

[文章编号] 1007-3949(2008)16-02-0117-04

• 实验研究 •

同种异体骨髓间充质干细胞移植对扩张型心肌病心功能衰竭大鼠左心室功能的影响

周 瀛, 白小涓, 王 勃

(中国医科大学附属第一医院循环内科, 沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 骨髓间充质干细胞; 扩张型心肌病; 心功能衰竭; 左心室功能

[摘要] 目的 探讨同种异体大鼠骨髓间充质干细胞移植在阿霉素诱导的扩张型心肌病心功能衰竭大鼠心脏内存活、分化的情况以及对左心室功能的影响。方法 雌性 Wistar 大鼠 55 只, 随机分成正常对照组 ($n=10$)、模型组 ($n=15$)、诱导前移植组 ($n=15$) 和诱导后移植组 ($n=15$)。体外分离培养雄性大鼠骨髓间充质干细胞, 传至一代后用 10^{-6} mol/L 5-氟胞苷诱导 4 周, DAPI 标记后, 诱导前移植组移植诱导前的骨髓间充质干细胞, 诱导后移植组移植诱导后的骨髓间充质干细胞; 4 周后检测左心室功能及移植细胞存活、分化情况。结果 异体骨髓间充质干细胞移植 4 周后可存活并分化成心肌细胞, 表达心肌细胞特异性蛋白; 与模型组比较, 细胞移植组左心室功能明显改善, 且两细胞移植组间差异无显著性。结论 同种异体骨髓间充质干细胞移植 4 周后可存活并分化成心肌细胞, 对扩张型心肌病心功能衰竭大鼠的左心室功能有保护作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect on Left Ventricular Function in Doxorubicin-Induced Heart Failure of Rats by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation

ZHOU Ying, BAI Xiao Juan, and WANG Bo

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell; Dilated Cardiomyopathy; Heart Failure; Left Ventricular Function

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the possibility of survival, differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC) of rats in host myocardium and the effect on left ventricular function in doxorubicin induced heart failure. **Methods**

55 female Wistar rats were separated randomly into four groups: normal control group ($n=10$), heart failure group ($n=15$), heart failure plus BMMSC transplantation group ($n=15$), heart failure plus induced BMMSC transplantation ($n=15$). Male Wistar rats BMMSC were isolated and induced by 10^{-6} mol/L 5-aza for 4 weeks after first generation; then the cells were transplanted into rat heart by doxorubicin induced heart failure after DAPI labelled. After 4 weeks, left ventricular function were measured and the heart were checked by immunofluorescence.

Results BMMSC can survive and differentiate in host myocardium; the left ventricular function were significantly improved in BMMSC transplantation group compared with heart failure group, there was no difference between the two BMMSC transplantation groups.

Conclusion BMMSC can survive in host myocardium after 4 weeks transplantation and can improve the left ventricular function of doxorubicin induced dilated cardiomyopathy heart failure.

扩张型心肌病是一种以单侧或双侧心腔扩大、心肌纤维化、心肌收缩功能减退为特征的心脏疾病。它是除缺血性心脏病以外的另一类可以引起充血性心力衰竭 (congestive heart failure, CHF) 的心血管疾病。传统的内科药物和外科手术疗法都不能纠正其心肌细胞丢失的问题, 患者出现心力衰竭症状后, 预

后较差^[1]。重建有功能心肌细胞的方法是一种有效的治疗扩张型心肌病心功能衰竭的手段。心肌细胞成形术^[2]便是在干细胞研究基础上应运而生的, 通过向受损心肌补充肌源性细胞从而改善心功能。研究表明骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC) 由于其易于分离培养, 可自我复制, 具有高度增殖潜力, 并且在一定诱导条件下可分化成多种细胞的特点, 在修复损伤心肌方面有很大应用前景^[3,4]。本研究应用阿霉素诱导建立心肌病心功能衰竭大鼠模型, 成功后同种异体心肌内移植 BMMSC, 观察其对大鼠左心室功能的影响。

