

骨髓间充质干细胞移植对心衰大鼠 心肌结构和功能的影响

江德勤* 田杰 白永虹² 吕铁伟 张文 张蕾 朱静¹ 陈沅 钱永如
(重庆医科大学儿童医院心内科,¹重庆医科大学儿科研究所,²重庆医科大学儿童医院心脏彩超室,重庆400014)

摘要 研究骨髓间充质干细胞(MSC)移植对心力衰竭(简称心衰)大鼠心肌结构和功能的影响以及在病损心肌体内分化为心肌细胞的情况。将96只Wistar大鼠,用阿霉素成功诱导了54只心衰模型,随机分成3组,移植组为左室前壁注射MSC,对照组注射培养基,心衰组不给予任何干预措施。由彩色超声心动图(TTE)监测左室心功能参数。8周检测完成后取出心脏标本,做冰冻切片HE染色观察病损心肌结构的变化及免疫荧光检查植入MSC心肌肌球蛋白重链(MHC)及心肌特有的连接蛋白(Cx43)表达情况。结果表明植入的MSC存活并表达了MHC及Cx43,其周围宿主心肌细胞肿胀明显减轻。在移植MSC2周后,心功能开始改善,至8周时,心功改善能更明显。由此得出结论:MSC在病损心肌体内不仅能存活、分化为心肌细胞,使病损心肌组织病变减轻。而且可显著改善心衰大鼠的心功能。

关键词 骨髓间充质干细胞;移植;分化;心肌细胞;心功能

近年来,有许多实验研究表明骨髓间充质干细胞(MSC)移植可使局部心肌病变如心肌梗塞所致心力衰竭(简称心衰)的心功能恢复^[1-3]。但MSC植入到弥漫性心肌病变如心肌病的动物模型中,对其心肌结构和功能有何影响?以及在病损心肌体内能否分化为心肌细胞?这方面工作目前的研究不多。本研究采用阿霉素建立心肌病心衰的动物模型,体外分离、培养、扩增MSC,直接植入到该动物模型的心室肌内,观察MSC对其心肌结构和功能的影响以及在病损心肌体内分化为心肌细胞的情况,为MSC的临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器

Wistar大鼠(体重200g),购于第三军医大学大坪医院动物中心。阿霉素购自法玛西亚普强公司。DMEM/F12-1:1培养基购自Hyclone公司。优质胎牛血清购自Hyclone公司。0.25%胰蛋白酶购自上海生物工程技术服务公司。4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)购自Pierce公司。多克隆羊抗鼠MHC IgG抗体(1:100)、多克隆兔抗鼠Cx43 IgG抗体(1:100)购自Stancruz公司。FITC标记的羊

抗兔IgG二抗(1:200)购自北京中山生物公司。FITC标记的兔抗羊IgG二抗(1:200)购自北京中山生物公司。Acuson sequoia 512彩色超声心动图。SL型CO₂培养箱。TKR-200C小型动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸设备公司)。Olympus倒置显微镜(日本)。

1.2 MSC的分离、培养和标记

参照Pittenger等的方法^[4],选用80~100g的Wistar正常大鼠,用贴壁筛选法分离、扩增、纯化MSC,选用3~4代的MSC用于移植实验,在移植前12~24h,用DAPI(浓度为20μg/ml)标记MSC。

1.3 心衰模型的建立及随机分组

选用96只Wistar大鼠,阿霉素腹腔注射,每次2.5mg/kg,3次/周,间隔2周,再用1周,共6次,总剂量15mg/kg^[5],末次注射完成后,观察4周,对存活的大鼠,由经胸彩色超声心动图(transthoracic echocardiography, TTE)测得心功能参数,以左室射血分数(LVEF%)、左室短轴缩短率

收稿日期:2004-03-24 接受日期:2004-08-18

国家自然科学基金资助项目(No.30271381);重庆市科委资助项目(No.渝科发计字[2001]54-40)

*通讯作者。Tel: 0813-8876598, E-mail: jiangdeqin123456@163.com

(LVFS%)较正常参考值下降20%~30%作为心衰模型建立的标准。共建立了54只模型,随机分成3组,心衰组(心衰模型不做任何干预)18只,移植组18只(心衰模型植入MSC),对照组18只(心衰模型注入培养基)。

