

· 论 著 ·

超声观察骨髓间充质干细胞移植对兔心肌梗死心功能的影响

章仁品¹, 宋晓蓉², 翟志敏³, 严中亚²

[摘要] 目的 应用超声评价体外不同处理方式兔骨髓间充质干细胞(MSCs)移植于缺血心肌后对心脏功能的影响。方法 采用结扎冠状动脉左前降支的方法建立心肌梗死模型,2周后分别将自体 MSCs、经 5-aza 诱导的 MSCs、骨髓单个核细胞(BMMNCs), Dil 标记后用微量注射器注射于兔缺血心肌内,并以无血清培养基注射动物为对照组。分别在术前、细胞移植前、细胞移植后 2、4 周之后行 M 型超声心动测量:左室收缩末内径(LVESD)、左室舒张末内径(LVEDD),计算左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)等指标。结果 细胞移植后 2、4 周,超声心动检查发现 MSCs 组和 5-aza 诱导的 MSCs 组的兔心功能(LVEF、LVFS 值)比对照组显著升高($P < 0.05$),而 BMMNCs 组仅在移植后 4 周明显改善($P < 0.05$);LVESD、LVEDD 细胞移植组与对照组相比无显著差异($P > 0.05$)。结论 MSCs、经 5-aza 诱导的 MSCs、BMMNCs 均能存活于梗死心肌中,从而改善缺血心肌后左室收缩功能。

[关键词] 心肌梗死; 动物实验; 兔; 骨髓干细胞; 细胞移植; 心功能; 二维超声

中图分类号: R542.22; R540.45 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)03-0193-04

Observation of effect of transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on rabbit cardiac function after myocardial infarction by echocardiography

ZHANG Ren-pin¹, SONG Xiao-rong², ZHAI Zhi-min³, YAN Zhong-ya². 1. Department of Ultrasound, 105 Hospital of PLA, Hefei, Anhui 230031, China; 2. Department of Cardiovascular Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei, Anhui 230001, China; 3. The Second Affiliated Hospital, Anhui University of Medical Sciences, Hefei, Anhui 230022, China

[Abstract] **Objective** To investigate the roles of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) on rabbit post-infarct myocardium and their influences on cardiac function. **Methods** The myocardial infarction model was made by using coronary artery ligation of the left anterior descending. After 2 weeks, the self pulp MSCs, 5-aza induced MSCs, and bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) labeled with Dil were injected into ischemic myocardium of rabbits, and the injection of serum-free media used as the control group. Two-dimensional ultrasound measurements of left ventricular end-systolic diameter (LVESD), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS) index evaluation cardiac function were carried out before operation, before and after transplantation of 2 weeks and 4 weeks. **Results** After implantation of 2 and 4 weeks, the myocardial function (LVEF and LVFS value) of rabbits implanted with MSCs, 5-aza induced MSCs was better than control group ($P < 0.05$). BMMNCs group improved after transplantation of 4 weeks ($P < 0.05$). No significant difference of LVESD, LVEDD was found between cells transplantation groups and control group ($P > 0.05$). **Conclusion** MSCs, 5-aza induced MSCs, BMMNCs were lived in myocardial infarction, and improved left ventricular systolic function after myocardial ischemia.

[Key words] myocardial infarction; animal test; rabbit; bone marrow stem cells; cell transplantation; cardiac function; two-dimensional ultrasound

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点科研项目(2006KJ093A)

作者简介: 章仁品(1963-),男,安徽金寨人,本科,教授,主任医师,从事超声影像诊断工作

作者单位: 1. 230031 安徽合肥,解放军 105 医院超声科; 2. 230001 安徽合肥,安徽省立医院胸外科; 3. 230022 安徽合肥,安徽医科大学附属第二医院血液科

干细胞移植为冠心病治疗提供了一条崭新的途径,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源丰富,利用 MSCs 治疗缺血性心脏疾病已成为心血管领域研究的热点^[1]。本研究应用超声评价体外不同处理方式兔 MSCs 和骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNCs)移植于缺血心肌后对缺血心脏功能改善情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年雄性新西兰白兔(安徽医科大学第一附属医院实验动物中心提供,皖医实验准字第 001 号)40 只,体重 2500~3500 g,随机分成 4 组,每组 10 只:A 组(MSCs 组)、B 组[经 5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-aza)诱导的 MSCs 组]、C 组(BMMNCs 组)、D 组(对照组)。

