论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2444-04

自体骨骼肌卫星细胞移植对心肌梗死大鼠心功能的影响

王红勇[1],何作云[2],于长青[1],向德兵[1],胡厚祥[1],王 毅[1],杨成明[1],王旭升[1],傅春江[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆 400042,[2]新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 了解自体骨骼肌卫星细胞(satellite cell,SC)移植至心肌对心肌梗死(myocardial infarction, MI)大鼠心功能的影响及其可能机制。**方法** 45只Wistar大鼠采用随机抽签法分为假手术组、对照组及移植组,对照组及移植组大鼠经结扎冠状动脉前降支建立MI模型。将体外培养2周的大鼠自体SC以注射的方式移植到移植组大鼠梗死区周围,4周后测定各组大鼠血流动力学、心功能、血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)浓度及缺血心肌毛细血管密度的变化,同时观察移植细胞在梗死区的生长、增殖情况并探讨它们相互的关系。**结果** SC在梗死区中可增殖分化为横纹肌纤维;与假手术组比较,尽管对照组及移植组大鼠之收缩压、舒张压、平均动脉压、左室收缩压及左室压力最大上升/下降速率均明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),左室舒张末压均明显增高($P<0.01$),但移植组左室压力最大上升速率、左室压力最大下降速率及左室舒张末压较之对照组则有明显改善($P<0.05$,$P<0.01$);SC移植4周后,对照组大鼠毛细血管密度较之假手术组明显增高($P<0.05$);移植组大鼠缺血心肌中毛细血管密度及血清VEGF浓度较之假手术组、对照组亦明显升高($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** SC在心肌梗死区中能增殖分化为横纹肌样细胞,并可分泌VEGF促使缺血心肌毛细血管增生,从而共同参与改善心功能。

关键词: 骨骼肌卫星细胞;心肌梗死;移植;血管内皮生长因子;毛细血管;心功能

中图法分类号: R331.31;R542.2;R622.2 **文献标识码:** A

Effect of implantation of auto-skeletal muscle satellite cells into ischemic myocardium on cardiac function after myocardial infarction in rats

WANG Hong-yong[1], HE Zuo-yun[2], YU Chang-qing[1], XIANG De-bing[1], HU Hou-xiang[1], WANG Yi[1], YANG Cheng-ming[1], WANG Xu-kai[1], FU Chun-jiang[1] ([1]Department of Cardiovascular Diseases, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [2]Department of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of auto-skeletal muscle satellite cell implantation into ischemic myocardium on cardiac function and the mechanisms. **Methods** Approximately 10^7 to 10^9 muscle satellite cells (SCs) were cultivated *in vitro*. The left anterior descending (LAD) artery was ligated in Wistar rats to create myocardial infarction (MI). Some rats only underwent sham operation served as control. Two weeks after MI, autologous SCs, serum-free culture medium and sodium chloride injection were injected into ischemic myocardium of implantation rats ($n=15$), control rats ($n=15$) and myocardium around LAD of sham operation rats (SO, $n=15$), respectively. Four weeks after injection, hemodynamic parameters and cardiac function in all groups were evaluated by polygraph system, capillary density in the ischemic myocardium was demonstrated by immunohistochemical method, serum VEGF concentration was examined by ELISA, and the differentiated myofibers from SCs in the infarcted site were observed by pathologic examination and immunohistochemical method. **Results** Four weeks after injection, the SCs had progressively differentiated into striated muscle fibers in the myocardial infarction site, and immunohistochemical analysis confirmed their skeletal muscle

作者简介: 王红勇(1965-),男,四川省德阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事冠心病发病机制及治疗方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)68757246,E-mail:hongyong1234@sina.com

通讯作者: 何作云,电话:(023)68755593, E-mail:hzuoyun@yahoo.com

收稿日期: 2006-03-22;**修回日期:** 2006-04-15

origin. Compared with the SO rats, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean artery pressure (MAP), left ventricular systolic pressure (LVSP) and dp/dt_{max} were markedly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$) and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) was markedly increased ($P<0.01$) in the control rats and implantation rats. But the implantation of SCs into ischemic myocardium of implantation rats can significantly increase $+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$ and decrease LVEDP as compared with control rats ($P<0.05$ and $P<0.01$). Compared with the SO group, capillary density was markedly increased in the control rats and implantation rats ($P<0.05$, $P<0.01$). Capillary density and serum VEGF concentration in the implantation rats were higher than that in the SO rats and in the control rats ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The SCs, after being implanted into the myocardial infarction site, showed myocardial regeneration and the ability to increase serum VEGF concentration and enhance the capillary density in the ischemic myocardium and finally improve cardiac function.

