DOI:10.16016/j.1000-5404.201603126

骨髓间充质干细胞移植对低龄扩张型心肌病模型鼠心功能及心室肌钠通道的影响

刘奇峰,计晓娟,余更生,陈恒胜,白永虹,曹丽娜 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院心内科,儿科发育疾病研究教育部重点实验室,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室)

[摘要] **目的** 观察阿霉素诱导的低龄扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy,DCM)模型鼠心功能和心室肌细胞钠通道的情况,以及骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMMSCs)移植后低龄 DCM 鼠心功能和钠通道的改变,探讨 BMMSCs 移植后钠通道对心功能改善的作用。**方法** 75 只 14 d 龄的雌性 SD 鼠分为 5 组:正常组、正常 + BMMSCs 移植组(正常鼠左室前壁注射 BMMSCs)、DCM 组、DCM + PBS 移植组(DCM 鼠左室前壁注射 PBS)、DCM + BMMSCs 移植组(DCM 鼠左室前壁注射 BMMSCs),以腹腔注射阿霉素来诱导低龄 DCM 模型鼠;移植后 4 周以荧光显微镜观察心肌组织冰冻切片评价 BMMSCs 植入情况,通过超声心动图和全细胞膜片钳技术对各组大鼠心功能和钠通道功能的变化情况进行检测。**结果** 荧光干细胞示踪检查显示植入的 BMMSCs 在注射点附近呈团分布或沿进针路径分布,生长良好;超声心动图检查显示 DCM 组心功能较正常组及正常 + BMMSCs 移植组降低($P<0.05$),DCM + BMMSCs 移植组心功能较 DCM 组及 DCM + PBS 移植组提高($P<0.05$),DCM + BMMSCs 移植组移植 4 周后心功能较移植前提高($P<0.05$);膜片钳检查显示 DCM 组钠电流(sodium channel current,I_{Na})的电流密度峰值较正常组及正常 + BMMSCs 移植组降低,电流-电压(Ⅰ-Ⅴ)曲线上移,激活减慢,激活曲线右移,失活加快,失活曲线左移,差异具有统计学意义($P<0.05$);而 DCM + BMMSCs 移植组的 I_{Na} 电流密度峰值较 DCM 组及 DCM + PBS 移植组提高,Ⅰ-Ⅴ曲线下移,激活加快,激活曲线左移,失活减慢,失活曲线右移,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** BMMSCs 移植能改善低龄 DCM 鼠的心功能,其机制可能与 BMMSCs 移植后钠通道功能增强有关。

[关键词] 扩张型心肌病;干细胞移植;钠通道;膜片钳

[中图法分类号] R329.2; R331.31; R542.2 [文献标志码] A

Effect of BMMSCs transplantation on cardiac function and sodium channel in ventricular myocardium in young rat model of dilated cardiomyopathy

Liu Qifeng, Ji Xiaojuan, Yu Gengsheng, Chen Hengsheng, Bai Yonghong, Cao Lina (Department of Cardiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, International Science and Technology Cooperation Center of Child development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the changes of cardiac function and sodium channel in ventricular myocytes in young rats with doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy (DCM), determine the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) transplantation on the changes, and explore the effect of sodium channel change for the improvement of heart function after the transplantation. **Methods** Seventy-five 14-day-old SD female rats were divided into 5 groups, that is, normal group, MSC group (normal rats treated with BMMSCs injection on anterior wall of left ventricule), DCM group, DCM + PBS group (DCM rats treated with PBS injection), DCM + MSC group (DCM rats treated with BMMSCs injection). DCM rats

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研计划重点项目(2012-1-047)

[通信作者] 余更生,E-mail:yugengsheng@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160505.1543.002.html(2016-05-05)

were induced by intraperitoneal doxorubicin injection. In 4 weeks after transplantation, fluorescence microscopy was employed to observe the transplanted BMMSCs, ultrasonic cardiography (UCG) was used to evaluate the cardiac function of each groups, and patch clamp technique was adopted to record the changes of sodium channel in the left ventricular myocytes. **Results** The well-grown transplanted BMMSCs were found around the injection point or the needle path. The cardiac function in the DCM + MSC group was better than the DCM and DCM + PBS groups ($P < 0.05$), and was well improved in 4 weeks after transfection ($P < 0.05$). Compared with the normal group and BMC group, the current-voltage (Ⅰ-Ⅴ) curve shifted to upward, the steady-state activation was slow down, the activation curve shifted to right, the steady-state inactivation process was accelerated, and the inactivation curve shifted to left in the DCM group ($P < 0.05$). Compared with the DCM group and DCM + PBS group, the Ⅰ-Ⅴ curve shifted to downward, the current density of sodium channel current (I_{Na}) was higher, the steady-state activation was accelerated and the steady-state inactivation process was slower in the DCM ($P < 0.05$). **Conclusion** BMMSCs transplantation improves the cardiac function of young DCM rats, and this may be mediated by the improved sodium channel function after BMMSCs transplantation.