1.4 MSC的植入

在小动物呼吸机的支持下,进行细胞移植手术。DAPI标记后的MSC在移植前经PBS冲洗6次,消化、离心后,悬浮在含12%胎牛血清的DMEM/F12-1:1培养基中,用特制的1 ml皮试针吸取,体积50 μ l,移植细胞数量为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/只。手术的Wistar大鼠,首先用3.5%的水合氯醛腹腔注射(100~200 mg/kg)麻醉后,颈部正中,切开气管,连接小动物呼吸机进行辅助呼吸,调整动物呼吸机参数,吸:呼为1.5:1,呼吸频率112~132次/分,潮气量为每100 g 1~5 ml。沿胸骨左缘0.2 cm处,打开胸腔,暴露心脏,将准备好的细胞悬液50 μ l,直接注射左室前壁靠心尖处,注射点为4点,每点10~15 μ l。对照组手术方式同移植组,注射的是50 μ l培养基。移植组、对照组大鼠除术中、术后死亡外,从2周存活至8周分别为8只、9只,模型组除自然死亡外,从2周存活至8周12只。

1.5 心功能参数的测定

采用美国Acuson sequoia 512高频超声诊断仪,探头频率8.5 MHz,扫描速度为100 mm/s,由有经验的医师专人操作。测定方法:3.5%的水合氯醛腹腔注射(100~200 mg/kg)麻醉大鼠,仰卧固定于检查台上,取左室长轴切面的M型曲线,连续测3个心动周期的左室舒张末内径(LVDD cm)、左室收缩末内径(LVSD cm)。采用Simpson法计算LVEF、LVFS,取其平均值^[6]作为心功能参数指标。首先测定30只体重在180~220 g的正常Wistar大鼠的心功能参数作为相同条件下的正常参考值标准。然后测末次阿霉素腹腔注射后4周存活大鼠的心功能参数作为基线。最后测移植组、对照组手术后只2、4、6、8周(心衰组也同期测量)的心功能参数。

1.6 MSC植入心室后的组织学、形态学检查

末次TTE监测心功能指标后,处死实验大鼠(每组4只),留取左、右心室组织,液氮保存。取6 μ m厚左室前壁冰冻切片作苏木精伊红(HE)染色,在普通光学显微镜下观察。取5 μ m厚冰冻切片作免疫荧光检查,方法如下:首先,样本冰冻

切片丙酮固定20 min,0.1%Triton X-100浸泡20 min,用正常血清(MHC兔血清,1:20)封闭10 min后,先加一抗(MHC羊多抗IgG,1:100),在4 $^{\circ}$ C冰箱中温育过夜,再加二抗(FITC兔抗羊IgG 1:200;此抗体带荧光显色),37 $^{\circ}$ C烤箱中温育1.5 h,甘油封片后,荧光显微镜下即时观察。Cx43的免疫荧光检测方法同MHC。同时取宿主心肌作免疫荧光的阳性及阴性对照。

1.7 统计学分析

所有数据用SPSS11.5软件包处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 体外培养MSC的性状

从正常大鼠的骨髓中分离、培养原代MSC,24~48 h首次换液后,可见MSC呈小克隆分布,贴壁生长,呈短棒状,至7~10天,原代MSC有80%~90%汇合,呈仿锤形。传至4代,培养3天,可见MSC分布均匀,红细胞几乎消失,MSC仍呈仿锤形,90%~95%汇合(图1)。

2.2 MSC植入后对病损心肌结构的影响

移植MSC 8周后4个注射点的左室前壁横切面及纵切面组织形态学检查结果,均有相似变化。图2为横切面,冰冻切片经免疫荧光显微镜检查可见注射部位DAPI(标记MSC)蓝色荧光呈岛样分布,图3为同一冰冻切片的HE染色,蓝色荧光标记部位即MSC,位于注射部位中央的MSC,细胞核大、密集,胞浆稀少、染色呈淡染,在边缘的MSC与宿主心肌细胞接触处,MSC分化较好,胞浆丰富、染色接近宿主心肌细胞,排列与心肌纤维平行,部分MSC嵌入宿主心肌组织中,将宿主心肌纤维断裂处连接起来。图4为纵切面,可见DAPI蓝色荧光呈点状沿针道方向延伸分布,图5同一冰冻切片的HE染色,蓝色荧光标记部位即MSC,密集、胞核大、胞浆稀少而淡染,图6在200倍下可见植入的MSC分化形成新的两条平行的血管。对照组(图7)和心衰组大鼠心肌细胞肿胀明显,细胞间隙小,心肌纤维断裂,间质纤维增生,排列紊乱,心肌细胞中可见少许空泡形成,心肌间质中血管减少。图8可见MSC邻近的心肌细胞肿胀明显减轻,细胞间隙扩大,这种现象由局部向远距离扩散,越远离植入的MSC,心肌细胞肿胀明显,心肌细胞间隙缩小。

