

t-PA 基因修饰的内皮祖细胞对大鼠急性心肌梗死的治疗作用

方立, 黄钦, 黄芳, 李迎, 祁珩, 张银妆

(长沙市第一医院心血管内科二病区, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 组织型纤溶酶原激活物; 内皮祖细胞; 急性心肌梗死

[摘要] **目的** 探讨组织型纤溶酶原激活物(t-PA)基因修饰的脐血内皮祖细胞(EPCs)移植治疗对大鼠急性心肌梗死的治疗作用。**方法** 体外扩增 EPCs, 将构建的 t-PA 基因慢病毒表达载体转染脐血 EPCs, 建立大鼠心肌梗死模型, 实验随机分为 PBS 组、空载体 EPCs 组、单纯 EPCs 组和 t-PA EPCs 组。大鼠急性心肌梗死术后 3 h 开始移植治疗, t-PA EPCs 组、EPCs 组和空载体 EPCs 组静脉注射 t-PA 基因转染的 EPCs、单纯 EPCs 和空载体 EPCs。移植 4 周后, 采用心脏超声评价心脏功能及检测血浆 N 末端 B 型脑钠肽前体 (NT-Pro-BNP) 的表达水平, Western-blot 检测心肌组织中血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶 2/基质金属蛋白酶 9(MMP-2/MMP-9)及基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)的表达水平; 移植 8 h 后, ELISA 法检测血清中 t-PA、D-二聚体、纤溶酶原激活物抑制物 1 (PAI-1)和纤维蛋白原(Fib)表达情况。**结果** 与 PBS 组、空载体 EPCs 组以及单纯 EPCs 组比较, t-PA 基因修饰 EPCs 可明显改善心肌梗死后大鼠的心肌组织病理改变, 大鼠急性心肌梗死心功能各参数改善最为显著; t-PA EPCs 组 NT-Pro-BNP 的表达水平显著低于其他各组; t-PA EPCs 组 VEGF 和 TIMP 的表达水平显著高于其他各组; 相反, 基质金属蛋白酶(MMP-2/MMP-9)的表达水平显著低于其他各组。t-PA EPCs 组 t-PA、D-二聚体表达均显著高于其他各组, 而 PAI-1、Fib 表达均显著低于其他各组。**结论** t-PA 基因修饰的 EPCs 移植能有效治疗大鼠急性心肌梗死, 其具体治疗作用与其改善心脏功能、促进血管新生、抑制心室重构、抑制血栓形成或增加溶栓作用等有关。

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

Therapeutic effect of t-PA modified endothelial progenitor cells on acute myocardial infarction in rats

FANG Li, HUANG Qing, HUANG Fang, LI Ying, QI Heng, ZHANG Yin Zhuang

(Department of Cardiology, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China)

[KEY WORDS] tissue plasminogen activator; endothelial progenitor cells; acute myocardial infarction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the therapeutic effect of tissue plasminogen activator(t-PA) gene modified umbilical cord blood endothelial progenitor cells (EPCs) transplantation on acute myocardial infarction in rats. **Methods**

EPCs were expanded in vitro, the slow virus expression vector of t-PA gene was transfected into endothelial progenitor cells to establish rat myocardial infarction model, the experiment was randomly divided into 4 groups: PBS solution group, EPCs group transfected with empty vector, simple EPCs group and EPCs group transfected with t-PA gene. Transplantation was started after acute myocardial infarction 3h in rats, t-PA EPCs group, EPCs group, and empty vector EPCs group were injected with T-PA gene-transfected EPCs, EPCs, and empty vector EPCs. Four weeks after transplantation, cardiac function were evaluated by echocardiography and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) expression level was detected, then the expression levels of vascular endothelial growth factor(VEGF) and matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 (MMP-2/MMP-9) and Tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP) in myocardial tissue were detected by Western-blot. Eight hours after transplantation, the expression of t-PA, D-Dimer, fibrin degradation products (FDP), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and fibrinogen (Fib) in serum was detected by ELISA. **Results** Compared with PBS solution group, empty carrier EPCs group and simple EPCs group, the effect of t-PA gene modified EPCs was the

[收稿日期] 2018-08-28

[修回日期] 2018-12-23

[基金项目] 湖南省自然科学基金(2018JJ6127); 湖南省卫生计生委科研计划 B 类课题项目 (B20180471); 长沙市科技局项目 (K15ZD022-33; Kq1701007)

