

[文章编号] 1007-3949(2008)16-10-0813-06

• 实验研究 •

骨髓间充质干细胞移植对心肌缺血/再灌注大鼠心肌胶原与血管新生的影响

李贺¹, 周欣¹, 舒珺², 叶帆¹, 任宁², 黄体钢², 李玉明¹

(1. 武装警察医学院附属医院, 武警部队心血管病研究所, 天津市 300162

2. 天津医科大学, 天津心血管病研究所, 天津市 300211)

[关键词] 病理学与病理生理学; 间充质干细胞; 心肌缺血/再灌注; 心肌梗死; 心肌胶原; 血管新生

[摘要] **目的** 通过心肌缺血/再灌注模型观察大鼠骨髓间充质干细胞心肌移植对心肌细胞外胶原、小血管新生和心功能变化的影响, 并探讨其机制。**方法** 分离、原代培养 Wistar 大鼠骨髓间充质干细胞, 建立缺血/再灌注动物模型, 分为假手术组、心肌梗死+骨髓间充质干细胞移植组、心肌梗死对照组, 观察骨髓间充质干细胞移植后动物模型血流动力学指标、心肌梗死面积和心肌细胞形态、心肌间质、血管密度、心室膨展指数、心肌细胞横截面积和心肌胶原变化。**结果** (1)骨髓间充质干细胞心肌移植可缩小 60 min 缺血/再灌注大鼠 28 d 心肌梗死面积; (2)骨髓间充质干细胞移植可减轻心肌梗死动物左心室重塑, 但心功能改善作用不明显; (3)骨髓间充质干细胞移植发挥细胞外基质抑制、促血管生成作用, 心肌间质胶原含量、胶原分数下降, 心肌毛细血管、小动脉密度增加。**结论** 骨髓间充质干细胞移植可改善心肌梗死后心室重塑、促进血管新生和降低心肌胶原作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Intramyocardial Injection of Mesenchymal Stem Cells on Myocardial Collagen and Angiogenesis in Rats with Reperfused Acute Myocardial Infarction

LI He¹, ZHOU Xin¹, SHU Jun², YE Fan¹, REN Ning², HUANG Ti-Gang², and LI Yu-Ming¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease of CAPF, Cardiovascular Division of Department of Geriatric Medicine of Pingjin Hospital, Medical College of CAPF, Tianjin 300162, China; 2. Tianjin Institute of Cardiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[KEY WORDS] Mesenchymal Stem Cells; Myocardial Ischemia-Reperfusion; Myocardial Infarction; Myocardial Collagen; Angiogenesis

[ABSTRACT] **Aim** To examine the effects of mesenchymal stem cells (MSC) intramyocardial injection after infarction on extracellular collagen matrix (ECM), angiogenesis in ischemic myocardium and left ventricular function in ischemia-reperfused rats. **Methods** We created infarction in rat by ligating coronary anterior descending branch for 60 min and reperfused administered DAPI-labeled allogeneic bone MSC intramyocardial injection before reperfusion and measured vessel density, cross-sectional area of viable myocardium, indexes of expansion and left ventricular remodeling, collagen volume fraction, and hemodynamic parameters at 7 and 28 days post-surgery. **Results** The infarct size were reduced and indexes of remodeling attenuated significantly, but without apparent improvement of ventricular function at 28 days post-MSC injection. DAPI was found in infarct and peri-infarct myocardium, some of them were vWF and α -SMA positive, which suggested that MSC might differentiate into smooth muscle cells and endothelial cells, result in increasing the vessel density in periphery region of infarction and reducing collagen profile. **Conclusions** In an ischemia-reperfusion rat model, MSC myocardial transplanted differentiated into vessel smooth muscle and endothelial cells, increased vascularity and therefore reduced infarct size and ECM, but without improving cardiac function.