[**Key words**] dilated cardiomyopathy; stem cell transplantation; sodium channels; patch-clamp technique

Supported by the Key Project of Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-1-047). Corresponding author: Yu Gengsheng, E-mail: yugengsheng@163.com

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy,DCM)作为儿童时期心肌病的一种主要类型,发病率有逐年增高的趋势[1],且常伴有心律失常发生。严重的心律失常会导致心衰加重及猝死的发生,目前心肌细胞离子通道改变在心律失常发生发展中的影响已被广泛认可[2]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMMSCs)因具有多向分化潜能及低免疫原性,已成为细胞治疗众多疾病的研究热点之一[3]。钠电流(sodium current,I_{Na})作为心肌细胞动作电位0期去极化的最主要离子流之一,对心肌细胞电活动有着直接的影响,已证实钠通道的异常会导致心肌纤维化、心脏扩大[4]等改变。目前研究表明BMMSCs移植可使急性心肌梗死、慢性心衰等多种疾病的心功能得到改善[5],但多数研究是以成年动物为对象,对于低龄动物的研究较少,并且BMMSCs移植后心肌细胞钠通道的改变情况以及钠通道改变对心功能的影响目前尚不明确。本实验以低龄DCM鼠为对象,研究BMMSCs移植后心功能和心室肌细胞钠通道的改变,以明确BMMSCs移植后心肌细胞钠通道重构的情况,探究钠通道改变对心功能的影响,为在儿童中开展BMMSCs移植治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物和仪器

75只健康的14日龄雌性SD大鼠,体质量约20 g,购买自重庆医科大学实验动物中心。数模转换系统Digidata 1440A、膜片钳放大器MultiClamp 700B(Axon,美国);微电机拉制仪MODEL P-97、三维操纵仪MP-225(Sutter,美国);Langendorff离体心脏灌流系统(AD Instruments,新西兰);彩色超声诊断仪GE Vivid E9,i13L探头(General Electric Company,美国)。

1.2 药物和试剂

胎牛血清(Gibco,美国),阿霉素(美仑生物,国产),Ⅱ型胶原酶(Washington Biochemical Corporation,美国),CD29、CD34、CD45、CD90(eBioscience,美国),CM-Dil(Life Technologies,美国),其余如DMEM/F12、牛血清白蛋白、MgATP、CsCL、4-AP等试剂均购自Sigma公司。

1.3 实验溶液

无钙台氏液(mmol/L):NaCl 140.0、KCl 5.4、$MgCl_2$ 1.0、HEPES 10.0、Glucose 10.0,以NaOH调pH至7.35。KB液(mmol/L):KCl 40.0、KOH 80.0、EGTA 0.5、L-谷氨酸50.0、KH_2PO_4 20.0、$MgCl_2$ 3.0、HEPES 10.0、Glucose 10.0、牛磺酸20.0,以KOH调pH至7.35。酶液:将Ⅱ型胶原酶以0.6 mg/mL溶于配好的无钙台氏液中。I_{Na}细胞外液(mmol/L):氯化胆碱110.0、NaCl 30.0、KCl 5.4、$MgCl_2$ 1.0、HEPES 10.0、Glucose 10.0、TEA 10.0、4-AP 1.0、$CdCl_2$ 0.2、$NiCl_2$ 0.1,以NaOH调pH至7.4。I_{Na}电极内液(mmol/L):CsCl 140.0、$CaCl_2$ 1.0、$MgCl_2$ 2.0、HEPES 10.0、EGTA

10.0、MgATP 5.0,以 CsOH 调 pH 至 7.2。

1.4 BMMSCs 的培养、鉴定

采用50 g 左右的健康 SD 鼠,雌雄不限,以贴壁筛选法分离、培养和纯化 BMMSCs。选用第 3 ~4 代 BMMSCs,按照文献[3]报道的方法以流式细胞术对 BMMSCs 表面抗原 CD29、CD34、CD45 和 CD90 进行鉴定。

