论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0532-03

平滑肌细胞移植提高大鼠心肌缺血模型心功能的可行性实验研究

刘 铭[1],张宝仁[2],邹良建[2],杨 康[1] ([1]第三军医大学西南医院胸心外科,重庆 400038;[2]第二军医大学长海医院全军胸心外科研究所,上海 200433)

提 要:目的 初步探讨移植平滑肌细胞对大鼠冠脉结扎心肌缺血模型心功能的提高作用。**方法** 用酶消化法从胎鼠胃中分离、提取平滑肌细胞,进行体外培养、扩增。结扎大鼠左冠状动脉前降支,制作心肌缺血模型。细胞移植组($n=10$)将体外培养、BrdU标记的平滑肌细胞,注射移植到冠脉结扎后2周形成的心肌梗死区中;对照组($n=10$)用同样的方法注射等量不含血清的DMEM培养液;两组动物术后均每日皮下注射环胞霉素A抑制免疫排斥反应。超声检查评估移植前、后大鼠的心功能状况。取大鼠心脏标本做抗BrdU、抗α-SMA免疫组化染色,检测心肌梗死区中植入的平滑肌细胞的存活情况。**结果** 移植后4周,平滑肌细胞存活于心肌梗死区,并形成肌样组织。与对照组比较,移植组左室前游离壁厚度明显增加[(2.51±0.22)mm *vs* (1.32±0.16)mm, $P<0.01$],左室舒张末容积(LVEDV)明显减小[(1.23±0.12)ml *vs* (1.92±0.18)ml, $P<0.01$],左室射血分数(LVEF)显著提高[(56.7±6.8)% *vs* (32.3±2.9)%, $P<0.01$]。**结论** 平滑肌细胞移植后能存活于心肌梗死区,并改善缺血心肌的心功能。

关键词:细胞移植;平滑肌细胞;心肌缺血;心功能

中图法分类号:R-332; R329.25; R542.2 **文献标识码**:A

Feasibility in improving heart function by smooth muscle cells transplantation into ischemic myocardium

LIU Ming[1], ZHANG Bao-ren[2], ZOU Liang-jian[2], YANG Kang[1] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility in improving the heart function by smooth muscle cells transplantation into the ischemic myocardium model established by coronary artery ligation. **Methods** Myocardial infarct was produced by ligation of the left coronary artery. At 2 weeks after establishment of myocardial infarct, cultured fetal rat gatric smooth muscle cells marked with BrdU were transplanted into the ischemic myocardium by direct injection (transplantation group, $n=10$), or culture medium alone (control group, $n=10$). Heart function was assessed by echocardiography before and at 4 weeks after transplantation. At 4 weeks after transplantation, the hearts were harvested. The transplanted smooth muscle cells were assessed by immunostaining against BrdU and α-SMA. **Results** The injected fetal smooth muscle cells survived in the infarcted regions and formed muscle-like tissues at the site of transplantation at 4 weeks after transplantation. The grafts thickened the wall of the left ventricle [(2.51±0.22) mm *vs* (1.32±0.16) mm, $P<0.01$] and were associated with reduced LV end-diastolic volumes [(1.23±0.12) ml *vs* (1.92±0.18) ml, $P<0.01$], enhanced LV ejection fraction [(56.7±6.8)% *vs* (32.3±2.9)%, $P<0.01$], prevented cardiac dilatation, and improved the ventricular function. **Conclusion** Smooth muscle cells transplantation into the ischemic myocardium can improve the injured heart function.

Key words: cell transplantation; smooth muscle cell; ischemic myocardium; heart function

缺血性心肌病的细胞移植治疗是目前心血管病领域研究的热点之一。应用平滑肌细胞移植治疗心肌缺血在国外已有研究报道,国内的相关报道尚不多见。本研究通过将胎鼠平滑肌细胞移植到大鼠冠脉结扎后2周形成的心肌缺血组织中,观察其移植后的存活情况及对心功能的影响,初步探讨移植平滑肌细胞改善冠脉结扎心肌缺血模型心功能的可行性。