[作者简介] 方立, 博士, 副主任医师, 研究方向为内皮祖细胞的基础研究与临床应用, E-mail 为 527384528@qq.com。通信作者张银妆, 博士, 研究方向为心力衰竭的基础研究, E-mail 为 804962763@qq.com。

most significant in improving various parameters of cardiac function in rats with acute myocardial infarction. The expression level of NT-Pro-BNP in t-PA EPCs group was significantly lower than that in other groups. The expression level of VEGF and TIMP in t-PA EPCs group was significantly higher than that in other groups. On the contrary, the expression level of metalloproteinase (MMP-2/MMP-9) was significantly lower than that of other groups. The expressions of t-PA and D-dimer in t-PA EPCs group were significantly higher than those in other groups, while PAI-1 and fibrinogen were significantly lower than those in other groups. **Conclusions** t-PA gene modified EPCs transplantation can effectively treat acute myocardial infarction in rats. Its specific therapeutic effect is related to improving cardiac function, promoting angiogenesis, inhibiting ventricular remodeling, inhibiting thrombosis or increasing thrombolysis.

心肌梗死是目前严重危害人类健康的疾病之一,近年来心肌梗死的治疗措施已有明显进展,但心肌梗死的患病率和死亡率仍然急剧上升。目前治疗心肌梗死通常有溶栓治疗、经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉搭桥、激光心肌血运重建等方法,这些治疗措施虽然能够使闭塞的血管再通,改善心肌缺血,挽救濒临坏死的心肌,却无法逆转已经坏死的心肌细胞。因此,还需寻找新的策略促进心肌细胞再生或改善心肌供血。目前研究表明内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)最主要的生物学功能是促进血管新生、参与血管损伤后的内皮修复、促进心肌再生^[1-3]。目前 EPCs 在心血管疾病中的应用主要是促进缺血心肌的血管新生治疗、修复损伤血管及内皮再生物化学、种植支架预防血栓形成及再狭窄等。组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)能激活纤溶酶原为纤溶酶,促进血栓迅速溶解,是目前防治以血栓形成为主要病理变化疾病的最有效药物之一。近年来干细胞移植和基因介入治疗为缺血性心脏病的防治带来了新的希望。因此,t-PA 基因修饰的 EPCs 可通过促进血管新生、增加梗死区血供、改善心功能、抑制血栓形成或溶栓等效应发挥对急性心肌梗死的治疗作用。

本研究拟采用 t-PA 基因转染的脐血 EPCs 经静脉移植治疗大鼠急性心肌梗死,从血管新生、心室重构、心功能、血流动力学、溶栓作用等方面综合分析其对大鼠急性心肌梗死的治疗作用。开展本研究,是对急性心肌梗死治疗新方法、新措施的探索与证实,可望为今后临床应用 t-PA 基因修饰的 EPCs 治疗急性心肌梗死提供实验与理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

EPCs 来源于人脐带血液,脐血均取自本院产科;实验动物成年雄性 SD 大鼠,6~8 周,体质量 200

~220 g,用于建立心肌梗死模型,所有动物由中南大学实验动物学部提供;兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体(美国 Abcam 公司)、兔抗大鼠基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9、基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)多克隆抗体(美国 Abcam 公司)、小鼠抗大鼠 t-PA 单克隆抗体、 β -actin 鼠单克隆抗体、山羊抗兔二抗(美国 Santa 公司);大鼠 Pro-BNP 试剂盒(上海恒远生物科技有限公司),t-PA 活性及 PAI-1 试剂盒(上海太阳生物技术公司);D-二聚体、纤维蛋白原(Fib)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);VEV02100 小动物超声影像系统(加拿大 Visual Sonic 公司)。

1.2 t-PA 基因慢病毒表达载体的构建及其转染效率评价

对 pcDNA3.1(+)/t-PA 质粒进行酶切鉴定和测序,使目的基因连接入载体质粒中,构建成 t-PA 基因慢病毒载体质粒,分别采用 Brdu 标记细胞 DNA、BCA 蛋白定量、MTT 分析法检测内皮祖细胞 DNA 合成能力、总蛋白含量和细胞存活率。具体过程详见参考文献^[4]。

1.3 脐血内皮祖细胞的分离培养与鉴定

脐血内皮祖细胞的分离培养与鉴定过程详见参考文献^[5]。

1.4 心肌梗死模型建立、分组和细胞移植

成年 SD 大鼠麻醉后,去除手术处毛发,心电监测,气管置管、接小动物呼吸机辅助通气(频率 80 次/min,吸呼比 1:2,潮气量 5.5 mL),消毒后开胸,暴露左心耳,结扎左前降支动脉,观察心肌变白,心电图 ST 段抬高即为成功急性心肌梗死模型,实验进行随机分为 PBS 组、空载体 EPCs 组、单纯 EPCs 组和 t-PA EPCs 组,每组各 10 只大鼠。其中 t-PA EPCs 组、单纯 EPCs 组和空载体 EPCs 在细胞移植的当天,将收集的 2×10^6 个/mL EPCs 于大鼠尾静脉缓慢输入。移植后逐层关胸缝合皮肤,大鼠苏醒且