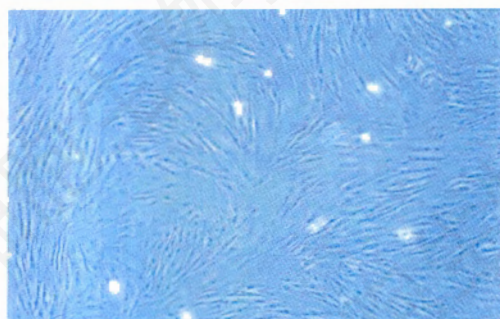


图1 传4代培养3天的MSC($\times 100$)

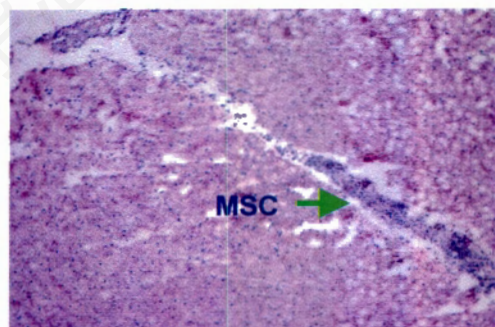


图5 为图4的HE染色检查结果($\times 100$)
箭头所示为植入的MSC。

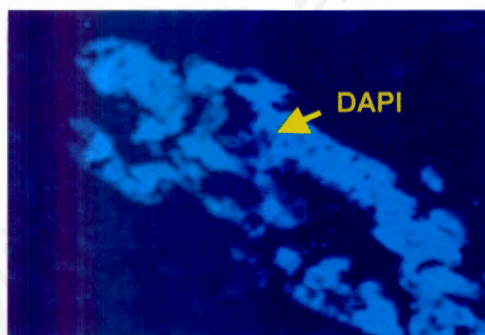


图2 MSC移植8周后左室前壁横切面直接荧光显微镜下观察($\times 100$)