骨髓干细胞心肌移植治疗心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 近年来受到广泛关注, 进行了大量实验研究和临床研究, 但目前疗效仍未达到理想的

程度。干细胞移植心肌分化、修复和归巢作用机制等仍未完全阐明, 解决这些问题对提高修复疗效意义重大^[1]。心肌损伤修复过程中, 除心肌细胞重塑、再生等变化外, 心肌细胞外胶原基质 (extracellular collagen matrix, ECM) 重塑对心功能维持及减退也具有重要意义, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 对减轻 MI 后早期心室重塑、梗死膨展有重要作用^[2-5]。ECM 与干细胞分化、心肌修复、血管生成间关系密切^[6-8], 骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 移植对心肌缺血后 ECM 变化

[收稿日期] 2008-06-24 [修回日期] 2008-10-25

[基金项目] 天津市科委自然科学基金重点项目 (05YFJZJC01602)

[作者简介] 李贺, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 主要研究方向为心脏神经分子生物学、心力衰竭机制, 联系电话为 022-60578667, Email 为 hlrtianjin@yahoo.com.cn; 周欣, 博士, 主治医师, 主要研究方向为心血管系统细胞外基质重塑。通讯作者李玉明, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 主要研究方向为盐敏感高血压、冠心病发病机制, Email 为 cardiolal@gmail.com。

有重要影响^[9, 10]。心肌再灌注治疗可早期恢复 MI 后心肌血供,对减轻心肌损伤、保护心功能极为重要。因此推测心肌再灌注联合干细胞心肌移植可能更有利于提高 MI 后心功能恢复。本实验通过心肌缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 模型观察大鼠 MSC 心肌移植对心肌细胞外胶原、小血管新生和心功能变化的影响,并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 75 只, 8~10 周龄, 体重 200~250 g (军事医学科学院实验动物中心), 室温 18~25℃、普通饲料、自由饮水。分为假手术组、MI 对照组和再灌注 + MSC 移植 (MSC 组) 共 3 组。

1.2 缺血/再灌注动物模型建立

大鼠以 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉, 腹腔注射阿托品 2 mg/kg 呼吸机辅助呼吸, 消毒后于胸骨左缘 1~2 mm 处剪断第 4 肋骨, 暴露心脏, 于肺动脉圆锥和左心耳交界处, 主动脉起始约 2~3 mm 处将缝合针自左心室侧穿入 (约 1/3~1/2 层心肌), 肺动脉圆锥侧穿出, 连同结扎置入的 1 cm 软胶棒 (直径为 3 mm) 及心肌后关闭胸腔。冠状动脉结扎 60 min 后开胸剪断结扎线, 逐层缝合肌肉、皮下组织及皮肤。假手术组仅开胸处理, 不结扎冠状动脉。

1.3 骨髓间充质干细胞的原代培养

4 周龄雄性 Wistar 大鼠 (100~120 g) 断颈处死, 无菌状态下暴露股骨、胫骨干骺端骨髓腔, 用不完全 DMEM/F12 (Invitrogen 公司) 培养基约 5 mL 冲洗骨髓腔至中空, 收集冲洗液 15 kr/min 离心 10 min 弃上清, 以 10% 完全 DMEM/F12 培养基重悬细胞。计数活细胞后, 调整活细胞浓度为 $(1\sim 5) \times 10^7 / \text{cm}^2$, 接种于 25 cm² 培养瓶中, 37℃、5% CO₂、95% 湿度细胞培养箱中培养; 分别于 24 h、48 h 换半量、全量培养基, 弃去未贴壁悬浮细胞, 后每 3 天换半量培养基; 待细胞汇合至 70%~80%, 弃去培养基, 用不完全 DMEM/F12 培养基冲洗, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 镜下见细胞变圆, 部分脱壁, 终止消化, 吹打使所有细胞脱壁, 15 kr/min 离心细胞悬液; 弃上清, 以 15% 完全 DMEM/F12 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$, 按 1:1 或 1:2 比例传代培养^[10]。取第 3、4 代 MSC, 加入细胞核染料 DAPI 工作液 3 mL, 37℃ 孵育 30 min 弃 DAPI 工作液, PBS 洗涤后, 以不完全 DMEM/F12 孵育细胞。移植前, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 15 kr/min

离心细胞悬液 10 min, 不完全 DMEM/F12 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^{10} / \text{L}$ 。

1.4 骨髓间充质干细胞心脏移植

心肌再灌注前于左心室前壁 MI 周边 5 点注射, MI 对照组注射不完全 DMEM/F12 培养基 100 μL; MSC 组注射 MSC $1 \times 10^{10} / \text{L}$, 每只 100 μL。