1 材料与方法

1.1 平滑肌细胞的提取、培养、鉴定和标记

取孕18 d的SD大鼠(购自第二军医大学实验动物中心)的胎鼠胃,用0.2%的胰蛋白酶和0.1%的Ⅰ型胶原酶37 ℃消化

作者简介:刘 铭(1971-),男,湖北省咸宁市人,博士,主治医师,主要从事缺血性心脏病的基础和临床方面的研究。电话:(023)68765330

通讯作者:张宝仁,E-mail:zbr@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-04-12;修回日期:2004-12-28

20 min,使游离成单个细胞,600 × *g* 离心 5 min,收集消化的细胞,接种至 10 cm 培养皿中,加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置 37 ℃含 5%CO_2 的孵箱中培养 1 周。移植前向培养液中加 25 μl 0.4% 的 5-溴-2′-脱氧尿苷(BrdU)孵育 72 h,标记细胞。取移植前体外培养的细胞,100% 甲醇 – 20 ℃ 15 min 固定,用平滑肌特异性的抗 α-SMA 单克隆抗体(Sigma 公司)二步法免疫组化染色,鉴定培养的细胞。

1.2　冠脉结扎法制备心肌缺血模型

成年、雄性 SD 大鼠 20 只(购自第二军医大学实验动物中心),分为细胞移植组和对照组,每组 10 只,体质量 300 g 左右,腹腔内注射氯胺酮(22 mg/kg)、戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,气管插管接小动物呼吸机辅助呼吸。左侧第 3、4 肋间进胸,用 6-0 无创丙烯缝线贯穿缝扎左冠状动脉前降支,建立心肌缺血模型。

1.3　细胞移植

收集体外培养的平滑肌细胞,制成 20×10^6/ml 的细胞悬液。动物麻醉方法同前,正中切口进胸,用微量注射器将细胞悬液 200 μl(含细胞 4×10^6 个)注射到冠脉结扎后 2 周形成的心肌梗死区中(移植组 $n = 10$);对照组注射等量不含血清的 DMEM 培养液($n = 10$)。两组动物术后均每日皮下注射环胞霉素 A(5 mg/kg)。

1.4　超声心功能检查

移植后 4 周,用美国惠普超声仪 HP 5500,采用高频探头,频率为 8 ~ 12 MHz,选取标准左室乳头乳短轴切面、左室长轴切面结合 M 型和多普勒超声检查评价两组大鼠心功能,测量左室前游离壁厚度(LVAW)、左室收缩/舒张末期容积(LVESV/LVEDV)以及左室射血分数(LVEF)等指标。

1.5　病理检查

细胞移植后 4 周,取大鼠心脏标本,10% 缓冲福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片,厚度为 4 μm。用抗 BrdU 和抗 α-SMA 做免疫组化染色,检测心肌梗死区中植入的平滑肌细胞的存活情况。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件作 t 检验。

2　结果

2.1　体外培养的平滑肌细胞

体外培养的平滑肌细胞呈梭形或多形性生长,束状或放射状排列,细胞生长密集成片,部分区域细胞多层重叠,部分区域细胞单层,高低起伏,呈平滑肌细胞培养典型的"峰-谷"状生长特征。抗 α-SMA 染色鉴定培养的细胞为平滑肌细胞,胞浆呈棕黄色,肌丝清晰可辨,并沿细胞纵轴分布,见图 1。

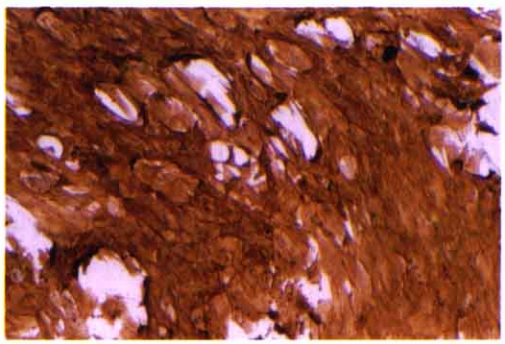


图 1　体外培养的平滑肌细胞抗 α-SMA 染色　(× 100)

Fig 1　Cultured smooth muscle cells immunostained for α-smooth muscle actin　(× 100)

