

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:51 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.012.html>

脐带间充质干细胞移植治疗心肌梗死的实验研究

武开宏 徐 飞 孙 剑 莫绪明

摘要 目的 探讨心肌内注射脐带间充质干细胞对心肌梗死的影响及作用机制。方法 采用开胸结扎冠状动脉前降支的方法建立心梗模型,将实验大鼠随机分为移植组和对照组。移植组每只大鼠局部注射约 5×10^6 个细胞悬液,对照组注射等量磷酸缓冲液。采用心脏彩色多普勒超声进行心功能测定。采用免疫荧光鉴定细胞存活、细胞因子分泌以及微血管密度的变化。结果 移植后4周,移植组大鼠的心脏功能较对照组明显改善。组织学检查显示移植的脐带间充质干细胞在梗死心肌内存活并迁移,免疫荧光染色显示移植的脐带间充质干细胞能够分泌血管内皮生长因子,而且移植组的微血管密度较对照组明显增加。结论 脐带间充质干细胞移植后能够通过分泌细胞因子促进血管新生,改善心脏功能。

关键词 干细胞; 移植; 心肌梗死; 旁分泌

中图分类号 R 654.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1773-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.012

心肌梗死后心肌的坏死是不可逆的,随着外科冠状动脉旁路移植术和介入治疗的发展,心肌梗死患者的死亡率显著降低,但仍有相当一部分患者因大面积心肌梗死而进展为心功能不全。由于心肌内源性修复十分有限,所以通过细胞移植来修复受损心肌、改善心脏功能的再生医学研究受到越来越多的重视^[1]。间充质干细胞是一类可以自体来源、具有自我更新和多向分化潜能的干细胞,研究^[2]表明间充质干细胞移植能够促进梗死心肌的再生和心脏功能恢复,但其具体的作用机制仍未完全阐明。该实验以脐带间充质干细胞为种子细胞,研究细胞移植对大鼠心肌梗死后心脏功能的影响并探讨可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与标记 采用胶原酶胰酶消化法分

离脐带间充质干细胞。培养组成: DMEM-F12 培养基、10% 胎牛血清、100 U/ml 青、链霉素、2 mmol/L 谷氨酰胺、5 ng/ml 表皮生长因子。选取第4~6代细胞作为移植细胞,移植前进行 CM-DiI 标记。标记方法: 将 2 μ g/ml CM-DiI 与脐带间充质干细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵育 8 min; 然后再 4 $^{\circ}$ C 继续孵育 15 min,重悬于 200 μ l PBS 中,供移植用。

1.2 细胞移植 选取8周龄SD雄性大鼠30只,按30 mg/kg 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉,采用结扎左冠状动脉前降支的方法建立大鼠心肌梗死模型,术后腹腔内注射青霉素40万U/d,连续3d,预防感染。模型建立后2周,将大鼠随机分为移植组和对照组,对移植组的大鼠,将 CM-DiI 标记的脐带间充质干细胞注射在缺血梗死区心肌内,每只大鼠接受 5×10^6 (200 μ l) 细胞悬液注射,对照组则注射等量的 PBS。观察时间为4周。

1.3 心功能检查 在细胞移植后4周,对移植大鼠行心脏超声心动图检查。采用 Sequoia 512 型 12 MHz 高频探头超声心动仪进行超声检查。采用左室射血分数和左室舒张末期容积来评价大鼠的心脏功能。

1.4 免疫荧光检查 功能检测完成后,脱颈法处死大鼠,取出心脏,去除心脏表面脂肪组织及大血管,制作冰冻切片。为检测移植细胞与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)分泌的相关性,免疫荧光鉴定局部梗死心肌内 VEGF 抗体的表达。为检测梗死心肌内的微血管密度,采用内皮特异性的凝集素 1(BS-1 lectin) 标记内皮细胞,在荧光显微镜下观察两组微血管密度的不同,随机选择5个视野区域进行计数并计数每平方毫米的微血管数量。免疫荧光的步骤: 切片用 PBS 轻轻洗涤2次后,2% 多聚甲醛固定20 min。PBS 浸洗后,封闭血清封闭30 min,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 轻轻浸洗3次,加入二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育30 min, PBS 浸洗后,共聚焦显微镜下观察。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2016-08-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81100114); 江苏省六大人才高峰课题(编号: 2014-WSW-057)