自主呼吸良好,拔除气管插管。术后注意保暖,预防感染。

1.5 心肌梗死大鼠模型心脏病理形态

TTC 染色过程:心肌梗死 TTC 染色心脏样本采集在取血后进行,剪破右心耳,沿取血位置灌入 50 mL 左右生理盐水,冲洗心脏。取心脏包裹于锡箔纸中,放入 -80°C 冰箱速冻 30 min,置于切片槽中,将心脏切成 2 mm 厚度的切片,放入 1% TTC 溶液中,将盛有 TTC 溶液的避光容器放入 37°C 水浴,5 min 后取出心脏切片放入 10% 甲醛溶液中固定,24 h 后进行拍照,观察梗死范围。**HE 染色过程:**石蜡切片常规脱蜡至水。0.01 mmol/L PBS 漂洗 1 次,5 min;苏木精染色 5 min,自来水洗 1 min;可把细胞核内的染色质染为蓝紫色;1% 盐酸-70% 乙醇分色 30 s,自来水洗、浸泡至切片变蓝色,约 30 min;1% 伊红溶液染色 10 min,因伊红染料为酸性,可以把细胞质染成红色。梯度乙醇脱水:75% 乙醇 1 min,85% 乙醇 3 min,95% 乙醇 7 min,100% 乙醇 I 10 min,100% 乙醇 II 10 min;二甲苯透明:二甲苯 I 20 min,二甲苯 II 20 min;中性树胶封片,晾干,显微镜下观察。

1.6 超声心动图评价心功能

EPCs 移植 4 周后采用彩色多普勒超声心动图仪评价左心室功能,取胸骨旁左心室乳头肌水平短轴切面及左心室长轴切面行心脏超声检测,二维和 M 型超声同步测量,记录左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD),计算出左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS),取 3 个心动周期的均值。

1.7 免疫印迹分析

EPCs 移植 4 周后股动脉放血处死各组大鼠,制备心肌组织匀浆,提取组织蛋白,加入 100 μL $2\times$ SDS 蛋白裂解液裂解细胞,将裂解液转移至 Eppendorf 管,超声 10~15 s,12 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移到另一干净 Eppendorf 管;用 BCA 法测定蛋白浓度;将 20 μg 蛋白与 $2\times$ SDS 加样缓冲液混合,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min;样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移法转移到硝酸纤维素膜上;室温下封闭 4 h 后,分别加入 VEGF 抗体、MMP-2/MMP-9 抗体、 β -actin 抗体(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;洗去一抗后,加入辣根过氧化物酶偶联的

相应二抗,反应 2 h,化学发光法显色,扫描结果。

1.8 生物化学检测

EPCs 移植后在相应时间点放血处死各组大鼠,收集标本,采用双抗夹心 ELISA 法测定血浆 N 末端 B 型脑钠肽前体(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)浓度、t-PA 活性及组织型纤溶酶原激活剂抑制物(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)活性测定采用发色底物法,D-二聚体、纤维蛋白原(Fib)检测采用大鼠 D-二聚体、纤维蛋白原 ELISA 试剂盒,指标测定均按其测定试剂盒说明书进行。

1.9 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计学软件包进行数据处理分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用两样本 t 检验,多组间采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌梗死大鼠模型心肌病理形态改变情况

TTC 试剂可以与正常心肌细胞中的脱氢酶反应而染成红色,坏死心肌细胞由于细胞膜破裂,脱氢酶被完全释放所以不被染色。实验大鼠心脏经过 TTC 染色后的红色区域代表正常心肌,而白色区域就是心肌梗死区域。模型大鼠左心室壁能观察到明显的白色区域(图 1A),t-PA EPCs 组移植治疗后梗死面积即白色区域明显小于 PBS 组、空载体 EPCs 组和单纯 EPCs 组。HE 染色观察心肌组织梗死情况,梗死后的心肌纤维排列呈现紊乱状态,可见肌细胞坏死,可见胞质明显淡染,细胞核消失,并可见伴有大量的炎性细胞浸润,部分可见多灶性的纤维化。t-PA 基因修饰 EPCs 移植组移植治疗后的心肌染色显示在坏死的心肌组织中存活的心肌细胞明显增多,而胶原纤维和炎症细胞越少,心肌梗死后心肌纤维化程度明显减轻,表明 t-PA 基因修饰 EPCs 可明显改善心肌梗死后大鼠的心肌组织病理改变(图 1B)。