1.5 模型的建立及分组

以阿霉素腹腔注射法建立低龄 DCM 鼠模型,每次剂量1 mg/kg,每周2 次,连续给药6 周,阿霉素以生理盐水溶解,浓度1 mg/mL[6]。于第6 周末,由经验丰富的心脏超声专科医师专人操作,对所有大鼠行心脏彩色多普勒超声(ultrasonic cardiogram,UCG)检查,记录大鼠左室收缩末内径(left ventricular internal dimension systolic,LVIDs)、左室舒张末内径(left ventricular internal dimension diastolic,LVIDd)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening,LVFS)作为心功能参数进行统计学分析,然后随机处死1 只大鼠,取左室心肌组织做病理检查。若 DCM 模型鼠心功能较正常鼠有显著差异,且病理检查可见大鼠心肌结构受损,组织排列疏松、紊乱,部分心肌细胞出现水肿,心肌纤维溶解和断裂,呈心肌病样改变,则判定模型建立成功。建立 45 只 DCM 模型鼠,分为:DCM 组(模型鼠不给予干预)、DCM + PBS 移植组(模型鼠左室前壁植入 PBS)和 DCM + BMMSCs 移植组(模型鼠左室前壁植入 BMMSCs),每组 15 只;再以 30 只同龄正常鼠分为正常组和正常 + BMMSCs 移植组(n = 15,正常鼠左室前壁植入 BMMSCs)。

1.6 BMMSCs 植入

选取生长良好的第 3 代 BMMSCs,经消化、离心、重悬后,以 CM-Dil 染料(浓度为 5 μg/mL)对 BMMSCs 进行标记,制备的细胞 PBS 悬液终体积 100 μL,含有 1×10^6个细胞备用。

大鼠称质量、麻醉,仰卧位固定于操作台上。气管插管并连接小动物呼吸机,调整呼吸比 1∶1,呼吸频率 60 ~80 /min,潮气量每 100 克体质量 5 mL 。取胸骨左缘第5、6 肋间隙打开胸腔,充分暴露心脏,将预先准备好的 BMMSCs 悬液分多点以微量注射器注射到左室前壁靠近心尖处,确定无活动性出血后逐层缝合切口。待大鼠清醒后拔管撤机。常规注射青霉素 20×10^4 U/只。

1.7 移植后心功能及荧光检测植入 BMMSCs

在 BMMSCs 移植后第 4 周末对各组大鼠行心 UCG 检查,记录大鼠 LVIDs、LVIDd、LVEF、LVFS。移植组随机处死1 只大鼠,取左室心肌组织做冰冻切片,以4% 多聚甲醛固定、Triton 破膜、DAPI 标记细胞核后,于荧光显微镜下观察植入的 BMMSCs 生长及分布情况。

1.8 单个心室肌细胞的获得及 I_{Na}的检测

大鼠麻醉,仰卧位固定于操作台上,迅速开胸暴露心脏,自主动脉根部向上 5 ~10 mm 剪断取出心脏置于 4 ℃氧饱和台式液中,待心脏自主搏动搏出心腔内残余血液后,暴露主动脉并将其逆行插入灌流管中,动脉夹固定后再用丝线结扎固定。保证灌流口温度在 37 ℃左右,调整流速为 6 mL/min 左右。首先以无钙台氏液灌流 3 min,然后以酶液灌流,心脏压力将逐渐升高再降低,待心脏变软时停止灌流。取下心脏,剪取左室组织,在 KB 液中剪碎,以巴氏吸管轻轻吹打,以 200 目滤网过滤后自然沉降 10 min。小心吸走上层清液,加入 4 ℃ KB 液静置 30 min。然后再次小心吸走上层清液,以 0.25、0.5、1 mmol/L 浓度钙的细胞外液进行复钙。复钙完成后将细胞转移至多聚萘胺酸包被过的培养皿中静置 1 h 贴壁备用。

1.9 I_{Na}的检测

1.9.1 I_{Na}的记录 在全细胞模式下,给予细胞保持电位 -100 mV,测试电位 -90 ~ +60 mV,步幅 10 mV,时程 50 ms 的去极化刺激脉冲记录 I_{Na}。以各测试电位下的 I_{Na}峰电流密度为纵坐标,检测电压为横坐标作图得到 I_{Na}的电流-电压(Ⅰ-Ⅴ)曲线。

1.9.2 I_{Na}稳态激活曲线 保持电位于 -100 mV,给予 -100 ~ -20 mV、步幅 10 mV 的阶梯去极化钳制脉冲刺激,刺激波宽 50 ms,刺激频率 0.25 Hz,记录得到电流图形。然后利用公式 $G = I/(V - V_{Na})$将各测试电压的 I_{Na}峰值转换为膜电导(G),其中,G 为电导,V 为膜电位,V_{Na}为翻转电位。以电导值与最大电导值的比值对应膜电位分别绘制出各组 I_{Na}的激活曲线。所得曲线用 Boltzmann 方程 $G/G_{max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_{1/2})/K]\}$进行拟合,得到半数激活电压($V_{1/2}$)和斜率因子 K[7]。

