\bar{x} \pm s$)

项目	移植组		对照组	
	移植前	移植后 6 周	移植前	移植后 6 周
LV(mm)	43.50±2.67	37.00±2.39*△	42.14±2.04	44.43±6.88▽
EDV(mm)	65.63±8.42	56.86±7.63*△	67.14±6.01	70.57±8.50▽
ESV(mm)	24.63±15.34	16.25±6.45*△	22.71±5.65	25.57±7.55▽
EF(%)	60.50±13.36	71.25±8.94*△	65.86±8.93	59.71±7.18▽
FS(%)	32.88±6.96	39.50±6.85*△	36.57±4.61	31.29±5.19▽
左室心肌梗死面积	22.34±5.83	15.13±3.23*△	20.29±4.72	21.43±5.88▽
左室梗死质量比	21.13±4.16	13.13±3.23*△	18.57±2.89	22.85±6.49▽

*: $P < 0.05$, 与同组移植前比较; △: $P < 0.05$, 与对照组移植后 6 周比较; ▽: $P > 0.05$, 与同组移植前比较。

死改变(T波倒置、ST段抬高、R波波幅降低等)。再次造影观察血供,血供良好撤除导管,压迫止血,送返动物房,术后正常喂养,青霉素 240 万 U/d,连用 3 d 预防感染。

1.4 脐带间充质干细胞移植 心肌梗死模型制备 2 周后,造模成功的 16 只巴马猪分为两组,冠状动脉移植组 8 只;操作过程同建模过程,经 0.014 英寸指引导丝将 2.3F(Cordis, USA)微导管送至前降支远端,经微导管将含肝素的脐带间充质干细胞悬液(1.0×10^7 个/头,规格 20 mL: 1.0×10^7 个细胞)缓慢推注至冠状动脉内,注射时间为 10 min,肝素生理盐水冲洗灌注导管 2 次,复查冠状动脉造影;对照组 8 只;注射等量的生理盐水。

1.5 超声心动图检查 分别于术前、干细胞移植前和干细胞移植后 6 周,由 1 名有经验的超声医师使用 Philips Sonos 7500 超声心动仪(S3 探头频率为 1.6~3.2 MHz)测量超声心动指标,测量左室舒张末容积(LVEDV)、左室收缩末容积(LVESV)、计算射血分数(EF)、短轴缩短率(FS),取 3 次测量的平均值作为结果。

1.6 心肌核素显像检查 分别于术前、干细胞移植前和干细胞移植后 6 周,麻醉后送入核素室,用 14.8 MBq/kg 99 m Tc-MIBI 行心电图门控心肌灌注核素显像。通过 Emory Cardiac Toolbox 软件量化灌注质量缺损百分比(mass defect percent, MDP)及梗死面积。

1.7 新生毛细血管测定 心脏石蜡切片 vWF 相关抗原免疫组织化学染色后,光学显微镜下可见血管内皮细胞呈黄褐色(图 1),以此可观察毛细血管密度。每个标本取 3 张切片,在低倍镜($\times 100$)下观察切片全部视野,找到心肌梗死区后转到高倍镜下($\times 200$),每张切片随机取 5 个 200 倍视野,取平均数作为测定值。

1.8 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内不同时段数据分析采用配对 t 检验,组间比较采用两两比较的 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

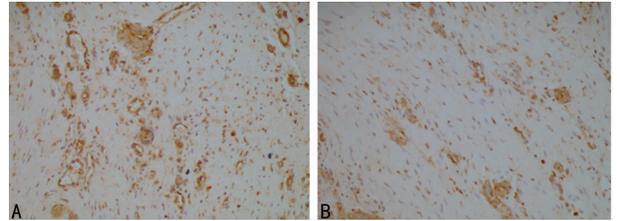
2 结果

2.1 两组干细胞移植前和移植后 6 周超声心动图指标的测定 对照组治疗后 6 周和治疗前比较各项指标均无改善($P > 0.05$)。移植组治疗后 6 周左室收缩期末内径、舒张期末内径、左室射血分数及短轴缩短率均较治疗前有明显改善($P < 0.05$),且与对照组比较亦有明显改善($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 两组心肌核素显像指标的测定 对照组治疗后 6 周和治疗前比较各项指标均无改善($P > 0.05$)。移植组治疗后 6 周左室心肌梗死面积、梗死质量比均较治疗前有明显改善($P < 0.05$),且与对照组比较亦有明显改善($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 两组新生血管数目的比较 两组猪心肌组织内抗 vWF 抗体免疫组织化学染色均有阳性(图 1),对照组的新生血管数目为(10.24 ± 1.71)个,移植组为(14.71 ± 2.99)个,两组间比

