文章编号:1000-5404(2008)12-1159-04

论著

兔骨髓间充质干细胞心脏移植治疗扩张型心肌病的实验研究

沈 兴[1],余更生[1],田 杰[1],白永虹[2],朱 静[3],刘官信[3],陈 沅[1] (重庆医科大学附属儿童医院:[1]心血管内科,[2]心脏超声室,[3]儿科研究所,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)心脏移植后对兔扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)心功能、心肌结构及心内膜单相动作电位(monophasic action potential durations, MAP)的影响。**方法** 新西兰兔分为正常对照组($n=12$),DCM实验组($n=13$),DCM对照组($n=13$),DCM模型通过静脉注射阿霉素诱导。DCM实验组移植骨髓MSCs, DCM对照组注射培养基,移植后4周采用超声心动图和MAP参数评价心功能和电生理的改变;并取移植区心肌组织行免疫荧光染色以观察移植细胞的增殖分化情况,另选部分心肌组织做HE染色和透射电镜查看心肌组织形态学改变。**结果** 与正常组相比,DCM各组心功能明显受损、MAP时程延长、心肌细胞变性坏死,且实验组受损较对照组轻;移植的细胞有肌钙蛋白T(cardiac troponin T,cTnT)和缝隙连接蛋白43(connexin 43,Cx43)的表达。**结论** 体内移植骨髓MSCs后在一定程度上可改善DCM心功能,使病损心肌组织病变减轻,并可能抑制心电紊乱的进一步发展。

关键词: 间充质干细胞;扩张型心肌病;心功能;心肌结构;单相动作电位
中图法分类号: R329.2;R459.9;R542.2 **文献标识码:** A

Experimental studies of mesenchymal stem cells transplantation into rabbits with dilated cardiomyopathy

SHEN Xing[1], YU Geng-sheng[1], TIAN Jie[1], BAI Yong-hong[2], ZHU Jing[3], LIU Guan-xin[3], CHEN Yuan[1] ([1]Department of Cardiovascular Diseases, [2]Department of Cardiac Ultrasonology, [3]Institute of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of grafted mesenchymal stem cells (MSCs) on cardiac function, myocardium structure and monophasic action potential (MAP) in rabbits with dilated cardiomyopathy (DCM). **Methods** Thirty eight rabbits were randomized into 3 groups: (1) normal group ($n=12$), (2) DCM cell implantation group ($n=13$), (3) DCM control group ($n=13$). Adriamycin was applied to create rabbit DCM model. Three weeks after the model was built, intramyocardial injection of MSCs was given to animal for cell transplatation and the cultivation matrials to the normal group. In 4 weeks later, the echocardiography and MAP studies were performed to evaluate cardiac function and electrophysiology, histologic section of the implanted sites. The expression of cardiac Troponin T (cTnT) and connexin 43 (Cx43) was investigated with immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, the value for monophasic action potential amplitude (MAPA) and the maximun velocity in "0" phase (Vmax) decreased significantly in DCM rabbits, while the value for 50% monophasic action potential durations (MAPD50) and 90% monophasic action potential duration (MAPD90) increased significantly, the effective refractory period (ERP) increased, too. However the increase of MAPD was less in cell impantation group than in DCM control group with no after -depolarization (two was found in the DCM control group). Compared with DCM control group, structual abnormalities was less grave in the cell implantation group and the implanted MSCs could express cTnT and Cx43. **Conclusion** Implanted MSCs can improve heart function, abate the structural abnormalities and may inhibit the progression of electrophysiology derangement.