2.2 心肌梗死大鼠心脏功能的评价

EPCs 移植 4 周后,各实验组大鼠行超声心动图及血浆 NT-Pro-BNP 检测,结果显示,与 PBS 组比较,空载体 EPCs 组、单纯 EPCs 组和 t-PA EPCs 组大鼠心功能各参数及 NT-Pro-BNP 均有改善,而以 t-PA EPCs 组最为显著(表 1)。

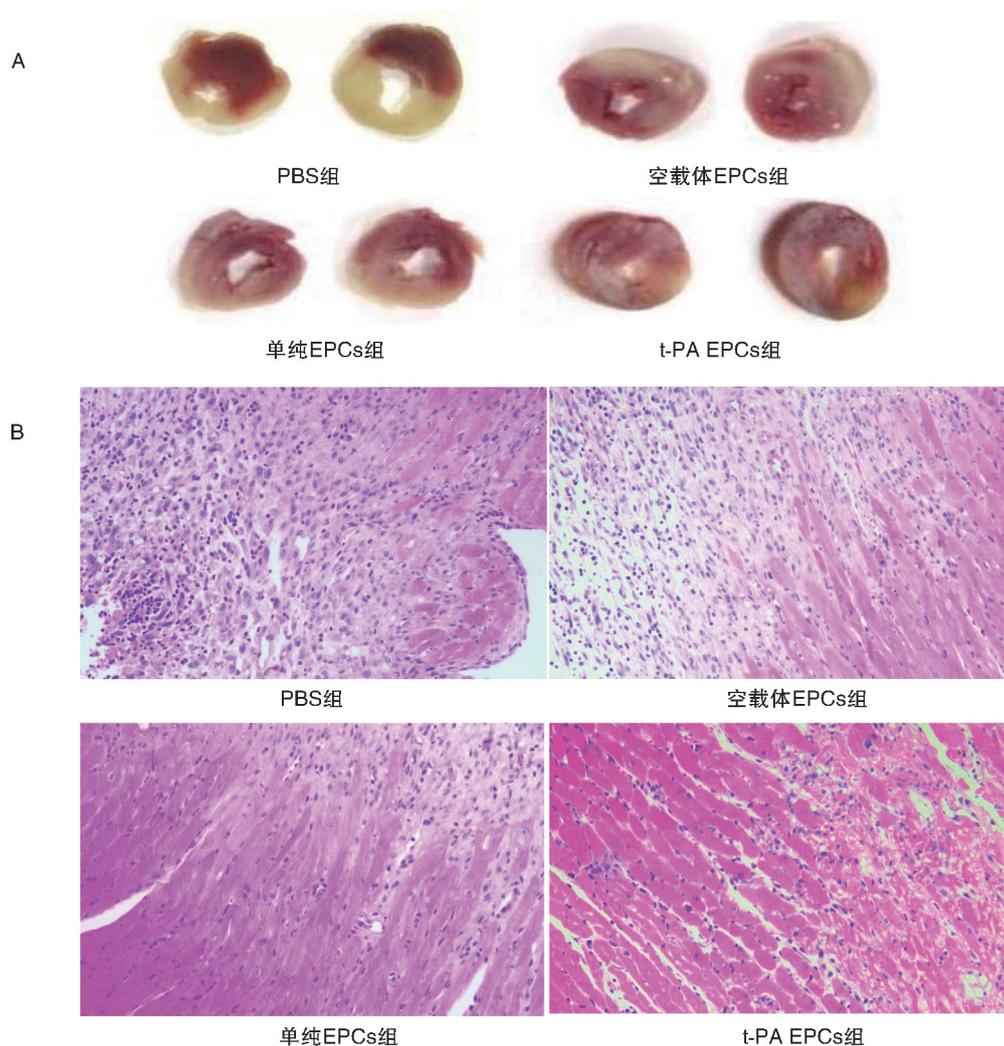


图 1. 心肌梗死大鼠模型心肌组织病理形态改变情况 A: TTC 染色观察心肌组织梗死情况; B: HE 染色观察心肌组织梗死情况(200 \times)。

Figure 1. Myocardial histopathological changes in rat model of myocardial infarction

