

转染人血管内皮生长因子 165 基因的骨髓间充质干细胞移植改善兔心肌梗死后心功能

盛小刚¹, 宋 卉², 冯建章³, 陈秋雄¹, 吴书林³

(1. 广东省中医院心脏中心, 广东省广州市 510105; 2. 汕头大学医学院药理学教研室, 广东省汕头市 515031;

3. 广东省心血管病研究所, 广东省广州市 510080)

[关键词] 内科学; 心肌梗死; 骨髓间充质干细胞; 血管内皮生长因子; 心功能; 基因治疗; 兔

[摘要] 目的 探讨将骨髓间充质干细胞移植和血管内皮生长因子基因治疗相结合治疗兔心肌梗死的疗效及其机制。方法 将 48 只新西兰大白兔随机分为心肌梗死组、骨髓间充质干细胞移植组、血管内皮生长因子组和骨髓间充质干细胞+血管内皮生长因子组。建立兔心肌梗死模型, 在心肌梗死后 2 周取 10^7 个骨髓间充质干细胞移植至梗死区。移植后 4 周测定心功能, 梗死区骨髓间充质干细胞进行鉴定及计数, 进行 (1) 因子免疫组织化学染色。结果 血流动力学比较发现, 骨髓间充质干细胞+血管内皮生长因子组各项参数明显优于骨髓间充质干细胞组; 心肌梗死区 BrdU 阳性细胞数骨髓间充质干细胞+血管内皮生长因子组明显多于骨髓间充质干细胞组 (61.24 ± 8.51 个/视野比 44.21 ± 7.68 个/视野, $P < 0.01$); 梗死区血管的数量骨髓间充质干细胞+血管内皮生长因子组 (48.75 ± 7.96 个/视野) 明显多于骨髓间充质干细胞组 (33.08 ± 6.12 个/视野, $P < 0.01$)、血管内皮生长因子组 (29.98 ± 8.04 个/视野, $P < 0.01$) 和心肌梗死组 (18.32 ± 3.88 个/视野, $P < 0.01$)。结论 转染血管内皮生长因子基因的骨髓间充质干细胞移植可改善兔心肌梗死后的心功能, 其疗效明显优于单纯骨髓间充质干细胞移植及血管内皮生长因子基因治疗, 可能是通过增加骨髓间充质干细胞的存活及改善梗死区的血供而起作用的。

[中图分类号] R542

[文献标识码] A

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation Combined with Vascular Endothelial Growth Factor 165 Gene Transfection Improved Heart Function After Myocardial Infarction in Rabbits

SHENG Xiaogang¹, SONG Hui², FENG Jian Zhang³, CHEN Qiu Xiong¹, and WU Shu Lin³

(1. Department of Cardiology, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510105; 2. Department of Pharmacology, Shantou University Medical College, Shantou 515031; 3. Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell; Vascular Endothelial Growth Factor; Gene Transfection; Heart Function; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To treat myocardial infarction (MI) with bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) transplantation combined with vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy in rabbits and to study its mechanisms. **Methods** Forty-eight rabbits were randomly divided into MI group ($n = 12$), MSC group ($n = 12$), VEGF group ($n = 12$), MSC+ VEGF group (M+ V group, $n = 12$). Rabbit myocardial infarction models were founded by the ligation of left anterior descending artery. 10^7 MSC were injected into the infarct zone in four sites 2 weeks later in MSC and M+ V group. phVEGF gene were injected in infarct zone in VEGF group and MSC transfected with phVEGF gene were injected in M+ V group. Heart function including LVEDP, LVSP, LVDP, $-dp/dt_{max}$, $+dp/dt_{max}$, were measured in vivo. The hearts were harvested at 4 weeks after transplantation and sectioned for HE stain, immunohistochemical stain of BrdU and (1) factor antigen. **Results** The left ventricular hemodynamics parameters showed that heart function were improved more in M+ V group than MSC group, MI group and VEGF group. The numbers of BrdU positive cell in M+ V group (61.24 ± 8.51) were more than in MSC group (44.21 ± 7.68 , $P < 0.01$). The numbers of vessels in infarcted zone were more in M+ V group (48.75 ± 7.96) than in MSC group (33.08 ± 6.12 , $P < 0.01$), VEGF group (29.98 ± 8.04 , $P < 0.01$) and MI group (18.32 ± 3.88 , $P < 0.01$). **Conclusions** VEGF gene transfected MSC transplantation could improve heart function after myocardial infarction, and they were more effective than sole MSC transplantation. Keeping more MSC survival and ameliorating the blood supply of infarct zone might be involved in the mechanisms.