作者单位: 南京医科大学附属南京儿童医院心胸外科, 南京 210008

作者简介: 武开宏,男,副教授,责任作者, E-mail: pumcwu@aliyun.com

2 结果

2.1 一般情况 模型建立 2 周内 6 只大鼠死亡, 均死于模型建立 48 h 内。余 24 只大鼠进行超声心动图检查, 有 23 只大鼠的左室射血分数低于 60%, 随机分为移植组 ($n = 12$) 和对照组 ($n = 11$)。细胞移植后, 移植组有 2 只、对照组有 1 只大鼠死亡且都死于开胸术后 48 h 内。最终每组各有 10 只大鼠。

2.2 超声心动结果 两组大鼠在接受移植前的超声心动指标无明显差异。在移植后 4 周, 与对照组比较, 脐带干细胞移植组大鼠在移植后 4 周的左室射血分数明显增加, 而左室舒张末期和收缩末期的内径显著增大 ($P < 0.05$)。

2.3 脐带间充质干细胞的存活及迁移 移植后第 4 周, PBS 组心脏的左心室切面观察显示心肌变薄、室腔增大。移植组心脏改变不明显。移植 4 周后, 荧光显微镜下观察显示梗死心肌内可见 CM-DiI 标记的脐带间充质干细胞, 细胞多集中在注射部位的心内膜或心外膜组织内 (图 1A), 并开始向周围心肌组织迁移、游走, 分散在心肌组织内 (图 1B)。

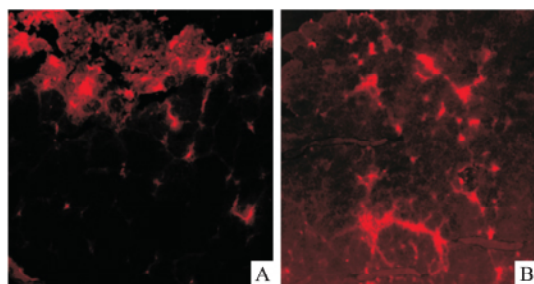


图 1 脐带干细胞在心肌内存活、迁移 $\times 20$
A: 局部注射部位; B: 细胞开始迁移、游走

2.4 免疫荧光检测 移植 4 周后, 荧光显微镜下可见 CM-DiI 标记的脐带间充质干细胞在梗死心肌内存活。VEGF 免疫荧光染色可见 CM-DiI 阳性的脐带间充质干细胞周围 VEGF 染色阳性, 表明移植的脐带间充质干细胞能够分泌 VEGF, 促进血管新生 (图 2)。

2.5 微血管密度检测 为鉴定脐带间充质干细胞分泌细胞因子 VEGF 能否促进血管新生, 该研究通过 BS-1 lectin 染色鉴定两组微血管密度变化 (图 3)。结果显示移植组的微血管密度为 (1214.65 ± 66.67) 个/ mm^2 , 对照组的微血管密度为 (867.78 ± 65.20) 个/ mm^2 , 与对照组比较, 移植组的微血管密度明显增加, 两组比较差异有统计学意义 ($t =$

2.436 $P < 0.05$)。表明脐带间充质干细胞能够增加局部梗死心肌内的血液供应, 从而促进心脏功能的恢复。

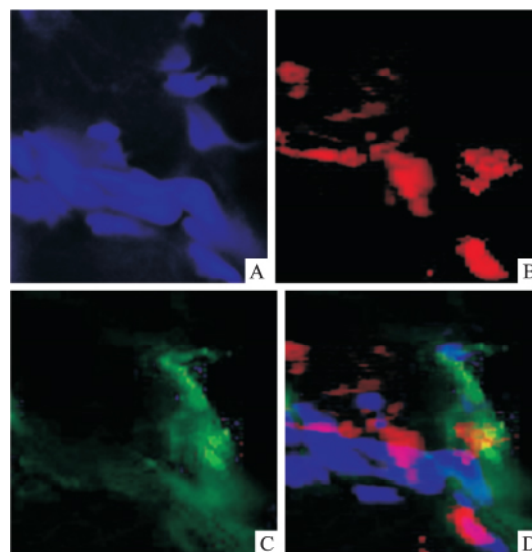


图 2 免疫荧光鉴定 VEGF 分泌 $\times 20$
A: DAPI 染色; B: DiI 阳性细胞; C: VEGF 染色阳性; D: ABC 重合后移植干细胞能够分泌 VEGF

