

## 骨髓单个核细胞移植对慢性心力衰竭大鼠 心肌修复的远期效果

黄海怡<sup>1</sup>, 黄佐<sup>1</sup>, 胡国梁<sup>1</sup>, 侯健<sup>2</sup>

(第二军医大学长征医院 1. 心血管内科; 2. 血液科, 上海市 200003)

[关键词] 病理学与病理生理学; 干细胞修复心力衰竭大鼠受损心肌; 骨髓干细胞移植; 慢性心力衰竭; 心肌修复; 心功能; 远期效果

[摘要] 目的 研究骨髓单个核细胞移植对慢性心力衰竭大鼠心肌的修复作用及其远期效果观察。方法 建立慢性心力衰竭大鼠模型。造模后通过心肌直接注射的方法, 于移植组移植 DAPI 标记过的骨髓单个核细胞; 对照组注射同等剂量 PBS 溶液; 假手术组仅开胸和关胸。并于造模后即刻、移植后 4、8 和 12 周, 分批分组进行免疫组织化学和透射电镜的检测。结果 心脏标本切片, 荧光显微镜检查证实有细胞核因被标记而呈荧光的新生心肌和血管。免疫组织化学检查发现细胞移植区有类似心肌细胞的细胞团、心肌特异性结蛋白和肌动蛋白, 增殖细胞核抗原检测阳性。透射电镜检查可见不成熟的心肌细胞, 有细胞超微结构的变化, 胞质中有散在肌丝样物质, 还可见内膜不完整的新生血管, 且阳性物质随时间推移而逐渐增多。对照组和假手术组则没有这些改变, 并且在不同时间段出现死亡病例。结论 骨髓单个核细胞移植可有效防止慢性心力衰竭大鼠心功能恶化, 促进心肌和血管再生, 在移植后长时间内没有出现新的心肌缺血损害、炎症反应和恶性心律失常, 持续修复受损心肌, 远期效果明显。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Long-Term Effects of Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation on Repairing Necrotic Myocardium in Chronic Heart Failure Rats

HUANG Hai-Yi<sup>1</sup>, HUANG Zuo<sup>1</sup>, HU Guo-Liang<sup>1</sup>, and HOU Jian<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology; 2. Department of Haematology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[KEY WORDS] Chronic Heart Failure; Myocardium Repairing; Heart Function; Long-Term Effects; Cell Transplantation; Mononuclear Bone Marrow Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the long-term effects of transplanting mononuclear bone marrow stem cell (MBMC) on repairing necrotic myocardium in chronic heart failure rats. **Methods** First, to establish chronic heart failure rat animal model. MBMC isolated from the rats were directly injected into the myocardium of transplantation group, control group were injected PBS, and sham-operated rats were underwent the surgery but not transplantation. At 4th, 8th and 12th week after transplantation, myocardium were assessed by immunohistochemistry and electron microscope. **Results** In heart specimens slice, by immunofluorescence microscope, it was confirmed that there were newborn cardiomyocyte and blood vessels at the site of transplantation which nucleolus were marked with fluorescence. Myogenic cell similar with cardiomyocyte, desmin and actin could be detected by immunohistochemistry, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) detected the proliferated cell. Immature cardiomyocyte, cell ultrastructure changes and newborn blood vessels which endothelium were not complete could also be detected by electron microscope. All these matter became more and more with time went on. There were no significant discoveries between control and sham-operation groups, and at different time, there appeared dead cases. **Conclusions** MBMC transplantation can effectively prevent heart function deteriorated in chronic heart failure, regenerate cardiomyocyte and blood vessels. There are no bad responses such as new ischemia, inflammation and malignant arrhythmia. MBMC can continue to repair necrotic myocardium. The long-term effect is notable.

[收稿日期] 2004-10-18 [修回日期] 2005-04-10

[作者简介] 黄海怡, 医学硕士, 住院医师, 主要从事冠心病研究, 联系电话为 021-63610109-73203, E-mail 为 britneyhuang@21cn.com。通讯作者黄佐, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病研究, 联系电话为 021-63610109-73212, E-mail 为 Huangzuo@yahoo.com.cn。胡国梁, 医学硕士, 住院医师, 主要从事冠心病研究, 联系电话为 021-63610109-73203, E-mail 为 dochgl@hotmail.com。

