维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0555－04

胚胎心肌细胞移植治疗心脏病的研究进展

赵 辉,韩 璞

(重庆市第五人民医院检验科,重庆 400062)

【中国图书分类法分类号】R541;R458 【文献标识码】B 【收稿日期】2002－10－05

Soonpaa 等[1]1994 年首次报道了将胎鼠心肌细胞植入成鼠心肌内获得存活、增殖,并与宿主心肌细胞间建立了细胞连接。Leor 等[2]1996 年发现将胎鼠心肌细胞移植入成年鼠心肌梗塞区 14～65 天后存活,并且使心脏的功能得以明显改善。Scrosin 等[3]将胎鼠心肌细胞植入阿霉素诱导的成鼠心梗组织内,发现细胞存活,供宿主细胞间建立超微连接,并且受损心肌的功能有显著提高。Li 等[4]将胚鼠心肌细胞移植到成年鼠低温损伤所致的心肌疤痕组织周围,发现疤痕组织的范围减小,小血管数量明显增多,心脏功能得以改善。心肌细胞移植治疗心脏病的作用和策略是:稳定受损心肌,防止组织重构;作为重组蛋白、生长因子和药物的载体,诱导宿主心肌组织的分子变构;改善局部和整体的心肌收缩功能[5]。

1 细胞植入治疗心脏病的方法

1.1 移植细胞的种类

目前采用的细胞主要有:胎鼠或人的胚胎心肌细胞、心房瘤细胞(AT—1)、平滑肌细胞、皮肤成纤维细胞、骨骼肌细胞、胚胎干细胞等[6],心房瘤细胞(AT—1)是由心房组织中分离出来的心房细胞株;骨骼肌细胞现虽已明确在心肌组织内可分化、增殖,但其不具备心肌组织的自发性节律性收缩,易引起心功能和心电生理的紊乱;Sakai 等[7]比较 3 种胚胎细胞移植后的效果发现,胚胎心肌细胞产生的舒缩功能明显强于平滑肌细胞和皮肤成纤维细胞。胚胎心肌组织主要含有胚胎心肌细胞和成纤维细胞,通过组织块消化法获取细胞后,根据前者贴壁速度慢而后者贴壁速度快的原理,运用差速贴壁法可获得较纯的胚胎心肌细胞,其在体外培养 24h 后可看到明显的自主性搏动。

1.2 移植的途径

采用显微注射的方法。在宿主胸部行一简单的胸廓造口术暴露出心脏后,用显微注射术将胚胎心肌细胞直接注入受损心肌组织内。

1.3 心脏病变的选择

大多数研究涉及缺血性心肌梗塞、药物所致的心衰和低温损伤导致的心肌疤痕组织等范围,但亦有涉及到先天性心脏病[8]和心肌病[9]领域。

2 观察内容

2.1 移植胚胎心肌细胞的鉴定方法

2.1.1 细胞形态学特征

胚胎心肌细胞植入宿主心肌组织后,取心肌组织做常规 HE 染色,可以观察到植入细胞体积小,圆形或梭形,细胞核大,核仁清楚,核/质比例高,呈幼稚细胞表型。同时采用电镜技术观察植入细胞超微结构的变化,Matsushita 等[11]报道用 β—半乳糖苷酶标记待移植的胚胎心肌细胞,然后植入到宿主心肌组织内,在植入后 4 周可以观察到在心梗组织边缘,标记的细胞与宿主心肌细胞出现了闰盘结构,为以后功能的建立打下了解剖学基础。

2.1.2 β—半乳糖苷酶基因标记技术[1,3,11,12]

将 β—乳糖苷酶基因通过质粒转染给待移植的胚胎心肌细胞,用 FISH 法检测宿主心肌组织内半乳糖苷酶的活性,从而可对移植的胚胎心肌细胞进行定位和定性。

2.1.3 Y 染色体特异性鉴测[3,13]

将雄性胚胎心肌细胞移植到雌性鼠心肌组织内,用 FISH 方法对 Y 染色体特异性基因位点 DYZ

作者介绍:赵 辉(1967－),男,主管检验师,
主要研究方向:临床生化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

或 SRY 区域进行鉴测。

2.1.4 α—肌动蛋白的免疫组化检测[1,2,11]

α—肌动蛋白在胚胎心肌细胞内含量丰富,而在成年心肌细胞内含量极少甚至检测不到。利用其这一特性,采用免疫组化染色的方法,在成年心肌组织内进行检测,如呈现阳性染色,则证明移植胚胎心肌细胞的存在。

2.2 植入胚胎心肌细胞与宿主心肌细胞的连接[11,12]

