个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)10-0990-02

不同数量大鼠L6骨骼肌成肌细胞移植对心肌梗死疗效的影响

赵 静,张 雷,邵素霞,张金平,赵春芳 (河北医科大学组织胚胎学教研室,石家庄 050017)

心肌梗死是导致中老年人死亡的主要疾病之一。近年来,用正常细胞移植修复梗死心肌,改善心功能,越来越受到国内外学者关注[1],但移植细胞数量与心肌梗死面积间的关系尚未明确。本实验观察了不同数量的大鼠L6骨骼肌成肌细胞对心肌梗死治疗效果的差异,旨在探讨适宜的移植细胞数量,为今后的研究提供必要的实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

清洁级雄性SD大鼠95只,体质量280~320 g,购于河北医科大学实验动物中心,分成1×10^6组、2×10^6组、4×10^6组、1×10^7组($n=20$)和对照组($n=15$)。大鼠L6骨骼肌成肌细胞株购于上海中华细胞库,细胞号为ATTC,CRL-1458。

1.2 方法

1.2.1 大鼠L6骨骼肌成肌细胞的培养、标记及移植前准备 将复苏后的大鼠L6骨骼肌成肌细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,5% CO_2、37 ℃条件下培养。细胞达到70%~80%融合时传代。按邵素霞等[2]方法制备胶体金溶液并取生长旺盛的细胞标记20 h,移植前30 min消化细胞,无血清培养液重悬,分装为1×10^6/100 μl、2×10^6/100 μl、4×10^6/100 μl和1×10^7/100 μl,4 ℃冰箱保存。

1.2.2 动物模型制备及细胞移植 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉(0.35 ml/kg)大鼠,静脉穿刺套管针做气管插管,连接小动物呼吸机(频率60次/min,潮气量3 ml/次)。从胸骨左缘第4肋间进胸,挤出心脏,在肺动脉圆锥和左心耳间距主动脉根部约3 mm处,以左冠状静脉为标志,用6-0丝线连同一束心肌结扎左冠状动脉前降支[3]。造模后立即将含有1×10^6、2×10^6、4×10^6和1×10^7个大鼠L6骨骼肌成肌细胞的100 μl细胞悬液分别注射到各移植组大鼠的心肌梗死区,对照组注射等量无血清培养液。术后3 d肌注青霉素(20万U/d)预防感染。

1.2.3 组织学观察移植细胞在宿主体内的分化情况 于细胞移植后1、2、3、4周,取心肌梗死区组织标本制作5 μm石蜡切片,HE染色。S-P法免疫组化主要步骤:3%甲醇H_2O_2室温孵育10 min,微波抗原修复98 ℃ 20 min;10%正常山羊血清37 ℃ 10 min;滴加一抗:desmin(1∶200)、PCNA(1∶300)、Cx43(1∶60)、GATA-4(1∶50),4 ℃冰箱过夜;生物素标记二抗、加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(三抗)37 ℃各孵育1 h。DAB显色,苏木精复染,常规脱水封片。阴性对照用PBS代替一抗,其余步骤同上。

1.2.4 心功能评价 细胞移植后4周再次麻醉大鼠。右颈总动脉插管,连接MS4000多道电生理记录仪。记录左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室内压最大上升速率(LV+dp/dt)和左室内压最大下降速率(LV-dp/dt)。每只大鼠连续测5个心动周期,每个周期间隔2 min,取其平均值。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,两组间比较行t检验。

2 结果

2.1 HE染色及免疫组化结果

1×10^6组大鼠心肌梗死区移植细胞不明显,移植后1周少数移植细胞PCNA表达阳性。2×10^6组移植后1周移植细胞数量多,排列密集,细胞为圆形,核大,嗜碱性强,细胞质较少,与心肌细胞形态区分明显,PCNA阳性细胞较多;2周时少量移植细胞表达desmin,阳性细胞细胞质呈棕黄色;移植后4周,desmin阳性细胞增多,部分细胞分化为梭形且排列出现方向性,但未见典型的肌管形成。Cx43及GATA-4在移植部位未见表达。4×10^6组和1×10^7组大鼠移植后10 d左右开始陆续衰竭、死亡,肉眼见心肌及周围组织有瘤样增生物,光镜下见移植细胞形态有一定异型性,细胞核嗜碱性强,核分裂象较多,移植细胞长入周围正常组织间。