Key words: skeletal muscle satellite cell; myocardial infarction; implantation; vascular endothelial growth factor; capillary; cardiac function

心肌梗死(myocardial infarction, MI)后所致的心肌细胞丢失和纤维疤痕形成是影响心功能的主要因素之一，自体干细胞心肌移植能够部分代替坏死的心肌因而有一定的疗效。目前骨髓干细胞在心肌内增殖、分化为心肌细胞的理论受到怀疑[1]，而与骨髓干细胞相比，骨骼肌卫星细胞(satellite cell, SC)则具有更强大的增殖、分化和抗缺血能力[2]，因此其成为最优选的心肌移植干细胞之一。我们在大鼠 MI 后 2 周移植自体 SC，观察移植 4 周后大鼠血流动力学、心功能的改变，并测定大鼠血清 VEGF 浓度、大鼠缺血心肌毛细血管密度的变化，同时观察移植细胞在梗死区的生长、增殖情况并探讨它们相互的关系。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

2～3 月龄 Wistar 大鼠 45 只(由第三军医大学实验动物中心提供)，雌雄各半，体质量 150～200 g，采用随机抽签法分为 3 组，每组 15 只大鼠：① 假手术组：除不结扎左前降支外，其余操作同对照组和移植组。②对照组：结扎冠状动脉左前降支造成 MI。③移植组：MI 模型成功后 2 周即采用 SC 心肌移植。

1.2　实验方法

1.2.1　大鼠 MI 模型制作　　采用 Li 等[3]的开胸结扎大鼠左前降支的方法。术后给予常规饲料和饮水，雌雄分笼饲养，并给予腹腔注射青霉素钠盐 8×10^4 U，2 次/d，连续 3 d。

1.2.2　SC 的纯化、培养及扩增　　采用 Dorfman 等[4]的方法，于 MI 模型制作的同时取大鼠腿部骨骼肌分离 SC 并经 2 周的传代培养将其扩增至总数为 10^7～10^9，以 0.2 ml 无血清 M199 培养液悬浮 SC，待移植。

1.2.3　SC 心肌移植　　MI 模型制作成功后 2 周自原切口进胸(方法同前)，暴露出心脏，用微量注射器吸取 0.2 ml 成肌细胞悬液，沿梗死区与正常心肌交界处多点注射，随后迅速将心脏复位，挤出胸腔内气体，关闭胸腔。对照组沿梗死区与正常心肌交界处多点注射 0.2 ml 无血清 M199 培养液，而假手术组则在左前降支周围心前壁多点注射 0.2 ml 生理盐水。术后处理同前。

1.2.4　血流动力学及心功能测定　　SC 心肌移植 4 周后 Wistar 大鼠以 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后分离右颈总动脉，穿刺该段动脉并将微压力传感导管置入左心室。打开事先标定好的压力记录设备，以 400 Hz 的频率应用 Spectrum 软件进行实时的模拟——数字信息转换测定左室压力变化情况。所得数据储存于计算机分析心率(heart rate, HR)、左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左室压力最大上升速率($+dp/dt_{max}$)及左室压力最大下降速率($-dp/dt_{max}$)，然后将导管退至颈动脉记录收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP)，并计算出平均动脉压(mean artery pressure, MAP)。

1.2.5　血清 VEGF 水平测定　　采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)，VEGF 试剂盒购自美国 R&D 公司，包括鼠抗人 VEGF 多克隆抗体(一抗)、羊抗鼠单克隆抗体(二抗)及辣根过氧化物酶，具体检测按试剂盒说明书进行。显色后用美国 ELX800UV 酶标仪在波长 450 nm 条件下比色读数，在绘好的标准曲线上求出 VEGF 数值。