[收稿日期] 2007-07-14 [修回日期] 2007-12-25

[作者简介] 周瀛, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为干细胞移植在心血管疾病中的应用, E-mail 为 amyzhou23@yahoo.com.cn。通讯作者白小涓, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病及心肌病的研究, E-mail 为 xjuanbai@hotmail.com。王勃, 主治医师, 主要从事干细胞的基础研究。

1 材料与方法

1.1 试剂和抗体

DMEM(低糖型)培养基(Hyclone 公司),标准胎牛血清(澳大利亚一天津灏洋生物有限公司),5-氮胞苷(Sigma 公司),DAPI(Roche 公司),兔抗鼠 CD34 和 CD44、小鼠抗大鼠 α 横纹肌肌动蛋白和羊抗小鼠 IgG FITC 荧光标记试剂(武汉博士德生物工程有限公司),小鼠抗大鼠肌钙蛋白 T(Neomarker 公司),免疫组织化学超敏 S-P 工作液试剂盒和 DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),盐酸阿霉素(浙江海正药业股份有限公司)。

1.2 实验动物分组

Wistar 大鼠 60 只,由中国医科大学实验动物部提供。取体重 130~150 g 雄性 Wistar 大鼠 5 只,作为 BMMSC 供体细胞来源。取体重 200~250 g 雌性 Wistar 大鼠 55 只,其中 10 只作为正常对照组,45 只制备成扩张型心肌病心功能衰竭大鼠模型。扩张型心肌病心功能衰竭大鼠随机均分为:模型组,移植无血清 DMEM;诱导前移植组,移植诱导前 BMMSC;诱导后移植组,移植诱导后的 BMMSC。

1.3 细胞分离培养诱导及鉴定

取雄性 Wistar 大鼠,用 10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔麻醉,75% 乙醇消毒皮毛后移入超净台,剥离双后肢皮肤,于髋关节处剪断,逐层剥离附着于骨干的肌肉,剪断胫、股骨两侧的干骺端,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液冲洗髓腔,以 200 目筛网过滤后 1 500 r/min 离心 8 min,弃上清,加 PBS 混悬离心 2 次后加含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,充分吹打,以 5×10^4 /L 接种于培养瓶,置于 37 °C CO₂ 培养箱中温育,24 h 后换液一次,以后每 3~4 天换液一次,去除未贴壁的细胞,待生长到 80%~90% 汇合时,以 0.125% 胰蛋白酶消化,1:2 传代。取传至一代的 BMMSC 细胞,培养 3 天后待细胞贴壁伸展,更换含 10 μ mol/L 的 5-氮胞苷完全培养基,于 37 °C CO₂ 培养箱中孵育 24 h,更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,继续培养 4 周。取传至一代的 BMMSC,诱导 4 周后的 BMMSC 爬片后用于免疫组织化学染色鉴定 CD34、CD44、 α 横纹肌肌动蛋白和肌钙蛋白 T。鉴定时以 0.01 mol/L 的 PBS 洗 1 次,纯丙酮室温固定 10 min, PBS 洗;滴加 H₂O₂,室温 10 min, PBS 洗 3 次;滴加血清封闭液,室温 20 min,甩去多余血清,分别滴加一抗,4 °C 过夜。余步骤按免疫组织化学超敏 S-P 工作液试剂盒及 DAB 显色试剂盒说明书进行。PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 模型制备及细胞标记移植