1.9.3 I_{Na}稳态失活曲线 采用双脉冲测定稳态失活曲线。予保持电位 -80 mV 施与 50 ms,阶跃 10 mV,-150 ~20 mV 系列条件脉冲刺激在每一个条件脉冲后紧跟固定去极化至 -30 mV, 25 ms 的测试脉冲。以去极化电位为横坐标,相对电流(I/I_{max})为纵坐标作图,得出 I_{Na}稳态失活曲线,采用 Bolzmann 方程:$I/I_{max} = I/I\{I + \exp[(V_m - V_{1/2})K]\}$进行拟合,其中 I_{max}为最大膜电流,K 为斜率因子,$V_{1/2}$为半数稳态失活电压[7]。

1.9.4 I_{Na}稳态恢复曲线 钳制电位 -80 mV,予 500 ms、-40 mV 的方波刺激后复极至 -80 mV,分别

间隔 10、20、40、80、160、320、640、1 280 ms 后施加第 2 次 25 ms、-40 mV 的方波刺激。以间隔时间为横坐标,第二次方波引出的电流幅值为纵坐标作图,得到稳态恢复曲线,以 Exponential 方程:$I = A_1 \exp(-t/\tau) + A_0$进行拟合,求出恢复时间常数($\tau$)[7]。

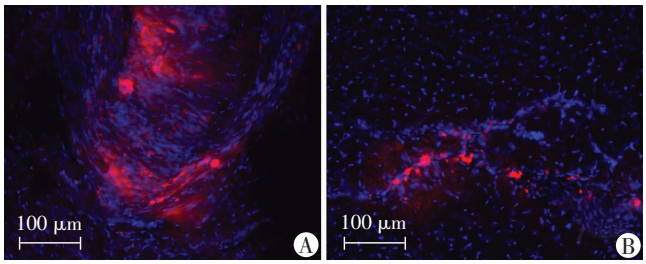
1.10 数据处理

采用 Clampfit10.3 分析软件处理电流数据,通过 Origin 9 进行作图,采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 荧光检测植入 BMMSCs 的情况

移植后第 4 周,正常组大鼠未出现死亡,其余各组在移植术中或术后均有数只大鼠死亡。于荧光显微镜下观察心脏左室横切面,可见 BMMSCs 分布于注射点附近部位,成团分布,或沿进针通道散在分布,呈红色荧光,生长良好,并有少量向附近心肌组织迁移,见图 1。



A:注射点附近分布;B:进针通道分布

蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核,红色荧光为植入的 BMMSCs

图 1 荧光显微镜观察 BMMSCs 移植后 4 周心脏横切面情况

2.2 BMMSCs 移植后心功能检测

UCG 检测结果显示,DCM 组大鼠心功能较正常组明显降低,左室内径明显增大;DCM + BMMSCs 移植组大鼠的心功能较 DCM 组及 DCM + PBS 组明显改善,心腔未有明显减小,但 LVIDs 值明显减低,差异有统计学意义($P < 0.05$),DCM + BMMSCs 移植组移植后 4 周较移植前心功能及 LVIDs 值均明显改善($P < 0.05$),见表 1、2。

2.3 BMMSCs 移植对低龄 DCM 鼠 I_{Na} 的影响

结果显示,DCM 组 Ⅰ-Ⅴ曲线较正常组及正常 + BMMSCs 移植组上移,DCM + BMMSCs 移植组Ⅰ-Ⅴ曲线较 DCM 组和 DCM + PBS 组下移。在测试电位 -40 mV 时,正常组、正常 + BMMSCs 移植组、DCM 组、DCM + PBS 移植组、DCM + BMMSCs 移植组的 I_{Na} 电流密度绝对值分别为(64.86 ± 2.61)、(63.49 ± 2.64)、(45.28 ± 2.35)、(45.02 ± 2.19)、(55.44 ± 2.45)pA/pF,正常组和 DCM 组间比较、DCM 组和 DCM + BMMSCs 移植组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。这提示 DCM 可电压依赖性减小低龄鼠的 I_{Na},而 BMMSCs 移植可提高低龄 DCM 鼠的 I_{Na},但对正常鼠心肌细胞 I_{Na} 无明显影响(图 2)。

表 1 各组大鼠 BMMSCs 移植前后 LVEF 和 LVFS 情况[($\bar{x} \pm s$)%]