箭头所示为DAPI标记MSC。

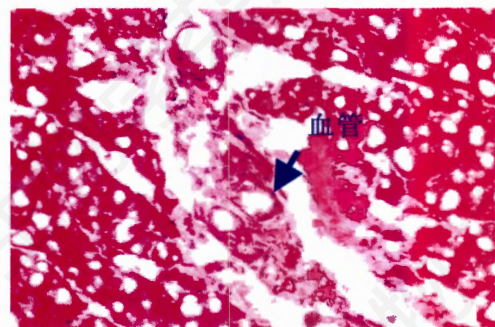


图6 为图4的HE染色结果($\times 200$)
箭头所示为植入的MSC新形成的两条平行的血管。

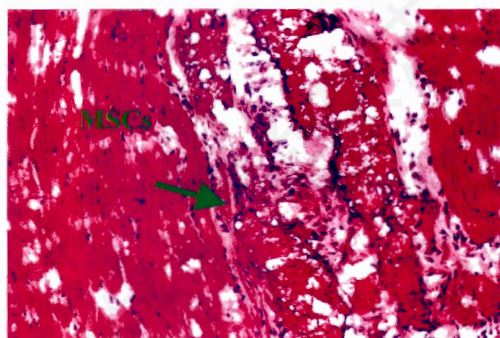


图3 为图2的HE染色检查结果($\times 100$)
箭头所示为植入的MSC。

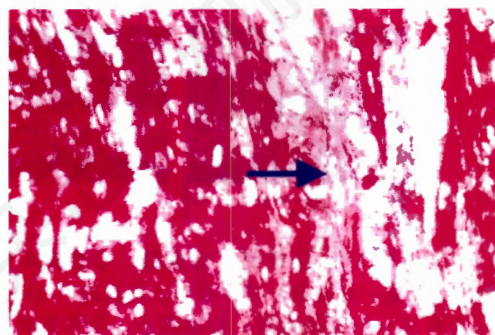


图7 心衰大鼠左室前壁HE染色($\times 200$)
箭头所示为心肌纤维断裂, 间质增生。

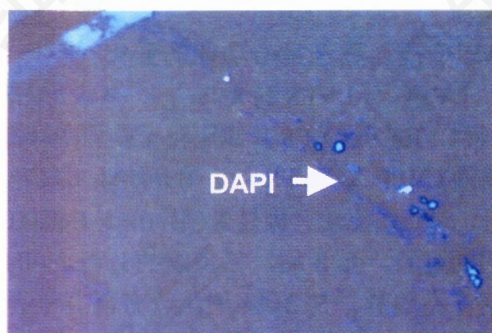


图4 MSC移植8周后左室前壁纵切面直接荧光显微镜下观察($\times 100$)

箭头所示为DAPI标记MSC。

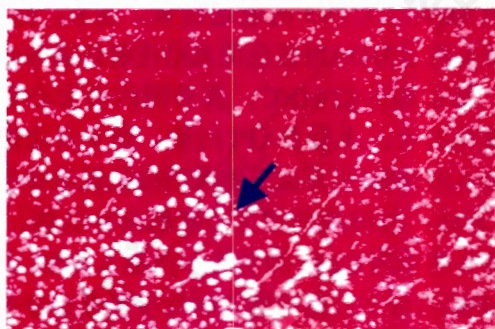


图8 MSC移植8周后左室前壁HE染色($\times 100$)
箭头左侧所示为心肌细胞肿胀减轻, 间隙扩大。

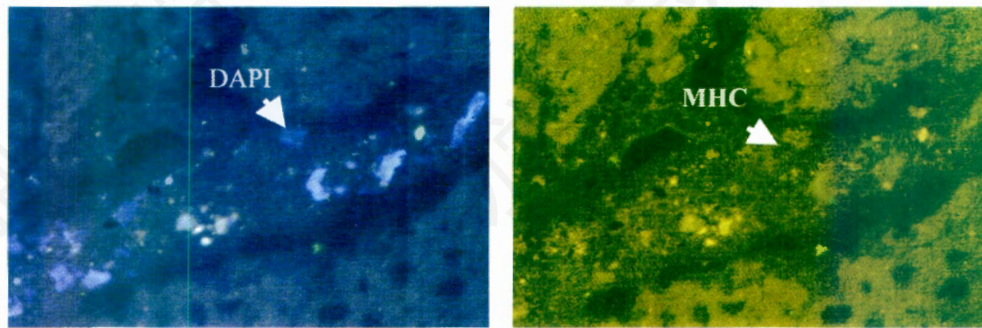


图9 MSC移植8周后左室前壁纵切面($\times 400$)

左边为直接荧光显微镜下观察结果,箭头所示为DAPI蓝色荧光。右边为免疫荧光检查,箭头所示为植入MSCs表达MHC,左右两图为同一视野。

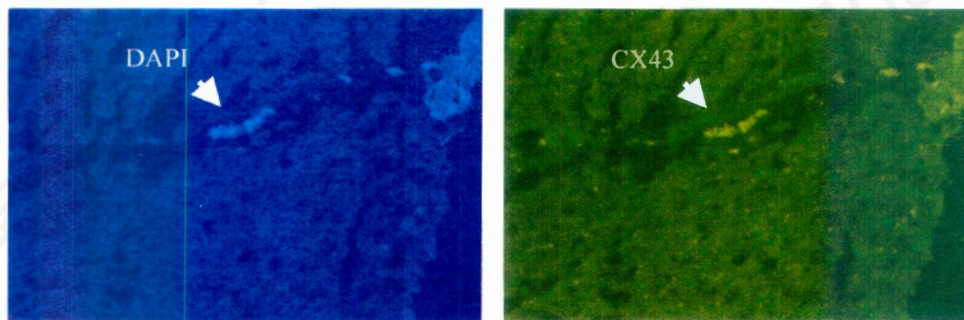


图10 MSC移植8周后左室前壁纵切面($\times 400$)