Key words: mesenchymal stem cells; dilated cardiomyopathy; cardiac function; cardiac structure; monophasic action potential

基金项目: 重庆市科委基金([2003]43-92);重庆市教委基金([2004]12号)
Supported by the Foundation of Chongqing Committee of Science and Technology ([2003]43-92) and the Foundation of Chongqing Committee of Education ([2004]12)
作者简介: 沈 兴,女,四川省泸州市人,硕士,主治医师,主要从事儿童心血管疾病方面的研究,现在四川省泸州医学院附属医院儿科。电话:(0830)3165612
通信作者: 余更生,E-mail:yugengsheng@163.com,电话:(023)63624344
收稿日期: 2007-03-03;**修回日期:** 2007-10-30

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种以左心室或双心室扩大伴收缩功能损害为特点的心肌疾病,常伴发室性心律失常,是导致儿童、青少年死亡和致残的原因之一。目前临床上治疗主要包括药物治疗和手术治疗。尽管这些方面的进展使此类患者生存率得以提高,改善了生命质量,但对终末期患者仍缺乏有效的治疗方法。近年提出的细胞移植修复受损心肌为这类患者带来了福音。大部分的研究表明细胞移植后能改善心肌局部的血流灌注、室壁厚度和室壁动度,从而改善心功能[1,2]。但继之而来的一些问题却引起越来越多的关注,尤其细胞移植后对心脏电生理的影响备受瞩目。因此,本研究将探讨骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)体内移植后对DCM兔心功能、结构及电生理的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康新西兰白兔38只(购于重庆医科大学实验动物中心),分为正常对照组12只,DCM实验组13只(移植骨髓MSCs),DCM对照组13只(注射培养基)。

1.2 DCM模型的建立

参照Amoda等[3]的方法采取阿霉素(浙江海正医药公司,生产批号:050307)诱导DCM模型,阿霉素以生理盐水稀释为1 mg/ml,每次1 mg/kg,每周2次,连续8周。在用药结束后3周经胸超声测定左心功能,探头频率8 MHz,由有经验的医师专人、专机操作。选取左室舒张末期内径(left ventricular diastolic dimension, LVDD)、左室收缩末期内径(left ventricular systolic dimension, LVSD)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室缩短分数(left ventricular short fraction, LVFS)作为观察指标,以各指标差异于正常组两个标准差以上初步判断建模成功,然后随机处死2~3只动物,取心肌作病理检查证实。

1.3 骨髓MSCs的体外扩增和DAPI对MSCs的标记

采取兔胫骨结节穿刺获取骨髓原液,用贴壁筛选法分离、扩增、纯化骨髓MSCs,选用5~6代的骨髓MSCs用于移植实验,在移植前12~24 h,用DAPI(Pierce公司,浓度为25 μg/ml)标记骨髓MSCs。

1.4 骨髓MSCs的移植

阿霉素末次注药后3周进行移植。将标记好的骨髓MSCs经PBS冲洗6~8次,消化、离心后,悬浮在杜氏改良F-12培养基(Dulbecco's modified eagle's medium/nutrient mixture, DMEM/F12, HyClone公司)中,细胞数为(4~6)×10^6/只,体积约100 μl,用特制的1 ml皮试针吸取。将动物用速眠新麻醉(0.2 ml/kg),沿胸骨左缘分层开胸,暴露心脏,将细胞分4点注射到左心室前壁,对照组注射等体积的DMEM/F12培养基。

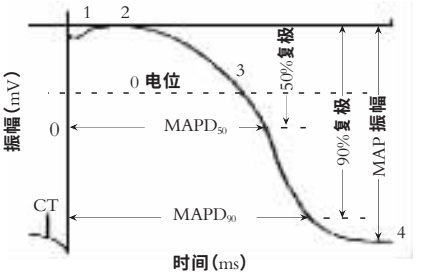
1.5 心功能的检测

移植术后4周采用日本Aloka SSD-5000超声诊断仪检测各组心脏结构及功能,探头频率8 MHz。观察各组LVDD、LVSD、LVEF、LVFS指标的变化。

1.6 心脏电生理的检测

起搏记录电极选用EP Technologies的Franz接触电极,电生理记录仪为成都仪器厂RM6240多导电生理记录仪。测定时分离颈总动脉3~4 cm,通过颈总动脉插入Franz接触导管,到达左心腔时轻轻施压使导管顶端与心内膜紧密接触,获得满意而稳定的单相动作电位(monophasic action potential, MAP)图形,同步记录体表Ⅱ导联。之后保持导管在心腔内的位置不变,以S_1S_2刺激测出该点的有效不应期(ERP):S_1S_1予以240 ms起搏,S_1S_2从220 ms开始,以6∶1的比例,10 ms负扫,直至S_2不能引起心室激动,即为心室内该点的ERP。