1.2 实验材料 BB5060UVC02 培养箱(Heraeus 公司)、低温高速离心机(Olympus 公司)、BX51 荧光显微镜(Olympus 公司)、Acuson Sequoia 512 超声诊断仪(Philips 公司)、9020P 心电图机(日本光电公司)、L-DMEM 培养液(Low glucose-Dulbecco's-modified Eagle's medium, Sigma 公司)、5-aza(Sigma 公司)。

1.3 心肌梗死(MI)模型制备 动物静脉复合麻醉后开胸,连接并记录术前心电图,充分暴露心脏;6-0 无损伤线紧贴左心耳下方连同其表面心大静脉一齐缝扎,留 1 cm 线头做标记。10 min 后心电图 II 导联上出现 S-T 段弓背样抬高为结扎成功,顺次关胸,心肌梗死模型制备成功。

1.4 MSCs 的原代培养、分离纯化与诱导分化 从兔股骨大转子下方抽取骨髓 5 ml,磷酸缓冲液(PBS)稀释 1 倍,再加至等量淋巴细胞分离液(Per-coll 1.077 g/ml)上,4℃ 条件下,500 × g 离心 15 min,小心吸取白膜层至另一离心管,PBS 冲洗 3 次,获取的 BMMNCs 重悬于含 10% FBS、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 的 L-DMEM 培养基中,以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于 25 cm^2 透气培养瓶中,置 37℃、5% CO_2 、湿度饱和培养箱中培养,48 h 换液,以后每隔 2~3 d 换液 1 次。将原代 MSCs 重悬于 L-DMEM 培养基中进行传代培养,传至第 3 代,贴壁细胞达到 80%~90% 融合时加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza,

置 CO_2 培养箱中孵育 24 h,弃去培养液,PBS 冲洗 3 次,0.25% 胰酶消化收集细胞。

1.5 移植细胞的制备 移植当日,以 0.25% 胰酶室温下消化培养瓶贴壁细胞 5 min 左右,获得的单细胞悬液 900 × g 离心 5 min;细胞悬液(BMMNCs 组为 5 ml 骨髓中分离出的单个核细胞)先置 37℃ 培养箱中孵育 5 min,再与终浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ Dil 荧光染料孵育 15 min 后,PBS 反复洗 3 次,重悬于无血清 L-DMEM 中,调节细胞数量至 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 备用,移植前细胞 4℃ 保存(通常保存 1 h)。

1.6 细胞移植实验 缺血模型建立第 2 W 后移植。再次开胸暴露心脏,分别将 Dil 标记后密度为 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液 400 μl ,用微量注射器直接多点注射至心肌梗死周边区域,对照组注射 400 μl 的 L-DMEM 无血清培养基。

1.7 心脏功能检测 分别于造模前(术前)、细胞移植前及细胞移植后 2、4 W 行超声心动图检查。用 Acuson Sequoia 512 超声诊断仪,7V3C 变频探头,频率 3.0~7.0 MHz,常规观察心腔大小、结构,选择左室长轴切面,用 M 型 B 超测量左室收缩末内径(LVESD)、左室舒张末内径(LVEDD),Teichholz 公式^[2]计算左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS),连续记录 3~5 个心动周期,取平均值。

1.8 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料分析采用单因素方差分析,使用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

各组间实验动物术前、移植前心功能检查结果无显著差异,移植前超声检查与术前相比可见到左心室扩大,室间隔变薄,运动减弱,移植后超声检查室间隔梗死部位运动增强,细胞移植后 2、4 W 见 MSCs 组和诱导组的 LVEF、LVFS 比对照组明显提高($P < 0.05$),BMMNCs 组仅在移植 4 W 有显著改善($P < 0.05$)(表 1)。各组 LVESD、LVEDD 未见明显差异($P > 0.05$)(表 2)。

表 1 四组心肌梗死白兔 LVEF、LVFS 变化的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	n	LVEF				LVFS			
		术前	移植前	移植 2 W	移植 4 W	术前	移植前	移植 2 W	移植 4 W
A 组	9	72.0 ± 8.0	56.2 ± 11.1	70.8 ± 4.6 *	71.7 ± 6.8 *	35.1 ± 6.1	24.0 ± 7.7	33.8 ± 3.4 *	34.7 ± 5.7 *
B 组	9	72.9 ± 5.5	57.2 ± 5.1	70.4 ± 6.1 *	70.3 ± 5.8 *	37.1 ± 2.9	23.8 ± 6.4	33.9 ± 3.5 *	35.5 ± 6.3 *
C 组	10	71.0 ± 6.8	55.1 ± 9.9	66.7 ± 7.3	69.1 ± 5.3 *	34.5 ± 5.9	23.2 ± 4.7	30.0 ± 6.7	34.3 ± 8.4 *
D 组	10	71.3 ± 4.1	54.7 ± 8.8	60.4 ± 5.1	62.4 ± 7.8	35.2 ± 4.1	22.8 ± 3.3	28.8 ± 1.4	27.2 ± 5.3
F 值		2.32	2.46	3.50	3.54	2.12	2.52	3.52	3.68
P 值		0.14	0.15	0.05	0.04	0.13	0.18	0.05	0.04