左边为直接荧光显微镜下观察结果,箭头所示为DAPI蓝色荧光,右边为免疫荧光检查,箭头所示为植入MSC表达Cx43,左右两图为同一视野。

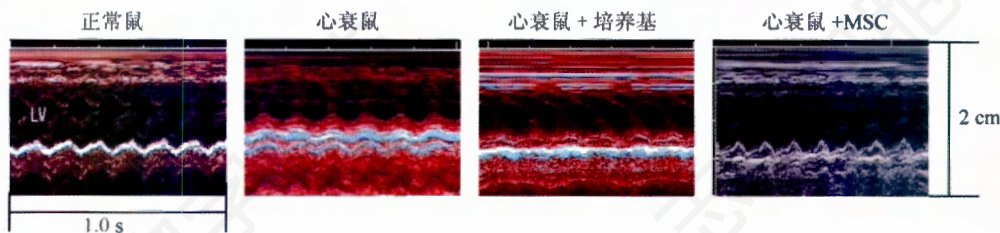


图11 正常鼠、心衰鼠、心衰鼠+培养基、心衰鼠+MSC,术后8周的M型超声心动图

图中可见,心衰鼠、心衰鼠+培养基与正常鼠超声心动图比较,心腔扩大,左室后壁变厚,左室后壁动度减小。心衰鼠+MSC与心衰鼠、心衰鼠+培养基比较,心腔缩小,左室后壁变薄,左室后壁动度增大。

2.3 MSC植入后分化为心肌细胞的鉴定

MSC移植后8周左室前壁的纵切面,用免疫荧光检查MHC、Cx43的表达结果。图9、图10的左边箭头所示为DAPI蓝色荧光沿注射针道方向延伸分布,标记植入的MSC,其周围的宿主心肌细胞未见蓝色荧光,未被DAPI污染。图9右边箭头所示为植入的MSC可见位于胞质的纹状肌黄绿色荧光MHC表达,较周围的宿主心肌细胞表达弱。图10右边箭头所示为Cx43的表达,在植入MSC之间和植入MSC与宿主心肌细胞之间均可见点状分布的黄绿色荧光Cx43表达,与MHC相似,较周围的宿主心肌细胞表达弱。左右两图为同一视野。实验中

用PBS代替一抗作阴性对照,无MHC、Cx43的表达。

2.4 MSC植入后左室心功能的变化

2.4.1 LVEF与LVFS的变化 从表1、表2可见,3组LVEF和LVFS基线比较无差异($P>0.05$),但移植组的LVEF和LVFS从2周开始即明显升高,与心衰组、对照组比较有极显著差异($n=6, P<0.001$),随着时间的延长,至8周,移植组的LVEF和LVFS呈逐渐升高趋势,与2、4周比较有显著差异($n=6, P<0.05$)。而对照组和心衰组2、4、6、8周的LVEF和LVFS比较无差异($n=8, P>0.05$),随着时间的延长,亦无逐渐升高趋势。其彩色超声心动图见图11。

表1 心衰组、对照组、处理组在2、4、6、8周的LVEF比较($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	基线	2周	4周	6周	8周
心衰组	12	63.52 ± 5.60	62.16 ± 6.13	61.46 ± 4.73	64.43 ± 4.59	63.85 ± 10.11
对照组	9	61.53 ± 4.78	67.13 ± 4.25	67.21 ± 6.43	66.71 ± 7.08	68.75 ± 5.74
处理组	8	61.23 ± 5.32	76.50 ± 1.65*	80.23 ± 3.95*	81.90 ± 4.34*	86.00 ± 5.05 [△]
组间比较	F	0.89	6.81	22.32	26.96	15.80

3组LVEF基线比较无差异($P>0.05$); *与对照组、心衰组比较2、4、6、8周, $P<0.0001$; [△]与2、4周比较, $P<0.05$ 。

表2 心衰组、对照组、处理组在2、4、6、8周的LVFS比较($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	基线	2周	4周	6周	8周
心衰组	12	29.90 ± 3.82	29.15 ± 4.16	28.62 ± 2.85	30.85 ± 3.30	30.45 ± 7.29
对照组	9	30.65 ± 3.65	32.45 ± 3.01	32.82 ± 4.90	31.85 ± 4.69	33.86 ± 4.44
处理组	8	29.97 ± 4.52	39.70 ± 1.50*	43.60 ± 4.04*	45.36 ± 4.71*	50.26 ± 6.92 [△]
组间比较	F	0.68	18.98	24.61	31.23	18.69