获得稳定的MAP图形后,以舒张期基线和平台期峰点间的距离为单相动作电位的振幅(monophasic action potential, MAPA);0相上升的最大速率为V_{max};单相动作电位时程(monophasic action potential duration, MAPD)从激动开始至复极完成50%的时间为$MAPD_{50}$,至复极完成90%的时间为$MAPD_{90}$。每次连续测量3个MAP图形求其平均值(图1)。



1:快速复极;2:平台期;3:复极化后期;4:舒张期电位

图1 MAP指标测定

1.7 心肌结构的观察

取实验组移植区心肌及对照组心肌标本,一部分以2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定、脱水、包埋、切片行透射电镜观察结构的改变;一部分行冰冻切片,4 ℃预冷的纯丙酮溶液中固定15 min,然后荧光显微镜下观察有无DAPI标记的细胞,将含DAPI的切片一部分作HE染色观察植入细胞在光镜下的结构。

1.8 植入细胞免疫组织化学的检测

将上述制备的含DAPI染色阳性的冰冻切片一部分作肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT)和缝隙连接蛋白43(Connexin 43, Cx43)的免疫荧光检测,cTnT一抗选用1∶200多克隆鼠抗兔IgG抗体(Stancruz公司),Cx43一抗选取多克隆兔IgG抗体(Sigma公司),二抗使用Cy3标记的抗鼠和抗兔SABC试剂盒(武汉博士德生物有限公司),按二抗提供的程序进行组化染色,同时取宿主心肌作免疫荧光的阳性及阴性对照片。

1.9 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 12.0进行t检验。

2 结果

2.1 动物一般情况

由于阿霉素的急、慢性毒性作用以及手术后感染等原因,

DCM 各组均有动物死亡。至移植后 4 周各组存活动物如下:DCM 实验组 4 只,DCM 对照组 4 只,正常组 12 只。

2.2　体外培养骨髓 MSCs 的性状

从正常兔的骨髓中分离、培养原代 MSCs,48 h 后可见骨髓 MSCs 呈小克隆分布,贴壁生长,培养至 7 ~ 10 d,原代骨髓 MSCs 有 80% ~90% 融合,呈纺锤形。传至 5 ~6 代,MSCs 分布均匀,形态一致。DAPI 标记骨髓 MSCs 的核呈蓝色荧光。

2.3　心功能的改变

与正常组相比,DCM 实验组及 DCM 对照组心脏结构及功能均有明显改变,表现为心室腔扩大,LVDD、LVSD 升高,LVEF、LVFS 降低,差别有显著意义($P<0.05$);而 DCM 实验组与 DCM 对照组相比,虽然心室腔没有明显减小,但 LVSD 下降,LVEF 和 LVFS 升高($P<0.05$,表 1)。

表 1　正常组、DCM 对照组、DCM 实验组动物心功能各参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LVDD(mm)	LVSD(mm)	LVEF(%)	LVFS(%)
对照组	4	16.25 ± 1.22^{a}	13.07 ± 1.02^{a}	58.85 ± 3.36^{a}	29.65 ± 1.77^{a}
实验组	4	16.07 ± 1.28^{a}	10.32 ± 1.15^{ab}	67.30 ± 2.74^{ab}	33.05 ± 1.54^{ab}
正常组	12	13.48 ± 1.75	9.67 ± 1.88	76.66 ± 2.67	38.90 ± 2.41

a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

2.4　心肌电生理的改变

体表心电图检测时各组均没有心律失常的发生。与正常组相比,DCM 实验组及 DCM 对照组 MAPA、V_{max} 明显下降,$MAPD_{50}$、$MAPD_{90}$及 ERP 延长,差别有显著意义;与 DCM 对照组相比,DCM 实验组 $MAPD_{50}$、$MAPD_{90}$有所缩短,没有早期后除极的发生,DCM 对照组有两只动物出现 EAD,没有诱发室性心动过速的发生(表 2)。