2.2 心功能结果

1×10^6组心功能较对照组有所改善,但差异不显著($P>0.05$)。2×10^6组LVSP[(18.8±1.3)kPa *vs*(15.5±1.2)kPa]、LV-dp/dt[(559±55)kPa/s *vs* (446±70)kPa/s]、LV-dp/dt[(432±46)kPa/s *vs* (315±29)kPa/s]均明显高于对照组($P<0.01$),LVEDP[(2.0±0.4)kPa *vs* (3.2±0.4)kPa]明显低于对照组($P<0.01$),心功能显著改善。4×10^6组和1×10^7组大鼠未坚持到实验终点故未测心功能。

3 讨论

结蛋白(desmin)是一种中间丝蛋白,广泛分布于骨骼肌、心肌和平滑肌,用来检测移植细胞是否向肌细胞转化,具有高分化高表达的特点。增殖细胞核抗原(PCNA)用来检测移植细胞的增殖情况。本实验在2×10^6组观察到L6骨骼肌成肌细胞移植后1周PCNA阳性表达最多;desmin 2周时可见表达且阳性细胞逐渐增多,部分分化为梭形,说明大鼠L6骨骼肌成肌细胞可以在宿主体内存活、增殖,且部分向肌细胞分化。心肌细

基金项目:河北省科技厅指令计划(07276101D-129);河北医科大学2005年青年基金(0000039)
Supported by the Mandatory Project of Hebei Science&Technology Department(07276101D-129) and the Youth Foundation of Hebei Medical University(0000039)

作者简介:赵 静,女,河北省石家庄市人,硕士,助教,主要从事心脏形态学方面的研究。电话:(0311)86266082,E-mail:zhaoj514@126.com
通信作者:邵素霞, E-mail: shaosuxia502@sohu.com

收稿日期:2008-12-13;修回日期:2009-03-01

胞标志物 Connecxin43 及 GATA-4 未见表达提示移植细胞未向心肌细胞转化。心功能检测结果提示大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞对心肌梗死的治疗有效,且移植细胞数量与梗死面积之间存在一定关系[4]。骨骼肌成肌细胞改善心功能的机制尚不完全明确,我们认为主要有几个方面:①直接收缩,增强心脏泵功能;②填补、支撑受损心壁,增加心室壁弹性,限制心室重构;③通过释放细胞因子或生长因子的旁分泌作用影响周围心肌。移植细胞数量不足增加室壁弹性有限,对心功能的恢复作用较小,过量时移植细胞大量增殖,破坏了周围正常组织结构,反而使心功能恶化。综上所述,L6 骨骼肌成肌细胞可作为治疗心肌梗死的种子细胞,但治疗效果因细胞数量而异,对本实验而言,2×10^6组治疗效果显著。

关键词:细胞移植;大鼠;骨骼肌成肌细胞;心肌梗死;心功能

中图法分类号:R542.22　　**文献标识码**:B

文章编号:1000-5404(2009)10-0991-01

参考文献:

[1] Gavira J J, Herreros J, Perez A, *et al*. Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006, 131(4): 799-804.
[2] 邵素霞, 张　雷, 赵春芳, 等. 新生大鼠骨骼肌卫星细胞的原代培养及标记方法[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(1): 79-82.
[3] 唐俊明, 谢祈阳, 王明江, 等. 结扎大鼠左冠状动脉不同时间制备心肌梗死模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(3): 204-208.
[4] Radisic M, Euloth M, Yang L, *et al*. High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering[J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 82(4): 403-414.