2.2　心脏超声检查结果,见表 1

表 1　移植后 4 周移植组和对照组心脏超声检查结果 ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

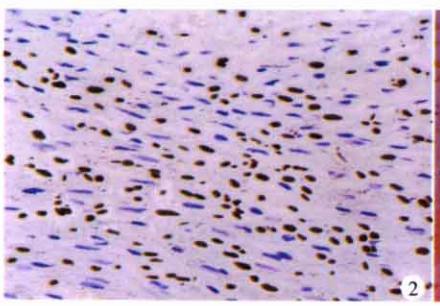
Tab 1　Heart function assessed by echocardiography at 4 weeks transplantation group and control group($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

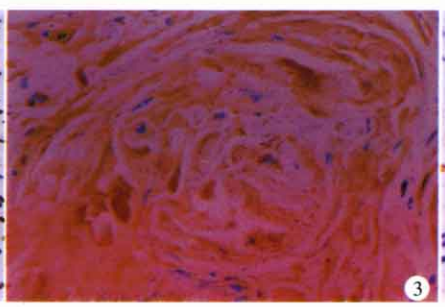
Group	LVAW(mm)	LVEDV(ml)	LVESV(ml)	LVEF(%)
Transpantation	2.51 ± 0.22▲	1.23 ± 0.12▲	0.69 ± 0.07▲	56.7 ± 6.8▲
Control	1.32 ± 0.16	1.92 ± 0.18	1.33 ± 0.14	32.3 ± 2.9

▲: $P < 0.01$, *vs* control

2.3　心肌梗死区中植入的平滑肌细胞

细胞移植组心肌梗死区中有抗 BrdU 染色阳性细胞,胞核呈棕色颗粒状,见图 2。抗 α-SMA 染色确定梗死区中植入的细胞为平滑肌细胞,并形成肌样组织。存活的平滑肌细胞多分布于心肌梗死区的边缘,周围有淋巴细胞浸润,见图 3。对照组无阳性发现,见图 4。





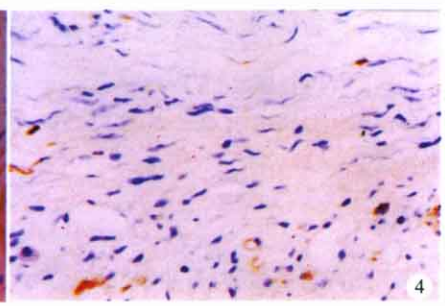


图 2　移植组心肌梗死区中抗 BrdU 染色阳性细胞　(× 100)

Fig 2　Positive cells in the infarct immunostained against BrdU in transplantation group　(× 100)

图 3　平滑肌细胞移植后形成的肌样组织,抗 α-SMA 染色　(× 400)

Fig 3　The muscle-like tissues formed by the transplanted smooth muscle cells immunostained against α-SMA　(× 400)

图 4　对照组心肌缺血区抗 α-SMA 染色　(× 400)

Fig 4　The scar tissues immunostained against α-SMA in control group　(× 400)

3 讨论

在细胞移植治疗缺血性心脏病的研究中，Li 等[1]较早报道应用平滑肌细胞移植于液氮直接冻蚀左心室游离壁造成的大鼠心肌缺血模型中，结果显示：植入的平滑肌细胞存活于心肌梗死区，与对照组比较，移植组大鼠受损心功能明显改善。由于直接冻蚀心肌的方法造成的心肌缺血梗死和临床心肌梗塞的病理过程明显不同，因此，其结论的临床意义不明确。比较而言，结扎冠状动脉制造的心肌梗死模型更符合临床病理过程，而将平滑肌细胞移植应用于此模型的研究少见报道。

本研究取胎鼠平滑肌细胞进行体外培养、扩增，并将其移植到冠脉结扎后 2 周形成的大鼠心肌梗死区，通过双标记免疫组化染色，发现植入的平滑肌细胞在心肌梗死区能存活，并形成肌样组织，且存活的细胞多位于梗死区的边缘，这是因为梗死边缘区的血运条件较好的缘故[2]。移植前、后的心脏超声检查结果显示：移植组左心室壁明显增厚，心腔缩小，射血分数提高，心功能改善。由于植入的平滑肌细胞排列不规则，细胞间又无连接结构，不能参与宿主心肌细胞的协同收缩，因此，平滑肌细胞移植心功能提高的机制在于增厚、加固了薄弱的心室壁，抑制心腔的进行性扩张和心室重构[1,3]。由于本研究是同种异体细胞移植，因此不可避免会发生排斥反应，尽管应用了免疫抑制剂环孢霉素 A，但植入的平滑肌细胞周围仍可见淋巴细胞浸润，提示免疫排斥反应的存在。

