

骨髓间充质干细胞移植治疗心力衰竭

林明, 林美萍, 陈书尚, 许昌声

【摘要】 目的 探讨骨髓间充质干细胞移植对阿霉素诱导的心力衰竭大鼠心功能的影响。**方法** 无菌条件下取 8 周龄 F344 大鼠的股骨和胫骨, 获得骨髓间充质干细胞(MSCs), 在体外纯化、扩增后, 用 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)进行标记, 然后注射到心力衰竭模型细胞移植组 and 对照组大鼠的心肌组织内, 细胞移植后 4 周, 采用生理记录仪测量 3 组大鼠的心功能, 处死动物, 心脏切片行免疫组化了解移植细胞在受体心脏的存活情况。**结果** 细胞移植后 4 周, 细胞移植组大鼠死亡率为 6.2%, 明显低于假细胞移植组 12.5% ($P < 0.01$); 在受体大鼠的心脏切片上有 BrdU 标记的移植细胞存活。心功能测定显示: 与对照组相比, 细胞移植组最大左室收缩末压(LVSP)、心率(HR)、左室内压最大(最小)变化速率($LV \pm dp/dt_{max}$)均明显下降 ($P < 0.01$), 而左室舒张末压(LVDP)明显升高 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 细胞移植组大鼠的 LVSP、HR、 $LV \pm dp/dt_{max}$ 均有明显升高 ($P < 0.01$), 而 LVDP 明显降低 ($P < 0.01$); 与假移植组相比, 细胞移植组大鼠的 HR、 $LV \pm dp/dt_{max}$ 仍有明显下降 ($P < 0.01$), 而 LVDP 明显升高 ($P < 0.01$)。**结论** MSCs 移植可有效改善阿霉素诱导的扩张型心力衰竭大鼠的心功能, 减少心力衰竭大鼠的死亡率。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 心力衰竭; 移植

Therapy of Heart Failure Rats with Mesenchymal Stem Cell Transplantation LI N Ming, LI N Mei ping, CHEN Shu shang. The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University Department of Hypertension, China

【Abstract】 Objective Explore the effect of mesenchymal stem cell transplantation on cardiac function in rats with adriamycin (Adr) induced heart failure. **Methods** MSCs were isolated from 8-week old F344 rats and cultured in vitro. Cells at the third passage were identified with a flow cytometer and labeled with (5-Bromo-2'-Dexuuridine, BrdU) before transplantation. BrdU labeled MSCs (3×10^6 cells) was transplanted into rats (the transplantation group and the sham transplantation group, respectively) via femoral vein. Four weeks after the transplantation, cardiac function was evaluated using physiological recorder. Hearts were harvested and analyzed by immunohistochemistry to identify the transplanted BrdU labeled cells. **Results** Four weeks after transplantation: the mortality of transplantation group was 6.2%, significantly lower than 12.5% in sham transplantation group ($P < 0.01$); BrdU labeled transplanted MSCs could be found in the hearts of the recipients. Hemodynamic measurements showed that Adr caused a significant decrease in LVSP, heart rate, $LV \pm dp/dt_{max}$ and an increase in LVDP in the sham transplantation group ($P < 0.01$), compared with the normal control group. Mesenchymal stem cell transplantation significantly improved hemodynamic parameters: LVSP, heart rate, $LV \pm dp/dt_{max}$ and LVDP, compared with those in the sham transplantation group, but still significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Mesenchymal stem cell transplantation significantly improve cardiac function and survival in rats with Adr induced heart failure.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Heart failure; Transplantation

各种心脏疾病引起心肌细胞坏死和心脏功能受

损以后, 由于心肌细胞死亡后不能再生, 残留的正常心肌细胞亦不能增殖替代坏死组织, 因而心脏功能随时间进行性恶化^[1-2]。临床药物治疗和介入治疗均不能替代不可复生的坏死心肌; 因此, 在心肌受损后进行细胞移植以产生新的心肌组织, 恢复受损的心脏功能, 已成为国内外研究的重点。近年的研究

收稿日期: 2007-03-23

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2006J0089); 福建医科大学教授基金资助项目JS6040)