植入胚胎心肌细胞与宿主心肌细胞之间形成稳定的细胞连接,是宿主心肌组织发挥其机械功能和心电功能的物质基础。目前主要采用电镜技术和免疫组化染色方法来进行观察,Matsushita 等[11]报道在心梗组织边缘,胚胎心肌细胞与宿主心肌细胞形成了稳定的细胞连接。用免疫组化染色的方法,通过对 CX43、Cad 等在供宿主心肌细胞连接处的表达和染色,显示了两者间细胞连接的存在。

2.3 植入胚胎心肌细胞后的心功能评价

目前主要采用 2D 或 Dopper 超声心动图来进行心功能的评价。Scorsin 等[13]1997 年首次报道应用短焦距(10—13MHZ)超声探头的 2D 超声心动图技术,通过左室长轴监测心脏功能,发现心肌梗塞的成鼠在植入胚胎心肌细胞一个月后,其射血分数和心输出量均明显提高。

3 影响植入胚胎心肌细胞存活的因素

3.1 植入的细胞数量

Yuh 等[14]报道分别用浓度为 1×10^7/ml 和 2×10^7/ml 的胎鼠肝细胞对两组成年鼠进行移植,结果发现第二组产生免疫耐受的百分率明显高于第一组。Hans 等[18]报道将胎鼠心肌细胞移植到低温所致的成年鼠疤痕心肌组织中 2~8 周后,在移植细胞与宿主细胞边缘,只有 40% 的区域两种细胞间有连接,而 60% 却被疤痕组织所分隔,提示与移植细胞的数量有关。目前大多数研究的植入细胞数量在 1×10^6/ml 以上。一定数量的植入细胞才能在宿主心肌组织内存活、增植,而引起这一质变的数量界限的机制至今尚未得到明确阐明。

3.2 免疫排斥反应

目前的研究大多数都局限于同种异体移植(allograft),故免疫排斥反应仍然是影响植入细胞存活的主要因素。据 Li 等[4]报道将胚胎心肌细胞植入冷冻的心肌处,同时给予免疫抑制剂 cyclospicin A 5mg/kg/day 皮下注射维持治疗,结果在细胞植入 4 周时,植入的胚胎心肌细胞面积为 $21mm^2$。而 20 周后面积则减少到 $6mm^2$,而疤痕组织则扩大了两倍,并可见周围有大量的淋巴细胞侵润,提示在植入胎鼠心肌细胞处发生了免疫排斥反应。究其原因可能与采用异体胎鼠心肌细胞、免疫抑制剂用量不足或植入的胎鼠心肌细胞转染有半乳糖苷酶基因有关。

为了避免免疫排斥反应的发生,LI 等[15]2000 年报道利用闭塞冠脉所致的成年猪心肌梗塞模型,进行自体心肌细胞移植的研究,采用组织活检技术,取心室壁组织,在体外培养 4 周后,将获得增殖的心肌细胞注射回到梗塞部位,来观察细胞成活情况和心功能的改变,结果显示植入细胞在宿主心肌组织内成活并使其心功能改善。而成熟心肌细胞是丧失了分化增植能力的终末细胞,如能够通过一定的调控手段引起其表现型的改变,被重新植回体内后,则有引起潜在致癌性的危险,故该方法仍存在争议。因此,寻求一种即安全,又避免免疫排斥反应的方法,是当今研究者最为关注的一个研究方向。

3.3 胚胎心肌细胞生长发育的调控

胚胎心肌细胞在某些调节因子的作用下能够迅速生长,同宿主心肌细胞形成正常电生理连接,发挥其改善心肌的功能。现在已发现,生长因子(包括胰岛素样生长因子、上皮生长因子、转移生长因子等)是一组多肽类物质,通过内分泌和旁分泌的方式对细胞的生长发育起调控作用。如胰岛素样生长因子—1 作为心肌细胞分化强有力的刺激因子,可促进胎鼠或新生鼠心肌细胞 DNA、蛋白质合成,诱导心肌肥厚并促进肌凝蛋白轻链向肌球蛋白及肌动蛋白表达[16]。

3.4 植入心肌细胞与宿主心肌细胞的整合

植入细胞作为一种幼稚细胞具有很强的增殖能力,1996 年 Li 等[17]将心肌细胞移植到成年鼠后肢的皮下组织来观察植入细胞的成活情况,结果这些细胞形成了心肌组织及稳定的细胞连接,并且能够象心室组织自发和规律的收缩。宿主心功能的改善的物质基础是供宿主细胞间能够整合,形成稳定的细胞间连接(包括紧密连接、桥粒合缝隙连接)。紧密连接和桥粒可保证宿主心肌组织实现同步性收