1.5 血流动力学检测

术后 28 d 各组存活动物麻醉、消毒后分离右侧颈总动脉, 4-0 丝线结扎颈动脉远心端, 近心端切开将 2F Millar 压力导管送至主动脉内, 连接 MP150 16 导生理仪测定主动脉收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)、左心室舒张期末压 (left ventricle end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室内压力最大上升、下降速率 ($+ dp/dt_{\text{max}}$ 及 $- dp/dt_{\text{max}}$)。

1.6 心脏组织学检测

大鼠分别于术后 7 d 处死用于心肌组织学分析, 术后 28 d 检测血流动力学变化后处死用于组织学分析。检测血流动力学后, 动物称重, 开胸从主动脉根部离断取出心脏, 沿冠状动脉沟分离心房和心室, 分别吸干后称重; 切除左心室心尖和心底部各约 2 mm 厚心肌, 将剩余左心室垂直于左心室长轴横切为上下两部分, 心肌组织常规固定。

1.7 心肌组织染色

心肌石蜡包埋, 5 μm 切片, 每个标本取 10 张切片铺于包被多聚赖氨酸载玻片上, 60℃ 烤片 4~6 h, 分别苏木素-伊红、苦味酸-天狼猩红染色^[11]和血管假血友病因子 (von Willebrand factor, vWF)、α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, α-SMA)、麦胚凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA) 免疫荧光染色^[12, 13]。

1.8 心肌组织图像分析

于 10 倍视野下, 用 Image Pro Plus 4.5 图像分析软件测定。(1) 游离壁 MI 区厚度: 随机选取 5~6 个完全包含 MI 区游离壁自心内膜至心外膜的区域, 计算平均厚度。(2) MI 范围: $\text{MI 范围} = (\text{MI 区心内膜长度} + \text{MI 区心外膜长度}) / (\text{左心室心内膜周长} + \text{左心室外膜周长})$ 。(3) 心室膨展指数: $\text{膨展指数} = (\text{左心室心腔面积} / \text{左心室面积}) \times (\text{室间隔厚度} / \text{游离壁 MI 区厚度})$ 。(4) 心肌细胞横截面积: 荧光显微镜 (Nikon 80i) 400 倍视野下, 室间隔细胞外基质 WGA 染色阳性区域内, 随机选取 5 个胞膜完整、胞核位于胞膜中间圆形的心肌细胞, 计算心肌细胞横截面积。(5) 心肌胶原分析: 偏振光显微镜 (Nikon E600POL) 200 倍视野下分别扫描 MI 区和

室间隔进行天狼猩红染色病理图像,每个区域随机选取 5 个视野,分析图像后直接或间接得出以下指标:胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF) = 胶原总面积 / 图像总像素数,代表胶原在所测组织中相对含量;胶原成熟程度 = (红色胶原总面积 + 橙色胶原总面积) / (黄色胶原总面积 + 绿色胶原总面积),代表所测组织中胶原成熟程度;用像素数表示红色胶原、橙色胶原、黄色胶原及绿色胶原总面积^[11, 14]。(6)动脉密度:荧光显微镜 200 倍视野下,距 MI 边缘 2 mm 内随机选取 5 个视野,测量视野面积 (A),计数视野中 α -SMA 染色阳性、外直径 5~50 μ m 小动脉 (N),小动脉密度 (arterioles density, AD) = N / A;用 α -SMA 作为平滑肌细胞标志物检测 MI 区及周边小动脉及密度。选取外直径在 5~50 μ m、环形阳性区域为小动脉判断标准^[13]。(7)毛细血管密度:荧光显微镜 400 倍视野下,距 MI 边缘 2 mm 内随机选取心肌和毛细血管,5 个横切视野,测量视野面积 (A),计数视野中 wWF 染色阳性、

外直径 < 5 μ m 的毛细血管 (N),毛细血管密度 (capillary density, CD) = N / A^[13]。

1.9 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布计量资料用单因素方差分析及成组设计 *t* 检验,方差齐时组间两两比较用 LSD 法,方差不齐时用 Games-Howell 法。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组模型大鼠术后体重、心脏重量变化

各组大鼠术后 7 d、28 d 处死,体重、心室重量变化不明显,差异无显著性(表 1)。

2.2 血流动力学指标

术后 28 d 各组主动脉收缩压、舒张压差异无显著性,与假手术组比较,MI+MSC 移植组左心室 + dp/dt_{max} 与 - dp/dt_{max} 降低、LVEDP 增高 ($P < 0.05$)。