1.2.6　大鼠缺血心肌毛细血管密度的测定[5]　　取梗死区与非梗死区交界处缺血心肌组织一块(假手术组取前降支周围心肌)，10% 甲醛固定、石蜡包埋、切片，以Ⅷ因子相关抗原抗体作内皮细胞免疫组化染色(按 S-P 试剂盒步骤进行)。毛细血管计数方法如下：每张切片选取低倍镜(×40)确定微血管密度最大的区域，然后在高倍镜(×400)下选择 5 个最高血管密度区域计数，取 5 个区域平均值作为该病例的毛细血管计数。任何一个呈棕黄色的相互分离的内皮细胞、内皮细胞簇、内皮细胞

条索均按毛细血管计算。

1.2.7 病理检查 取移植组、对照组梗死区标本(假手术组取前降支周围心肌),固定、脱水、石蜡包埋并切片作苏木精-伊红(HE)及抗 myosin 染色,同时取正常大鼠骨骼肌和心肌作阳性和阴性对照(骨骼肌特异性的 myosin 单抗仅对骨骼肌及其来源的组织呈阳性反应,而对人或动物的心肌无交叉反应)。

1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 SC 特性

原代骨骼肌 SC 呈球形,折光性强,培养 12 h 后细胞开始贴壁,72 h 后贴壁完全且逐渐延展成梭形或纺锤形。当细胞融合到 70% ~80% 以上而延迟分瓶或直接采用分化培养基,细胞生长停滞,相互融合形成多核肌管。骨骼肌特异性的肌球蛋白(myosin)单克隆抗体免疫细胞染色 SC 显示为弱阳性,而肌管显示为强阳性。

2.2 病理学观察

2.2.1 HE 染色 假手术组前降支周围心肌及对照组梗死区未见 SC 增殖和分化;移植组梗死区见少至中量的带有横纹且具有多核的肌细胞存在,组织排列较有序,纤维组织少于 MI 组大鼠(图 1)。

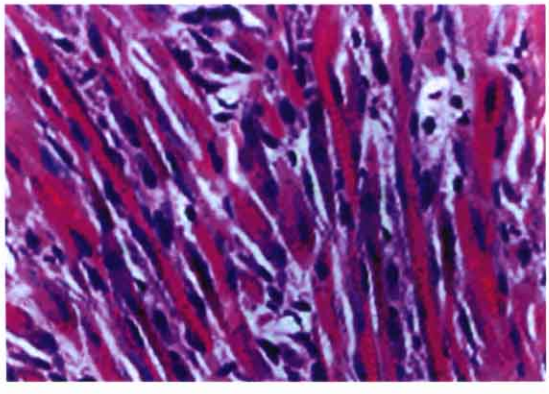


图 1 移植组大鼠梗死区光镜观察 (HE ×400)

2.2.2 免疫组化检测 利用 myosin 单抗染色,在移植组心肌梗死区中成活的肌细胞显示为强阳性,作为阳性对照的大鼠骨骼肌亦显示为强阳性,而作阴性对照的正常大鼠心肌显示了阴性结果,由此进一步证实了梗死区中的这些肌细胞是来源于 SC 的增殖和分化。在假手术组前降支周围心肌及对照组梗死区中 myosin 单抗免疫组化染色未见阳性细胞出现。

2.3 大鼠血流动力学及心功能的改变

在实验过程中因麻醉意外、手术失血、心脏破裂及气胸等原因,假手术组、对照组及移植组大鼠分别脱失 3、4、3 只。骨骼肌于 SC 心肌移植 4 周后可见。与假手术组比较,对照组、移植组的 SBP、DBP、MAP、LVSP、左室 $+dp/dt_{max}$ 及 $-dp/dt_{max}$ 均有较明显的降低($P<0.05$,$P<0.01$),而 LVEDP 则明显增高($P<0.01$);与对照组比较,移植组 LVEDP、左室 $+dp/dt_{max}$ 及 $-dp/dt_{max}$ 有较明显地改善($P<0.05$,$P<0.01$),SBP、MAP、HR 及 LVSP 虽有改善的趋势,但无统计学意义($P>0.05$)(表 1、2)。