作者单位: 福建医科大学附属第一医院心内科, 福建 福州

350005

发现,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植作为一种新兴的治疗手段,可修复损伤的心肌,改善缺血心脏的整体功能,并进行了大量的基础及临床研究^[3-7]。然而有关利用 MSCs 移植治疗非缺血性心肌病的研究相对甚少。本研究采用腹腔注射阿霉素的方法建立扩张型心肌病心力衰竭的大鼠模型,探讨 MSCs 移植后移植细胞在宿主心脏的存活情况及对大鼠心功能的改善。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

12 周龄清洁级、具有同基因背景的近交系雄性 F344 大鼠 45 只,体质量(200.3 ± 27.8)g(上海斯莱克实验动物有限责任公司提供)。所有大鼠均在相同的条件下饲养:3~4 只/笼,恒温(22 ± 2)℃,恒湿(55 ± 5)%,人工光照明暗各 12 h/d,24 h 自由取食和饮水,饲料由上海必凯公司提供。

1.1.2 药品及试剂

淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司),胎牛血清及低糖 DMEM 培养基(Gibco 公司),胰蛋白酶(DIFCO),5-溴-2'-脱氧尿苷(5-Bromo-2'-Deoxyuridine, BrdU)及小鼠抗大鼠 BrdU 单克隆抗体(Sigma 公司),SP 法试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及心力衰竭模型建立

实验动物分组:动物先随机选取 10 只作为对照组;其余 35 只大鼠用于建立阿霉素(adriamycin, Adr)(浙江海正药业股份有限公司,批准文号:国药准字 H33021980)诱导的心力衰竭模型:阿霉素针剂用生理盐水配成 2 g/L 浓度,用 1 mL 注射器,按 2 mg/kg 剂量溶于 1 mL 生理盐水,腹腔注射,1 次/周,共 6 次。待模型建立后,存活大鼠(32 只)再随机分为 2 组:假移植组(16 只)、细胞移植组(16 只)。

1.2.2 MSCs 的分离、纯化、扩增与鉴定

将 F344 大鼠乙醚过度麻醉致死,无菌条件下获取股骨和胫骨,剪除两端干骺端,显露骨髓腔,用 DMEM 培养液对骨髓腔进行反复冲洗,将冲洗液进行离心(1000 r/min)10 min,弃去上清液及脂肪层,用 2 mL DMEM 培养液重新混悬细胞,混匀后按 2:1 轻轻地加到比重为 1.077 g/L 的淋巴细胞分离液上,2000 g/min 离心 10 min(离心半径 2.5 cm),

吸取单个核细胞。加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,移入培养瓶,放入 CO₂ 的孵箱进行培养,用 Ficoll 密度梯度离心法来分离纯化 MSCs,约 3~4 d 换液 1 次。原代培养的细胞生长至铺满瓶壁的 2/3 以上时(约 10~14 d),即可传代。重复消化传代,即可得到纯化的 MSCs。美国 Beckman Coulter 公司的流式细胞仪检测传代后的细胞表面抗原表达。本研究以第 3 代 MSCs 作为移植治疗细胞。

1.2.3 MSCs 的细胞标记

移植前,待细胞达到 50% 融合时,在细胞培养瓶内加入上述 BrdU 液,终浓度调至 50 mg/L,于 37℃、含 5% 的 CO₂ 的饱和湿度培养箱内继续培养 48 h。

1.2.4 MSCs 移植

将大鼠经戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉生效后,暴露股静脉,用微量注射器吸取标记好的细胞溶液 50 μL,缓慢注入细胞移植组大鼠股静脉,压迫止血后缝合皮肤。术后予青霉素 20 万 U 腹腔注射预防感染。而假移植组则注射 50 μL 空白 DMEM 培养基,其余步骤同移植组。对照组不做任何处理。