[收稿日期] 2006-01-06

[修回日期] 2006-07-10

[作者简介] 盛小刚, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病介入治疗, 联系电话为 020-87351238-63221, E-mail 为 shengxiaogang1@sina.com.cn。宋卉, 博士, 副教授, 研究方向为心血管药理研究, 联系电话为 0754-8900432。冯建章, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病研究, 联系电话为 020-83827812。

近年研究证实骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 移植可改善心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 后心功能^[1,2], 但将 MSC 注射至心肌梗死区后, 由于梗死区血供差, 不利于 MSC 的存活, 因此增加梗死区血供不仅有利于 MSC 的存活, 还可改善梗死区的血运重建。研究证实, MSC 作为基因治疗理想的靶细胞^[3], 有可能将细胞工程与基因治疗完美结合, 从而具有广阔的应用前景。本研究已证实血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因能成功转染 MSC 中并获得稳定表达, 表达的 VEGF 具有生物活性^[4]。本实验拟进一步观察其自体细胞移植与基因治疗相结合治疗心肌梗死的疗效, 并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

低糖 DMEM (Gibco 产品); 胎牛血清 (四季青公司产品); Percoll 分离液 (Pharmacia 产品); 即用型第 2 代免疫组织化学 Elivision™ plus 广谱试剂盒 (福州迈新生物技术开发公司产品); BrdU (5-Bromo-2'-deoxy-uridine, Sigma 产品); (11)因子多克隆抗体及免疫组织化学检测试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); BrdU 单克隆抗体及 BrdU 检测试剂盒 (Roche 产品); AdTrackCMV-VEGF165 真核表达质粒 (由广东省人民医院中心实验室惠赠)、Taq 酶、引物合成 (上海生工)、限制性内切酶 (华美公司)、T4 连接酶 (大连华运公司)、Gel Extraction 试剂盒 (GIBCOL)、质粒提取试剂盒 (QIAGEN)、LIPOFECTAMINE™ 2000 reagent (GIBCOL)。

1.2 动物及分组

健康纯种新西兰大白兔 48 只, 雌雄不拘, 体重 2.0~2.5 kg, 兔龄 4~5 月, 由岭南科研动物中心提供。将兔随机分为 4 组: ①心肌梗死组 (MI 组): 12 只, 心肌梗死 2 周后在梗死区注射生理盐水; ②MSC 移植组 (MSC 组): 12 只, 行心肌梗死模型 2 周后在梗死区注射 10^7 个 MSC; ③VEGF 组: 12 只, 心肌梗死 2 周后于梗死区注射 VEGF 基因 (100 μ g 溶于 200 μ L PBS 中); MSC+VEGF 组 (M+V 组): 12 只, 心肌梗死 2 周后于梗死区注射 10^7 个转染 VEGF 基因的 MSC。在移植前 3 天进行 VEGF 基因转染。

1.3 兔心肌梗死模型的建立

结扎左前降支中段制作心肌梗死模型^[4]。

1.4 兔骨髓干细胞的分离及培养

于胫骨近端抽取骨髓血约 4~6 mL, 应用 Percoll

分离液 (1.073 kg/L) 离心提取 MSC, 用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 进行培养。在移植前 6 天用 BrdU 对细胞进行标记。

1.5 质粒的制备及转染^[5]

将质粒 pUC19-VEGF165 和含绿色荧光蛋白的真核表达质粒 pAdTrackCMV 分别用 HindⅢ和 SalⅠ双酶切, 回收纯化目的基因片段 VEGF165 和线性化的质粒 pAdTrackCMV, 两者用 T4DNA 连接酶连接。将产物转化大肠杆菌 DH5 α , 用 100 mg/L 卡那霉素进行筛选。挑阳性克隆, 提取质粒分别用 HindⅢ和 SalⅠ酶切, 进行鉴定筛选。鉴定后进行扩增, 微柱法提取质粒, 乙醇沉淀法纯化质粒, 用 TE 溶解后 -80℃ 保存备用。在细胞移植前 3 天应用阳离子脂质体 LIPOFECTAMINE™ 2000 reagent 介导的 VEGF 基因转染, 按说明书进行操作。