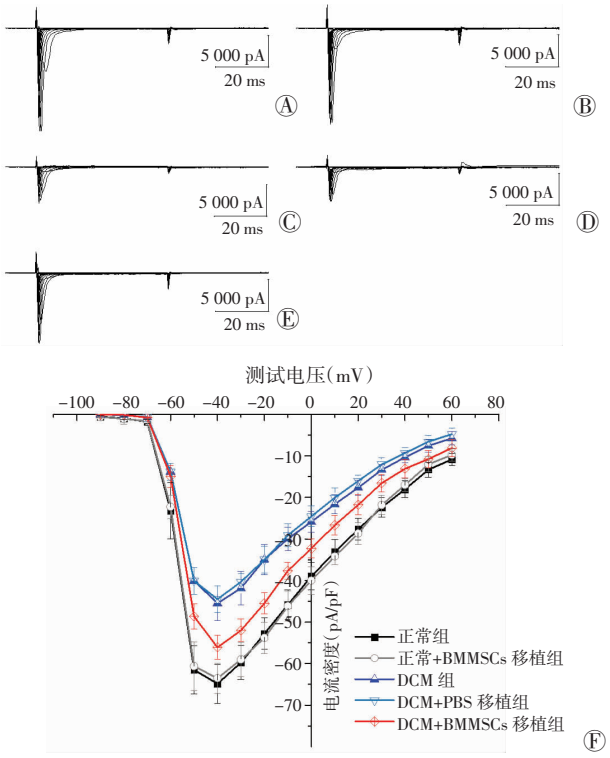
组别	n	LVEF		LVFS	
		移植前	移植后 4 周	移植前	移植后 4 周
正常组	15	94.86 ± 0.59	94.91 ± 0.62	64.84 ± 1.57	65.28 ± 1.71
正常 + BMMSCs 移植组	14	94.70 ± 0.61	94.94 ± 0.54	64.58 ± 1.68	65.29 ± 1.41
DCM 组	13	79.30 ± 0.81	78.41 ± 0.53[a]	42.54 ± 0.74	41.60 ± 0.59[a]
DCM + PBS 移植组	12	79.02 ± 0.48	78.13 ± 1.02	42.08 ± 0.47	41.34 ± 0.94
DCM + BMMSCs 移植组	13	79.05 ± 1.06	85.39 ± 0.45[bc]	42.27 ± 1.01	48.90 ± 0.53[bc]

a:$P < 0.05$,与正常组比较;b:$P < 0.05$,与 DCM 组比较;c:$P < 0.05$,与移植前比较

表 2 各组大鼠在移植前后 LVIDs 和 LVIDd 情况(cm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVIDs		LVIDd	
		移植前	移植后 4 周	移植前	移植后 4 周
正常组	15	0.156 1 ± 0.009 1	0.153 1 ± 0.008 6	0.446 5 ± 0.016 2	0.438 7 ± 0.013 1
正常 + BMMSCs 移植组	14	0.156 9 ± 0.008 2	0.160 9 ± 0.008 1	0.448 2 ± 0.013 1	0.452 3 ± 0.014 7
DCM 组	13	0.296 9 ± 0.012 0	0.296 4 ± 0.012 7[a]	0.512 9 ± 0.016 1	0.519 2 ± 0.017 5[a]
DCM + PBS 移植组	12	0.299 9 ± 0.010 7	0.303 0 ± 0.016 3	0.532 6 ± 0.012 3	0.531 2 ± 0.017 1
DCM + BMMSCs 移植组	13	0.285 9 ± 0.009 0	0.252 4 ± 0.007 4[bc]	0.496 3 ± 0.012 2	0.491 2 ± 0.010 9

a:$P < 0.05$,与正常组比较;b:$P < 0.05$,与 DCM 组比较;c:$P < 0.05$,与移植前比较



A:正常组;B:正常 + BMMSCs 移植组;C:DCM 组;D:DCM + PBS 移植组;E:DCM + BMMSCs 移植组;F:各组 I - V 曲线

图 2 各组大鼠 I_{Na}、I - V 曲线及电流密度情况

2.4 BMMSCs 移植对低龄 DCM 鼠 I_{Na} 稳态激活曲线的影响

结果显示,DCM 组钠通道的激活曲线较正常组及正常 + BMMSCs 移植组右移,DCM + BMMSCs 移植组激活曲线较 DCM 组及 DCM + PBS 移植组左移。正常组、正常 + BMMSCs 移植组、DCM 组、DCM + PBS 移植组、DCM + BMMSCs 移植组的 $V_{1/2}$ 分别为(-56.42 ± 0.61)、(-56.75 ± 0.61)、(-49.60 ± 0.29)、(-50.17 ± 0.51)、(-53.15 ± 0.26)mV,正常组和 DCM 组间比较、DCM 组和 DCM + BMMSCs 移植组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);各组斜率因子 K 分别为(2.55 ± 0.23)、(2.49 ± 0.25)(4.63 ± 0.29)、(4.68 ± 0.29)、(3.34 ± 0.19)mV,正常组和 DCM 组间比较、DCM 组和 DCM + BMMSCs 移植组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。提示低龄 DCM 鼠的钠通道激活减慢,BMMSCs 移植可加快低龄 DCM 鼠钠通道的激活过程,BMMSCs 移植对正常鼠钠通道激活过程无明显影响(图 3)。