1.3 结果观察

1) MSCs 细胞形态的观察:在倒置显微镜下,观察不同时期培养细胞的形态及特点。

2) 大鼠心功能的测定:于细胞移植术后 4 周,利用 RM6240 型四道生物信号采集处理系统,YP100 型压力换能器(成都仪器制造厂),测定各组大鼠的心功能。包括心率(HR)、最大左室收缩末压(LVSP)和左室舒张末压(LVDP)以及左室内压最大(最小)变化速率($\pm dp/dt_{\max}$)。

3) 心肌切片组织免疫学检查:完成心功能检查后,处死动物,取出心脏,在 4% 甲醛中固定 24 h,常规梯度酒精脱水、石蜡包埋后切片(4 μm)。行 HE 染色和免疫组化染色,使用普通光学显微镜观察心脏的病理改变。

1.4 统计学方法

本研究数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 10.0 统计软件处理数据,多个样本的均数比较采用 one way-ANOVA 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著意义。

2 结果

2.1 细胞移植后 4 周各组大鼠存活情况(表 1)

2.2 大鼠 MSCs 的形态观察与鉴定结果

对通过骨髓腔冲洗获得的细胞进行接种、培养, 24~48 h 后, 部分细胞开始贴壁。倒置显微镜下观察, 贴壁生长的细胞大多呈梭形或多角形, 有星状突起, 大小长短不一。另有较多黏附于瓶壁的杂细胞和死细胞(图 1A)。未贴壁的细胞及黏附于贴壁细胞之上的杂细胞在换液的过程中逐渐被清除。细胞以分散、克隆集落方式增殖。随着集落生长的不断扩大, 细胞逐渐密度变大, 细胞形状亦逐渐变为长梭形, 呈现成纤维样细胞外观(图 1B)。原代细胞约经 10~14 d 长满瓶底, 此时进行传代。传代培养后细胞增殖生长迅速, 约 10 d 后细胞长满瓶底。细胞为均一的长梭形成纤维样细胞, 呈放射状或栅栏状生长。另有少量体积较小的、圆形贴壁细胞与成纤维样细胞伴随生长(图 1C)。传到第 3 代, MSCs 为均

一的长梭形成纤维样细胞, 杂细胞已基本去除(图 1D)。流式细胞仪检测结果显示细胞均一性好, 纯度达 95% 以上; 其中 CD11b、CD34、CD45 检测是阴性, 而 CD44 与 CD90 表达阳性。