注:与 D 组比较, * $P < 0.05$

表 2 四组心肌梗死白兔 LVESD、LVEDD 变化的比较($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)

分组	n	LVESD				LVEDD			
		术前	移植前	移植 2 W	移植 4 W	术前	移植前	移植 2 W	移植 4 W
A 组	9	0.80 ± 0.10	1.05 ± 0.17	0.88 ± 0.09	0.88 ± 0.09	1.36 ± 0.14	1.36 ± 0.14	1.35 ± 0.10	1.38 ± 0.11
B 组	9	0.79 ± 0.07	1.02 ± 0.11	0.86 ± 0.14	0.85 ± 0.15	1.33 ± 0.11	1.33 ± 0.11	1.40 ± 0.11	1.36 ± 0.14
C 组	10	0.81 ± 0.08	1.05 ± 0.15	0.98 ± 0.11	0.86 ± 0.14	1.35 ± 0.18	1.35 ± 0.18	1.40 ± 0.13	1.34 ± 0.15
D 组	10	0.82 ± 0.11	1.03 ± 0.09	0.99 ± 0.12	0.94 ± 0.10	1.35 ± 0.11	1.35 ± 0.09	1.36 ± 0.14	1.38 ± 0.10
F 值		1.68	1.32	1.19	1.63	2.23	1.57	1.44	1.64
P 值		0.13	0.14	0.47	0.28	0.14	0.25	0.26	0.22

3 讨 论

研究表明,利用细胞性心肌成形术治疗各种形式的心肌损伤具有广阔的前景,利用骨髓来源的多种干/祖细胞成分修复受损心脏越来越受到人们的重视,虽然大量的研究报道声称 MSCs 能在梗死区分化为心肌细胞和血管组织,实现受损区域的心肌再生和血管重建,防止梗死后的恶性心室重构,移植后能显著改善心功能^[3,4],但由于所用细胞的分离和鉴定方法、细胞数量、移植前细胞处理方式以及移植的途径、时机等方面的不同,结果不尽一致。

本研究实验结果显示:MSCs 组及经 5-aza 诱导的 MSCs 组在各时点的 LVEF 及 LVFS 均较对照组显著提高,表明体外不同处理方式兔 MSCs 和 BMMNCs 移植于缺血心肌后均能够改善缺血心脏左室的收缩功能。BMMNCs 组在第 4 W 也出现相似效果,显示其作用相对缓慢迟滞,其原因是其中 MSCs 含量较少,需要在体外扩增到一定数目,才能取得预期的效果。李树仁等^[5]的实验结果与此相近。表明体外不同处理方式兔 MSCs 和 BMMNCs 移植于缺血心肌后均可明显改善缺血心脏的左室收缩功能。

骨髓干细胞移植改善心功能的主要机制目前认为可能是:①骨髓干细胞移植到宿主内,可分化为心肌细胞,从而减少了梗死区有功能心肌细胞的下降程度^[6]。②在梗死心肌中生长发育的心肌样细胞

提高了心肌组织的弹性、韧性和收缩性,增加梗死部位心肌的厚度,阻止了梗死后的心室重塑过程。Shake 等^[7]将标记的 5-aza 诱导后自体 MSCs 移植到梗死后 2 W 的猪的梗死心肌中,12 W 以后发现舒张末室壁厚度增加了 30%,而对照组左心室明显变薄,瘢痕面积较大,而未经 5-aza 诱导的 MSCs 似乎不能改变梗死后的心室重构^[8]。③通过分泌一些促血管形成的物质促进心肌中前体细胞向成熟血管内皮细胞分化,促进血管新生,增加“冬眠”和(或)抑钝的心肌细胞血流供给。④对心肌细胞保护和抗凋亡作用。Gnecchi 等^[9]研究认为 MSCs 移植后,通过旁分泌作用对剩余正常的和受损心肌的保护和抗凋亡作用,保护心功能。