慢性心力衰竭缺乏有效治疗手段, 预后较差。现有的内外科治疗手段虽使患者的生存率有所提高, 但并不能很好地解决心肌细胞数量和功能丧失的问题。近来大量研究表明, 细胞移植可明显改善心力衰竭患者的心功能, 但它们大多是细胞移植后短期(移植后 4 周)研究观察结果。本实验利用大鼠

骨髓单个核细胞(mononuclear bone marrow stem cell, MBMC)进行移植,观察不同时间点(移植后4周、8周、12周)MBMC在心肌坏死区的存活情况以及对心肌修复和心功能恢复的作用,初步探讨MBMC移植治疗慢性心力衰竭的远期效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的制备和分组

成年雄性近交系Wistar大鼠135只(中国科学院实验动物中心提供),体重300g,根据文献[1]大鼠皮下注射大剂量盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)170 mg/kg(上海大众制药公司),1次/天,连续2天。造模4周后行心脏超声及血流动力学检测、病理及电镜检查。以心腔扩张、射血分数(ejection fraction, EF)小于45%为标准,入选实验组。将造模成功的心力衰竭大鼠随机分为细胞移植组、对照组和假手术组。

### 1.2 制备和标记骨髓干细胞悬液

另取大鼠24只,无菌条件下取股骨和胫骨,常规方法抽取骨髓,将骨髓液用密度为1.077 g/L的Percoll分离液分离单个核细胞,2 000转/min,20 min,吸取界面层细胞。计数细胞,检测细胞活性为85%,调整细胞浓度为 $5 \times 10^6$ /L。移植前在骨髓液中加入浓度为50 mg/L的4',6-二乙酰基-2-苯基吲哚(DAPI)(Roche),孵箱内孵育1 h。

### 1.3 骨髓单个核细胞移植

造模4周,即对各项检测提示为成功心力衰竭模型的大鼠进行细胞移植。大鼠腹腔麻醉(氯胺酮75 mg/kg,戊巴比妥那6.8 mg/kg,阿托品1 mg/kg,利多卡因10 mg/kg),气管插管,呼吸机辅助呼吸。左侧第4肋间进胸,暴露心脏,将DAPI标记的细胞悬液10  $\mu$ L(含 $5 \times 10^6$ 个细胞)分两点注射到心脏前壁;对照组注射10  $\mu$ L PBS溶液;假手术组仅开胸和关胸。

### 1.4 免疫荧光检查

于细胞移植后4、8和12周分批取出大鼠心脏,将注射部位的心肌制成5  $\mu$ m厚的连续冰冻切片,加入抗心肌肌动蛋白(Neomarkers 1:30)作为一抗,滴加异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗鼠IgG(Envision 1:60)作为二抗,进行激光共聚焦显微镜检查,检测DAPI示踪的干细胞是否具有心肌细胞特异性标记;另一部分冰冻切片加入兔抗人(II)因子相关抗原多克隆抗体(DaKo 丹麦 1:100)和FITC标记的山羊抗兔IgG(北京中山公司 1:30),检测植入的细胞是否具

有微血管特异性标记的内皮细胞样细胞。

### 1.5 免疫组织化学检查

取注射部位心肌,甲醛固定,石蜡包埋,切片,然后分别进行HE常规染色和免疫组织化学染色,(II)因子相关抗原抗体染色,普通光镜200倍视野下(0.08 mm<sup>2</sup>),每张切片任取5个视野计算血管数,观察坏死区血管新生情况。检测心肌细胞特异性肌动蛋白、心肌组织结蛋白(DaKo 丹麦 1:50),PCNA(DaKo 丹麦 1:100)检测细胞增殖。

### 1.6 透射电镜检查

将1%多聚甲醛固定的1 mm<sup>3</sup>心肌组织依次经2%锇酸固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,制成超薄组织切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅溶液染色,置于铜网上,在透射电子显微镜下(Hitachi H800),观察心肌组织超微结构变化,选取典型视野拍照。

### 1.7 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0软件分析,移植前后不同时间采用配对 $t$ 检验,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

## 2 结果

### 2.1 动物模型检测

大鼠在注射ISO后4周,行超声心动图检测,可见心腔扩大,室壁变薄,搏动减弱,心脏结构破坏,射血分数降低,血流动力学检测心功能明显受损。将心腔扩张、EF<45%的大鼠入选慢性心力衰竭实验组(共81只,约占60%)。随机抽取其中的9只行病理及电镜检查,发现类似慢性心力衰竭的早期变化:心肌细胞水肿,变性,闰盘错位,心肌细胞内肌原纤维含量减少,肌浆网扩张,断裂。说明心力衰竭动物模型造模成功,动物存活率100%,随机分为3组,各24只(表1和图1, Table 1和Figure 1)。