表 2　正常组、DCM 对照组、DCM 实验组 MAP 参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MAPA(mV)	$MAPD_{50}$(ms)	$MAPD_{90}$(ms)	V_{max}(V/s)	ERP(ms)
DCM 对照组	4	12.04 ± 1.56^{a}	134.89 ± 15.09^{a}	208.61 ± 14.98^{a}	0.16 ± 0.04^{a}	112.50 ± 18.93^{a}
DCM 实验组	4	12.84 ± 2.03^{a}	100.16 ± 17.47^{ab}	152.92 ± 13.41^{ab}	0.19 ± 0.02^{a}	97.50 ± 22.17^{a}
正常组	12	20.66 ± 4.12	80.33 ± 11.69	127.14 ± 14.32	0.27 ± 0.11	88.33 ± 9.37

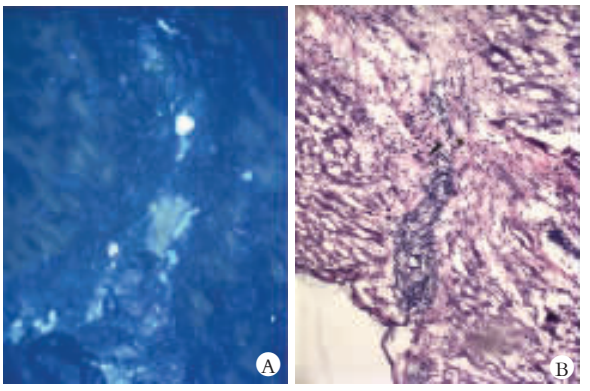
a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

2.5　移植骨髓 MSCs 后心肌结构的改变

荧光显微镜下见大量 DAPI 标记的骨髓 MSCs 分散分布于宿主心肌组织内(图 2A),在 HE 染色下见这些细胞呈短柱状,有分支,且分支相互连接成网状,走行与周围的宿主心肌一致,核成卵圆形,位于细胞中央,细胞质丰富,染色接近宿主心肌细胞(图 2B)。对照组可见心肌细胞呈广泛的水肿和显著的空泡变性改变(图 3)。电镜示对照组心肌细胞线粒体肿胀,增生,肌节长短不一,排列不均,出现异常收缩带,可见局部心肌溶解(图 4A)。实验组移植区组织与之相比,各种受损表现较轻(图 4B)。

2.6　植入细胞的分化

骨髓 MSCs 移植后 4 周左室心肌冰冻切片,可见植入细胞在 DAPI 激发光下显现蓝色荧光,而同一视野同一部位的细胞在 Cy3 激发光下显现红色点状或丝状结构,表明有 cTnT 及 Cx43 的表达(图 5、6),但其表达较宿主本身的心肌弱。而阴性对照中没有 cTnT 及 Cx43 的表达。



A:荧光显微镜观察;B: HE 染色观察

图 2　移植骨髓 MSCs 在兔心肌组织中的分布　(×200)