维普资讯 http://www.cqvip.com

缩。而缝隙连接是其电生理一致性的前提，Koh等[18]采用携带营养不良基因的小鼠，利用免疫组化染色技术来鉴定细胞连接的存在。目前的研究显示细胞移植后供宿主间能够形成整合，为宿主心肌组织的同步性和电生理的一致性奠定了物质基础。

4 存在的问题

4.1 胚胎心肌细胞在一定的调控因子作用下，能够进行分化和发育，从而促进宿主受损心肌的恢复。如果其无限度的生长，势必造成心肌的肥厚、心肌重构和心脏功能的紊乱，因此在诱导心肌细胞增植的同时还必须掌握终止其增止的技术，但目前终止其增殖的因子或影响因素还没有被阐明。

4.2 植入的心肌细胞在宿主心肌组织内存活并与其整合，在功能上与宿主心肌细胞成为一个合胞体，才能表现正常心肌细胞的功能，从而保证同步性收缩和电生理的一致性，否则其将成为一个潜在的异位起搏点，导致宿主产生严重的心律失常。

4.3 免疫排斥反应仍是细胞移植面临的一大难题，尽管使用了免疫抑制剂，且胚胎心肌细胞免疫原性很小，易产生免疫耐受，但仍难避免免疫排斥反应的发生，故如何避免或减少免疫排斥反应的发生是需进一步解决的一大问题。而应用骨髓间充质干细胞诱导分化心肌细胞植入心肌组织来治疗心脏病则避免了免疫排斥反应的发生。骨髓间充质干细胞属多能干细胞，在一定的调控因子作用下转化成心肌细胞后，植入并修复自身受损的心肌组织。该方法既改善了心肌功能又避免了排斥反应的发生。

5 展 望

各种严重的心脏疾病都包括功能性心肌细胞数量的减少，临床上通过药物的介导作用来加强尚存心肌细胞的功能以代偿心功能的降低，而这种代偿有一定的限度，终末期心脏功能性心肌细胞的缺失较多，这时该代偿则无济于事。因此重建或恢复这些功能性心肌细胞方法不失为一条有效的治疗途径，即在分子或细胞水平，运用分子生物学技术，将胚胎心肌细胞植入到受损心肌组织内，通过一定的调控因子使胚胎心肌细胞分化发育增殖，与宿主心肌细胞在功能尚上形成一个合胞体，从而改善心肌功能，达到根本治疗心脏病的目的。

本方法虽然在理论上具有可行性，且在动物实验上亦取得了一定的成果，但付诸于临床尚有一段距离，还有许多亟待解决的问题。总之，胚胎心肌细胞植入将是治疗心脏病的一条新途径，具有广阔的临床应用前景。

参 考 文 献

[1] Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al. Formation Of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium[J]. sciences, 1994;264:98－101.

[2] Leor J, PattersonM, Quinones MJ, et al Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat: a potential method for repair of infarcted myocardium[J]? circulation, 1996;94(9suppl):332－336.

[3] Scorsin M, Hagege AA, Dolizy I, et al Can cellular transplantation improve funtion in doxorubicin－induced heart failure[J]? Circulation, 1998;98(19suppl): 151－155.

[4] LI RK, Mickle DA, Weisel RD, et al Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue[J]. Circulation, 1997; 96 (supply):179－186.

[5] Schwarz ER, Patterson M, Kloner RA. Cardiomyocyte transplantation－a cell replacement for repair of myocardial infarction[J]? Z Kardiol, 1998;87(1):1－7.

[6] Kessler PD, Byrne BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential application[J]. Annu Rev Physiol, 1999;61:219－242.

[7] Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al. Fetal cell transplantation: a comparsion of three cell types[J]. J thoac cardiovasc surg, 1999;118(4):715－724.

[8] LI RK, Jia QZQ, Weisel RD, et al. Survival and function of bioengineered cadiac grafts[J]. Circulation, 1998;100 (119supply):63－69.

[9] Morita H Cardiomyopathy[J]. Nippon rinsho, 2001; 59 (1):137－140.

[10] Gojo S, Kitamura S, Germeraad WT, et al. Ex vivo gene transfer into myocardium usingreplication－defective retrovirus[J]. Cell Transplant, 1996;5(5suppl): 81－84.

[11] Matsushita T, Oyamada M, Kurata H, et al. Formation of cell junction between grafted and host cardiomyocyte at the border zone of rat myocardial infarction[J]. Circulation, 1999; 100(19suppl):262－268.

[12] Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, et al. Stable fetal cardiomyocyte grafts in the heart of dystrophic mice and dogs [J]. J Clin Invest ,1995;96(4):2034－2042.