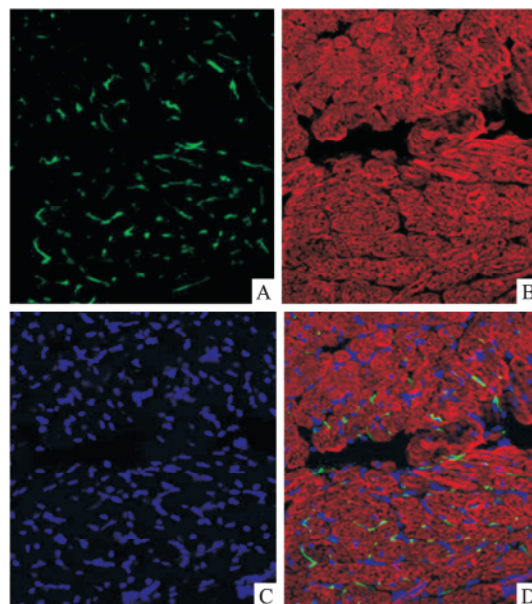


图 3 免疫荧光鉴定微血管分布 $\times 20$
A: BS-1 lectin 染色; B: 同一切片 sarcomeric actin 染色; C: DAPI 染色; D: A、B、C 复合图片

3 讨论

心肌梗死以及其导致的心力衰竭发病率高, 虽然外科冠状动脉旁路移植和介入治疗取得很大发展, 但对于弥漫性冠状动脉狭窄, 外科冠状动脉旁路

移植以及支架介入治疗都无能为力,只能依靠药物对症处理或等待心脏移植。由于供体心脏的匮乏,很多患者在等待移植的过程中死去,存活的患者生活质量差,造成沉重的家庭和社会负担^[3]。随着对干细胞认识的加深以及分子生物学的发展,细胞移植有可能成为治疗心肌梗死及心力衰竭的新方法。研究^[4]表明骨髓干细胞移植能够促进缺血心脏的功能恢复,为治疗心肌梗死等缺血性疾病开辟了一条新的途径。

张静等^[5]发现同种异体骨髓间充质干细胞移植后能够表达心肌特异性标志物,但表达持续性有限,说明心肌细胞分化在提高心脏功能方面的作用有限。

Bader et al^[6]系统研究了间充质干细胞移植改善心脏功能的作用机制可能与血管生成的旁分泌作用有关,能够分泌促血管新生因子,如 VEGF、bFGF 等,而 VEGF 在血管生成过程中起着非常重要的作用。Tang et al^[7]将骨髓间充质干细胞注射到心肌梗死大鼠的梗死边缘区,2 周后 bFGF、VEGF 和 SDF-1 表达升高,心脏收缩功能明显提高,提示间充质干细胞通过旁分泌作用促进血管新生,降低心肌重构,从而促进心脏功能的恢复。

本研究采用胶原酶消化法成功分离出脐带间充质干细胞,该细胞有骨髓间充质干细胞相似的生物学特性,且细胞增殖能力更加旺盛,同时这些细胞可以冻存,以备将来之用,是非常有前途的细胞来源。实验^[8-9]证明脐带间充质干细胞在体外能够分化为心肌细胞和内皮细胞,在缺血微环境下,能够分化为内皮细胞,参与血管新生。本研究结果显示脐带间充质干细胞能够在局部缺血心肌组织内存活,随着时间的变化而向周围组织迁移。超声结果显示移植 4 周后,移植组的左室射血分数明显增加,左室舒张功能明显改善。

通过对局部心肌组织的免疫荧光染色鉴定,结果显示移植的脐带间充质干细胞能够分泌 VEGF,促进血管新生。采用 BS-1 lectin 染色鉴定两组微血管密度变化,结果显示单位面积移植组的微血管密度较对照组明显增加,进一步证明了脐带间充质干细胞能够通过旁分泌增加局部梗死心肌内的血液供应,从而促进心脏功能的恢复。

经过本实验研究,推测脐带间充质干细胞移植后能够在心肌内存活并发生迁移,在局部心肌微环

境下,能够通过旁分泌作用分泌血管新生因子 VEGF 等,促进血管新生,从而促进心肌梗死后心脏功能的恢复。脐带间充质干细胞在梗死心肌微环境下的旁分泌机制还需要进一步研究^[10]。但脐带间充质干细胞能够冻存,以便将来用于自身移植^[11]。随着干细胞研究的进一步深入,脐带间充质干细胞将会成为重要的细胞移植的种子细胞来源。