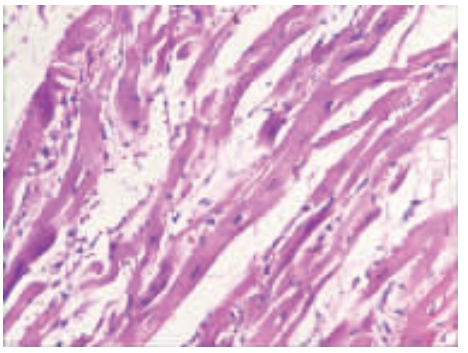
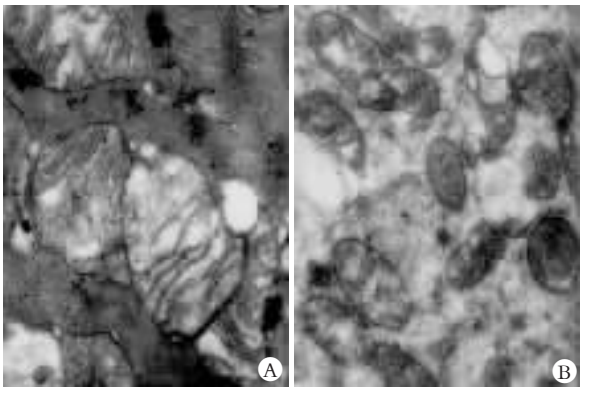
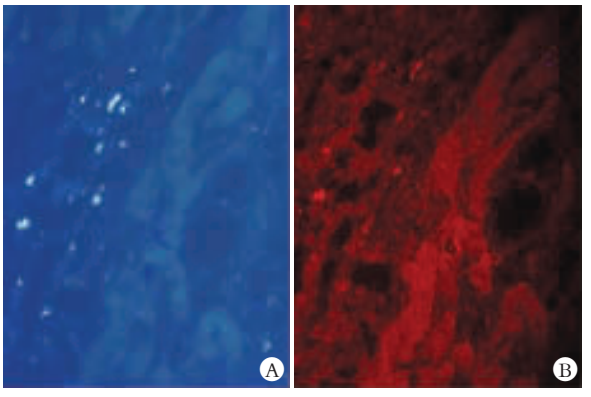


图 3　DCM 对照组心肌组织光镜观察　(HE×200)



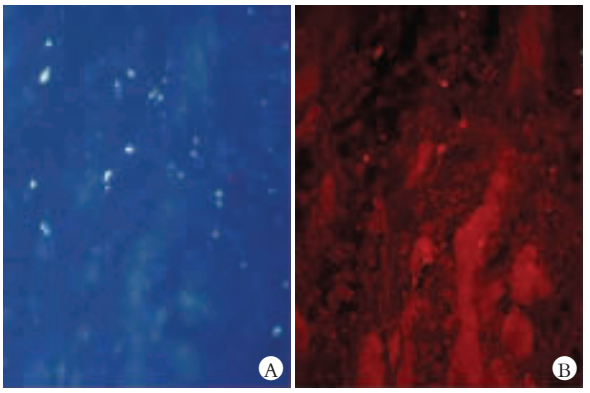
A:DCM 对照组;B:DCM 实验组

图 4　DCM 两组兔心肌组织电镜观察　(TEM×14 000)



A:DAPI 标记的骨髓 MSCs;B:植入骨髓 MSCs cTnT 的表达

图 5　骨髓 MSCs 植入后 4 周 cTnT 的检测　(免疫荧光×200)



A:DAPI 标记的骨髓 MSCs;B:植入骨髓 MSCs Cx43 的表达

图 6 骨髓 MSCs 植入后 4 周 Cx43 的检测 (免疫荧光 ×200)

3 讨论

DCM 是儿童及青少年时期好发的原发性心肌疾病,一旦出现心力衰竭的症状后预后很差。心脏移植是治疗晚期患者最有效的手段,但却面临着供体不足、移植后排异等问题,因此并不能使大部分的 DCM 晚期患者受益。所以心脏病学家们近年来致力于细胞移植的研究,希望通过向心脏补充外源性的可再生细胞从而达到重建心肌组织,提高心功能的目的。