2.5 BMMSCs 移植对低龄 DCM 鼠 I_{Na} 稳态失活曲线的影响

结果显示,DCM 组钠通道的稳态失活曲线较正常组及正常 + BMMSCs 移植组左移,DCM + BMMSCs 移植组的稳态失活曲线较 DCM 组及 DCM + PBS 移植组右移。正常组、正常 + BMMSCs 移植组、DCM 组、DCM + PBS 移植组、DCM + BMMSCs 移植组的 $V_{1/2}$ 分别为(-90.59 ± 2.02)、(-90.45 ± 1.68)、(-100.90 ± 0.53)、(-100.70 ± 0.81)、(-95.07 ± 0.52)mV,正常组和 DCM 组间比较、DCM 组和 DCM + BMMSCs 移植组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);各组斜率因子 K 分别为(15.70 ± 1.43)、(15.10 ± 1.64)、(7.05 ± 0.44)、(6.88 ± 0.41)、(9.78 ± 0.30)mV,正常组和 DCM 组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。这提示低龄 DCM 鼠钠通道的失活加快,BMMSCs 移植可减慢 DCM 鼠钠通道的失活过程,BMMSCs 移植对正常鼠失活过程无明显影响(图 4)。

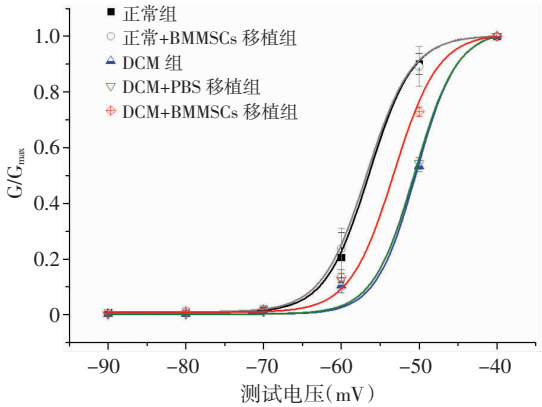


图 3 各组大鼠稳态激活曲线

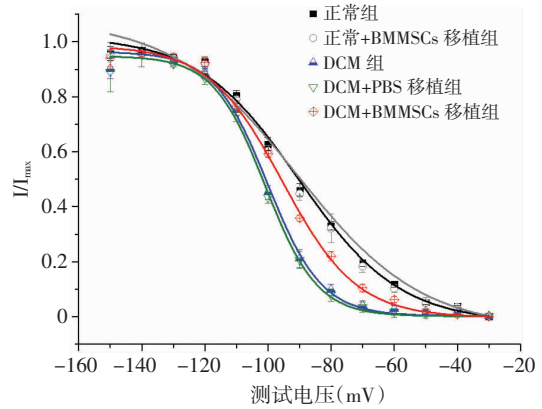


图 4 各组大鼠稳态失活曲线

2.6 BMMSCs 移植对低龄 DCM 鼠的 I_{Na} 稳态恢复曲线的影响

结果显示,正常组、正常 + BMMSCs 移植组、DCM 组、DCM + PBS 移植组和 DCM + BMMSCs 移植组的 τ 值分别为(83.13 ± 10.69)、(81.18 ± 10.74)、(78.39 ± 8.02)、(81.40 ± 10.50)、(78.77 ± 10.41)ms ,各组间比较结果均无统计学意义($P > 0.05$)。这提示低龄 DCM 和 BMMSCs 移植对大鼠钠通道的恢复过程无明显影响。

3 讨论

DCM 是儿童时期心肌病的主要类型之一,病情常很严重,并可能威胁生命。经过数十年的研究,DCM 仍然是临床治疗的难点,药物控制、机械维持等治疗方式的疗效都不尽如人意,导致 DCM 的死亡率居高不下。心脏移植作为唯一的根治手段,却因供体缺乏等多种因素的限制而收效甚微。近年来对于干细胞应用的开发,为我们提供了一种可能更常规、方便的重建心肌结构和恢复心脏功能的治疗手段。故本实验通过对 DCM 鼠进行 BMMSCs 移植,研究其心功能及心肌细胞 I_{Na}的改变情况。而与以往针对成年鼠研究不同,本实验以低龄鼠为研究对象,从 SD 大鼠 14 d 龄,体质量约 20 g 时开始建模,建模完成时大鼠仍未成年,DCM 发病年龄较以往模型明显降低,故此模型能较好地反映大鼠在低年龄阶段发生 DCM 时,心功能及心电生理性质的改变情况。