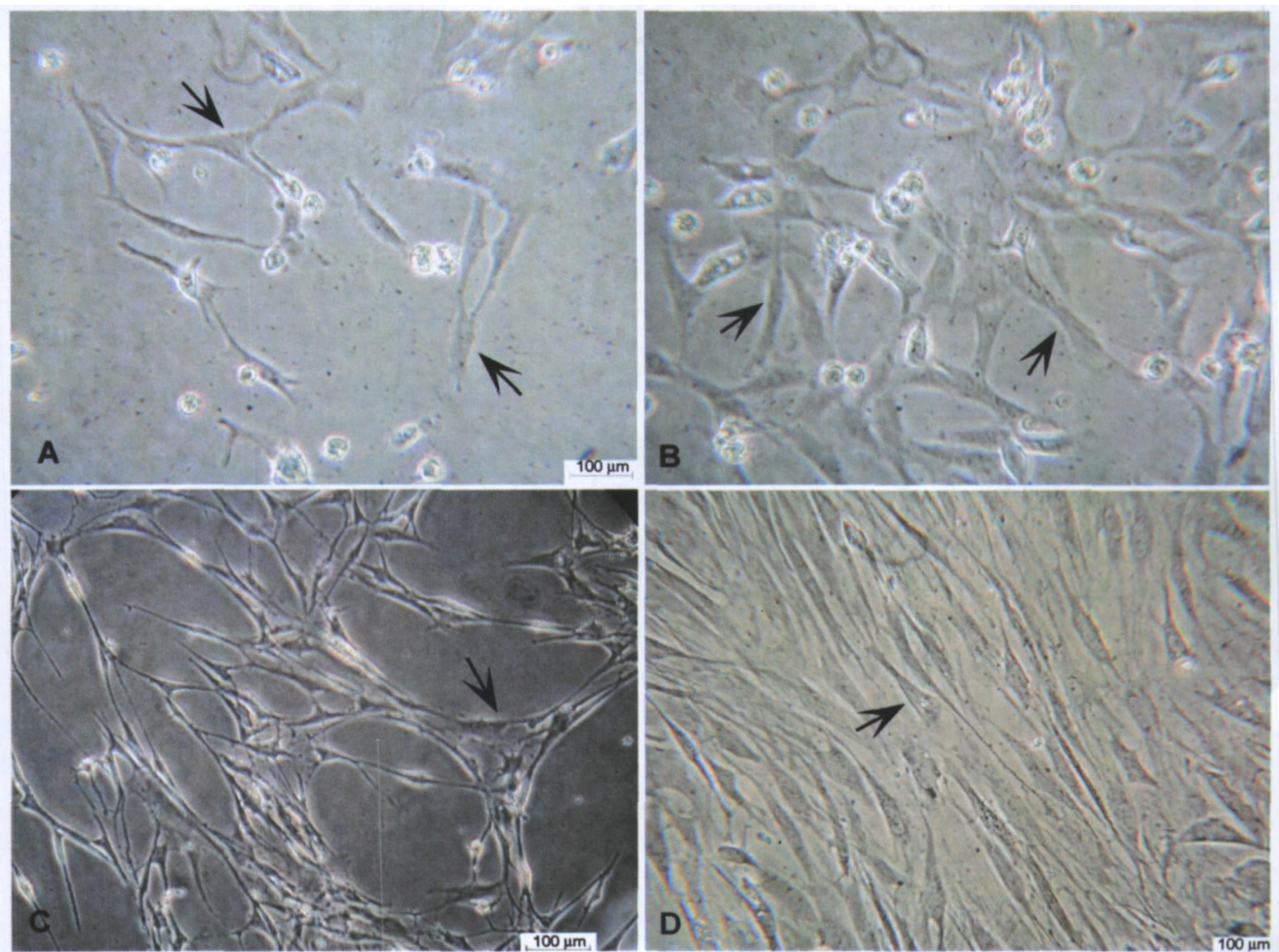
表 1 各组大鼠死亡率比较

组别	总数(只)	死亡数(只)	死亡率(%)
对照	10	1	10.0
假细胞移植	16	2	12.5
细胞移植	16	1	6.2 ^a

注: 与假细胞移植组比较, a: $P < 0.01$ 。

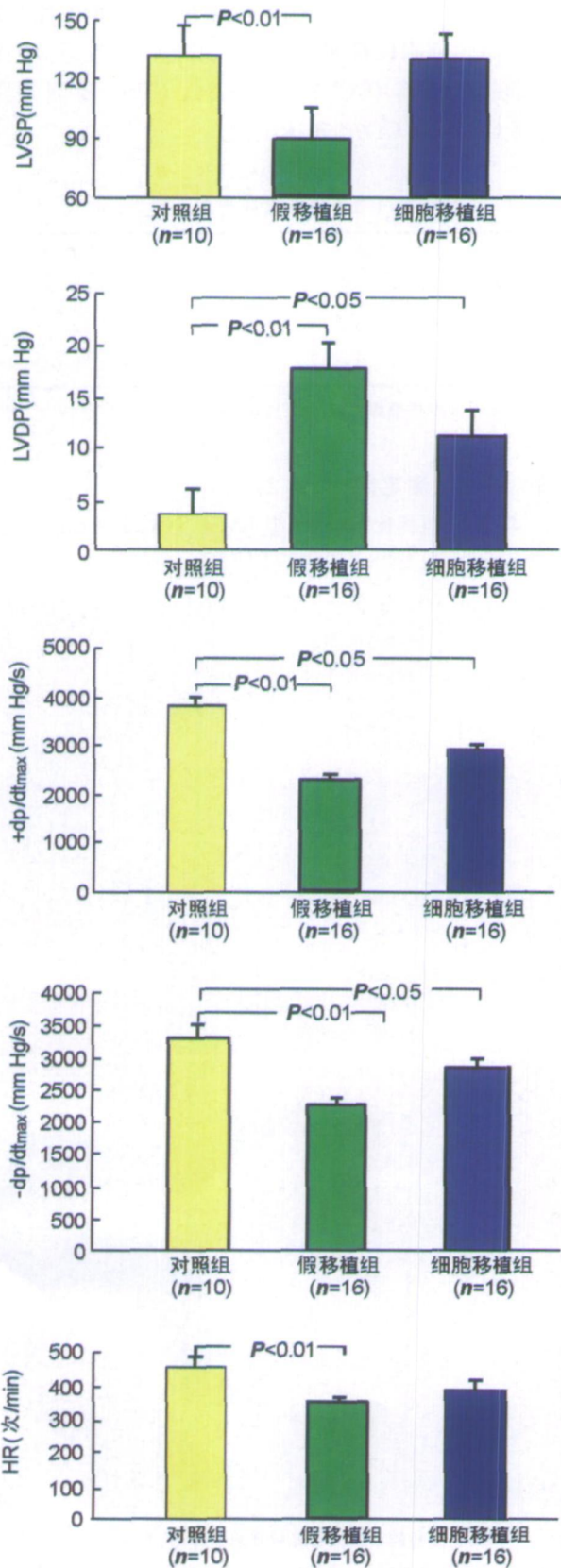
2.3 心功能测定结果(图 2)