1.6 骨髓间充质干细胞移植

在心肌梗死后 2 周行 MSC 移植。取 10^7 个细胞, 以 200 μ L PBS 溶解, 置于 4℃ 待用。开胸后在结扎点下左心室游离壁心脏搏动弱区用 4.5 号针注射 MSC 各 50 μ L 共 4 个点。

1.7 血流动力学指标测定

在移植后 4 周进行心功能测定。经颈动脉插管至左心室, 测定心率 (HR)、左心室平均收缩压 (LVSP)、舒张期末压 (LVEDP)、心室发展压 (LVDP) 及左心室压最大上升速率 (+dp/dtmax) 和最大下降速率 (-dp/dtmax)。

1.8 免疫组织化学分析

1.8.1 疤痕区 MSC 的鉴定及计数 取切片行 BrdU 免疫组织化学染色。每只兔取 4 个注射区切片各 2 张, 每张切片在 400 倍显微镜下取 5 个视野, 计算 BrdU 阳性染色细胞数作为 MSC 数目, 取平均值作为该兔 MSC 数目。BrdU 免疫组织化学染色按试剂盒 SABC 法进行染色。

1.8.2 梗死区 (11)因子免疫组织化学染色及计数

按试剂盒 SABC 法进行染色。每只兔取 4 个注射区切片各 2 张, 每张切片在 40 倍显微镜下计算视野内的阳性染色细胞数作为血管数, 取其平均值作为该兔血管数目。

1.9 统计学处理

所有数据采用统计软件 SPSS11.0 进行处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数的比较采用 *t* 检验, 计数资料以卡方检验进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 各组兔死亡率的比较

至实验结束,MI 组死亡 5 只(41.7%),MSC 组死亡 2 只(16.7%),VEGF 组死亡 4 只(33.3%),M+V 组死亡 2 只(16.7%),共死亡兔 13 只,各组间死亡率无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 各组兔左心室功能的比较

实验第 6 周,MI 组与 VEGF 组比较左心室功能各指标均差异无显著性。LVDP 在 M+V 组和 MSC

组明显低于 MI 组($P < 0.01$),M+V 组低于 MSC 组($P < 0.05$)。LVSP 在 M+V 组和 MSC 组明显高于 MI 组($P < 0.01$),M+V 组明显高于 MSC 组($P < 0.05$)。LVDP 在 M+V 组和 MSC 组明显高于 MI 组($P < 0.01$),M+V 组明显高于 MSC 组($P < 0.05$)。+dp/dtmax 和 -dp/dtmax 在 MSC 组和 M+V 组明显高于 MI 组($P < 0.01$),M+V 组高于 MSC 组($P < 0.05$)(表 1)。

表 1. 各组兔左心室血流动力学的比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	LVDP (mmHg)	LVSP (mmHg)	LVDP (mmHg)	+ dp/dtmax (mmHg/s)	- dp/dtmax (mmHg/s)
MI 组 ($n=7$)	9.84 \pm 0.82	82.13 \pm 5.20	75.05 \pm 4.41	2 608 \pm 278	1 572 \pm 175
MSC 组 ($n=10$)	6.11 \pm 1.03 ^a	95.42 \pm 10.37 ^a	88.17 \pm 4.55 ^a	3 210 \pm 286 ^a	2 258 \pm 298 ^a
VEGF 组 ($n=8$)	8.97 \pm 1.12	86.11 \pm 8.45	78.83 \pm 4.87	2 756 \pm 246	1 740 \pm 221
M+V 组 ($n=10$)	5.12 \pm 0.87 ^{ab}	99.82 \pm 8.04 ^{ab}	94.92 \pm 8.51 ^{ab}	3 520 \pm 309 ^{ab}	2 544 \pm 262 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与 MI 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 MSC 组比较。

2.3 梗死区骨髓间充质干细胞的鉴定及计数

心肌梗死区见 BrdU 阳性细胞存在。M+V 组(61.24 \pm 8.51 个/视野)存活的 MSC 明显多于 MSC 组(44.21 \pm 7.68 个/视野)($P < 0.01$)(图 1)。