表 1. 各组动物体重、左心室重量 / 体重

分 组	术后 7 d			术后 28 d		
	n	体重 (g)	左心室重量 / 体重 (g/kg)	n	体重 (g)	左心室重量 / 体重 (g/kg)
假手术组	6	260.00 ± 14.14	2.86 ± 0.21	6	330.00 ± 17.89	2.88 ± 0.24
MI 对照组	6	228.33 ± 29.94	3.24 ± 0.51	6	289.00 ± 35.73	3.17 ± 0.29
MSC 组	5	235.00 ± 42.62	2.83 ± 0.58	6	301.67 ± 17.68	3.23 ± 0.46

表 2 血流动力学指标比较

分 组	n	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	+ dp/dt _{max} (mmHg/s)	- dp/dt _{max} (mmHg/s)	LVEDP (mmHg)
假手术组	6	125.78 ± 1.88	93.09 ± 1.77	16442.05 ± 360.31	- 10649.65 ± 219.75	- 3.36 ± 1.03
MI 对照组	6	130.70 ± 9.18	101.93 ± 9.99	9677.68 ± 1727.49 ^a	- 7769.76 ± 1246.28 ^a	1.49 ± 4.28 ^a
MSC 组	6	132.20 ± 13.40	106.20 ± 18.09	10575.10 ± 62.93 ^a	- 8302.60 ± 1201.83 ^a	2.11 ± 2.89 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较。

2.3 心肌组织病理学分析

2.3.1 骨髓间充质干细胞心肌移植后示踪

观察到术后 7 d 和 28 d 移植 MSC 主要分布于 MI 区内及周边(图 1),部分 DAPI 标记阳性 MSC 表达 wWF 或 α -SMA(图 2)。

2.3.2 左心室横断面梗死范围变化 MI 对照组多为透壁性 MI 累及室壁厚度超过 50%; MSC 移植组 MI 范围限于中层心肌,心内膜下和心外膜下均可见岛状存活心肌。术后 7 d MI 组和 MSC 组 MI 范围相近 ($P > 0.05$), 术后 28 d MSC 组 MI 范围无明显变化,明显小于 MI 组 ($P < 0.05$), 后者 MI 范围

较前扩大 ($P < 0.05$, 表 3 和图 3)。

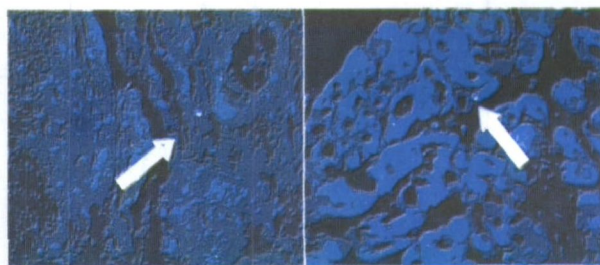


图 1 骨髓间充质干细胞心肌内移植后的分布 ($\times 400$)
A 为 DAPI 标记 MSC 阳性位于 MI 区内, B 为 DAPI 标记 MSC 阳性位于 MI 周边, 蓝色为 DAPI(细胞核染色)。

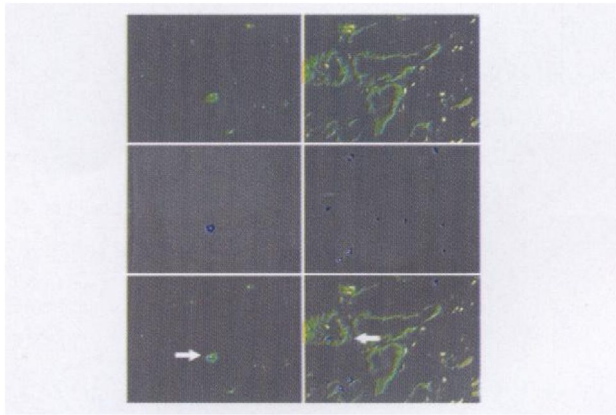


图 2 骨髓间充质干细胞心肌内移植后分化为内皮细胞或平滑肌细胞 (×400) 左图显示 MSC 心肌内移植后分化为内皮细胞, 参与毛细血管形成 (箭头所指), 左上为 wWF(内皮细胞染色, 绿色), 左中为 DAPI(细胞核染色, 蓝色), 左下为左上和左中叠加后图像; 右图显示 MSC 心肌内移植后分化为平滑肌细胞, 参与小动脉形成 (箭头所指), 右上为 α-SMA(平滑肌细胞染色, 绿色), 右中为 DAPI(细胞核染色, 蓝色); 右下为右上和右中叠加后图像。

