维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0348-04

胎儿肝脏间充质干细胞移植治疗心肌梗死的实验研究

常 静[1],雷 寒[1],陈建斌[2],贾锋鹏[1],黄仁英[3]

(1.重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院血液内科,重庆 400016;
3.垫江县妇幼保健院,重庆 648300)

【摘 要】目的:研究来源于胎儿肝脏的间充质干细胞(FMSCs)移植到大鼠心肌梗死模型中的存活及分化情况。方法:从平均胎龄为 9 周的胎儿肝脏中分离培养出 FMSCs,将该细胞移植到大鼠梗死心脏模型中,分别于移植后第 7 及第 14 天时取出心脏,通过荧光原位杂交及免疫组化的方法检测移植细胞的存活及心肌分化情况。结果:FMSCs 具有稳定的抗原表达谱,阳性表达 CD29、CD44、CD166、CD105、SH3、SH4,不表达造血干细胞表面标志抗原如 CD14、CD34、CD45。荧光原位杂交显示,将细胞移植到大鼠心肌梗死模型中 7 天后,有较多细胞在心肌组织中存活;但至移植后第 14 天,移植细胞从心肌组织中消失。免疫组化染色未发现存活的植入细胞发生向心肌方向的分化。结论:本实验成功分离培养出了 FMSCs,将其移植到梗死心肌模型中能短暂存活,但不发生向心肌方向的分化。

【关键词】人间充质干细胞;心肌干细胞移植;心肌分化
【中国图书分类法分类号】322.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-28

Study on transplantation of mesenchymal stem cells from human fetal livers into rat infarted heart

CHANG Jing, et al

(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the survival and the cardiac differentiation of mesenchymal stem cells from human fetal livers (FMSCs) after being transplanted into infarted rat myocardium. *Methods*: FMSCs were cultured from human fetal livers, the average age of which was 9 days. The infarction model was built by the ligation of left anterior descending artery and 3.5×10^6cells were transplanted into infarction area by direct injection one week after ligation. Rats were killed at 1 and 2 weeks after transplantation, and hearts were collected for the examination of the cells' survival and differentiation toward cardiac tissue by fluorescent in situ hybridization(FISH)and immunohistochemistry staining. *Results*: The FACS results showed that FMSCs expressed antigen CD29, CD44, CD166, SH2(CD105), SH3 and SH4, but did not express CD14, CD34 and CD45. The transplanted cells survived at 7th day after transplanted, but dissappeared at 14th day. No cardiac differentiation was observed during this period. *Conclusion*: The cells we cultured are testified as FMSCs by their phenotypic expression, and FMSCs could survive for a short period after transplanted into rat heart infarction model, but no cardiac differentiation is induced.

【Key words】Human mesenchymal stem cells; Cell transplantation of heart; Cardiac differentiation

对于急性心梗,目前临床缺乏针对梗死心肌的根本性治疗方法。近年来兴起的心肌干细胞移植则直接针对疾病的细胞学机制,移植细胞修复坏死心肌展示出良好的前景[1-3]。在众多候选干细胞中,间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)具有取材方便、易于体外分离培养、有多向分化潜能等优点。本实验拟在建立大鼠心肌梗死模型的基础上,将分离培养的来源于胎儿肝脏的 MSCs (Human fetal liver delivered MSCs, FMSCs) 移植到梗死心脏中,研究移植细胞在体内的存活和心肌分化情况,从而为心肌干细胞移植技术的临床应用打下必要的实验基础。

作者介绍:常 静(1969-),女,博士,主治医师,
主要研究方向:心肌干细胞移植。

基金项目:WHO 奖学金资助项目(2004)。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM-LG 培养液(Invitrogen 公司);荧光素标记的单克

维普资讯 http://www.cqvip.com

隆抗体抗 CD29(Coulter 公司)、抗 CD44(Immenotech 公司)、抗 CD166 (Ansell 公司)、抗 CD105 (Ansell 公司)、抗 SH3 (Osiris Therapeutics Inc 公司)、抗 SH4 (Osiris Therapeutics Inc 公司)、抗 CD14、抗 CD34、抗 CD45(Becton Dickinoson 公司);FISH 探针 (针对人 DNA 的荧光标记的探针,Vysis 公司);抗 Desmin(DAKO 公司)和 Troponin I(Sigma 公司);荧光标记的兔抗鼠 IgG(DAKO 公司)。