表 1 血流动力学参数的改变($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	MAP(mmHg)	HR (次/min)
假手术组	12	131.19 ± 17.36	97.22 ± 15.12	108.54 ± 15.85	350.20 ± 49.43
对照组	11	100.73 ± 14.21[a]	81.06 ± 13.05[b]	87.62 ± 13.41[a]	376.11 ± 50.42
移植组	12	111.55 ± 15.14[a]	80.60 ± 14.72[b]	90.92 ± 14.82[b]	363.08 ± 52.26

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与假手术组比较

表 2 左室收缩和舒张功能的改变($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	$+dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	$-dp/dt_{max}$ (mmHg/s)
假手术组	12	135.57 ± 18.34	4.05 ± 0.66	5 836.47 ± 541.69	4 812.21 ± 514.51
对照组	11	105.49 ± 13.36[a]	11.76 ± 1.47[a]	4 367.81 ± 476.24[a]	3 225.24 ± 396.52[a]
移植组	12	116.56 ± 19.73[b]	10.00 ± 1.47[ac]	4 791.69 ± 393.26[ad]	3 932.17 ± 409.57[ac]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与假手术组比较; c: $P<0.01$, d: $P<0.05$, 与对照组比较

2.4 血清 VEGF 浓度及缺血心肌毛细血管密度的改变

SC 移植 4 周后,移植组及对照组大鼠毛细血管密度较之假手术组明显增高[分别为(523.42 ± 82.14)、(430.73 ± 65.04)、(378.23 ± 43.16) n/mm^2,$P<0.05$,$P<0.01$],移植组大鼠毛细血管密度较之对照组大鼠亦明显增高[分别为(523.42 ± 82.14)、(430.73 ± 65.04) n/mm^2,$P<0.01$];移植组大鼠血清 VEGF 浓度较之假手术组、对照组亦明显升高[分别为(320.05 ± 39.29)、(266.52 ± 35.46)、(271.14 ± 37.52) pg/ml,$P<0.05$]。

3 讨论

SC 是一种位于肌纤维肌膜与基底膜之间的多潜能干细胞,一般处于静止状态,但在特定应激条件下可以被激活进入有丝分裂期并增殖而产生成肌细胞,进一步分化融合形成肌管参与骨骼肌的修复[2]。由于骨骼肌与心肌均起源于中胚层,同属横纹肌,分化过程有相似之处,自身有再生能力,体外易予培养,有较好的耐疲劳性和耐受缺血能力,它已成为最优选的用于坏死心肌修复的移植细胞之一。实验结果提示体外培养的 SC 开始呈现梭形或纺锤形,延迟分瓶或直接采用分化培养基则可相互融合形成多核肌管,myosin 免疫组化检测显示 SC 及肌管均呈阳性,证实培养细胞为骨骼肌 SC。移植 4 周后移植组梗死区可见少至中

量的带有横纹且具有多核的肌细胞存在，myosin 单抗染色显示为强阳性，证实 SC 能够在梗死区中增殖、分化为横纹肌参与心肌损伤的修复。而假手术组心肌及对照组梗死区未见上述现象[6]。

本实验结果还提示移植 4 周后移植组血清 VEGF 浓度、缺血心肌毛细血管密度明显高于假手术组及对照组（$P<0.05$，$P<0.01$），这是由于 SC 增殖、分化过程中可通过旁分泌和自分泌的方式分泌 VEGF 等生长因子，VEGF 进入血液循环从而使血清 VEGF 增高。VEGF 是目前公认的最具特异性的促血管新生的生长因子，能特异地作用于 VEGF 受体（在冠状动脉内皮细胞及心肌组织中有高度表达）促进血管内皮细胞的分裂、增殖和迁移，迅速导致毛细血管的新生。虽然心肌缺血、缺氧亦可使 VEGF 表达上调，从而一定程度的促进毛细血管新生（本实验显示对照组大鼠毛细血管密度明显高于假手术组），但由 VEGF 介导的 SC 治疗性血管新生作用可明显的加强这一效应。此外，VEGF 表达的增多，又可正反馈地促进移植细胞的进一步增殖和分化[7]，从而形成 SC 增殖、分化与 VEGF 表达促毛细血管新生的良性循环。