表 1. EPCs 移植 4 周后心肌梗死大鼠心脏功能及 NT-Pro-BNP 的变化情况

Table 1. Changes of cardiac function and NT-Pro-BNP in rats with myocardial infarction after 4 weeks of EPCs transplantation

分 组	<i>n</i>	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LVEF(%)	LVFS(%)	NT-Pro-BNP(ng/L)
PBS 组	10	10.54 \pm 0.65	8.37 \pm 0.57	35.23 \pm 3.84	16.76 \pm 1.64	828.35 \pm 68.94
空载体 EPCs 组	10	8.25 \pm 0.42 ^a	6.18 \pm 0.44 ^a	39.26 \pm 3.35 ^a	20.12 \pm 1.23 ^a	612.35 \pm 89.21 ^a
单纯 EPCs 组	10	8.32 \pm 0.52 ^a	6.06 \pm 0.54 ^a	39.23 \pm 3.79 ^a	20.37 \pm 1.12 ^a	608.43 \pm 74.94 ^a
t-PA EPCs 组	10	5.13 \pm 0.58 ^{ab}	4.17 \pm 0.34 ^{ab}	45.61 \pm 3.48 ^{ab}	25.31 \pm 1.72 ^{ab}	335.67 \pm 49.97 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 PBS 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与空载体 EPCs 组或单纯 EPCs 组比较。

2.3 心肌组织中 MMP-2/MMP-9、TIMP、VEGF 的表达

EPCs 移植 4 周后, 采用 Western-blot 检测大鼠心肌组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、MMP-2/MMP-9 以及 TIMP-1 的表达情况。结果显示, 与 PBS 组比较, 空载体

EPCs 组、单纯 EPCs 组和 t-PA EPCs 组 VEGF 的表达均明显升高, 而以 t-PA EPCs 组升高最为显著(图 2、表 2)。同样, 与 PBS 组比较, 空载体 EPCs 组、单纯 EPCs 组和 t-PA EPCs 组 MMP-2/MMP-9 的表达均明显下降, 而 TIMP 表达明显升高, 以 t-PA EPCs

组表达差异最为显著(图2,表2)。与此同时,采用Western-blot检测大鼠心肌组织中t-PA和绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的表达情况(t-PA基因慢病毒表达载体和空载体中均带有标志基因EGFP)。结果显示,与PBS组、单纯EPCs组和空载体EPCs组比较,t-PA EPCs组t-PA表达明显升高,而空载体EPCs组和t-PA EPCs组心肌组织中均可检测到EGFP基因,提示基因转染有效(图2)。

2.4 血浆中纤溶指标的变化情况

EPCs移植后8h后,检测血清中t-PA、D-二聚体(D-Dimer)、纤溶酶原激活物抑制物1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、纤维蛋白原(fibrinogen, Fib)等纤溶指标的变化情况,结果显示:空载体EPCs组、单纯EPCs组、t-PA EPCs组t-PA、D-Dimer均明显高于PBS组,其中t-PA EPCs组高于单纯EPCs组和空载体EPCs组;空载体EPCs组、单纯EPCs组、t-PA EPCs组PAI-1活性、Fib含量均明显低于PBS组,其中t-PA EPCs组更低于单纯EPCs组和空载体EPCs组(表3)。

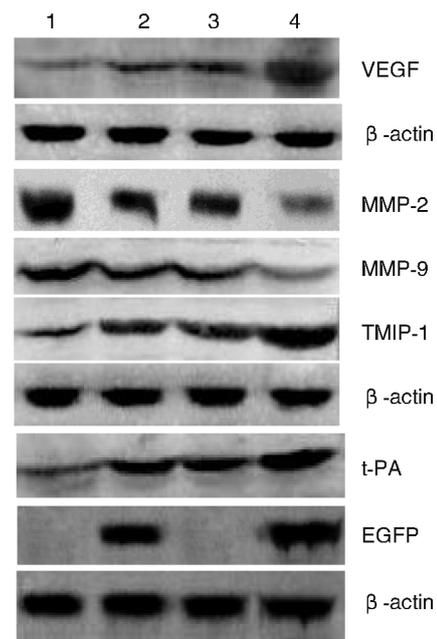


图2. Western-blot检测心肌组织中MMP-2/MMP-9、TIMP、VEGF的表达情况 1为PBS组;2为空载体EPCs组;3为单纯EPCs组;4为t-PA EPCs组。

Figure 2. Western blot was used to detect the expression of MMP-2/MMP-9, TIMP and VEGF in myocardial tissue

1-PBS solution group; 2-empty vectorEPCs group; 3-simple EPCs group; 4-t-PA EPCsgroup.