扩张型心肌病心功能衰竭大鼠每只每周给予盐酸阿霉素 2 mg/kg 腹腔注射,共计 6 周,正常对照组给予等体积生理盐水^[5]。6 周后观察大鼠的一般行为和死亡率。手术前将培养的 BMMSC 用 PBS 冲洗,加入培养基及 1/10 体积的 10 mg/L 的 DAPI(4',6-二乙酰基-2-苯基吲哚) 37 °C 孵育 30 min,倒去含 DAPI 的培养基, PBS 洗 2 次,洗去未结合的 DAPI, 0.125% 胰蛋白酶消化后,重悬于无血清的 DMEM 培养基中,调整细胞浓度至 2.5×10^7 /L,冰上保存小于 1 h。手术时用 10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔内注射麻醉大鼠,气管插管后用小动物呼吸机有氧正压通气,于左侧胸腔第四肋间逐层开胸,开心包后挤压右侧胸腔,使心脏暴露于胸腔外,将 DAPI 标记后的 BMMSC 或诱导后细胞 2.5×10^7 /L 分 5 点注入细胞移植组大鼠左心室游离壁,每处 40 μ L。模型组给予等体积无血清 DMEM,正常对照组只开胸而不注射细胞。注射完毕后,迅速将心脏放回正常位置,逐层缝合胸腔,负压吸引胸腔排除空气,待大鼠恢复自主呼吸后拔管,保温待大鼠清醒,给予水和标准饲料分笼饲养,青霉素腹腔注射预防感染。

1.5 血流动力学指标测定

于术后 4 周称量大鼠体重后,用 40% 乌拉坦 0.2 mL/kg 腹腔内注射麻醉大鼠,仰卧位固定四肢及头部。颈部皮肤剃毛消毒,取正中切口,逐层切开皮肤及皮下组织,气管插管,沿气管旁间隙找到右侧颈动脉,插管后连接 8 导生理记录仪,通过压力转换器测定大鼠左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP) 和舒张压(left ventricular diastolic pressure, LVDP),左心室内压最大上升和下降速率($\pm dp/dt$)。

1.6 心肌基本结构及细胞移植后存活和分化情况观察

测定结束后,经鼠股静脉注入 10% 氯化钾 2~3 mL,使心室停搏于舒张期,迅速开胸,用预冷的 PBS 心腔灌流将血液冲洗干净,切取心脏,去除心房、右心室、大血管及心脏外结缔组织后,部分心肌组织行冰冻切片,于荧光显微镜下观察 DAPI 标记的供体细胞生存、迁移和分布情况;冰冻切片室温下丙酮固定 30 min,行心肌肌钙蛋白 T 免疫荧光染色鉴定,观察供体细胞移植后的分化状况。其余心肌组织于 4% 多聚甲醛溶液固定保存 24 h 后,石蜡包埋切片行 HE 染色,光镜下观察心肌病理改变。

1.7 统计学分析

所有数据用均 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间对比采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

相差显微镜下原代培养的细胞由小圆形贴壁细胞逐渐伸展呈小多角形、星形,以后胞体逐渐增大,呈集落样生长。经 5-氮胞苷诱导 4 周后,细胞胞体逐渐增大呈长梭形,形态渐趋均一。传至一代的 BMMSC CD34 染色阴性,CD44 染色阳性(图 1),提示传代的细胞为 BMMSC,而非造血干细胞;诱导前部分 BMMSC α 横纹肌肌动蛋白染色阳性,肌钙蛋白 T 染色阴性;诱导后部分 BMMSC α 横纹肌肌动蛋白阳性,肌钙蛋白 T 染色也呈阳性(图 1),提示诱导后的细胞表达了心肌特异性蛋白。通过细胞计数的方法可知,诱导前 α 横纹肌肌动蛋白阳性细胞所占的比率为 22.1%,诱导后为 47.3%,诱导后肌钙蛋白 T 阳性细胞所占比率为 31.5%。

2.2 大鼠存活情况及血流动力学指标

大鼠给予阿霉素后活动能力减弱,有腹水生成,与正常对照组比较,左心室功能下降明显,模型建立成功,造模后死亡率 7% (3/45); 其对手术耐受性减低,术后生存率 73% (33/45),其中模型组术后存活率 80% (12/15),与正常对照组比,左心室功能明显下降 ($P < 0.01$); 诱导前移植组术后存活率 73% (11/15),诱导后移植组 67% (10/15),与模型组比,左心室功能明显改善 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),但两细胞移植组之间差异无显著性(表 1)。