2 3 3 左心室心肌梗死区室壁厚度、膨展指数比较

术后 7 d 与假手术组比较, MSC 移植组 M I 区室壁厚度以及膨展指数无显著变化, 而 M I 对照组 M I 区室壁厚度减小、膨展指数增大 ($P < 0.05$); 术后 28 d M I 对照组膨展指数比术后 7 天增大, 而 MSC 组室壁厚度、膨展指数无明显变化 (表 3)。

2 3 4 非梗死区心肌细胞横截面积比较

术后 7 d 28 d M I 组心肌细胞横截面积 (cross sectional area CSA) 明显高于假手术组和 MSC 组 ($P < 0.05$), 而 MSC 组 CSA 变化不显著 ($P > 0.05$, 图 3)。

2 4 胶原分析

2 4 1 左心室梗死区胶原容积分数比较

术后 7 d 28 d M I 组、MSC 组 M I 区 CVF 均显著高于假手术组, 术后 7 d M I 组、MSC 组 CVF 差异无显著性; 术后 28 d MSC 组 CVF 小于 M I 对照组 ($P < 0.01$), 且低于术后 7 d 水平 ($P < 0.05$, 表 4)。

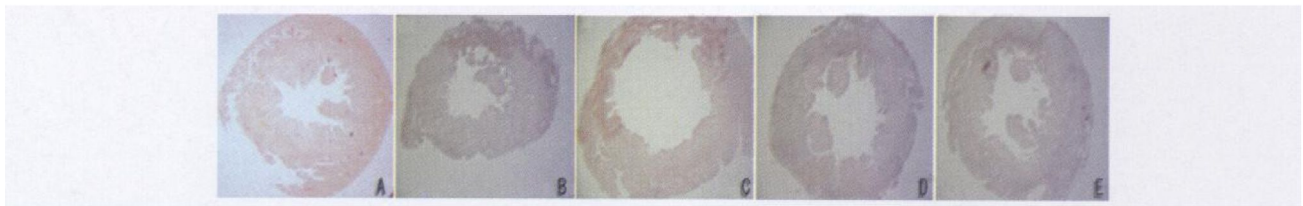


图 3 左心室横断面 (苦味酸-天狼猩红染色, ×10) A 为假手术组, B 为 M I 对照组 M I 后 7 d C 为 M I 对照组 M I 后 28 d D 为 MSC 组 M I 后 7 d E 为 MSC 组 M I 后 28 d

表 3 左心室 M I 范围、M I 区室壁厚度、膨展指数比较

分组	术后 7d				术后 28d			
	n	M I 范围	M I 区室壁厚度 (mm)	膨展指数	n	M I 范围	M I 区室壁厚度 (mm)	膨展指数
假手术组	6	—	2.41 ± 0.28	0.33 ± 0.02	6	—	2.49 ± 0.19	0.35 ± 0.04
M I 对照组	6	32.23% ± 6.74%	1.51 ± 0.47 ^a	0.44 ± 0.05 ^a	6	41.80% ± 5.21% ^d	1.44 ± 0.30 ^a	0.51 ± 0.05 ^{ad}
MSC 组	5	28.28% ± 2.26%	2.24 ± 0.41 ^b	0.29 ± 0.06 ^c	6	23.03% ± 2.89% ^{cd}	2.23 ± 0.33 ^c	0.31 ± 0.02 ^c

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 M I 对照组比较; d 为 $P < 0.05$ 与术后 7 d 比较。

2 4 2 左心室梗死区胶原成熟度比较 术后 7 d M I MSC 组 M I 区胶原成熟程度差异无显著性, 术后 28 d M I 组胶原成熟程度明显增加 ($P < 0.01$), MSC 组成熟程度无明显变化 (图 4)。