表2. 心肌组织中VEGF、MMP-2、MMP-9和TIMP蛋白的相对表达

Table 2. Relative expression of VEGF, MMP - 2, MMP - 9 and TIMP-1 protein in myocardial tissue

分组	n	VEGF	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	t-PA
PBS组	10	0.011±0.008	2.234±0.024	1.624±0.015	0.221±0.016	0.223±0.021
空载体EPCs组	10	0.022±0.004 ^a	1.288±0.024 ^a	1.124±0.022 ^a	1.134±0.016 ^a	1.236±0.023 ^a
单纯EPCs组	10	0.025±0.012 ^a	1.312±0.026 ^a	1.117±0.024 ^a	1.122±0.022 ^a	1.223±0.031 ^a
t-PA EPCs组	10	1.052±0.016 ^{ab}	0.682±0.023 ^{ab}	0.353±0.026 ^{ab}	2.225±0.027 ^{ab}	2.315±0.028 ^{ab}

a为P<0.05,与PBS组比较;b为P<0.05,与空载体EPCs组或单纯EPCs组比较。

表3. EPCs移植8h后大鼠血浆中t-PA、D-二聚体、PAI-1、Fib变化情况

Table 3. Changes of t-PA, D-Dimer, PAI-1 and Fib in rat plasma after 8 hours of EPCs transplantation

分组	n	t-PA(kIU/L)	D-Dimer(μg/L)	PAI-1(kIU/L)	Fib(mg/L)
PBS组	10	0.37±0.13	0.67±0.12	1.46±0.34	567±68
空载体EPCs组	10	0.65±0.14 ^a	1.08±0.16 ^a	0.82±0.16 ^a	369±38 ^a
单纯EPCs组	10	0.68±0.09 ^a	1.06±0.24 ^a	0.81±0.11 ^a	374±36 ^a
t-PA EPCs组	10	1.03±0.26 ^{ab}	3.27±0.53 ^{ab}	0.23±0.08 ^{ab}	163±32 ^{ab}

a为P<0.05,与PBS组比较;b为P<0.05,与空载体EPCs组或单纯EPCs组比较。

3 讨论

EPCs是一类能增殖并分化为血管内皮细胞,但尚未表达成熟血管内皮细胞表型、也未形成血管的

前体细胞;EPCs可以从骨髓、脐带血以及从成人外周血中收集。目前研究表明EPCs最主要的生物学功能是促进血管新生^[6]和参与血管损伤后的内皮修复及内膜再生物化学^[7]。另外有研究提示,EPCs

除参与血管新生外,还可以转化为心肌细胞,进一步改善梗死后的心肌再生^[8-10]。申请者最近研究发现 EPCs 通过旁分泌降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 增殖与表型转化,其机制可能与其抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的活化以及原癌基因 c-myc、c-fos 的表达有关,提示 EPCs 还有防止动脉粥样硬化作用^[5,11]。近年来,EPCs 移植在高血压、冠心病等心血管疾病治疗中越来越受到广大科研工作者的重视和应用,证实急性心肌梗死患者行自体 EPCs 移植治疗是安全可行的^[12]。目前认为 EPCs 移植治疗心肌梗死等疾病的机制可能与下述有关:①EPCs 直接参与血管新生:Aicher 等在 EPCs 移植治疗缺血性疾病的动物试验中证实新生血管中 7%~20% 的内皮细胞是由移植的 EPCs 分化而来^[13];②移植的 EPCs 以旁分泌的形式分泌促血管生成因子促进血管形成:研究表明 EPCs 能分泌一些能促进血管形成生长因子、细胞因子或外泌体(如 VEGF 等)^[14];③参与血管损伤后的内皮修复及内膜再生物化学^[7];④移植的 EPCs 可能分化为心肌细胞^[8-10]。因此,EPCs 用于心肌梗死灶细胞移植,促进心肌细胞再生、促进血管新生、增加梗死区血供、改善心功能、抗动脉粥样硬化是一个十分合理的选择。