表1. 造模前与造模后超声检测心功能的比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=135$ )

Table 1. Compare heart function by echocardiography between the group before and after ISO

指 标	注射 ISO 前	注射 ISO 后
前壁厚度(cm)	0.21 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.04
短轴缩短率	51.0% $\pm$ 8.0%	23.5% $\pm$ 10.7% <sup>b</sup>
舒张末容积(mL)	0.19 $\pm$ 0.11	0.48 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
收缩末容积(mL)	0.02 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
射血分数	94.86% $\pm$ 1.05%	40.69% $\pm$ 3.21% <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与注射ISO前比较。

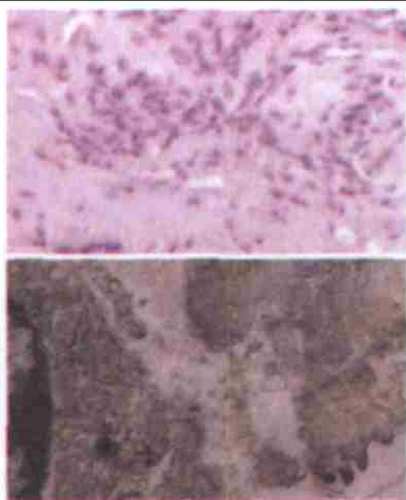


图 1. 电镜观察大鼠造模后心肌组织的超微结构(×8 000)

A 为造模 4 周后, 大鼠心肌组织变性、坏死, 广泛血管、间质周围纤维化; B 为造模 4 周, 心肌组织中错位、断裂的闰盘。

**Figure 1. Electronmicroscopy analysis of rats myocardium ultrastructure before and after being injected ISO (×8 000)**

## 2.2 细胞移植后大鼠存活情况

细胞移植后数周, 可见对照组和假手术组大鼠较移植组大鼠瘦弱, 皮下组织菲薄, 行动迟缓, 食欲低下, 且随时间的延长而严重; 而移植组大鼠则一般状况良好, 逐渐接近正常大鼠形态和行为。细胞移植组术中死亡 4 只, 术后全部存活; 对照组术中死亡 2 只, 术后 6 周、10 周分别死亡 2 只; 假手术组术中死亡 2 只, 于术后 7、11 周分别死亡 1 只和 2 只。移植治疗后没有出现心肌缺血损害、炎症反应和恶性心律失常等不良反应。

## 2.3 标记的骨髓单个核细胞在坏死心肌内存留和分化

骨髓单个核细胞在植入坏死心肌后 4、8 和 12 周, 激光共聚焦显微镜下可见 DAPI 标记的蓝色细胞核。DAPI 是一种荧光染料, 可与骨髓干细胞内 DNA 双链结合而发出蓝色荧光, 对细胞无毒性, 标记率 100%, 以此作为示踪剂可观察骨髓干细胞移植后的整个分化过程。虽然当时注射点只有 2 点, 但这些蓝色细胞核的细胞播散并迁移至坏死心肌区域, 移植细胞大约占左心室前壁的 35%~45%, 标记 DAPI 的细胞数量随时间的增长而逐渐减少。合成两种荧光细胞图像, 可见细胞切面图: DAPI 示踪的细胞核呈现蓝色荧光, 抗肌动蛋白抗体阳性的细胞浆呈现绿色荧光。同样,  $\alpha$ 因子相关抗原抗体阳性的微血管内皮中也可见到蓝色和绿色荧光并存的

图像 (图 2, Figure 2)。

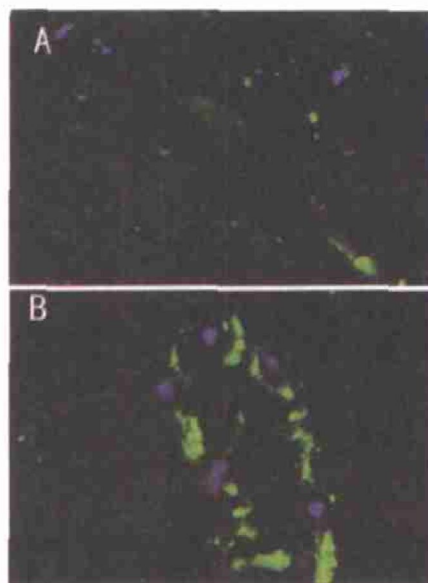


图 2. 细胞移植后 4 周大鼠心肌组织免疫荧光染色 A 为细胞同时表达肌动蛋白和 DAPI: 肌动蛋白胞质染色, 绿色荧光, DAPI 胞核染色为蓝色荧光, 提示为移植细胞来源的新生心肌样细胞。B 为细胞同时表达  $\alpha$ 因子和 DAPI:  $\alpha$ 因子胞质染色为绿色荧光, DAPI 胞核染色为蓝色荧光, 提示为移植细胞来源的新生毛细血管。