与对照组相比, 假移植组 LVSP、HR、LV $\pm dp/dt_{max}$



MSCs: 骨髓间充质干细胞。A: 接种后 48 h 的原代骨髓间充质干细胞照片($\times 200$), 贴壁生长的细胞大多呈梭形或多角形, 有星状突起, 大小长短不一(箭头标记处); B: 接种后 7 d 的原代骨髓间充质干细胞照片, 细胞形状亦逐渐变为长梭形, 呈现成纤维样细胞外观(箭头标记处); C: 体外培养的第二代骨髓间充质干细胞照片($\times 100$), 细胞为均一的长梭形成纤维样细胞, 呈放射状或栅栏状生长(箭头标记处), 另有少量体积较小的、圆形贴壁细胞与成纤维样细胞伴随生长; D: 体外培养的第 3 代骨髓间充质干细胞照片($\times 200$), 传到第 3 代, MSCs 为均一的长梭形成纤维样细胞(箭头标记处)

图 1 大鼠 MSCs 的形态观察



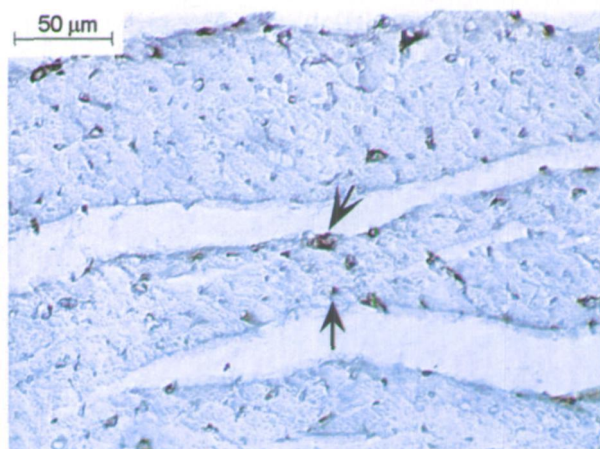
MSC:骨髓间充质干细胞;LVSP:左室收缩末压;LVDP:左室舒张末压±dp/dt_{max}:最大(最小)变化速率;HR:心率

图 2 MSC 移植后 4 周,大鼠的心功能测定结果

均明显下降($P < 0.01$),而 LVDP 明显升高($P < 0.01$),表明扩张型心肌病心力衰竭的大鼠模型已成功建立。与假移植组相比,细胞移植组大鼠的 LVSP、HR、LV ±dp/dt_{max} 均有明显升高($P < 0.01$),而 LVDP 明显降低($P < 0.01$);而与对照组相比,细胞移植组大鼠的心功能指标中除 LVSP ($P > 0.05$)外,心率、LV ±dp/dt_{max} 仍有明显下降($P < 0.01$),而 LVDP 明显升高($P < 0.01$,图 2)。