[13] Scorsin M ,Hagage AA, Marotte F, et al. Does transplantation of cardiomyocyte improve function of infarcted myocardium[J]. Circulation. 1997;96:188－193.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[14] Yuh DD, Gandy KL, Reitz BA, et al. Perinatal induction of immunotoleranceto cardiac and pulmonary allografts[J]. J Thorac Cardiovasc Surg ,1997;114(1):64－75.

[15] LI RK, Weisel RD, Mickle DA, et al. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart funtion after a myocardial infraction[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000; 119 (1):62－68.

[16] Ito H, Hiroe M, Hirata Y, et al. Insulin－like growth factor－1 induces hypertrophy with enhanced rat cardiomyocytes[J]. Circulation. 1993;87:1715－1721.

[17] Li RK, Mickle DA, Weisel RD, et al. In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocyte[J]. Circ Res, 1996, 78(2):283－286.

[18] Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, et al. Survival integration and differentiation of cardiomyocyte grafts: A study in normal and injured rat hearts[J]. Circulation, 1999, 100(2); 193－202.

(上接第 545 页)

影响复合树脂的应用效果。

银汞合金由白合金粉与汞等调合而成[4]。银汞合金的体积收缩,可使充填体与牙齿组织间出现微小裂隙,易发继发龋。它与牙齿组织无粘接性,主要通过牙体洞型预备而获得固位力,因而制备洞型特别重要,但在临床上不易制备理想洞型,所以在 3 种材料中银汞合金充填的脱落率最高,可能与上述因素有关。

楔状缺损充填以后,患者主要关心美观、保存时间等问题。光固化复合树脂的满意率稍低,主要因为患者认为树脂容易变色、易色素沉着等。银汞合金有金属光泽,与牙齿颜色反差大,不美观,所以患者的满意率最低。

本组病例统计只考虑了脱落率、满意率等因素,但在使用的方便性、费用等方面,玻璃离子亦优于其它两种材料。对于牙体楔状缺损的治疗建议最好使用含氟的玻璃离子水门汀,并在操作过程中应注意隔湿,充填完后涂布表面保护剂,24h 后进行表面修整、抛光。这样可取得相对理想的治疗效果。

参 考 文 献

[1] 樊明文,主编. 牙体牙髓病学正[M]. 第 1 版,北京:人民卫生出版社,2001:150.

[2] 赵忠诚. 三种充填材料治疗牙颈部龋临床疗效的对比分析[J]. 现代口腔医学杂志,2002;16(3):256－257.

[3] Ryge G. Clinical Criteria. Int Dent J, 1980;30:347.

[4] 陈治清,主编. 口腔材料学[M]. 第 2 版,北京:人民卫生出版社,2001:132;180;72.

(上接第 550 页)

[11] Payne SM. Iron acquisition in microbial pathogenesis [J]. Trends Microbiol, 1993;1(2):66－69.

[12]Frazier BA, Pfeifer JD, Russell DG, et al. Paracrystalline inclusions of a novel ferritin containing nonheme iron, produced by the human gastric pathogen Helicobacter pylori: evidence for a third class of ferritins[J]. J Bacteriol, 1993; 175(4):966－972.

[13] Husson MO, Legrand D, Spik G, et al. Iron acquisition by Helicobacter pylori: importance of human lactoferrin [J]. Infect Immun, 1993;61(6):2694－2697.

[14] Nakao K, Imoto I, Ikemura N, et al. Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with Helicobacter pylori infection and with the degree of gastric inflammation [J]. Am J Gastroenterol, 1997;92(6): 1005－1011.

[15] Nakao K, Imoto I, Gabazza EC, et al. Gastric juice levels of lactoferrin and Helicobacter pylori infection[J]. Scand J Gastroenterol, 1997;32(6):530－534.

[16] Dhaenens L, Szczebara F, Husson MO. Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin－binding protein from Helicobacter pylori [J]. Infect Immun, 1997; 65(2):514－518.

[17] Annibale B, Capurso G, Martino G, et al. Iron deficiency anaemia and Helicobacter pylori infection[J]. Int J Antimicrob Agents, 2000 ;16(4):515－519.

[18] Wilson KT, Ramanujam KS, Mobley HL, et al. Helicobacter pylori stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line [J]. Gastroenterology, 1996; 111 (6): 1524－1533.

[19] Shami PJ, Weinberg JB. Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34＋ human bone marrow cells [J]. Blood, 1996;87(3):977－982.

[20] Rafferty SP, Domachowske JB, Malech HL. Inhibition of hemoglobin expression by heterologous production of nitric oxide synthase in the K562 erythroleukemic cell line [J]. Blood, 1996;88(3): 1070－1078.

[21] Barabino A. Helicobacter pylori－related iron deficiency anemia: a review[J]. Helicobacter, 2002;7(2):71－75.