**Figure 2. Immunofluorescence analysis of rats myocardium 4 weeks after transplantation**

## 2.4 HE 常规染色和免疫组织化学检查

在细胞移植后 4、8 和 12 周, 各组标本中均可见变性坏死、纤维化的心肌, 在移植组细胞移植区域可见细胞核相对较大, 类似胎心或新生心肌细胞的细胞团, 心肌细胞的纤维化被有效抑制, 有明显的新生血管, 血管内膜不完整, 血管密度明显高于对照组。心肌肌动蛋白阳性, 并随时间的推移而增多。心肌组织结蛋白表达坏死区明显高于正常区域, 但排列紊乱, 整个心肌组织均可见阳性结蛋白, 且随着时间的推移部分心肌组织结蛋白的分布趋向正常。PCNA 可检测到部分心肌细胞增殖。对照组和假手术组的心肌纤维坏死呈灶状, 数量多而密集, 心肌细胞肿胀, 部分横纹不清, 部分溶解消失, 心肌细胞基本结构紊乱, 未发现核浆比例大的细胞及新生血管, 结蛋白阳性, 但排列较移植组紊乱, PCNA 检测无阳性细胞 (图 3, Figure 3)。

## 2.5 电镜检测

对照组和假手术组心肌组织超微结构变化明显, 纤维化明显, 线粒体肿胀、空泡化, 嵴减少, 肌纤维、闰盘断裂。移植组心肌组织中可见不成熟的心



肌细胞,核大,细胞器丰富,胞浆中可见散在肌丝样物质,散在的肌小节及内膜不完整的新生血管,并随

着时间的推移而增多(图4, Figure 4)。

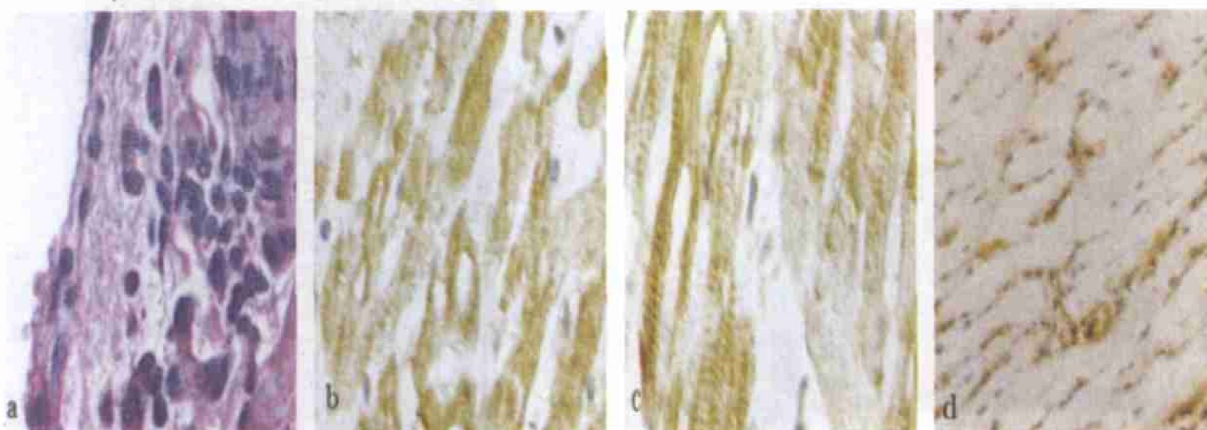


图3. 移植后8周大鼠心肌组织HE常规染色和免疫组织化学检查 a为移植区可见细胞核相对较大,类似胎心或新生心肌细胞的细胞团,心肌细胞的纤维化被有效抑制(HE staining  $\times 400$ ); b为部分结蛋白已恢复排列,并重见肌小结( $\times 400$ ); c为移植区域可见结构相对整齐的肌动蛋白,可见肌小节,较移植4周时增多( $\times 400$ ); d为移植区域CD31因子染色,可见明显的新生血管,血管内膜不完整( $\times 100$ )。