参考文献

- [1] Cogle C R, Wise E, Meacham A M, et al. Detailed analysis of bone marrow from patients with ischemic heart disease and left ventricular dysfunction: BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes [J]. Circ Res, 2014, 115 (10): 867-74.
- [2] Sanganalath S K, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions [J]. Circ Res, 2013, 113 (6): 810-34.
- [3] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014 [J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42 (2): 98-122.
- [4] Goumans M J, Maring J A, Smits A M. A straightforward guide to the basic science behind cardiovascular cell-based therapies [J]. Heart, 2014, 100 (15): 1153-7.
- [5] 张静, 魏峰, 吴忠东, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞在大鼠体内心肌缺血微环境中的分化及存活 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49 (3): 300-3.
- [6] Bader A M, Brodarac A, Klose K, et al. Mechanisms of paracrine cardioprotection by cord blood mesenchymal stromal cells [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2014, 45 (6): 983-92.
- [7] Tang Y L, Zhao Q, Qin X, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction [J]. Ann Thorac Surg, 2005, 80 (1): 229-36, discussion 236-7.
- [8] 武开宏, 莫绪明, 卢士红, 等. 人脐带间充质干细胞分化为心肌细胞的实验研究 [J]. 中华生物医学工程杂志, 2010, 16 (3): 191-4.
- [9] 武开宏, 莫绪明, 孙剑, 等. 脐带间充质干细胞分化为内皮细胞促进血管新生 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2011, 27 (9): 553-5.
- [10] Yao Y, Huang J, Geng Y, et al. Paracrine action of mesenchymal stem cells revealed by single cell gene profiling in infarcted murine hearts [J]. PLoS One, 2015, 10 (6): e0129164.
- [11] Balci D, Can A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8 (1): 60-72.

EPO 治疗对大鼠脊髓损伤后脊髓运动功能恢复的实验研究

王康康¹ 张 辉¹ 方 晓¹ 王少滨² 李小波¹ 刘 杰¹ 尹宗生¹

摘要 目的 探讨人重组促红细胞生成素(rh-EPO)在大鼠脊髓损伤(SCI)后运动功能恢复中的作用。方法 选取30只200~230 g成年雄性SD大鼠,随机分为假手术(Sham)组、脊髓损伤(SCI)组和EPO组,每组10只。Sham组仅行椎板切除术,不伤及脊髓。SCI组和EPO组行椎板切除及脊髓打击术。术后EPO组腹腔注射rh-EPO,SCI组和Sham组采用相同剂量的生理盐水。应用BBB评分评估大鼠术后第1、3、7、14天的后肢运动功能恢复情况。HE染色观察术后第14天脊髓形态学变化;免疫荧光测定新生神经元的增殖情况。结果 术后第1、3天SCI组和EPO组之间BBB评分差异无统计学意义;术后第7、14天EPO组BBB评分明显高于SCI组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。SCI组可见大量胶质瘢痕、

空洞形成和炎性细胞浸润;EPO组上述改变较SCI组减轻。Sham组、SCI组和EPO组新增殖神经元数目逐渐增多,各組间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 大剂量rh-EPO的治疗可减轻脊髓内炎症反应、刺激脊髓新生神经元的增殖和促进大鼠SCI后后肢运动功能的恢复。

关键词 脊髓损伤;促红细胞生成素;神经元;大鼠

中图分类号 R 651.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)12-1776-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.013

2016-07-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81171173);安徽省自然科学基金(编号:11040606Q25)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

²安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230022

作者简介: 王康康,男,硕士研究生;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: yinzongsheng1961@sina.com

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是骨科较常见的损伤,对于患者而言是一个毁灭性的打击,对于医疗系统而言需要长期高昂的支出^[1],目前尚无有效的治疗方案。研究^[2]显示人重组促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rh-EPO)对神经系统具有保护作用,但具体机制尚不清楚。急性SCI后的神经生发对其肌力的恢复是至关重要的,而SCI预后不良的原因之一就是神经元死亡过多和新增殖的神经元过少。SCI后的炎症反应破坏脊髓

Human umbilical cord stem cell transplantation to treat myocardial infarction: an experimental study

Wu Kaihong, Xu Fei, Sun Jian, et al

(Dept of Cardiothoracic Surgery, Nanjing Children's Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210008)

Abstract Objective To investigate the therapeutic effects and mechanisms of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarction model. **Methods** Myocardial infarction was induced by using left anterior descending coronary artery, the experimental rats were randomly divided into transplantation group(5×10^6 cells) and phosphate buffered saline(PBS) control group. Cardiac function was assessed by echocardiography 4 weeks after cell transplantation. Immunofluorescence was performed to investigate the survival of transplanted cells, the difference of secretion of cytokines and capillary density. **Results** A statistically significant improvement of cardiac function was observed in the transplantation group compared with the control group 4 weeks after transplantation. Histological examination revealed that the transplanted cells survived and engrafted in the infarcted myocardium. Cell treatment contributed to the secretion of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Similarly, capillary density increased in transplantation group compared with the control group. **Conclusion** Transplantation of human umbilical cord derived stem cells contributes to cardiac function recovery through secretion of growth factors and angiogenesis.

Key words stem cells; transplantation; myocardial infarction; paracrine