

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.015

人 WJ-MHCs 移植对心肌梗死后心力衰竭大鼠 TNF- α 及 NT-proBNP 的影响*

梁晓辉¹, 赵子翔², 欧东波³, 罗建春², 龚超奇², 覃善都², 赵东海^{1,2 Δ}

(1. 桂林医学院研究生学院, 广西桂林 541004; 2. 中国人民解放军第 303 医院心血管内科, 广西南宁 530021; 3. 中国人民解放军第 422 医院心血管内科, 广东湛江 524005)

[摘要] **目的** 观察人华通胶间充质干细胞(WJ-MHCs)对心肌梗死后心力衰竭大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及 N 末端 B 型脑利钠肽前体(NT-proBNP)的影响。**方法** 采用 80 只雄性 SD 大鼠通过异丙肾上腺素多点皮下注射, 剂量为 200 mg/kg, 隔 24 h 注射 1 次共 2 次。待大鼠存活 1 周建立模型后各取 12 只随机均衡分入 WJ-MHCs 移植组、普通对照组、空白对照组各 12 只健康大鼠, 3 组再分为移植前和移植后 4 周两个亚组。WJ-MHCs 移植组于心肌梗死后 1 周移植以 DAPI 标记的 WJ-MHCs, 空白对照组及普通对照组不做处理正常饲养。分别于移植前和移植后 4 周检测大鼠心脏组织中 TNF- α 水平, 移植后 4 周 WJ-MHCs 细胞在大鼠心脏中的情况, 大鼠 TNF- α 和 NT-proBNP 的水平, 左室射血分数(LVEF)。**结果** 移植后 WJ-MHCs 移植组较移植前 LVEF 明显提高($P < 0.05$), 较移植前及普通对照组血清 TNF- α 及 NT-proBNP 明显降低($P < 0.05$); 移植后 WJ-MHCs 移植组较普通对照组心脏组织中 TNF- α 表达明显减少; WJ-MHCs 移植组病死率(16.67%)较普通对照组病死率(33.33%)明显降低; 免疫荧光显示移植后 4 周仍可检测到移植的 WJ-MHCs。**结论** 移植人 WJ-MHCs 可明显降低心梗后心衰大鼠心脏组织及循环中的 TNF- α , 降低循环中的 NT-proBNP, 提高心功能。

[关键词] 脐带华通胶间充质干细胞; 炎症; 心肌梗死; 心力衰竭**[中图分类号]** R541.6; R542.2+2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)29-4073-04

Effect of human umbilical cord WJ-MHCs on TNF- α and NT-proBNP in the rats with heart failure of acute myocardial infarction*

Liang Xiaohui¹, Zhao Zilin², Ou Dongbo³, Luo Jianchun², Gong Chaoqi², Qin Shandu², Zhao Donghai^{1,2 Δ}

(1. Graduate College, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China; 2. Department of Cardiology, No. 303 Hospital of PLA, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Department of Cardiology, No. 422 Hospital of PLA, Zhanjiang, Guangdong 524005, China)

[Abstract] **Objective** To observe the influence of human umbilical cord wharton's jelly-mesenchymal stem cells(WJ-MHCs) on the tumor necrosis factor α (TNF- α) and N-terminal pro-brain natriuretic peptide(NT-proBNP) in rats with heart failure of acute myocardial infarction. **Methods** Totally 80 male rat models of heart failure of acute myocardial infarction were made by isoprenaline(ISO) 200 mg/kg injected subcutaneously twice at an interval of 24 hours. After one week, 24 survival rats were randomly divided into WJ-MHCs transplantation group and normal control group. Sham group was made of 12 health rats, and then each of the three groups was subdivided into pre-transplantation group and post-transplantation group 4 weeks later. WJ-MHCs transplantation group was transplanted with WJ-MHCs with DAPI labeled after ISO injected one week. Sham group and normal group were untreated and normally bred. The left ventricular ejection fraction(LVEF) measured by before transplantation and post-transplantation 4 weeks later. The injected cells and the expression of TNF- α was measured. **Results** Compared to pre-transplantation group, WJ-MHCs transplantation group increased the LVEF($P < 0.05$); compared to pre-transplantation and normal control, WJ-MHCs transplantation group reduced the TNF- α and NT-proBNP in the serum($P < 0.05$) and the expression of TNF- α from the heart tissue($P < 0.05$); compared to normal transplantation, WJ-MHCs transplantation group reduced the mortality from 33.3% to 16.7%; immunofluorescence demonstrated that transplanted cells were still found alive in the heart after transplantation 4 weeks later. **Conclusion** Transplantation of WJ-MHCs down-regulates TNF- α and NT-proBNP in the serum in the serum and the expression of TNF- α from the heart tissue and up-regulates the LVEF in rats with heart failure of acute myocardial infarction.