较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 冠状动脉组; B: 对照组。

图 1 梗死交界区毛细血管 vWF 多克隆抗体染色($\times 200$)

3 讨论

AMI 后常发生左心室重构,最终导致顽固性心力衰竭。虽然溶栓治疗、经皮冠状动脉介入治疗及冠状动脉旁路移植术等治疗方法可以挽救濒死心肌细胞,但对坏死的心肌细胞无能为力。Makino 等^[6]第 1 次在体外将骨髓间充质干细胞诱导分化成心肌细胞,从而利用干细胞的多向分化潜能为心肌梗死、心力衰竭的治疗带来新的希望^[7]。骨髓干细胞在特定的环境下可分化为心肌细胞,改善心功能,大量的基础和临床研究证实了其能改善心肌梗死患者的预后^[8-11]。但是,骨髓干细胞取材具有有创性、分离取材受时间限制、细胞分化能力低、细胞数量不足等缺点,限制了其应用。脐带间充质干细胞是一种来源广泛、再生能力强、有较强分化潜能、免疫原性低、不诱发畸胎瘤、无病毒感染风险及伦理问题的干细胞^[12]。近年来已进行了很多基础和临床研究,引起关注。

经冠状动脉途径移植干细胞是将干细胞经导管注入梗死相关动脉的远端,干细胞在环境的作用下局部经微细血管迁移至缺血的心肌中^[13]。AMI 作为节段性心脏病,通过经导管冠状动脉内注射可以使移植细胞快速到达梗死及其周围组织,使大量的移植细胞在梗死局部聚集。而且由于 AMI 后炎症细胞的浸润以及炎性介质的释放,梗死区及周围毛细血管扩张通透性升高,有利于干细胞通过毛细血管壁进入梗死心肌中,所以,此种干细胞移植方法创伤小、效率较高。本实验经冠状动脉移植绿色荧光蛋白标记的脐带间充质干细胞至梗死心肌,6 周后检查可见绿色荧光蛋白标记的干细胞,表明干细胞在心肌中存活,从而证明经冠状动脉移植是一种有效的移植方法。

本研究显示,干细胞移植组的左室收缩期末内径、舒张期末内径、左室射血分数、短轴缩短率较对照组显著改善,干细胞移植组的左室心肌梗死面积、左室梗死质量比与对照组比较显著缩小,表明经冠状动脉移植脐带间充质干细胞能够改善心肌梗死后心肌的收缩功能、缩小心肌梗死面积。其可能机制:(1)干细胞移植至宿主内存活并分化为心肌细胞,具有心肌细胞能承担的收缩功能。(2)直接分化为血管内皮细胞和平滑肌细胞,形成新的血管;以旁分泌或自分泌的方式分泌促血管生长的细胞因子,促进血管的生长^[14],改善梗死区血供,促进了心功能的恢复。本研究结果显示,干细胞移植组(下转第 895 页)

自我管理,从而有效控制血糖^[3]。同时,家庭成员在关心和照顾患者的同时,既可支持和监督患者的饮食、药物治疗,又可帮助患者维系和促进健康的行为和生活方式,从而促进了家庭的合作度和亲密度^[12]。而家庭成员的关心和鼓励又可帮助患者增加战胜疾病的信心和强烈实施自我管理的责任感,从而促进患者自我管理行为的执行。因此,本调查也证实,家庭功能与社区老年糖尿病患者自我管理行为密切相关,家庭成员间的良好关系有助于社区老年糖尿病患者进一步实施自我管理行为,从而促使患者达到疾病的最佳控制。

参考文献

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12):1090-1101.
- [2] 于平平,肖湘成,王琳云,等.社区 2 型糖尿病患者的自我管理行为与其血糖控制的相关性研究[J]. *中南大学学报:医学版*, 2013, 38(4):425-430.
- [3] 周勇妹,钟宁,高文娟,等.2 型糖尿病患者家庭功能与血糖控制情况相关性研究[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(5B):1566-1568.
- [4] Toobert DJ, Hampson SE, Glasgow RE. The summary of diabetes self-care activities measure; results from 7 studies and a revised scale[J]. *Diabetes Care*, 2000, 23(7):943-950.