2.3 心肌基本结构及细胞移植后存活、分化情况

造模 6 周后,肉眼可见模型组大鼠的心室扩张,

室壁变薄,纤维瘢痕形成,左心室截面直径与正常对照组比有统计学意义(8.89 ± 1.02 比 6.18 ± 0.59 , $P < 0.01$)。HE 染色发现,阿霉素造成心肌中有轻微空泡变性,并有心肌细胞萎缩现象。移植细胞体积比成熟自体心肌细胞小,胞核相对较大,类似胎心或新生的心室肌细胞。免疫荧光结果表明,移植入宿主心肌内的 BMMSC 4 周后仍然存活,并有部分细胞分化成心肌细胞,表达心肌特异性蛋白——肌钙蛋白 T(图 2)。

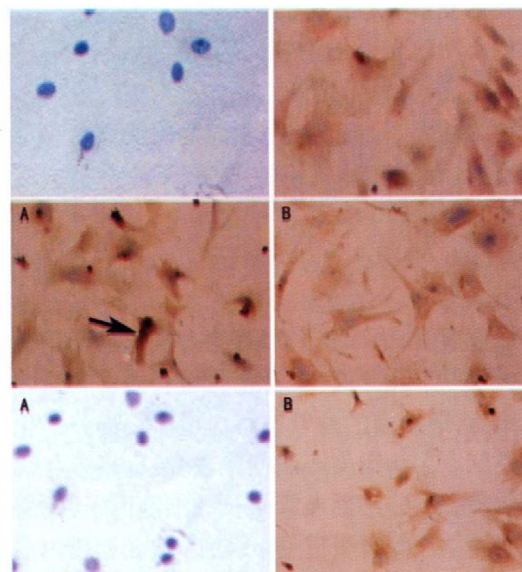


图 1. 骨髓间充质干细胞 CD34(左上)、CD44(右上)染色和 α 横纹肌肌动蛋白(中)、肌钙蛋白 T(下)染色($\times 400$) A 为诱导前, B 为诱导后。

表 1. 细胞移植前后左心室功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LVSP(mmHg)	LVDP(mmHg)	+ dp/dt(mmHg/s)	- dp/dt(mmHg/s)
正常对照组	10	141.2 \pm 4.2	5.1 \pm 1.2	4410 \pm 389	3018.1 \pm 358
模型组	12	113.6 \pm 12.6 ^a	25.4 \pm 8.2 ^a	2378.9 \pm 351 ^a	1995 \pm 160 ^a
诱导前移植组	11	122.5 \pm 10.2 ^b	17.1 \pm 6.1 ^c	3130 \pm 215 ^c	2345 \pm 114 ^b
诱导后移植组	10	121.6 \pm 11.3 ^b	18.4 \pm 5.5 ^c	3044 \pm 295 ^c	2440 \pm 97 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。



图 2. 心肌 HE 染色(左, $\times 200$)及髓间充质干细胞移植后存活(中)、分化(右)情况($\times 400$)

3 讨论

利用干细胞移植增加具有收缩功能的心肌细胞数目,从而改善因各种原因所致的心功能衰竭,是继内科药物、介入及手术治疗后的又一新的治疗手段。作为供体的细胞类型包括骨骼肌卫星细胞、胚胎干细胞和骨髓干细胞等,BMMSC 由于自体来源,具备多向分化能力,无免疫排斥反应,具有很好的应用前景^[6]。既往的动物实验和临床研究表明,BMMSC 移植可以在心肌内存活并改善因冷冻或结扎所致的心肌梗死后受损的心脏功能^[7,8],但对非缺血性心肌病导致的心功能衰竭,BMMSC 及其诱导后细胞移植的效果尚缺乏足够的动物实验及临床实验依据^[9-11]。本研究结果表明,细胞移植组的心功能恢复明显优于模型组,表现在移植组的 LVSP 及左心室内压最大上升和下降速率明显高于模型组,且诱导前后的 BMMSC 对心功能改善都有明显作用,而二者间差异无统计学意义。