[Key words] umbilical cord wharton's jelly-mesenchymal stem cells; inflammation; myocardial infarction; heart failure

心肌梗死及其他原因导致心脏损伤后, 死亡及损伤的心肌细胞会引起心脏局部的无菌性炎症反应, 导致免疫细胞趋化至炎症部位, 在清除损伤部位坏死细胞的同时会释放大量的炎症反应介质对仍存活的心肌细胞造成损伤及凋亡, 从而导致心肌细胞数量及收缩能力的持续下降, 从而引起心力衰竭, 而 TNF- α

在其中起重要作用^[1]。华通胶间充质干细胞(wharton's jelly-mesenchymal stem cells, WJ-MHCs)为来源于脐带的多能干细胞, 拥有强大的增殖及免疫抑制能力^[2]。本实验将人 WJ-MHCs 移植入心肌梗死后心力衰竭的大鼠心脏中, 探讨其对心肌梗死后心力衰竭大鼠炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及 N

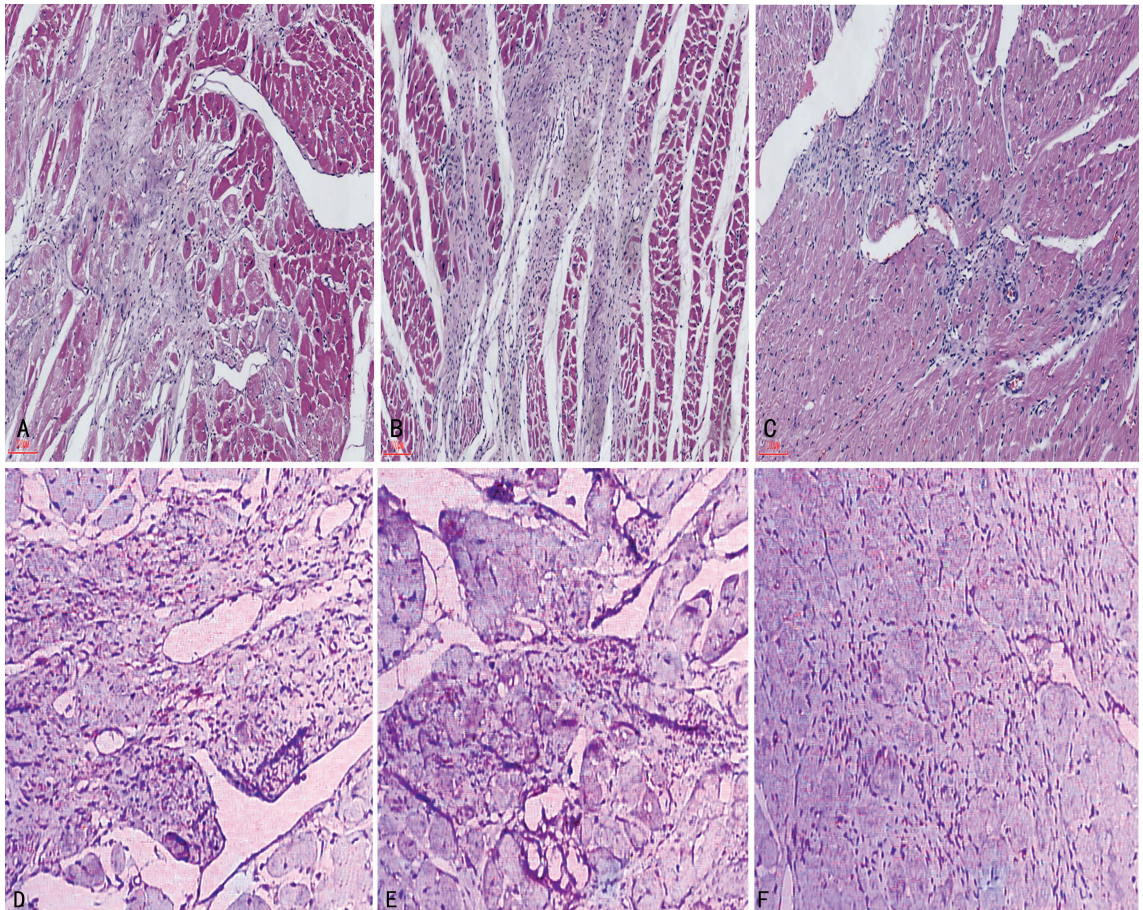
* 基金项目: 广西壮族自治区自筹经费科研课题(Z2013542)。 作者简介: 梁晓辉(1988-), 硕士, 医师, 主要从事脐带干细胞的研究。