2.4 梗死区血管数量的比较

心肌梗死组梗死区血管数量明显少于 VEGF 组(18.32 \pm 3.88 个/视野比 29.98 \pm 8.04 个/视野, $P < 0.01$);MSC 组(33.08 \pm 6.12 个/视野)明显多于 MI 组($P < 0.01$);M+V 组(48.75 \pm 7.96 个/视野)明显多于 MSC 组($P < 0.01$)、VEGF 组($P < 0.01$)和 MI 组($P < 0.01$)(图 2)。

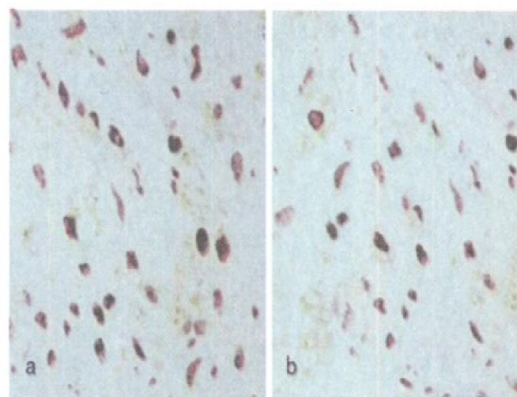


图 1. 梗死区骨髓间充质干细胞 BrdU 免疫组织化学染色($\times 400$) a 为 M+V 组, b 为 MSC 组。

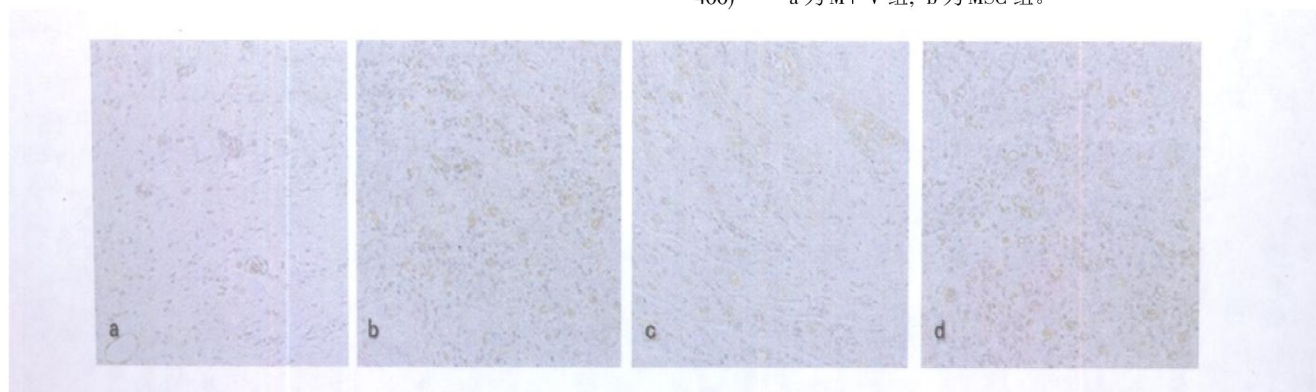


图 2. 梗死区血管数量 CD31 因子免疫组织化学染色($\times 40$) a 为 MI 组, b 为 MSC 组, c 为 VEGF 组, d 为 M+V 组。

3 讨论

本研究结果表明血管内皮生长因子(VEGF)基

因治疗与 MSC 移植相结合可改善兔心肌梗死后心功能,其疗效明显优于单纯 MSC 移植。

血管内皮生长因子是一种高度特异性的、强烈的血管内皮细胞促分裂因子和血管生成因子。研究证实, VEGF 基因治疗缺血性心脏病有良好疗效。Isner 实验室相继报道用 VEGF 质粒 DNA 经球囊导管给药或直接注射给药治疗动物或人的缺血性疾病的研究结果^[6]。本研究中 VEGF 组将 VEGF 基因裸质粒直接注射入梗死区, 发现其梗死区也有新生血管增多, 但却对心功能无明显改善, 可能是其虽有新生血管的增生, 但尚不足以改善大面积心肌梗死后的心功能。但对 VEGF 质粒的治疗剂量需多大才能产生疗效尚不清楚, 过大剂量可能引起相关副作用。Kloner 等^[7]将在大鼠左心室游离壁 4 个位点注射 125 μg phVEGF165, 未见梗死面积缩小和心功能改善, 注射 500 μg phVEGF165 则有效。本研究中将 100 μg VEGF 质粒注射至兔心肌梗死区, 也未见其心功能得到改善。VEGF 基因裸质粒治疗心肌梗死尚需进一步探讨。