3.1 移入 BMMSCs 的情况及其对心功能和心腔结构的影响

DCM 常会引起进行性的心功能降低,目前有多项研究结果显示移植的 BMMSCs 可通过向心肌细胞分化、分泌细胞因子和刺激新生血管生成等[8]途径来改善心功能。但以往研究的对象多为成年个体,关于 BMMSCs 移植对低龄 DCM 个体的影响目前仍未明确。本实验针对低龄 DCM 鼠进行研究,荧光结果显示植入的 BMMSCs 可呈团状分布于注射点附近或是散在分布于进针通道附近,生长良好,并有少量 BMMSCs 迁移至周围组织中,此结果提示植入的 BMMSCs 可在低龄 DCM 鼠的心肌中存活并定植。结合本课题组前期研究发现植入后 4 周 BMMSCs 有心肌肌钙蛋白 T(cTnT)及缝隙连接蛋白 43(Cx43)的表达[9],和以往体外对 BMMSCs 诱导分化的研究[10],我们认为植入的 BMMSCs 可能在心肌微环境的中向心肌细胞分化,此观点与以往研究结果相符[8]。心脏彩超结果显示 BMMSCs 移植可改善低龄 DCM 鼠的心功能,并能使 LVIDs 值降低,但移植 4 周后低龄 DCM 鼠的心腔并未缩小。LVIDs 值降低提示左室收缩的动度更大,意味着左室收缩功能的提高、每搏输出量增加,从而可提高低龄 DCM 鼠的心功能。此外,最近有研究报道加大 BMMSCs 移植剂量并且延长观察周期至 10 周后,发现 DCM 鼠左室腔径的缩小[11]。这提示评价 BMMSCs 移植的疗效可能需要更长的观察时间。

3.2 BMMSCs 移植对 I_{Na}的影响

心律失常也是导致 DCM 病情进展的重要原因之一,而钠通道作为介导心肌动作电位快速去极化的主要功能单位,其功能障碍会引起一系列心电生理紊乱和心律失常的发生。钠通道有激活、失活、和复活三种状态,钠通道激活加快、失活减慢会导致通道关闭延迟和 I_{Na}增加,造成钠通道的功能增加,会引起复极化延迟和早期后除极(early after-depolarization,EAD)的出现,可导致长 QT 间期综合征和尖端扭转性室速[4];而钠通道激活减慢、失活加快会导致通道关闭提前和 I_{Na}减小,造成心肌细胞动作电位和膜反应性的降低,从而导致心电兴奋和电传导的异常,甚至可能会引起希氏浦肯野系统发生进行性的传导障碍,伴或不伴左、右束支传导阻滞和 QRS 波增宽,导致完全性房室传导阻滞,可能造成严重的血流动力学改变,引起患者晕厥或猝死[12]。以往多项研究已证实钠通道相关基因 SCN5A 突变是导致 DCM 发生和进展的重要原因[13-14],但关于低龄 DCM 鼠心肌细胞钠通道具体的电生理改变情况,以及 BMMSCs 移植对低龄 DCM 鼠钠通道的影响,目前还少见报道。本实验通过膜片钳技术在低龄鼠的心肌细胞离子通道水平进行研究,结果显示 DCM 可造成钠通道的激活减慢,失活加快,I_{Na}降低,而 BMMSCs 移植可使钠通道的激活加快,失活减慢,I_{Na}提高。这提示 BMMSCs 移植后,低龄 DCM 鼠心肌细胞中钠通道异常的门控功能可得到改善,使钠通道功能升高,改善心电兴奋和电传导功能[13],从而可减少 DCM 中传导阻滞等心律失常的发生。本研究还发现 BMMSCs 植入未造成健康大鼠 I_{Na}改变,提示植入 BMMSCs 在纠正钠通道的功能降低后,可能不会因为钠通道功能增加而引起其他心律失常。此外,关于植入 BMMSCs 对钠通道功能产生影响的具体机制,笔者认为可能有以下两点:第一,BMMSCs 向心肌细胞分化后可表达 I_{Na}[10],从而可在一定程度上协助或替代受损的心肌细胞发挥作用;第二,目前多项研究表明血管内皮生长因子、表皮生长因子会上调钠通道蛋白 Nav1.5 和 Nav1.6 的表达[15-16]。因此,推测 BMMSCs 植入后分泌的细胞因子可能会影响钠通道蛋白的调节,提高钠通道功能,但具体情况仍需要进一步实验证实。

3.3 I_{Na}与心功能的关系

本研究结果显示 BMMSCs 植入后,低龄 DCM 鼠的 I_{Na}和心功能均出现提高,那心功能的提高与 I_{Na}的提高是否有关系呢?目前研究表明,心肌细胞钠通道对于心功能存在多方面的影响:首先,心肌的收缩对于胞内的钙离子有严重依赖性,有研究报道 I_{Na}的降低可导致心肌细胞膜上钠钙交换体(sodium-calcium exchanger,NCX)功能代偿性增强,从而引起胞内钙离子浓度降低,会导致钙离子调节性心脏收缩力降低[17];其次,钠通道功能障碍所引起的心电传导异常的会直接影响心