近年来基因工程及生物组织工程的迅速发展为细胞移植的成功及移植效率的提高提供了崭新的手段及前景,因此选用合适的靶向基因成为基因修饰内皮祖细胞移植的关键。组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)是血液系统中纤溶系统激活剂,与尿激酶和链激酶比较,t-PA 与血栓基质具有更高的特异性亲和力。t-PA 能在病变血栓局部激活纤维蛋白原使其转化成具有生物活性的纤维蛋白酶,水解纤维蛋白导致血栓溶解,闭塞血管再通,但不引起纤溶系统性激活,因而大大降低了治疗过程中出血的风险,是目前一种用于治疗急性心肌梗死等血栓性疾病的特效药物^[15]。研究表明如果将外源的 t-PA 基因导入细胞中,使之在机体局部持续高表达具有生物活性的 t-PA 蛋白,对防止心肌梗死时血栓形成和再通闭塞血管有重要意义^[16]。在 Griese 等^[17] 研究中,将 t-PA 基因和水蛭素(hirudin)基因转入体外培养的 EPCs,而后移植 EPCs 到达鼠颈动脉损伤部位,可测得转入基因的稳定表达,有抑制血栓形成作用。提示 t-PA 可以作为合适的靶向基因转染 EPCs,在急性心肌梗死时通过靶向移植发挥其抑制

血栓形成或溶栓的作用。基于上述研究背景,本研究提出:t-PA 基因修饰的 EPCs 移植是治疗急性心肌梗死的有效措施。前期研究笔者将已成功构建的 t-PA 基因慢病毒表达载体转染脐血 EPCs,并已证实构建的 t-pA 基因慢病毒表达载体用于转染内皮祖细胞是安全可靠的^[4]。本研究采取经大鼠尾静脉注入 t-PA 基因修饰的 EPCs 治疗大鼠急性心肌梗死,进一步从血管新生、心室重构、心功能、血流动力学、溶栓作用等方面综合分析其对大鼠急性心肌梗死的治疗作用。

急性心肌梗死后心肌细胞坏死、凋亡、心室重构是促使心衰发生的根本原因,实验结果显示 t-PA 基因修饰 EPCs 移植组均能显著改善心脏功能参数及降低 NT-Pro-BNP,提示 t-PA 基因修饰 EPCs 移植可有效地提高 LVEF,阻止室腔扩张、室壁变薄,增加心排量,有效地降低心肌能量消耗水平,表明其有较好的改善心肌梗死后心脏收缩舒张功能和心肌能量消耗的作用。VEGF 生长因子能诱导 EPCs 增殖、分化、迁移和血管形成,是刺激血管内皮细胞增殖和移行的重要因子,对血管内皮细胞的分裂、增殖、抑制凋亡、水解基底膜、迁移和血管构建的调控作用较强,且特异性高,在创伤修复、侧支循环建立等病理生理过程中发挥重要作用^[18]。本研究结果显示空载体 EPCs 组、单纯 EPCs 组和 t-PA EPCs 组 VEGF 的表达均明显升高,而以 t-PA EPCs 组升高最为显著。提示 t-PA 基因修饰 EPCs 移植能增加急性心肌梗死大鼠 VEGF 的表达,表达上调的 VEGF 可通过多种机制促进血管新生:VEGF 通过其受体可通过促进内皮细胞的异常增生、迁移,使血管通透性增强,从而在血管新生中发挥重要作用^[19];VEGF 可诱导骨髓源性的 EPCs 活化,并促进其从骨髓中动员到外周血循环中,促进受损血管的新生,同时移植的 EPCs 结合到新生血管壁上,通过增殖分化参与血管生长^[20];VEGF 通过自分泌和旁分泌的形式作用于自身及其临近的成熟血管内皮细胞,进一步增强局部的血管生长。这样大量的新生血管可以限制纤维瘢痕组织的继续扩大,防止或减慢心室腔的扩大程度和速度,即防止左心室重构的进一步发展。心肌梗死后心肌组织中 MMPs 的表达会持续增加或 TIMP-1 下降,这些变化会影响心脏重构及心功能。为研究 t-PA 基因修饰 EPCs 移植对大鼠急性心肌梗死心室重构即 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的影响,本研究观察了心肌梗死 4 周后上述指标的变化情况。结果表明空载体 EPCs 组、单纯 EPCs 组和 t-PA EPCs 组 MMP-2/MMP-9 的表达均

明显降低,而 TIMP-1 的表达明显升高,以 t-PA EPCs 组最为显著,提示 t-PA 基因修饰 EPCs 能够改善急性心肌梗死后心室重构,从而改善局部或整体心脏的收缩和舒张功能。凝血与纤溶系统的动态平衡对维持生理性纤维蛋白溶解和预防病理性血栓形成起着重要的作用,t-PA 是纤溶系统主要的物质,能使纤溶酶原转化为纤溶酶而降解纤维蛋白凝块,使纤溶活性增加。组织型纤溶酶原激活剂抑制物(PAI-1)是 t-PA 的抑制物,能促进血栓形成,对抑制纤溶有重要的作用,D-二聚体是观察纤溶效果最有价值的指标。本研究发现单纯 EPCs 移植和 t-PA 基因修饰 EPCs 能明显增加 t-PA、D-Dimer,降低 PAI-1 活性、Fib 含量,而 t-PA 基因修饰 EPCs 效果最明显。表明增加的 t-PA 能先择性地作用于与纤维蛋白结合的纤溶酶原,使之转为纤溶酶,使血栓溶解,而 PAI-1 的下降更有利于血栓溶解,从而提高纤溶活性和抑制血栓形成。