1.2 从胎儿肝脏中分离培养出 FMSCs

所用胎儿平均胎龄为 9 周(6~10 周),胎儿母亲必须通过血清学检查排除各种感染,包括梅毒、弓形体病、风疹、HIV、巨细胞病毒、B 型和 C 型肝炎、细小病毒、1 型和 2 型单纯性疱疹等。在无菌条件下真空抽吸取出胎儿,分离肝脏,去掉包膜,DMEM-LG 中剪成碎块并研磨,制成悬液,用孔径为 100μm 的尼龙网筛过滤细胞悬液,使之成为单细胞悬液。将其稀释至 10^7 个细胞 /ml, 与密度为 1.073g/ml 的 percoll 混合,1000g 离心 30min。吸取界面层细胞加入 PBS 并混匀,以 500g 的速度离心 7~10min,弃上清。重复上述过程,再次洗涤,然后用 DMEM-LG 培养液调整细胞浓度为 1×10^6/ml,置于 37℃、5%CO_2 及饱和湿度的孵箱内培养 72h, 然后通过更换培养液, 弃掉未贴壁细胞。以后每 3~4 天换液 1 次。当细胞达 80%融合时消化传代, 以 $4\times10^3/cm^2$ 的密度接种于培养瓶中扩增。收集第 2~9 代的细胞用于下述实验。

1.3 流式细胞仪检测 FMSCs 表面抗原的表达

取第 2~9 代的 MSCs,去掉培养液,洗涤消化后将 0.5×10^6 个细胞悬浮于含 300μlPBS 中。分别加入 5μl 下列抗体:荧光素标记的单克隆抗体抗 CD29、抗 CD44、抗 CD166、抗 CD105、抗 SH3、抗 SH4、抗 CD14、抗 CD34、抗 CD45,在室温、避光条件下孵育 15min,PBS 洗涤后重新悬浮于 PBS 中。在等量细胞悬液中加入 5μl 荧光素标记的兔抗鼠单克隆抗体中孵育 15min,作为对照管,以排除非特异性结合所产生的荧光对结果的影响。放在流式细胞仪上检测, 最后用 Cellquest 软件对结果进行分析,结果以直方图显示。

1.4 急性心肌梗死模型的建立及 FMSCs 的移植

采用结扎左冠状动脉前降支 (left anterior descending artery,LAD)的方法建立急性心肌梗死模型。具体步骤如下:4 只 SD 大鼠麻醉固定后, 将气管套管插入气管内并连接到动物呼吸机上,于大鼠左侧第四、五肋间行横切口切开皮肤、胸大肌,开胸暴露心脏,在肺动脉圆锥与左心耳交界处之下 1~2mm 处寻找 LAD,结扎造成左室前壁心肌梗死,可见梗死心肌变得苍白。手术 1 周后, 重新开胸, 直视下将悬浮在 100μl PBS 中的 3.5×10^6 个 FMSCs 分数点植入梗死心肌周围,逐层关胸。分别在 FMSCs 移植后 1 周及 2 周处死大鼠,取出心脏,冲洗后去除左右心房和右心室。在福尔马林中固定 24h,然后包埋于石蜡中,用石蜡切片机将标本切成厚度为 3μm 的切片。

1.5 荧光原位杂交追踪移植细胞

通过 HE 染色寻找注射位点,从而确定移植细胞所在之处。用荧光标记的人类 DNA 特异性探针,通过 FISH 技术检测组织切片中的移植细胞。将石蜡切片在 60℃烘烤 2h 以去除石蜡,然后放在从高至低不同浓度的乙醇中使之恢复水化(乙醇浓度依此为 95%、70%、50%),浸泡在枸橼酸盐缓冲液(10mmol/L,pH6.0)中,放在微波炉中加热(750W×1.5min,然后 50W×4.5min)。依此在下述溶液中及温度下孵育以破坏膜蛋白:0.5ml 胃蛋白酶 /50ml HCl(150μg/ml)、37℃、15~20min,2×SSC/0.1% Igepal、37℃、10min,1%福尔马林 /50mmol/LMgCl$_2$/PBS、20℃、10min,PBS、20℃、5min。放在从低到高不同浓度的乙醇中脱水(浓度依此为 70%、90%、99.5%),待干燥后将 3μl 探针溶液加在切片有组织贴附的部位上, 用小圆形盖玻片放在组织上,用胶封闭,在 74℃下烘烤 10min 使组织及探针中 DNA 变性。将切片放在潮湿的塑料盒中, 在 39℃中孵育 12h,使探针中 DNA 与组织中目标 DNA 充分反应杂交。去掉封闭胶,将切片放置在 2×SSC 中,数分钟后小圆形盖玻片因自身的重量而脱落, 充分洗涤后用含有 DAPI(4,6-diamino-2-phenylindole)的封片液封片。在荧光显微镜下观察,来源于人类的 FMSCs 呈现红色细胞核, 而来源于鼠类的细胞呈现蓝色细胞核。