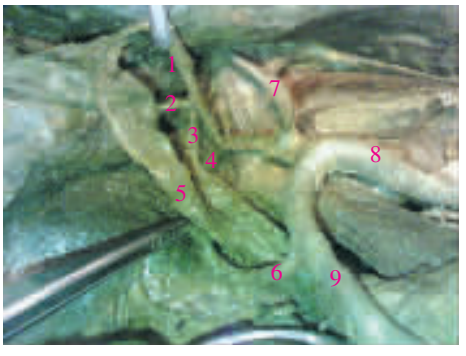
(编辑　王小寒)

个案与短篇

肝右动脉、胆囊动脉及肝圆韧带变异 1 例

闵金海[1],胡鸿保[1],顾丽华[1],张　艳[1],雍刘军[2]　(成都医学院基础医学院:[1]临床医学系 2 队,[2]解剖学教研室,成都 610083)

作者在解剖一具男性尸体时发现其双肝右动脉、双胆囊动脉且肝圆韧带变异,现报告如下:肝固有动脉发出肝右动脉,距肝右动脉起始端 1.3 cm 处,发出 1 支胆囊动脉,管径 0.22 cm,该动脉在胆囊三角内走行 1.2 cm 后,发出前、后 2 条分支,前支长 3.5 cm,管径 0.13 cm,分布于胆囊前壁;后支长 2.6 cm,管径 0.11 cm,分布于胆囊后壁。在胃十二指肠动脉起始端 1.6 cm 处,发出 1 条副肝右动脉,长 5.2 cm,管径 0.32 cm,该动脉先水平走行,后转向后上,在胆囊管与肝总管交汇处的后方注入肝实质(图 1)。在肝的脏面未发现肝圆韧带,在肝的前缘找到肝圆韧带并向上追踪,在镰状韧带内有肝圆韧带走行,距肝前缘 5.5 cm 处肝圆韧带穿肝膈面入肝,并在肝膈面形成 1 条明显压迹(图 2)。



1:胆囊动脉前支;2:胆囊动脉后支;3:肝总管;4:肝右动脉分支;5:胆囊管;6:副肝右动脉;7:肝左动脉;8:肝总动脉;9:胃十二指肠动脉

图 1　变异的肝右动脉及胆囊动脉



1:肝圆韧带入肝处;2:肝圆韧带游离缘;3:肝圆韧带压迹

图 2　变异的肝圆韧带

讨论

肝脏的血供极其丰富,与其复杂的功能相适应,正常肝组织有 1 条肝右动脉,并从肝右动脉发出 1 条胆囊动脉,且肝圆韧带由肝脏面发出,而在此标本中却出现了双肝右动脉、双胆囊动脉及由肝膈面发出肝圆韧带的情况。虽然此标本存在的肝右动脉变异已有不少报道[1,2],胆囊动脉变异更是多见[3],但肝圆韧带变异较为罕见,三者同时变异就更为少见了。了解这一变异,对胆囊、肝脏手术及肝圆韧带的临床应用等均具有一定的参考价值。

关键词:肝右动脉;胆囊动脉;肝圆韧带;变异

中图法分类号:R322.47　　**文献标识码**:B

参考文献:

[1] 荆雪虹, 卢　川, 高　力. 变异起源于胃十二指肠动脉的肝动脉及其临床意义[J]. 医学影像学杂志, 2006, 16(7): 731-733.
[2] 陈　洪, 甘晟光. 肝右动脉发自肠系膜上动脉变异 1 例[J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24(2): 159
[3] 方驰华, 刘　旭. 腹腔镜下胆囊切除术中的变异胆囊[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(19): 1764.

(编辑　王小寒)

作者简介:闵金海,男,贵州省遵义市人,五年制本科学员,主要从事应用解剖学方面的研究。E-mail: fateim4869@163.com
通信作者:雍刘军, 电话: (028)68289155
收稿日期:2008-12-12;**修回日期**:2009-01-06