目前正开展将细胞性心肌成形术和基因治疗相结合治疗缺血性心脏病的研究。多数研究是通过对移植细胞转染具有血管新生作用的基因, 从而达到促进移植细胞存活、增加血液灌注和改善心功能的目的。研究证实: 通过将 VEGF 基因转染大鼠骨骼肌成肌细胞^[8]、H9C2 肌母细胞株^[9]或者胚胎干细胞分化出来的细胞^[10], 再将细胞移植至心肌梗死区, 均发现梗死区血管明显增多, 心功能改善。

目前已有大量 MSC 移植治疗心肌梗死的研究^[1,2], 但尚未见骨髓干细胞与基因转染相结合治疗心肌梗死的报道。本研究已证实 VEGF 基因能成功转染 MSC 中并获得稳定表达, 表达的 VEGF 具有生物活性^[5], 田竞等^[11]也报道了 VEGF 基因在兔骨髓基质细胞中的成功表达。本实验进一步研究了转染 VEGF 基因的 MSC 移植对心肌梗死后心功能的影响, 发现其对心功能的改善明显优于单纯 VEGF 或 MSC 移植组, 在梗死区存活的 MSC 和新生血管数明显增多。说明将细胞移植和基因治疗相结合可能是治疗缺血性心脏病的更佳方案。Yau 等^[12]研究发现转染 VEGF165 基因的心肌细胞移植后尽管毛细血管密度显著增加, 局部血流及左心室血液灌注改善, 但对心功能的改善转染组和未转染组差异无显著

性, 考虑因冷冻损伤区疤痕多, 无冬眠心肌存活, 血供的改善并不能进一步改善心室功能。本研究发现 M+V 组心功能优于 MSC 组, 可能是缺血区血供的改善使冬眠心肌功能恢复, 从而心功能得到进一步改善。

转染 VEGF 基因的 MSC 移植可明显改善兔心肌梗死后的心功能, 其效果优于单纯基因治疗或细胞移植, 其机制可能与增加移植细胞的存活率及改善梗死区血供有关。关于移植细胞的数量和基因转染的方法和剂量等尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, **123** (6): 1 132-140
- [2] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, **73** (6): 1 919-925
- [3] Caplan AL. Mesenchymal stem cell and gene therapy [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2000, (379 Suppl): S67-70
- [4] 张嘉宁, 顾为望, 许乙凯. 结扎冠状动脉前降支与左心室支的急性心肌梗死比较[J]. *中国实验动物学报*, 1997, **5** (2): 103-107
- [5] 盛小刚, 冯建章, 吴书林, 靳力军, 余细勇, 张斌. 骨髓间充质干细胞的肌源性诱导分化及转染 VEGF 基因的表达[J]. *第一军医大学学报*, 2004, **24** (3): 290-294
- [6] Henry TD, Rochar Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease [J]. *Am Heart J*, 2001, **142** (5): 872-880
- [7] Kloner RA, Dow J, Chung G, Kedes LH. Intramyocardial injection of DNA encoding vascular endothelial growth factor in a myocardial infarction model [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2000, **10** (3): 285-289
- [8] Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, Sammut LA, Suzuki N, Kaneda Y, et al. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor expressing skeletal myoblasts [J]. *Circulation*, 2001, **104** (12 Suppl 1): I207-212
- [9] Sugimoto T, Inui K, Shimazaki Y. Gene therapy for myocardial angiogenesis: with direct intramuscular gene transfer of naked deoxyribonucleic acid encoding vascular endothelial growth factor and cell transplantation of vascular endothelial growth factor transfected H9C2 myoblast [J]. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, **51** (5): 192-197
- [10] Yang Y, Min JY, Rana JS, Ke Q, Cai J, Chen Y, et al. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cell [J]. *J Appl Physiol*, 2002, **93** (3): 1 140-151
- [11] 田竞, 马保安, 范清宇, 张鹏. 转染逆转录病毒的 VEGF 在兔骨髓基质干细胞内的表达[J]. *第四军医大学学报*, 2003, **24** (24): 2 262-265
- [12] Yau TM, Fung K, Weisel RD, Fujii T, Mickle DA, Li PK. Enhanced myocardial angiogenesis by gene transfer with transplanted cell [J]. *Circulation*, 2001, **104** (12 Suppl 1): I218-222

(此文编辑 朱雯霞)