2.4 心肌切片组织免疫学检查结果

光学显微镜下观察,细胞移植组大鼠的心肌切片,可以在心肌间及血管壁上找到 BrdU 标记的移植细胞(图 3)。



为固绿复染,在心肌间及血管壁上可见到 BrdU 标记的移植细胞(箭头标记处)

图 3 心脏切片免疫组化照片(×400)

3 讨论

近几年,干细胞移植的优点和可行性,引起了广泛的关注。MSCs 是骨髓基质中除造血干细胞外的另一类干细胞,具有自我更新、分化增殖和多向分化潜能的特点,在体外培养的过程中始终保持其多向分化的潜能,且具有取材方便、自身移植无免疫排斥反应、无医学伦理道德争议等优势,可能成为一种理想的治疗心肌损伤的移植细胞^[8]。1999 年,Kocher 等^[9]首次报道在体外利用 5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-aza)诱导 MSCs 分化为心肌细胞。这些分化后的心肌细胞的表型与胚胎心肌细胞相似,具有心肌样超微结构,形成肌管样结构相互连接,出现协同跳动,并表达心房利钠肽、脑利钠肽。

本研究从骨髓分离来源的第 3 代均质纯化的培养细胞经流式细胞仪检测显示细胞均一性好,仅表

达间质类细胞的表面标记产物而不表达淋巴细胞、巨噬细胞、白细胞、造血细胞等表面标记产物,属于 MSC。MSC 具有特殊的“归巢”作用,能够迁移聚集到受损心肌处,这已被许多研究所证实,但其确切机制尚不清楚,可能与受损心肌局部微环境改变,细胞黏附分子、趋化因子、生长因子表达上调有关^[9-10]。鉴于 MSCs 的这一特性,我们在实验中采用经外周静脉注射的方法进行 MSCs 移植。移植细胞用 Br-dU 标记,以便移植后鉴定是否有移植细胞在受体心脏存活。移植后 4 周行心脏免疫组化证实,移植的 MSCs 在受体大鼠的心脏上存活。

目前评价心功能主要是通过超声心动图来测量,本实验通过生物信号采集系统,使结果更加精确。本研究发现,细胞移植组大鼠的死亡率低于假移植组。MSCs 移植后 4 周,细胞移植组大鼠的心功能指标中,HR、LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 均显著高于假移植组,而 LVDP 显著低于对照组,证实了经外周静脉行 MSCs 移植,移植细胞不仅可以在受体大鼠心脏存活,而且可同时改善大鼠的收缩及舒张功能。但我们注意到,细胞移植组大鼠的心功能与正常大鼠的心功能相比,差异仍有非常显著意义,这表明假移植组大鼠的心功能仅是部分得到了改善。

总之,通过 MSC 细胞移植,能够在缺血坏死的心肌组织内见到心肌的新生,并证实为移植的细胞,且心力衰竭大鼠心功能得到明显的改善,存活率明显提高,为临床治疗扩张型心肌病提供了新的治疗手段和实验依据。

4 参考文献

1 Armstrong MT, Lee DY, Armstrong PB. Regulation of prolifer-

ation of the fetal myocardium [J]. Dev Dyn, 2000, 219: 226-236.

2 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium [J]. Nature, 2001, 410: 701-705.

3 Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, et al. Survival integration and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts [J]. J Circulation, 1999, 100: 193-202.

4 Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287: H107-115. [Epub ahead of print].

5 YL Tang, Q Zhao, YC Zhang, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium [J]. Regul Pept, 2004, 117: 3-10.

6 Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results [J]. Jpn Circ J, 2001, 65: 845-847.

7 Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation [J]. Lancet, 2003, 361: 47-49.

8 Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 123: 1132-1140.

9 Kocher AA, Schuster MD, Szabo MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function [J]. Nat Med, 2001, 7: 430-436.

10 Gulla MM, Lazzari L, Pacchiana R, et al. Homing of peripherally injected bone marrow cells in rat after experimental myocardial injury [J]. Haematologica, 2003, 88: 614-621.

(本文编辑:曾国琦)