除平滑肌细胞外，目前可用于心肌移植的“种子”细胞包括心肌细胞[3]、骨骼肌成肌细胞[4]、骨髓基质干细胞[5]等，其共同不足是细胞来源有限，细胞的提取、培养、纯化过程复杂繁琐，制作成本高；而平滑肌细胞在体内分布广泛，来源充足，取材和培养容易，操作方便，并可作自体移植，因此，有一定临床应用价值[3,6]。

参考文献：

[1] Li R K, Jia Z Q, Weisel R D, *et al*. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(3): 513 - 522.

[2] Yoo K J, Li R K, Weisel R D, *et al*. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 70(3): 859 - 865.

[3] Scorsin M, Marotte F, Sabri A, *et al*. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas[J]? Circulation, 1996, 94(9 Suppl): II 337 - II 340.

[4] Taylor D A. Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure[J]. Curr Control Trials Cardiovasc Med, 2001, 2(5): 208 - 210.

[5] Hughes S. Cardiac stem cells[J]. J Pathol, 2002, 197(4): 468 - 478.

[6] Penn M S, Francis G S, Ellis S G, *et al*. Autologous cell transplantation for the treatment of damaged myocardium[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2002, 45(1): 21 - 32.

（编辑 汪勤俭）

（上接 531 页）

例中 18 例治愈，治愈率 60%，两组有显著性差异（$P < 0.05$），见表 1。

表 1 观察组与对照组治疗效果比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	年龄(岁)	停经时间(d)	治疗前 HCG 值(IU/L)	治愈率(%)
试验组	30	27.2±10.3	44.5±19.4	33.55±11.25	90.0
对照组	30	25.6±11.4	45.3±20.3	33.47±12.13	60.0
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	<0.05

药物副反应：试验组 6 例轻度恶心，但无呕吐，无口腔溃疡及骨髓抑制。对照组出现恶心、呕吐 5 例，所有病人均无肝肾功能损害。

3 讨论

MTX 为代谢类药物，是叶酸的拮抗剂，干扰 DNA 的合成，滋养细胞对其敏感，使用于异位妊娠后胚胎可停止发育[1]。抑制滋养细胞增殖并导致其凋亡，目前 MTX 已广泛用于治疗未破裂性输卵管妊娠，并取得了一定的效果，但全身用药的治疗效果并非令人满意，李志凌等[2]在 MTX 单次肌肉注射治疗异位妊娠的预试验中，未排除异位包块直径 > 5.0 cm 病例，其治疗失败率高达 50% ~ 70%，考虑与包块直径大，滋养细胞存活有关。米非司酮为孕酮拮抗剂，因与孕激素有相似的结构，从而竞争孕激素受体，使患者体内孕激素水平下降，异位妊娠的胚胎组织得不到孕激素的有效支持故而“枯萎”[1]。近年来应用米非司酮治疗输卵管妊娠的报道逐渐增多，刘凤英等[3]报道的 47 例治疗成功率为 61.7%。两者配伍治疗异位妊娠起协同作用，米非司酮和 MTX 联合治疗输卵管妊娠显著提高了成功率，能更快、更有效地抑制滋养细胞增长，从而减少了输卵管妊娠发生破裂的危险。本研究结果显示，联合用药具有安全可靠，疗效肯定的优点，值得推广应用。

关键词：输卵管妊娠；米非司酮；甲氨喋呤

中图法分类号：R714.22 文献标识码：B

参考文献：

[1] 任玉环. 保守治疗异位妊娠 3 种方法探讨[J]. 实用妇产科杂志, 2002, 18(6): 372 - 373.

[2] 李志凌, 左绪磊, 陈涤暇, 等. 氨甲喋呤单次肌肉注射治疗异位妊娠适应症和监测指标的研究[J]. 实用妇产科杂志, 1999, 15(6): 305 - 306.

[3] 刘凤英, 张洪文, 刘宜智, 等. 米非司酮治疗异位妊娠 47 例[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(3): 265 - 268.

（编辑 陈聪连）