Figure 3. HE staining and Immunohistochemical analysis of rats myocardium 8 weeks after transplantation

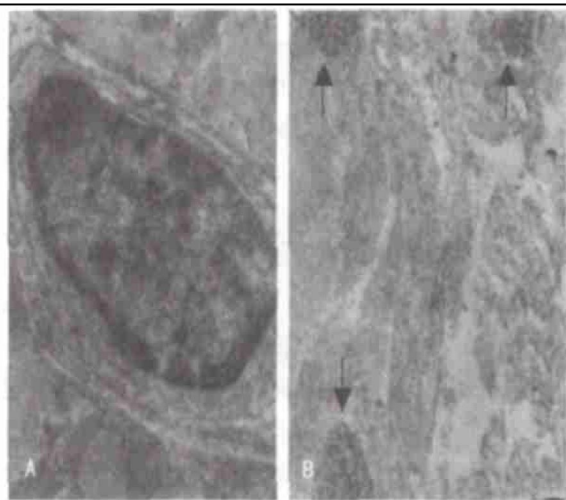


图4. 电镜观察移植后12周大鼠心肌组织超微结构 A为移植后新生血管,核大,细胞器丰富,内膜和基底膜不完整( $\times 10\,000$ ); B为不成熟的心肌细胞,细胞器丰富,肌丝样物质及肌小节明显( $\times 3\,000$ )(箭头所指)。

Figure 4. Electronmicroscopy analysis of rats myocardium ultrastructure 8 weeks after transplantation

### 3 讨论

近年来大量研究表明,细胞移植可有效改善心力衰竭患者的心功能,提高生存率,随着移植技术的成熟,该种新治疗方法已开始应用于临床。但目前研究大多集中在局部心肌损害引起的心功能不全

上,对多种因素引起的弥漫性心肌损害而导致的慢性心力衰竭的细胞移植治疗,以及长期预后效果研究较少。

骨髓干细胞是多种细胞及组织的多潜能前体细胞,属成体干细胞,没有明确的形态学特征,为MB-MC,它包括造血干细胞、间充质干细胞和内皮祖细胞,既具有自我更新和分化潜能,又能释放某些细胞因子促进血管新生<sup>[2]</sup>。而其中的骨髓间充质干细胞则在骨髓间质中含量最为丰富,在特定的条件下可以分化为各种细胞,具有强大的扩增能力和多向分化潜能,是较理想的细胞来源<sup>[3]</sup>。然而经体外长时间培养扩增的高纯化骨髓间充质细胞,其体外诱导成肌前体细胞发生率并不高,长期培养后细胞存活率低,在体内移植后归巢能力明显下降<sup>[4]</sup>,向细胞分化的百分率只有45%左右,只能使40%受体动物的功能改善<sup>[5]</sup>。如使用新鲜骨髓移植,应用含有各种成分的MBMC混合悬液,则不仅为重建心肌提供了细胞物质基础,而且提供了间充质细胞分化所必需的细胞因子、所依赖的诱导微环境。新鲜抽取的MBMC不需体外扩增,更好地保留了间充质细胞多向分化潜能和自动迁移特性,并且避免了体外长期培养的污染机会。本研究就是利用大鼠新鲜抽取分离的MBMC,将其移植入慢性心力衰竭大鼠心脏中,来评价其修复坏死、变性的心肌组织和血管,使之再生的价值以及观察其长期预后的效果。

大鼠心力衰竭模型是医学实验中经常用到的,建立该模型的方法很多,而皮下注射 ISO 对动物在原发打击之后避免了其它持续损伤因素的存在,如增大后负荷、冠状动脉供血不全、病毒感染、特异性炎症系统刺激和细胞因子释放等,因此能很好地反映心力衰竭的自然病理过程。大剂量 ISO 会造成心肌弥漫性坏死、纤维化及心室扩张<sup>[1]</sup>,该方法药量容易控制,操作简便,引起心肌损伤范围广,目前被广泛应用于建立心力衰竭动物模型。ISO 引起心功能破坏呈时间、剂量依赖性,剂量越大,形成模型的时间越短,可以根据实验急慢性的不同选择用药剂量。据文献[6]报道,采用 170 mg/kg 剂量 2 周时即可出现心腔扩张,4 周时心腔扩张,EF < 45% 者可达 63%,如采用 340 mg/kg 剂量,2 周时心腔即全部扩张,4 周时 100% 出现 EF < 45%,但死亡率较高。本实验采用 170 mg/kg 剂量,4 周时大鼠全部存活,超声心动图及血流动力学检测到室壁变薄,搏动减弱,心脏结构和功能明显受损。心腔扩张明显,EF < 45% 的大鼠比例为 60%,有显著统计学意义。其病理及电镜检查发现类似慢性心力衰竭早期的病理变化,提示心力衰竭动物模型造模成功。