1.6 免疫组化染色检测移植细胞向心肌方向的分化

取上述通过 FISH 显示有移植细胞的切片进行免疫组化染色,用心肌特异性抗体检测移植细胞是否在心脏组织中发生了向心肌方向分化。洗涤后加 5%兔血清封闭非特异性抗原,室温下孵育分钟,弃去血清。加入各种心肌特异性的单克隆抗体,包括抗 Desmin 和 Troponin I,稀释度为 1:50,在室温下孵育 12h。洗涤后滴加 1:10 荧光标记的兔抗鼠 IgG, 孵育 1h,洗涤后在荧光显微镜下观察并拍照。

2 结 果

2.1 FMSCs 的形态学观察

初始分离的细胞悬浮在培养液中,大部分细胞于 24h 内贴壁,贴壁细胞呈圆形。随着培养时间的延长,贴壁细胞数量增加,出现小的细胞突起。72h 换液去除未贴壁细胞,此时贴壁细胞较多,低倍镜下大多数细胞呈较均一的长梭形。高倍镜下显示,细胞多为单核,核大,核仁明显,核仁数目不等,多为 2~4 个,胞浆丰富,富含颗粒,集中在细胞核的周边区域,相互间以细胞突起相连接。图 1 为 HE 染色后高倍镜下所得图片。随着细胞数目的不断增加,逐渐形成大小不一、边界清楚的细胞集落,其中含数十至数百个形态均一的长梭形细胞,细胞呈平行排列生长或旋涡状生长。

2.2 FMSCs 的表面抗原特性

流式细胞仪检测第 2~9 代 FMSCs 的表面抗原特性。结果提示,所测的各代细胞表面抗原表达具有均一性,即阳性表达 CD29、CD44、CD166、CD105、

维普资讯 http://www.cqvip.com

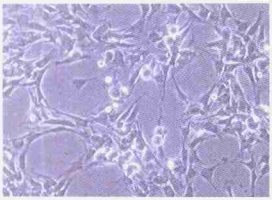
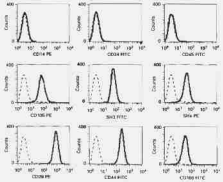


图 1 FMSCs 在体外呈梭形，并逐渐形成细胞集落(×100)



即各代细胞阳性表达 CD29、CD44、CD166 、SH2(CD105)、SH3 及 SH4，而阴性表达 CD14、CD34 及 CD45

图 2 培养所得的细胞具有稳定的 MSCs 的表型特征



移植 7 天后在所有移植了细胞的大鼠心脏组织中均发现了较多的移植细胞的存活，红色为来源于人的移植细胞胞核，蓝色为来源于大鼠的细胞胞核(×100)

图 3 移植细胞的存活情况

SH3、SH4，不表达造血干细胞表面标志抗原如 CD14、CD34、CD45。见图 1~4。



对 FISH 染色提示有移植细胞存在的切片再次进行 troponin I 的免疫组化染色，结果显示，移植细胞虽然在心肌组织中存活，但并没有发生向心肌细胞的分化(×200)

图 4 移植细胞双重染色结果

2.3 移植细胞的存活情况

7 天后在所有移植了细胞的大鼠心脏组织中均发现了较多的移植细胞的存活。植入细胞主要集中在注射部位，移植细胞胞核显示为红色、细胞核形态规则，为圆形或卵圆形、轮廓清楚、提示细胞处于良好状态，而其周围的蓝色核为大鼠心肌细胞胞核(图 3)。14 天后未在移植了细胞的心脏组织中发现移植细胞的存活。

2.4 移植细胞的存活情况

将 FISH 染色阳性的玻片再进行心肌特异性抗原 Desmin 和 Troponin I 的免疫组化染色，即进行双重染色。结果显示(图 4)，存活的移植细胞上没有心肌特异性抗原的表达，提示移植细胞没有发生向心肌方向的分化。