3组LVFS基线比较无差异($P>0.05$); *与对照组、心衰组比较2、4、6、8周 $P<0.0001$; [△]与2、4周比较 $P<0.05$ 。

表3 心衰组、对照组、处理组在2、4、6、8周的LVSD和LVDD比较($\bar{x} \pm s$, cm)

组别	n	LVSD				LVDD			
		2周	4周	6周	8周	2周	4周	6周	8周
心衰组	12	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.07	0.37 ± 0.06	0.38 ± 0.06	0.54 ± 0.08	0.54 ± 0.08	0.53 ± 0.08	0.54 ± 0.08
对照组	9	0.39 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.06	0.38 ± 0.06	0.57 ± 0.07	0.60 ± 0.07	0.58 ± 0.07	0.57 ± 0.06
处理组	8	0.32 ± 0.04*	0.32 ± 0.03*	0.30 ± 0.08*	0.24 ± 0.07*	0.53 ± 0.05	0.56 ± 0.04	0.54 ± 0.10	0.48 ± 0.10
组间比较	F	4.34*	5.57*	5.37*	10.36*	0.89	1.78	0.68	2.13

术后2、4、6、8周, *与对照组、心衰组比较, $P<0.05$ 。

2.4.2 LVDD与LVSD的变化 从表3可见, 移植组LVDD术后2、4、6、8周无明显减小, 与心衰组、对照组比较无差异($n=6, P>0.05$)。而移植组LVSD术后2、4、6、8周时明显减小, 与心衰组、对照组比较有显著差异($n=6, P<0.05$), 心衰组与对照组2、4、6、8周比较无差异($n=8, P>0.05$)。

3 讨论

有学者对MSC在体外诱导后植入心肌梗塞动物模型中进行研究, 发现植入的MSC不仅可分化为心肌细胞, 还可局限心肌梗塞面积, 使心功能得到不同程度的改善^[6,7]。本实验中移植MSC前, 未经体外诱导, 直接植入大鼠心肌病模型心肌中。结果显示移植MSC在病损心肌体内可分化为心肌细胞, 并使其病损心肌结构有一定恢复, 其心功能从2周开始明显改善, 延伸了MSC移植可治疗弥漫性心肌病变所致心力衰竭的应用范围。

MSC植入心肌梗塞动物模型中观察到, MSC可迁徙到心肌梗塞中心, 形成新的心肌组织, 局限梗死面积, 从而改善其心功能^[7]。本实验移植MSC入心肌病模型中, 局部植入MSC, 对病损心肌结构的影响也是从局部开始的, 首先与植入MSC邻近的病损心肌细胞肿胀减轻, 心肌细胞间隙扩大, 断裂的心肌纤维出现连接, 越远离MSC, 这种现象

越不明显。这在TTE M型曲线中也可见这种现象, 心功能的改善是从植入MSC的局部开始的, 即从左心室心尖逐渐向心底方向扫描, 在M型曲线上靠近心尖处测量的心功能参数较好。随着时间的延长, 这种现象逐渐向心底方向移动, 故8周时的心功能较2、4周好。而且植入的MSC沿针道方向延伸分布, 表明MSC植入心肌组织中8周后是存活的, 具有较强的迁徙能力。在针道的边缘, 与宿主心肌细胞邻近处, MSC分化较好, 胞浆丰富, 染色接近宿主心肌细胞的胞浆, 针道中央的MSC密集, 胞核较大, 胞浆少, 淡染, 分化较差。表明宿主心肌细胞在诱导MSC向心肌细胞方向分化起关键作用; 由此推测心肌细胞膜上具有促使MSC向心肌细胞方向分化的信号通道。Tomita等^[8]在体外将MSC与心肌细胞联合培养结果也证实这一点。植入的MSC在针道中央可见血管生成, 表明植入的MSC可分化为血管内皮细胞, 新的血管生成对MSC的存活、分化、心功能的恢复等均起着重要作用, 同Kocher等^[1]的实验结果一致。免疫荧光检查结果显示植入的MSC表达了横纹肌特异性蛋白MHC、心肌细胞特异性蛋白Cx43, 但较宿主心肌细胞弱, 可能与植入细胞的时间较短有关, 表明植入的MSC分化为心肌细胞, 即具有心肌再生作用。