细胞移植后 4、8 和 12 周,分批分组对动物进行检测。在抗心肌特异的肌动蛋白抗体阳性的细胞浆绿色荧光背景下,可见有散在的 DAPI 示踪呈现蓝色荧光的细胞核,大约占左心室前壁的 35% ~ 40%,同样,在 CD31 因子相关抗原抗体阳性的微血管内皮中也可见到 DAPI 示踪植入的干细胞,此结果表明新生成的心肌和血管是由骨髓干细胞分化而来的。DAPI 示踪的细胞核数量随时间的推移逐渐减少,其原因有多种<sup>[7,8]</sup>:可能是心脏缺血缺氧的微环境不利于移植细胞的存活,也可能是机体本身的炎症和免疫反应对移植细胞的排斥,以及细胞间生存信号的丢失,导致移植细胞的死亡。移植细胞死亡率最高是发生在细胞移植后 24 h 内,1 周时细胞死亡趋于稳定,此后细胞仍有少量持续死亡,至 12 周时,细胞存活率为 15%,绝大多数存活细胞在受损心肌中定向分化,随时间的推移,分化速度趋于平缓,持续改善心功能。

在移植组细胞移植区域,见到类心肌细胞团、明显的新生血管以及心肌特异性肌动蛋白和功能性结蛋白;电镜下见到不成熟的心肌细胞及内膜不完整

的新生血管,说明在由骨髓血管内皮前体细胞分化的外源性新生血管及干细胞分泌的细胞因子促进的内源性再生血管组成的心脏微环境中,植入的 MB-MC 分化成了心肌样细胞,增加了有效心肌数目和毛细血管密度,降低肥厚心肌的细胞凋亡,减少胶原形成,有效修复了变性坏死的心肌组织,限制了重构。并且这些新生组织随着时间的推移(4、8、12 周)而增多,趋向成熟,同时动物的一般形态和活动情况也逐渐接近正常大鼠,存活率 100%,移植远期效果明显。

而对照组和假手术组在术后不同时间出现了形态和行为异常,甚至死亡,分析原因为慢性心力衰竭逐渐加重最终导致的心力衰竭,病理检测可见心肌纤维坏死呈灶状,多而密集,心肌细胞肿胀,横纹不清,溶解消失,心肌细胞基本结构紊乱。

本实验表明,通过 MBMC 移植确可在慢性心力衰竭大鼠变性坏死心肌组织区见到心肌及血管组织的新生,均来源于移植的细胞,且在移植后长时间内没有出现新的心肌缺血损害、炎症反应和恶性心律失常,持续修复受损心肌,远期效果明显。这种治疗方法将为临床上治疗慢性心力衰竭提供一个新的治疗手段。

#### [参考文献]

- [1] Teerlink JR, Pfeffer JM, Pfeffer MA. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res*, 1994, **75**: 105-113
- [2] Vulliamy PR, Greeley M, Halloran SM, Mac Donal KA, Kittleson MD. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cell and microinfarction in dogs. *Lancet*, 2004, **363** (9411): 783-784
- [3] Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M. Mesenchymal stem cell can be differentiated into endothelial cell in vitro. *Stem Cell*, 2004, **22**: 377-384
- [4] Szilvassy SJ, Bass MJ, Zant GV, Grimes B. Organ selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cell and is compromised by ex vivo expansion. *Blood*, 1999, **93**: 1557-566
- [5] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Pickel J, et al. Bone marrow cell regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, **410**: 701-705
- [6] 李为民,田颖,孔一慧,甘润韬,孙桂芳,沈景霞,等. 异丙基肾上腺素致大鼠心力衰竭模型的实验研究. 哈尔滨医科大学学报, 2003, **37** (5): 386-388
- [7] Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33**: 907-921
- [8] Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (2): 107-116

(此文编辑 朱雯霞)