目前平滑肌细胞、骨骼肌成肌细胞等都曾用于心肌的细胞移植。大部分的研究表明植入细胞可以在受体心脏内增殖形成肌样组织,增加室壁张力和弹性,限制心室扩张从而改善心肌功能[1,2]。本研究也显示骨髓 MSCs 体内移植后可在移植部位定植,并向远处迁徙,向心肌样细胞分化,表达心肌特有结构蛋白,提高 DCM 受损心肌的心功能,改善心肌病理损害。其原因可能与移植的骨髓 MSCs 可刺激自分泌、旁分泌以改变心脏局部微环境促进心肌细胞生成和新生血管形成,以及移植的骨髓 MSCs 可通过减少疤痕组织形成从而改善心室结构重构等有关系。但研究表明不管是平滑肌细胞还是骨骼肌成肌细胞都没能与心肌细胞形成同步化收缩,因此可能导致致命性的心律失常。而心脏电生理一致性的物质结构基础是心肌细胞间的缝隙连接,Cx43 是心肌细胞缝隙连接的特征性蛋白。有研究发现骨髓 MSCs 在体外未经诱导前即有 Cx43 的表达,经 5-氮胞苷诱导后表达率明显升高,提示骨髓 MSCs 在诱导前即具有自发向心肌细胞分化的能力,或骨髓 MSCs 中含有心肌原性的多能干细胞群,具有心肌细胞的部分特征[4]。本实验在植入骨髓 MSCs 4 周后也检测到 Cx43 的表达,且移植骨髓 MSCs 的动物心室内膜复极时程的延长不及 DCM 对照组,没有 EAD 的发生(EAD 是一种后除极电位,它的出现反映了心肌细胞电活动的不稳定性,当其达到一定阈值时可引发新的动作电位而导致触发性心律失常[5]),提示骨髓 MSCs 移植后可能会抑制 DCM 心电紊乱的进展。其原因可能与骨髓 MSCs 移植后表达 Cx43,使植入细胞与宿主心肌间形成电-机械收缩的整体有关[6];另外部分研究认为骨髓 MSCs 具有钾、钙等离子通道[7],当其植入体内后并不需要完全分化为成熟的心肌细胞就具有电传导的能力,这一特性已被用于生物起搏器的研究[8]。但也有研究发现干细胞移植后 6 周,虽可表达 Cx43,但 Cx43 主要沿细胞长轴分布,与成熟心肌 Cx43 主要分布在细胞首尾连接区不同,可使心肌组织电传导能力明显下降,引起心律失常[9]。Price 等[10]将骨髓 MSCs 植入心肌梗死猪模型后也发现心外膜复极离散度加大,可能会加重心肌梗死后致室性心律失常的电生理基质,推测可能与成活细胞和宿主细胞之间的电生理异质性以及成活心肌细胞解剖排列紊乱可能形成折返等因素有关[9]。本实验动物模型的不同以及实验方法的不一致可能造成了这种结果的差异,另外实验中观察时间短对结果可能也有一定影响。因此,骨髓 MSCs 植入后对电生理的影响仍然需要长期大量动物实验及多中心的临床研究以证实。

参考文献:

[1] Tura B R, Martino H F, Gowdak L H, *et al*. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies——MiHeart Study[J]. Trials, 2007, 8: 2.

[2] Soares M B, Lima R S, Rocha L L, *et al*. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice [J]. Am J Pathol, 2004, 164(2): 441 - 447.

[3] Arnolda L, McGrath B, Cocks M, *et al*. Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit: an animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms[J]. Cardiovasc Res, 1985, 19(6): 378 - 382.

[4] 张 文, 田 杰, 江德勤, 等. 骨髓间充质干细胞体外分化为心肌样细胞相关调控基因的时序表达[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(11): 1004 - 1008.

[5] Cranefield P F. Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias [J]. Circ Res, 1977, 41(4): 415 - 423.

[6] Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, *et al*. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions [J]. J Physiol, 2004, 555(Pt 3): 617 - 626.

[7] Heubach J F, Graf E M, Leutheuser J, *et al*. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells[J]. J Physiol, 2004, 554 (Pt 3): 659 - 672.

[8] Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, *et al*. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers[J]. Circ Res, 2004, 94(7): 952 - 959.

[9] Leobon B, Garcin I, Menasche P, *et al*. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(13): 7808 - 7811.

[10] Price M J, Chou C C, Frantzen M, *et al*. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties [J]. Int J Cardiol, 2006, 111(2): 231 - 239.

(编辑 郭建秀)