 Δ 通讯作者, Tel: 18577769775; E-mail: 303yz@sina.com。

表 1 人 WJ-MHCs 移植前、移植后 4 周 3 组大鼠心功能及血清 TNF- α 和 NT-proBNP 变化($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	n	LVEF(%)	TNF- α (ng/L)	NT-BNP(pg/mL)
普通对照组	移植前	12	37.13 \pm 6.31 ^a	72.31 \pm 5.86 ^a	783.71 \pm 90.14 ^a
	移植后	8	45.13 \pm 6.05 ^a	61.29 \pm 6.53 ^a	442.62 \pm 52.91 ^a
人 WJ-MHCs 移植组	移植前	12	36.87 \pm 6.53 ^a	74.25 \pm 6.10 ^a	787.55 \pm 86.35 ^a
	移植后	10	54.54 \pm 7.24 ^{ac}	37.48 \pm 5.39 ^{abc}	304.77 \pm 55.55 ^{abc}
空白对照组	移植前	12	65.42 \pm 6.64	26.23 \pm 4.52	125.34 \pm 20.48
	移植后	12	66.44 \pm 6.59	25.31 \pm 4.19	122.27 \pm 19.56

^a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与普通对照组比较; ^c: $P < 0.05$, 与人 WJ-MHCs 移植组移植前比较。



A、D: 空白对照组; B、E: 普通对照组; C、F: 人 WJ-MHCs 移植组。

图 1 各组大鼠心脏组织 HE 切片($\times 100$)

末端 B 型脑利钠肽前体(NT-proBNP)的影响。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组 采用 SD 大鼠(购自广西壮族自治区疾病与预防控制中心)共 80 只,均为雄性,体质量 190~220 g,建立模型后各取 12 只随机均衡分入 WJ-MHCs 移植组和普通对照组,取 12 只健康大鼠作为空白对照组,然后 3 组再分为移植前组和移植后 4 周两个亚组,WJ-MHCs 移植组移植 WJ-MHCs,对照组不做处理,正常饲养。WJ-MHCs 由军事医学科学院制备及提供。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 取体质量为 190~220 g 雄性 SD 大鼠,按照参考文献[3]报道的方法复制心肌梗死模型:每只大鼠按 200 mg/kg 剂量多点皮下注射异丙肾上腺素,隔 24 h 注射 1 次共 2 次,注射完毕后正常饲养,待注射完毕后大鼠成功存活 1 周,心肌梗死后心力衰竭模型即制作成功。

1.2.2 人 WJ-MHCs 的标记 将培养基吸出,把含有 DAPI(武汉博士德 AR1177)的 DMEM-LG(上海慧颖 31600034)加入培养瓶中,37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min,吸出培养基,用 PBS 溶液冲洗 6 遍,以洗去未结合的 DAPI,再加入 0.25% 的胰酶消化细胞,待细胞消化脱壁后,用等量的含血清培养基中止消化。吸出细胞悬液,离心 1 000 r/min,5 min,吸出上清液,加入 PBS 洗涤 1 次,重复离心 1 次,用无血清的 DMEM 悬浮细胞至细胞浓度为 1×10^6 /mL,置于冰上 1 h 内备用,标记过程注意避光。

1.2.3 WJ-MHCs 移植 模型制作成功后,实验组大鼠麻醉后固定于动物手术台上寻找心尖搏动最强点,将 1 mL 细胞悬液直接通过心尖搏动最强点缓慢注入心室(达到满意位置后用注射器稍回抽,如见鲜红色血液瞬间进入注射器即示注射位置成功),完后用无菌纱布轻轻按压注射部位,0.5 h 后待大鼠完全苏醒后放回鼠笼精心饲养。