2 4 3 非梗死区胶原容积分数比较 术后 7 d 3 组间非 M I 区 CVF 差异无显著性, 术后 28 d M I 组、MSC 组 CVF 均较假手术组增高 ($P < 0.01$), 并高于术后 7 d MSC 组 CVF 升高水平低于 M I 组, 与

术后 7 d 差异无显著性 (表 4)。

2 5 心肌小血管变化

2 5 1 左心室梗死区血管假血友病因子染色结果

与假手术组比较, 术后 7 d 各组 M I 区毛细血管密度显著增大 ($P < 0.05$); MSC 组血管密度高于 M I 组 ($P < 0.05$)。术后 28 d MSC 组密度继续升高, 高于 M I 假手术组及术后 7 d ($P < 0.05$), 而 M I 组密度下降, 低于术后 7 d 水平 ($P < 0.05$, 图 5)。

表 4 室间隔心肌细胞横截面积及左室心肌梗死区、非梗死区胶原容积分数比较

分组	术后 7 d				术后 28 d			
	n	CSA (μm^2)	CVF	nM I CVF	n	CSA (μm^2)	CVF	nM I CVF
假手术组	6	404.31 ± 56.09	2.25% ± 0.25%	—	6	420.80 ± 78.03	2.42% ± 0.32%	
M I对照组	6	501.38 ± 73.44 ^a	70.58% ± 1.32%	2.35% ± 0.70%	6	518.25 ± 51.55 ^a	71.40% ± 6.44%	4.50% ± 0.78% ^d
M SC组	5	443.90 ± 47.72 ^b	63.67% ± 10.84%	2.33% ± 0.71%	6	438.74 ± 44.15 ^b	51.06% ± 5.88% ^{bc}	3.11% ± 0.80% ^{bc}

a为 $P < 0.01$ 与假手术组比较; b为 $P < 0.01$ 与 M I对照组比较; c为 $P < 0.05$ d为 $P < 0.01$ 与术后 7d 比较。nM I CVF 为非梗死区胶原分数。

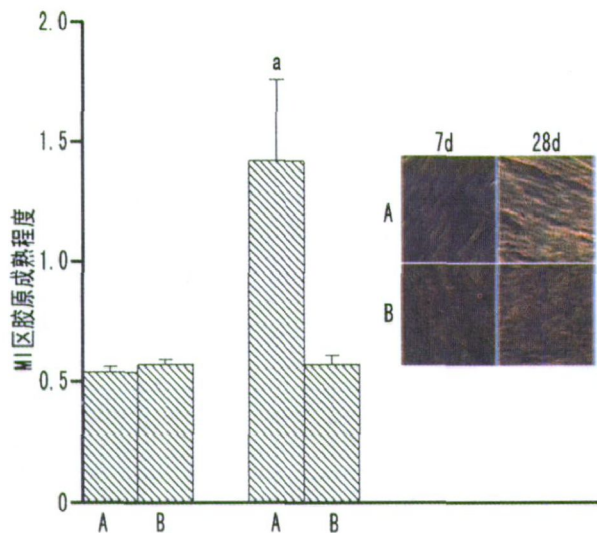


图 4 M I区胶原成熟程度的比较 ($\times 200$) A 为 M I对照组, B 为 M SC组。a为 $P < 0.05$ 与相同时间 M I组比较。

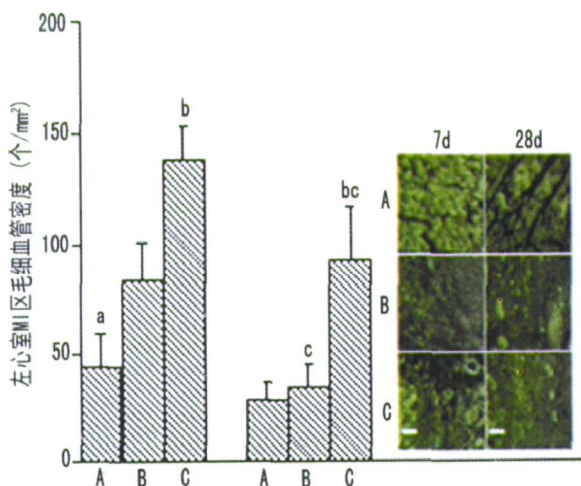


图 5 左室心肌梗死区毛细血管密度比较 ($\times 400$) A 为假手术组, B 为 M I对照组, C 为 M SC组。a为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b为 $P < 0.05$ 与相同时间 M I组比较; c为 $P < 0.05$ 与术后 7d 比较。