肌的收缩力[18];此外,钠通道异常所引起的各种心律失常的也会导致心功能降低。长期的心功能降低和心律失常会使心肌组织产生适应性的改变,如心室扩张、纤维化等。本研究中 BMMSCs 移植提高 I_{Na},会减少心律失常的发生,并使钙离子调节得到一定程度的恢复,从而可使心功能增加,因此笔者认为 BMMSCs 移植后,I_{Na}的提高可能是造成受体心功能改善的原因之一,但其具体影响机制仍需进一步研究探索。

3.4 本研究的局限性

由于时间和技术等原因,本实验主要针对了心肌细胞钠通道的改变进行研究,而未能对钾通道和钙通道的电重构情况进行全面检测,无法全面揭示低龄 DCM 鼠心电重构的整体情况,本课题组将在后续工作中进一步完善并进行深入的研究。

综上所述,低龄 DCM 鼠心功能减低时,钠通道激活减慢,失活加快,I_{Na}降低,而 BMMSCs 移植后,低龄 DCM 鼠钠通道激活加快,失活减慢,I_{Na}升高,心功能提高,推测 BMMSCs 移植后钠通道改变是低龄 DCM 鼠心功能改善的机制之一。

参考文献:

[1] Lipshultz S E, Cochran T R, Briston D A, *et al*. Pediatric cardiomyopathies: causes, epidemiology, clinical course, preventive strategies and therapies[J]. Future Cardiol, 2013, 9(6): 817-848. DOI: 10.2217/fca.13.66

[2] Towbin J A, Lorts A. Arrhythmias and dilated cardiomyopathy common pathogenetic pathways?[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 57(21): 2169-2171. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.11.061

[3] Wetzig A, Alaiya A, Al-Alwan M, *et al*. Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells[J]. BMC Cell Biol, 2013, 14: 54. DOI: 10.1186/1471-2121-14-54

[4] Remme C A. Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects[J]. J Physiol, 2013, 591(17): 4099-4116. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.256461

[5] Alaiti M A, Ishikawa M, Costa M A. Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy[J]. Transl Res, 2010, 156(3): 112-129. DOI: 10.1016/j.trsl.2010.06.008

[6] Ezquer F, Gutierrez J, Ezquer M, *et al*. Mesenchymal stem cell therapy for doxorubicin cardiomyopathy: hopes and fears[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6: 116. DOI: 10.1186/s13287-015-0109-y

[7] Zhao Z, Yin Y, Wu H, *et al*. Arctigenin, a potential anti-arrhythmic agent, inhibits aconitine-induced arrhythmia by regulating multi-ion channels[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(5): 1342-1353. DOI: 10.1159/000354532

[8] Strauer B E, Steinhoff G. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(11): 1095-1104. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.06.016

[9] 沈兴, 余更生, 田杰, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(12): 1159-1162. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2008.12.017

[10] 郝春媛, 马爱群, 王亭忠, 等. 钠离子通道阻断剂抑制骨髓间充质干细胞向心肌样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23): 4181-4188. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2013.23.001

[11] Mohammadi-Gorji S, Karimpor-Malekshah A A, Hashemi-Soteh M B, *et al*. Effect of mesenchymal stem cells on Doxorubicin-induced fibrosis[J]. Cell J, 2012, 14(2): 142-151.

[12] Wolf C M, Berul C I. Inherited conduction system abnormalities--one group of diseases, many genes[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2006, 17(4): 446-455. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2006.00427.x

[13] Moreau A, Gosselin-Badaroudine P, Delemotte L, *et al*. Gating pore currents are defects in common with two Nav1.5 mutations in patients with mixed arrhythmias and dilated cardiomyopathy[J]. J Gen Physiol, 2015, 145(2): 93-106. DOI: 10.1085/jgp.201411304

[14] McNair W P, Sinagra G, Taylor M R, *et al*. SCN5A mutations associate with arrhythmic dilated cardiomyopathy and commonly localize to the voltage-sensing mechanism[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 57(21): 2160-2168. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.09.084

[15] 潘惠艳, 赵丽红, 代荫梅, 等. 表皮生长因子促进电压门控钠通道 Nav1.5 表达及人乳腺癌细胞的侵袭[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(4): 388-393.

[16] 潘惠艳, 赵群, 詹阳, 等. 血管内皮生长因子 C 上调电压门控钠通道 Nav1.6 表达促进宫颈癌细胞的侵袭[J]. 肿瘤, 2012, 32(5): 313-319. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2012.05.001

[17] Olson T M, Michels V V, Ballew J D, *et al*. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation[J]. JAMA, 2005, 293(4): 447-454. DOI: 10.1001/jama.293.4.447

[18] Bezzina C R, Rook M B, Groenewegen W A, *et al*. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system[J]. Circ Res, 2003, 92(2): 159-168. DOI: 10.1161/01.RES.0000052672.97759.36

(**收稿**:2016-03-21;**修回**:2016-04-19)

(编辑 栾 嘉)