1.2.4 心功能的检测 分别于人 WJ-MHCs 移植前和移植后 4 周腹腔注射麻醉,左胸前部剃毛,采用超声心动图仪检测搏出量占心室舒张末期容积的百分比,即左室射血分数(ejection fraction,LVEF)。每一数据均测量 3 次,取其均值。

1.2.5 心脏标本取材 心功能检测完毕后,于 WJ-MHCs 移植 4 周后麻醉大鼠,胸腔内注射 10% 的氯化钾溶液 1 mL,使心脏停止于舒张期,迅速取出心脏,去除心脏表面多余组织,冰盐水洗净,以备免疫组织化学及免疫荧光检测。

1.2.6 免疫组织化学及检测

1.2.6.1 免疫荧光检测 完成心脏标本取材后沿心脏短轴方向将左心室切下装入-80℃冰箱中保存,待切片时取出,室温下解冻后在恒冷冰冻切片机上将组织块切成 6~8 μm 厚度的切片。冰冻切片在室温下避光放置 20~30 min 风干,在免疫荧光显微镜下观察移植细胞情况。

1.2.6.2 免疫组织化学检测 完成心脏标本取材后,将待测心脏标本在 40 g/L 甲醛溶液中固定 24 h,随后进行脱水,透明,浸蜡和包埋,垂直于心脏长轴连续切片,厚度 3 μm,使用 TNF-α(武汉博士德 BA0131)抗体进行免疫组织化学染色,观察其表达情况。

1.2.7 酶联免疫吸附测定 在取出心脏标本前,通过心脏取出 2 mL 静脉血分别用大鼠 TNF-α 试剂盒(武汉博士德 EK0526)和 NT-proBNP(上海蓝基 E02N0008)试剂盒检测血清中 TNF-α 和 NT-proBNP 的情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计学软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 移植前后 TNF-α 与 NT-proBNP 变化 表 1 结果显示普通对照组和人 WJ-MHCs 移植组在细胞移植前 LVEF 较空白对照组明显降低,TNF-α 及 NT-proBNP 均较空白对照组明显升高。WJ-MHCs 移植组在细胞移植后 LVEF 较移植前明显提高,TNF-α 及 NT-proBNP 较普通对照组及移植前明显降低同时其病死率较普通对照组低(16.67% vs. 33.33%)。

2.2 免疫组织化学结果 结果显示模型制作成功后心脏组织中心肌细胞大量坏死,坏死区域淋巴细胞浸润(图 1A)显著同时心梗区域 TNF-α 表达明显增加(图 1D);移植 WJ-MHCs 4 周后 WJ-MHCs 移植组(图 1C)较普通对照组(图 1B)心肌梗死区及淋巴细胞浸润减少 WJ-MHCs 移植组(图 1F)较普通对照组(图 1E)TNF-α 表达减少。

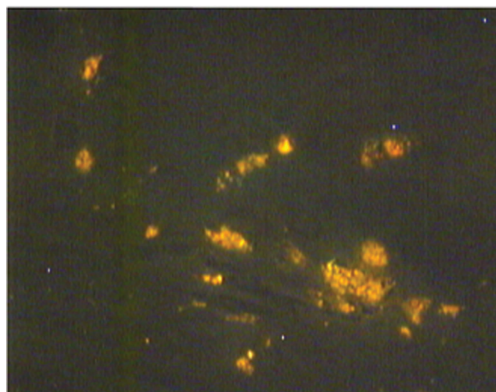


图 2 大鼠移植 WJ-MHCs 4 周后心脏组织免疫荧光切片(×100)