研究表明,BMMSC 移植改善心功能的作用机制可能涉及以下几方面: ①分化为血管内皮和血管平滑肌细胞,形成新的血管改善血供。②部分分化成心肌细胞。③与宿主心肌细胞融合,直接参与宿主心脏收缩。④分泌促血管生长的细胞因子,促进侧支循环建立。刺激宿主心肌细胞分泌血管内皮生长因子,促进先前存在的血管系统的增殖。在损伤局部通过自身分泌以及上调周边细胞表达多种细胞活性因子,抑制凋亡,减少心肌细胞的丢失。其中移植细胞在宿主心肌内存活并向心肌细胞分化是改善心功能的前提。本实验结果表明,BMMSC 移植进入心肌 4 周后仍能存活,并有部分细胞分化成心肌细胞,表达心肌特异性蛋白——肌钙蛋白 T。BMMSC 向心肌细胞分化的机制目前尚不明确,既往的研究表明,BMMSC 向心肌细胞分化的条件在体外主要是化学诱导,在体内主要是心肌微环境诱导。本实验应用的诱导剂 5-氮胞苷是一种 DNA 甲基化抑制剂,Robertson 等^[12]解释甲基化对某些基因维持印记是必需的,去甲基化可使基因转录,恢复活性,5-氮胞苷可与 DNA 共价结合,促进 BMMSC 中某些基因的去甲基化过程,使某些与心肌分化相关的基因得以表达,从而使 BMMSC 向心肌细胞分化。而

未诱导的 BMMSC 移植进入心脏后,局部的心脏环境可能进一步诱导其向心肌细胞分化,即“组织环境学说”^[13],各种因素包括心腔内压力、心脏舒缩的牵拉作用以及电信号传导刺激等,促发细胞间的连接并改变细胞外的基质构成,从而诱导 BMMSC 向心肌细胞分化。本实验观察到在体外经化学诱导的 BMMSC 移植进入宿主心脏后部分细胞可以表达心肌特异性蛋白——肌钙蛋白 T,未经诱导的 BMMSC 移植进入宿主心脏 4 周后,也有部分细胞表达肌钙蛋白 T,提示两种方式均可使 BMMSC 向心肌细胞分化,并在宿主体内发挥收缩功能。这可能就是移植诱导前后的 BMMSC 对心功能改善无显著性差异的原因。其促进血管生成及内分泌功能尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Richardson P, McKenna WN, Bristow M, et al. Report of 1995 World Health Organization /International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies [J]. *Circulation*, 1996, **93**: 841-842.
- [2] Chiu RCJ, Zibaitis A, Kao RI. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation [J]. *Ann Thorac Surg*, 1995, **60**: 12-18.
- [3] Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006, **231** (1): 39-49.
- [4] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells [J]. *Exp Bio Med (Maywood)*, 2001, **226** (6): 507-520.
- [5] Siveski-Hiskovic N, Hill M, Chow DA, et al. Proboccol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect [J]. *Circulation*, 1995, **91**: 10-15.
- [6] Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2002, **91** (3): 189-201.
- [7] Tomita S, Li RK, Weisel RD. Autologous translation of bone marrow cells improves damaged heart function [J]. *Circulation*, 1999, **100** (suppl ③): 247-256.
- [8] Tomita S, Mickle DAG, Weisel RD. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow cell transplantation [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, **123**: 1132-1140.
- [9] 张静,李庚山,李国草,等.骨髓间充质干细胞自体移植治疗阿霉素心肌病[J].微循环学杂志,2005, **15** (3): 8-10.
- [10] 周诚,杨辰垣,肖诗亮,等.骨髓基质细胞移植治疗扩张型心肌病可行性的探讨[J].心肺血管病杂志,2004, **23** (3): 170-172.
- [11] 胡春松,程晓曙,吴清华,等.自体骨髓移植治疗扩张型心肌病并心力衰竭的初步疗效(附 5 例报告)[J].中国分子心脏病学杂志,2003, **3** (1): 14-17.
- [12] Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions [J]. *Carcinogenesis*, 2000, **21** (3): 461-467.
- [13] Oric D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium [J]. *Nature*, 2001, **410**: 701-705.

(此文编辑 许雪梅)