总之,上述结果表明 t-PA 基因修饰的 EPCs 移植治疗能改善大鼠心肌梗死心脏功能,其机制与促进血管新生、抑制心室重构、抑制血栓形成或增加溶栓作用等有关。这些结果为急性心肌梗死的治疗提供了新的思路,为 t-PA 基因修饰的 EPCs 移植的临床应用提供了实验基础和理论依据。

[参考文献]

- [1] Wang T, Fang X, Yin ZS. Endothelial progenitor cell-conditioned medium promotes angiogenesis and is neuroprotective after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(5): 887-895.
- [2] Sun J, Zhang Z, Ma T, et al. Endothelial progenitor cell-derived exosomes, loaded with miR-126, promoted deep vein thrombosis resolution and recanalization[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 223.
- [3] Yin Y, Duan J, Guo C, et al. Danshensu accelerates angiogenesis after myocardial infarction in rats and promotes the functions of endothelial progenitor cells through SDF-1 α /CXCR4 axis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 814: 274-282.
- [4] 方立, 黄钦, 李迎, 祁珩, 等. t-PA 基因慢病毒表达载体的构建及其在内皮祖细胞中的表达研究[J]. *按摩与康复医学*, 2018, 9(8): 62-65.
- [5] 方立, 陈美芳, 余国龙, 等. 内皮祖细胞对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(6): 459-464.
- [6] Haider KH, Aziz S, Al-Reshidi MA. Endothelial progenitor cells for cellular angiogenesis and repair: lessons learned from experimental animal models[J]. *Regen Med*, 2017, 12(8): 969-982.
- [7] Salter B, Sehmi R. The role of bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenic responses in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(7): 2168-2177.
- [8] Mudyadadzo TA. Endothelial progenitor cells and cardiovascular correlates[J]. *Cureus*, 2018, 10(9): e3342.
- [9] López-Ruiz E, Perán M, Picón-Ruiz M, et al. Cardiomyogenic differentiation potential of human endothelial progenitor cells isolated from patients with myocardial infarction[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(9): 1229-1237.
- [10] Abd El Aziz MT, Abd El Nabi EA, Abd El Hamid M, et al. Endothelial progenitor cells regenerate infarcted myocardium with neovascularisation development[J]. *J Adv Res*, 2015, 6(2): 133-144.
- [11] 方立, 李迎, 祁珩, 等. 内皮祖细胞条件培养液对血管紧张素 II 所致血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(11): 997-1003.
- [12] Li H, Liu Q, Wang N, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing miR-126-3p improves heart function in ischemic cardiomyopathy[J]. *Circ J*, 2018, 82(9): 2332-2341.
- [13] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells[J]. *Nat Med*, 2003, 9(11): 1370-1376.
- [14] Wang W, Li C, Li W, et al. MiR-150 enhances the motility of EPCs in vitro and promotes EPCs homing and thrombus resolving in vivo[J]. *Thromb Res*, 2014, 133(4): 590-598.
- [15] Siren V, Kauhanen P, Carpen O, et al. Urokinase, tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 expression in severely stenosed and occluded vein grafts with thrombosis[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2003, 14(4): 369-377.
- [16] Wang K, Zhou X, Zhou Z. Blockade of the platelet P2Y12 receptor by AR C69931MX sustains coronary artery recanalization and improves the myocardial tissue perfusion in a canine thrombosis model[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5): 357-362.
- [17] Griese DP, Achatz S, Batzlsperger CA. Vascular gene delivery of anticoagulants by transplantation of retrovirally transduced endothelial progenitor cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 58(2): 469-477.
- [18] Isner JM, Kalka C, Kawamoto A, et al. Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 953: 75-84.
- [19] Zhao Y, Song J, Bi X, et al. Thymosin β 4 promotes endothelial progenitor cell angiogenesis via avascular endothelial growth factor-dependent mechanism[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 2314-2320.
- [20] Wang S, Chen Z, Tang X, et al. Transplantation of vascular endothelial growth factor 165 transfected endothelial progenitor cells for the treatment of limb ischemia[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 4967-4974.

(此文编辑 朱雯霞)