2.3 免疫荧光结果显示 移植 WJ-MHCs 4 周后,WJ-MHCs 在心脏组织中仍然存活,见图 2。

3 讨论

心力衰竭的主要机制是各种原因导致的心肌细胞损伤、死亡,导致心脏结构发生变化,最终导致心脏泵功能下降。最近的研究证实,心肌损伤及死亡后导致的心脏局部炎症反应是心力衰竭发生发展的中心环节^[4]。而在心脏炎症反应中,炎症因子既是使动因素,因其可以使炎症细胞趋化至炎症部位,又是维持和效应因子,因其可使趋化至炎症部位的炎症细胞增殖及活化释放炎症因子,持续损伤炎症部位存活的细胞及刺激纤维结缔组织增生,使心脏结构发生变化导致心脏重构^[5-7]。一般认为 TNF-α 越高,炎症反应越强烈。而 TNF-α 在心脏炎症导致的心室重构过程中起重要的作用,Kubota 等^[8]通过将 TNF-α 基因导入小鼠 α 肌球蛋白重链使小鼠心脏高度表达 TNF-α 而制成 TNF-α 转基因大鼠,将其正常饲养后出现心室肥大及扩张、间质纤维化、心肌细胞凋亡、LVEF 下降及 β1 受体数量减少等。因此将 TNF-α 作为判断心力衰竭远期预后的影响因子是合适的^[9]。

虽然 MSCs 有很强的增殖及分化能力,但是目前仍没有证据表明其可以在心脏中分化为心肌细胞及血管内皮细胞^[10],本研究结果显示在移植人 WJ-MHCs 后,心肌梗死后心力衰竭大鼠心功能较移植前明显提高,且较普通对照组显著提高,说明通过人 WJ-MHCs 移植治疗心肌梗死后心力衰竭是有效的。但根据目前研究显示,心力衰竭大鼠心功能的获益与人 WJ-MHCs 定向分化为心肌细胞和血管内皮细胞无关,因此心力衰竭大鼠心功能的提高并非获益于心肌细胞数量增加引起的心肌收缩能力提高。本研究同时显示在移植 WJ-MHCs 后,心脏局部及循环中 TNF-α 较移植前明显减少,因此心力衰竭大鼠心功能的提高与 WJ-MHCs 移植后抑制心脏局部炎症有关。目前已经有研究证实,免疫细胞可以识别和杀伤应激细胞,比如心肌梗死后存活的心肌细胞^[6],同时心肌梗死及其他原因导致的心肌细胞死亡后,心脏自身抗原被免疫系统识别,从而导致免疫系统持续对心肌细胞造成损伤^[11]。研究显示 WJ-MHCs 比其他成人间充质干细胞比如骨髓间充质干细胞拥有更强的免疫抑制能力^[12],因此作者选择 WJ-MHCs 进行移植,研究结果显示移植后心肌梗死后心衰大鼠循环及心脏中的 TNF-α 均较移植前及普通对照组明显减少,移植后心梗区域炎症浸润较移植前及普通对照组明显减轻,同时大鼠心功能得到提高,移植 4 周后仍可在大鼠心脏标本中检测到移植细胞,说明移植后细胞长期在心脏中存活并发挥作用。因此认为通过人 WJ-MHCs 移植可以改善心脏炎症反应,而且移植后心功能以及 NT-proBNP 均较移植前及普通对照组明显改善,因此 WJ-MHCs 移植治疗心力衰竭是有效的。

BNP 又称为脑钠肽,为左室功能不全使心肌细胞释放入血的一种天然激素,为临床反映心力衰竭的敏感指标,但其半衰期较短,NT-proBNP,来源于 BNP 相同但无生物活性,其比 BNP 半衰期稍长更易于临床检测^[13]。因此 NT-proBNP 更反映心力衰竭当时的严重程度,而 TNF-α 反映的则是心脏炎症程度,本实验中普通对照组较移植组病死率增高,也说明心脏炎症更能反映心力衰竭的远期预后,本研究结果显示移植后 NT-proBNP 和 TNF-α 均较移植前及普通对照组明显下降,因此通过 WJ-MHCs 移植不仅可以短期改善心衰,更可治疗心脏炎症对心肌细胞的持续损伤而改善心力衰竭的长期预后。