本研究结果表明移植MSC 2周后, LVEF、

LVFS 显著升高, 左室收缩功能明显改善, 大鼠体重增加, 反应敏捷。与 Tomita 等^[9]移植 MSC 到心肌梗塞模型的结果一致, 提示 MSC 移植不仅可以使局部心肌缺血导致的心衰得以恢复, 还可以改善弥漫性心肌病变引起的心功能不全。但 Tomita 等移植的 MSC 是经体外 5- 氮杂胞苷诱导的, 此诱导剂有剧毒, 可引起 DNA 变性, 加入后可导致 MSC 大量坏死。而本实验移植的 MSC 未经体外诱导, 可达到同样效果, 应用更为方便、安全。移植 MSC 改善心肌病心衰动物模型心功能的确切机制目前尚不清楚, 可能与以下因素有关: (1) 植入 MSC 形成了新的心肌组织, 与宿主心肌组织能整合, 产生电机械连接, 从而加强心脏收缩力。本文做了部分体表心电图监测, 未发现明显的心律失常, 认为植入 MSC 对宿主心肌组织的心电一般不会产生不利影响; (2) 植入 MSC 形成新的血管; (3) 植入 MSC 使

病损的心肌组织得到一定的修复。本实验观察到移植后 2 周 LVEF、LVFS 就出现明显升高, 此时 MSC 尚未分化为成熟的心肌细胞^[10], 但为什么能使心功能得以改善呢? 推测可能与 MSC 的植入, 自分泌或旁分泌了与心功能改善相关的细胞因子或体液因素有关, 值得进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Kocher AA *et al.* *Nat Med*, 2001, 7: 430
- [2] Orlic D *et al.* *Nature*, 2001, 410: 701
- [3] Orlic D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10344
- [4] Pittenger MF *et al.* *Science*, 1999, 284: 143
- [5] Shah HR *et al.* *J Invest Surg*, 1997, 10: 387
- [6] Scorsin M *et al.* *Circulation*, 1998, 98: II151
- [7] Taylor DA *et al.* *Nat Med*, 1998, 4: 929
- [8] Tomita S *et al.* *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 50: 321
- [9] Tomita S *et al.* *Circulation*, 1999, 100: II247
- [10] 吕铁伟等. *细胞生物学杂志*, 2004, 26: 197

Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Myocardium Structure and Function in the Rats

De-Qin Jing*, Jie Tian, Yong-Hong Bai², Tie-Wei Lv, Wen Zhang, Lei Zhang, Jing Zhu¹, Yuan Chen, Yong-Ru Qian
(*Cardiology Department, Children's Hospital of Chongqing Medical University; ¹Paediatric Research Institution, Chongqing Medical University; ²Department of Echocardiography, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China*)

Abstract The experiment studied effect of bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) transplantation on myocardium structure and function in rats. Fifty-four heart failure rat models were induced by doxorubicin among ninety-six female Wistar rats and divided into three groups randomly. In transplantation group, MSC were injected into left ventricular myocardium; control group received equivalent volume culture medium; heart failure group had no surgery. Left ventricular function was assessed by transthoracic echocardiography (TTE) every two weeks. At eight weeks after transplantation, the hearts were excised for histology analysis to observe the morphology changes of injured myocardium and immunohistochemistry analysis to investigate the expression of sarcomeric myosin heavy chain (MHC) and connexin43 (Cx43) in implanted MSC. The results showed the survival and expression of MHC and Cx43 in implanted MSC. The swelling of adjacent cardiomyocytes was alleviated. Heart functions were improved significantly at 2 weeks after transplantation. At eight weeks, heart functions were improved more significantly. In conclusion, implanted MSC not only may be survival and differentiated into cardiomyocytes *in vivo* as well as alleviate the damage of myocardium, but also improve heart function of rats with heart failure.

Key words mesenchymal stem cell (MSC); transplantation; differentiation; cardiomyocyte; heart function

Received: March 24, 2004 Accepted: August 18, 2004

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (No.30271381) and the Grant from Science and Technology Committee of Chongqing Municipality (No. [2001]54-40)

*Corresponding author. Tel: 86-813-8876598, E-mail: jiangdeqin123456@163.com