2.5.2 左室梗死区 α -平滑肌肌动蛋白染色结果 术后 7d M SC组小动脉密度高于 M I组 ($P < 0.05$), 均较假手术组显著增大 ($P < 0.05$), 术后 28

d观察结果与 7 d相近 (图 6)。

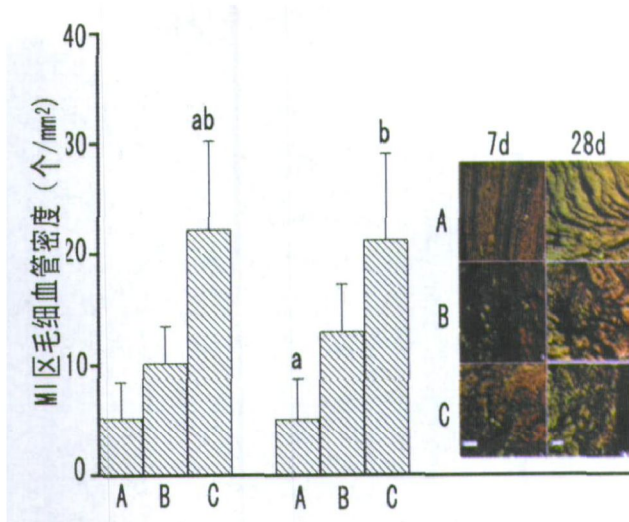


图 6 左室梗死区小动脉密度比较 ($\times 200$) A 为假手术组, B 为 M I对照组, C 为 M SC组。a为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b为 $P < 0.05$ 与相同时间 M I组比较。

3 讨论

本实验主要观察到 M SC 心肌移植可缩小 60 min 心肌 I/R 大鼠 28 d M I面积; 可减轻 M I动物左心室重塑, 但心功能改善作用不明显; 发挥 ECM 抑制、血管生成作用, 心肌间质胶原含量、胶原分数下降, 心肌毛细血管、小动脉密度增加。

本实验显示分布于 M I区及周边阳性标记的移植 M SC表达 vWF 或 α -SMA, 可能说明 M SC 分化为内皮或平滑肌细胞, 参与毛细血管、小动脉形成, 小血管密度增加, 同时 M I面积较 M I大鼠显著缩小, 提示 M SC 移植后小血管生成增加可能改善心肌灌注, 特别是 M I周边区, 并可能减轻心肌缺血性损伤、挽救存活心肌, 促进 M I心肌修复。Hu 等^[15]也观察到同样结果。与本实验相近, Silva 等^[16]给慢性冠状动脉前降支闭塞犬心肌注射 M SC (100×10^8 /L 盐水), 30 d 后观察到心肌血管密度增加、纤维化减轻, 心肌缺血区移植细胞转化为血管内皮和平滑肌细胞, 但未观察到 M SC 心肌细胞转化。Schuster

等^[17]报告,给冠状动脉结扎的裸鼠静脉注射人 2×10^6 CD34⁺ 细胞,24 h后心脏干细胞归巢 23%,2周后心脏中等(直径 0.020 ± 0.002 mm)和大毛细血管(直径 0.053 ± 0.004 mm)密度显著增加,术后15周左心室收缩功能明显改善。

MSC移植可减轻心室重塑基本一致^[15,18,19]。本实验MSC移植大鼠左心室形态,如MI区室壁厚度、膨展指数、非MI区CSA较MI大鼠显著改善,提示MSC移植改善、延缓心室重塑进程。然而,尽管本实验MSC移植大鼠MI面积明显缩小,MI后28dMI面积较非移植大鼠缩小近50%,但心功能仅轻度提高。Moelker等报告用球囊阻塞小型猪左冠状动脉回旋支2h后恢复灌注,建立再灌注MI模型,给这些动物冠状动脉内注射骨髓干细胞或单个核细胞,1周后心脏磁共振检查整体及局部心功能无明显改善,4周后MI面积显著缩小^[18]。MI面积缩小而心功能改善不明显的原因尚不清楚,也有研究观察到心功能改善但MI面积无变化^[20]。临床观察经冠状动脉自体骨髓干细胞心脏移植对急性心肌梗死患者心功能影响也不一致^[21-23]。需进一步阐明。