- [5] 董胜莲,形凤梅,吴保平,等.农村 II 型糖尿病患者糖尿病知识与自我管理现状调查[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(2):240-245.
- [6] 吴振强,崔光辉,张秀军,等.老年人家庭功能状况及影响因素分析[J]. *中国公共卫生*, 2009, 25(2):139-140.
- [7] 陈长香,李淑杏,赵雅宁,等.老年人生存质量与家庭功能的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(19):4257-4258.
- [8] 黄金,刘跃华,张艳,等.2 型糖尿病患者自我管理现状与糖尿病知识、态度的相关性[J]. *中南大学学报:医学版*, 2013, 38(2):176-181.
- [9] 徐茉莉,高丽,刘晓玲,等.483 例糖尿病患者自我管理现状及影响因素分析[J]. *重庆医学*, 2013, 42(36):4390-4394.
- [10] 孙胜男,赵维纲,董颖越,等.糖尿病患者自我管理现状及影响因素分析[J]. *中华护理杂志*, 2011, 46(3):229-232.
- [11] Garg SK, Hirsch IB. Self-monitoring of blood glucose-an overview[J]. *Diabetes Technol Ther*, 2014, 16(Suppl 1):S3-10.
- [12] 丁兰,李世华,武琳,等.对社区糖尿病患者采用以家庭为单位的护理管理的效果[J]. *中华护理杂志*, 2010, 45(11):1019-1021.

(收稿日期:2014-10-11 修回日期:2014-12-10)

(上接第 892 页)

的新生毛细血管的数量多于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(3)干细胞可与宿主细胞建立电-机械耦联,参与心机的收缩。(4)干细胞移植后减轻心机的纤维化,维持受损心机的相对完整性,增加瘢痕组织的弹性,限制心室的扩张,抑制心室的重构,保护了泵功能。(5)移植后新生的心肌细胞增加心脏的顺应性和弹性,改善舒张功能。

参考文献

- [1] Haider HK, Ashraf M. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(6):H2557-2567.
- [2] Frishman WH, Anversa P. Stem cell therapy for myocardial regeneration[J]. *Heart Dis*, 2002, 4(4):205.
- [3] Scorsin U, Hagege A, Marotte P, et al. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium[J]. *Circulation*, 1997, 96(1):188-193.
- [4] Wu KH, Mo XM, Zhou B, et al. Cardiac potential of stem cells from whole human umbilical cord tissue[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(5):926-932.
- [5] 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见[S]. 2006-09-30.
- [6] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(5):697-705.
- [7] Latifpour M, Nematollahi-Mahani SN, Deilamy M, et al. Improvement in cardiac function following transplantation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells[J]. *Cardiology*, 2011, 120(1):9-18.
- [8] Klein HM, Ghodsizad A, Marktanner R, et al. Intramyocardial implantation of CD133⁺ stem cells improved cardi-

ac function without bypass surgery[J]. *Heart Surg Forum*, 2007, 10(1):66-69.

- [9] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) randomized controlled trial[J]. *Am Heart J*, 2007, 154(4):710-718.
- [10] Yang Z, Zhang F, Ma W, et al. A novel approach to transplanting bone marrow stem cells to repair human myocardial infarction: delivery via a noninfarct-related artery[J]. *Cardiovasc Ther*, 2010, 28(6):380-385.
- [11] Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months follow up data from the randomized, controlled BOOST (bone marrow transfer to enhance ST elevation infarct regeneration) trial[J]. *Circulation*, 2006, 110(113):1287-1294.
- [12] 刘玲英,柴家科,韩焱福,等.脐带 Wharton 胶来源 MSCs 生物学特性及其优越性的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(6):745-749.
- [13] Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure[J]. *Circulation*, 2003, 107(18):2294-2302.
- [14] Jain M, Pfister O, Hajjar RJ, et al. Mesenchymal stem cells in the infarcted heart[J]. *Coron Artery Dis*, 2005, 16(2):93-97.

(收稿日期:2014-10-16 修回日期:2014-12-20)