参考文献

- [1] Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart; to be or not to NF- κ B[J]. *Circ Res*, 2011, 108: 1122-1132.
- [2] Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues Do not discard[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(3): 730-742.
- [3] Han HG, Wang ZW, Zhang NB, et al. Role of nitric oxide during early phase myocardial ischemic preconditioning in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(13): 1210-1214.
- [4] Hofmann U, Frantz S. How can we cure a heart "in flame"? A translational view on inflammation in heart failure[J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(4): 356.
- [5] Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, et al. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(12): 2141-2149.
- [6] Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(1): 5-14.
- [7] Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML. Macrophage roles following myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2008, 130(2): 147-158.
- [8] Kubota T, Mctiernan CF, Frye CS, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α [J]. *Circ Res*, 1997, 81(4): 627-635.
- [9] Rordorf R, Savastano S, Sanzo A, et al. Tumor necrosis factor- α predicts response to cardiac resynchronization therapy in patients with chronic heart failure[J]. *Circ J*, 2014, 78(9): 2232-2239.
- [10] Michler RE. Stem cell therapy for heart failure[J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22(3): 105-116.
- [11] Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Rev Reports*, 2012, 8(2): 375-392.
- [12] Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility[J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(2): 195-202.
- [13] Januzzi J, Richards AM, Panel IC. An international consensus statement regarding amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing: The international NT-proBNP consensus panel-Introduction[J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101(3A): 1A-2A.
- (收稿日期: 2015-04-25 修回日期: 2015-06-16)
-
- (上接第 4072 页)
- an anterior occiput-to-axis locking plate system; a pilot study[J]. *Spine J*, 2014, 14(8): 1399-1409.
- [2] Panjabi MM, Crisco JJ, Vasavada A, et al. Mechanical properties of the human cervical spine as shown by three-dimensional load-displacement curves[J]. *Spine*, 2001, 26(24): 2692-2700.
- [3] Lee SH, Im YJ, Kim KT, et al. Comparison of cervical spine biomechanics after fixed-and mobile-core artificial disc replacement; a finite element analysis[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(9): 700-708.
- [4] Zhang QH, Teo EC, Ng HW, et al. Finite element analysis of moment-rotation relationships for human cervical spine [J]. *J Biom*, 2006, 39(1): 189-193.
- [5] Lv CW, Lei W, Ma ZS, et al. Posterior rotating rod reduction strategy for irreducible atlantoaxial subluxations with congenital odontoid aplasia[J]. *Spine*, 2010, 35(23): 2064-2070.
- [6] Goel A. Treatment of basilar invagination by atlantoaxial joint distraction and direct lateral mass fixation [J]. *J Neuros Spine*, 2004, 1(3): 281-286.
- [7] Goel A. Progressive basilar invagination after transoral odontoidectomy: Treatment by atlantoaxial facet distraction and craniocervical realignment[J]. *Spine*, 2005, 30(18): 551-555.
- [8] 刘策, 周定标, 余新光, 等. 寰枕融合畸形患者寰枢侧块关节形态变化与寰枢椎脱位的三维特征[J]. *中华神经医学杂志*, 2009, 8(1): 57-60.
- [9] Menezes AH. Craniocervical junction database analysis: incidence, classification, presentation, and treatment algorithms[J]. *Childs Nervous System*, 2008, 24(10): 1101-1108.
- [10] Gholve PA, Hosalkar HS, Ricchetti ET, et al. Occipitalization of the atlas in children-Morphologic classification, associations, and clinical relevance[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89A(3): 571-578.
- [11] 尹一恒. 颅颈交界区畸形中寰枢外侧关节的结构变异与生物力学研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2012.
- [12] 周定标, 张远征, 余新光, 等. 自发性寰枢椎脱位(附 155 例报告)[J]. *中华神经外科杂志*, 2000, 16(5): 270-272.
- [13] 李青, 贾连顺, 陈雄生, 等. 寰枢枕骨化对枕颈部生物力学影响的实验研究[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2002, 20(6): 469-472.
- [14] Salunke P, Sharma M, Sodhi HBS, et al. Congenital atlantoaxial dislocation; a dynamic process and role of facets in irreducibility[J]. *J Neuros Spine*, 2011, 15(6): 678-685.
- [15] Yin Y, Yu X, Zhou D, et al. Three-dimensional configuration and morphometric analysis of the lateral atlantoaxial articulation in congenital anomaly with occipitalization of the atlas[J]. *Spine*, 2012, 37(3): 170-173.
- [16] Jian FZ, Chen Z, Wrede KH, et al. Direct posterior reduction and fixation for the treatment of basilar invagination with atlantoaxial dislocation [J]. *Neurosurgery*, 2010, 66(4): 678-687.
- (收稿日期: 2015-04-18 修回日期: 2015-07-26)