3 讨 论

以前认为 MSCs 只存在于成体的骨髓中，但最近的研究发现，从多种成体组织中或胚胎中中均能分离培养出 MSCs。目前分离 MSCs 的方法主要有三种：贴壁分离筛选法、密度梯度离心法及磁珠分离法。MSCs 常规培养基为 DMEM 或 α-MEM 加 10% FCS，其中低糖环境比高糖环境更利于 MSCs 的增殖。本实验所用的细胞取材于胎儿肝脏，采用的方法是密度梯度离心法。将胎儿肝脏制备成单细胞悬液后采用密度梯度离心法，用密度为 1.073g/ml 的 Percoll 液离心分离出其中的单个核细胞，然后将其接种于培养皿中，用 DMEM-LG+10%FCS 作为基本

维普资讯 http://www.cqvip.com

培养基。通过换液去掉未贴壁细胞，利用 MSCs 的粘附贴壁特性对单个核细胞进行进一步分离纯化。结果显示，第 2~9 代 FMSCs 具有一致的抗原表达谱，均阳性表达 CD29、CD44、CD166、CD105(SH2)、SH3 和 SH4，而阴性表达 CD14、CD34 和 CD45。该表达谱也同 Campagnoli[4-6]等关于 FMSCs 的报道相符，也符合上述有关 MSCs 表面抗原的特点，证实我们成功分离培养出了高纯度且性质稳定的 MSCs。

本实验发现，在移植后第 7 天，在所有移植了细胞的大鼠心脏中均发现移植细胞的存在，提示所用的移植方法是成功有效的。移植后第 14 天，未在心脏组织中发现移植细胞的存在，提示曾经存活的移植细胞已经死亡，推测可能与移植细胞诱发的免疫排斥反应有关。在移植后 7 天对移植细胞进行双重染色，既用 FISH 检测移植细胞的存活情况，同时用免疫组化方法检测存活移植细胞的分化情况。结果显示，虽然在这些大鼠的心脏组织中发现了大量移植细胞的存在，但没有发现移植细胞向心肌方向的分化。这与某些相关报道的结果不符[7]。Tomita[8]等将猪 MSCs 自体移植到梗死心肌中，4 周后在坏死心肌中发现移植细胞表达肌钙蛋白 I，并出现肌小节结构及 Z 带。这提示 MSCs 不仅在移植后存活，而且发生了向心肌细胞的分化。对于上述结果差异，我们通过在移植前检测移植细胞的纯度、活细胞含量(资料未显示)，排除了因移植细胞质量所导致的结果差异。而 Murry 等将 c-kit+Lin-的造血干细胞移植到心脏组织中，并没有发现该移植细胞发生向心肌方向的分化[9]。因而，我们推测，这种结果的差异是因为 MSCs 来源于不同种类的动物所致。

尽管已有大量临床实验显示，MSCs 移植能显著改善心脏功能、减少梗死面积[10-12]，但关于其具体机制则仍不清楚。有人甚至提出，MSCs 对心脏情况的改善可能来源于移植细胞所分泌的各种细胞因子，包括促血管生长因子等，而并非依赖于移植细胞的心肌样分化。上述推测有待进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] Kajstura J, Rota M, Whang B, et al. Bone marrow cells differentiatiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion[J]. Circ Res, 2005; 96: 127-137.

[2] Li TS, Hayashi M, Ito H, et al. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-β-preprogrammed bone marrow stem cells[J]. Circulation, 2005; 24: 2438-2445.

[3] Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2006; 98: 1002-1013.

[4] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal belld, liver, and bone marrow[J]. Blood, 2001; 98: 2396-2402.

[5] Majumdar M, Keane-Moore M, Buyaner D, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells[J]. J Biomed Sci, 2003; 10: 228-241.

[6] Krampera M, Glennei S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive antigen specific T-cells to their cognate peptide[J]. Blood, 2003; 101: 3722-3729.

[7] 苏 立，陈运贞，张晓刚，等. 在心肌细胞/MSCs 共培养体系中 MSCs 出现心肌分化表型[J]. 重庆医科大学学报，2005; 30(5): 644-647.

[8] Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002; 123: 1132-1140.

[9] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infacts[J]. Nature, 2004; 428: 664-668.

[10] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cel transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial[J]. Lance, 2004; 364: 141-148.

[11] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation I chronic coronary artery disease: the IACT Study[J]. J Am Coll Cardiol, 2005; 46: 1651-1658.

[12] Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2006; 98: 1002-1013.