MI后心肌组织修复,主要以ECM,特别是胶原基质增加,即修复性纤维化为特征。心肌损伤后胶原含量增加可加强薄弱的受损部位组织强度,发挥支持和有益的代偿作用^[2-4]。本实验观察到,MI后28dMSC移植大鼠MI非MI区心肌胶原含量、成熟程度均低于MI大鼠。提示MSC移植抑制心肌纤维化。这一结果与文献报道一致^[5-9]。另外,本研究还观察到,MSC移植后胶原含量明显降低的同时小血管密度增加,提示二者间存在一定关系。

本实验使用的细胞核标记方法不能证明移植MSC存活、心肌细胞分化、功能状态等,本实验亦未观察移植细胞旁分泌细胞因子变化和对心肌修复的影响。然而,根据与I/RMI大鼠心肌组织形态、心肌胶原变化,能够说明,MSC移植可改善MI后心室重塑、促进血管新生,并发挥降低心肌胶原的作用。但其确切机制有待进一步阐明。

[参考文献]

- [1] Christoforou N, Gearhart JD. Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies [J]. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; **49** (6): 396-413
- [2] Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, et al. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window [J]. *Cardiovasc Res* 2006; **69** (3): 604-613
- [3] Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen Matrix: when is enough enough [J]? *Circulation* 2003; **108** (11): 1395-403
- [4] Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue [J]. *Cardiovasc Res* 2000; **46** (2): 250-256
- [5] Baharvand H, Azami M, Parivar K, et al. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **38** (3): 495-503
- [6] Krishnan L, Hoying JB, Nguyen H, et al. Interaction of angiogenic microvessels with the extracellular matrix [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **293** (6): H3650-658
- [7] Renault MA, Losordo DW. The matrix revolutions: matrix metalloproteinase, vasculogenesis, and ischemic tissue repair [J]. *Circ Res* 2007; **100** (6): 749-750
- [8] Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, et al. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions [J]. *FEBS Lett* 2007; **581** (21): 3961-966
- [9] Kudo M, Wang Y, Wani MA, et al. Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35** (9): 1113-119
- [10] Campagnoli C, Roberts JA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow [J]. *Blood* 2001; **98** (8): 2396-402
- [11] 周欣, 李玉明, 姬文婕, 等. 苯妥英钠促进心肌梗死后组织修复过程的实验研究 [J]. *中华心血管杂志*, 2004; **32** (4): 68-73
- [12] Gledde S, Stumpe T, Schiller H, et al. Do rat cardiac myocytes release ATP on contraction [J]? *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **289** (3): C609-C616
- [13] Dedkov EI, Christensen LP, Weiss RM, et al. Reduction of heart rate by chronic beta1-adrenoceptor blockade promotes growth of arterioles and preserves coronary perfusion reserve in postinfarcted heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **288** (6): H2684-693
- [14] 白谊涵, 李玉明, 周欣, 等. 苯妥英钠对大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增生的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (10): 743-746
- [15] Hu X, Wang J, Chen J, et al. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction [J]. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; **31** (3): 438-443
- [16] Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model [J]. *Circulation* 2005; **111** (2): 150-156
- [17] Schuster MD, Kocher AA, Sekit T, et al. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287** (2): H525-532
- [18] Moelker AD, Baks T, van den Bos EJ, et al. Reduction in infarct size, but no functional improvement after bone marrow cell administration in a porcine model of reperfused myocardial infarction [J]. *Eur Heart J* 2006; **27** (24): 3053-064
- [19] Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **290** (6): H2196-203
- [20] Boomsma RA, Swaninathan PD, Geenen DL. Intravenously injected mesenchymal stem cells home to viable myocardium after coronary occlusion and preserve systolic function without altering infarct size [J]. *Int J Cardiol* 2007; **122** (1): 17-28
- [21] Meluzin J, Janousek S, Mayer J, et al. Three-, 6-, and 12-month results of autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol* 2008; **128** (2): 185-192
- [22] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction [J]. *N Engl J Med*, 2006; **355** (2): 1199-209
- [23] Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2006; **355** (12): 1210-221

(此文编辑 李小玲)