诸多的 SC 心脏移植研究显示，移植细胞不仅能在心肌中长期存活和分化，而且心室功能也得到改善[8]。本实验采用有创的方法测定大鼠血流动力学及心功能的改变获得了相似的结果，结果提示对照组、移植组与假手术组比较，SBP、DBP、MAP、LVSP 及 $\pm dp/dt_{max}$ 均明显降低，差异显著（$P<0.05$，$P<0.01$），LVEDP 则明显增高（$P<0.01$）；而移植组较之对照组的 LVEDP、$+dp/dt_{max}$ 及 $-dp/dt_{max}$ 有明显改善，（$P<0.05$，$P<0.01$），SBP、MAP、HR 及 LVSP 虽有改善趋势，但无统计学意义（$P>0.05$）。上述结果表明，心肌梗死后无论治疗与否心功能均有不同程度的恶化，但骨骼肌 SC 心肌移植可明显减轻心功能恶化的程度，一定程度上有利于心功能的恢复。SC 移植改善心功能的机制有[9]：① 移植细胞分化后直接参与收缩功能移植的 SC 增殖分化后由快收缩纤维向慢收缩纤维转化，并可与宿主心肌细胞间形成桥粒、缝隙连接，由此与宿主心肌细胞同步收缩而改善心功能。②移植细胞的弹性移植细胞保持了受损心肌的相对完整性，使梗死区增厚，并通过肌纤维的弹性作用限制心室的扩张和重塑，改善心肌细胞的收缩性。③移植细胞的细胞因子分泌作用移植细胞可以通过自分泌和旁分泌的方式分泌 VEGF 等生长因子，诱导血管再生，反馈性的又促进移植细胞的增殖和分化[7]，并抑制纤维组织增生。

综上所述，心肌梗死 SC 移植后 SC 能够在梗死区中增殖和分化，通过自分泌和旁分泌的方式分泌 VEGF，促使心肌中毛细血管的增生，并且血清 VEGF 增高可明显改善血液的流变特性[10]，亦有利于冠脉循环的改善，从而共同起到改善心功能的目的。

参考文献：

[1] NYGREN J M, JOVINGE S, BREITBACH M, *et al*. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation[J]. Nat Med, 2004, 10(5): 494 - 501.

[2] COLLINS C A, OLSEN I, ZAMMIT P S, *et al*. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche[J]. Cell, 2005, 122(2): 289 - 301.

[3] LI J, BROWN L F, HIBBERD M G, *et al*. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis[J]. Am J Physiol, 1996, 270 (5 Pt 2): H1803 - H1811.

[4] DORFMAN J, DUONG M, ZIBAITIS A, *et al*. Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(5): 744 - 751.

[5] SAITO H, TSUJITANI S, IKEGUCHI M, *et al*. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue[J]. Br J Cancer, 1998, 78(12): 1573 - 1577.

[6] 张志辉，迟路湘. 心肌损伤早期标志物研究进展[J]. 第三军医大学学报，2004，26(23)：2173 - 2175.

[7] LESCAUDRON L, PELTEKIAN E, FONTAINE-PERUS J, *et al*. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant[J]. Neuromuscul Disord, 1999, 9(2): 72 - 80.

[8] SUZUKI K, MURTUZA B, HESLOP L, *et al*. Single fibers of skeletal muscle as a novel graft for cell transplantation to the heart[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 123(5): 984 - 992.

[9] LI R K, JIA Z Q, WEISEL R D, *et al*. Cardiomyocyte transplantation improves heart function[J]. Ann Thorac Surg, 1996, 62(3): 654 - 661.

[10] 王红勇，于长青，向德兵，等. 大鼠自体骨骼肌卫星细胞移植治疗心肌梗死后血清血管内皮生长因子的改变及其意义[J]. 中国临床康复，2004，8(21)：4198 - 4199.

（编辑　栾　嘉）