综上所述,超声心动图是测量心脏结构和功能的有效方法,能为 MSCs 移植治疗心肌梗死的研究提供有价值的信息。MSCs 移植为冠心病治疗提供了一条崭新的途径,但是 MSCs 体内移植还处于初步摸索阶段,对细胞的移植时机、有效剂量及细胞分化过程中的信号传递、所需生长因子等方面还有待进一步深入研究。

【参考文献】

[1] Perez Millan MI, Lorenti A. Stem cells and cardiac regeneration [J]. Medicina, 2006, 66(6): 574-582.
[2] 简文豪,杨浣宜. 心血管超声诊断学[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2006:138-139.

- [3] Zhang H, Song P, Tang Y, et al. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 134(5): 1321-1326.
- [4] Braga LM, Rosa K, Rodrigues B, et al. Systemic delivery of adult stem cells improve cardiac function in spontaneously hypertensive rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35(1): 113-119.
- [5] 李树仁, 齐晓勇, 刘会良, 等. 经冠状动脉移植自体骨髓单个核细胞和间充质干细胞对急性心肌梗死模型心功能的改善[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(11): 2081-2086.
- [6] 林强, 陈书艳. 骨髓间充质干细胞治疗急性心肌梗死的机制[J]. 心脏杂志, 2008, 20(4): 498-500.
- [7] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 73(6): 1919-1926.
- [8] Dai W, Hale SL, Martin BJ, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short and long-term effects[J]. Circulation, 2005, 112(2): 214-223.
- [9] Gneocchi M, He HM, Liang OD, et al. Paracrine action for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cell[J]. Nat Med, 2005, 11(4): 367-368.
- (收稿日期: 2009-10-22; 修回日期: 2010-03-10)
(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王建东)

· 短 篇 ·

超声检测脑梗死患者颈动脉粥样硬化的价值

李艳秋¹, 穆红艳²

【关键词】 脑梗死; 动脉粥样硬化; 超声; 检测

中图分类号: R743.33 文献标志码: B 文章编号: 1672-271X(2010)03-0196-01

对确诊脑梗死 93 例患者的颈动脉超声作回顾性分析, 探讨颈动脉粥样硬化与脑梗死的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 3 月至 12 月住院确诊的脑梗死患者 93 例, 男 67 例, 女 26 例, 年龄 38~91 岁。大面积脑梗死 21 例, 腔隙性脑梗死 65 例, 脑干梗死 7 例。既往有高血压病史 72 例, 糖尿病 21 例。

1.2 方法 采用 Vivid-7、IE33 彩色多普勒超声诊断仪, 探头频率 7~10 MHz。患者取仰卧位, 先从颈动脉起始部作纵向及横向扫查, 依次检查双侧颈总动脉(CCA)主干、分叉处(BIF)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA); 观察内-中膜厚度(IMT)有无斑块形成, 有斑块形成者, 测量管腔狭窄程度; 并用频谱多普勒测量各段动脉的峰值流速。记录管壁最大 IMT。参照有关标准评定斑块程度^[1]。

2 结果

93 例脑梗死患者中 88 例(94.62%)颈动脉存在不同程度的粥样硬化斑块, 其中 0 级 5 例(5.38%), 1 级 26 例(27.96%), 2 级 41 例(44.08%), 3 级 21 例(22.58%)。斑块分布以 BIF

最多, 其次是 CCA, 再其次是 ICA, 均以扁平斑最多见, 其次是软斑和硬斑。

3 讨论

本组结果显示: 脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块发病率较高, 达 94.62%, 斑块指数以 2 级最多。颈动脉粥样硬化斑块形成是缺血性脑血管病重要的病因和危险因素^[2]; 且颈动脉硬化病变率越高, 发生缺血性脑卒中的危险性也越大; 若斑块发生破裂, 暴露的脂质原胶可激活血小板, 启动凝血反应形成动脉内血栓或发生出血、溃疡、斑块脱落等, 造成脑梗死的发生。

颈动脉彩色多普勒超声可敏感地检测动脉内-中膜厚度及斑块的存在、大小、性质和严重程度, 对临床预防脑梗死及早期采取预防措施具有重要意义。

【参考文献】

- [1] 许竹梅, 赵水平, 范平. 超声测量颈动脉内膜中层厚度与颈动脉斑块的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8(2): 165-168.
- [2] 虞峰. 颈动脉粥样硬化与缺血性脑梗死的关系[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2006, 9(1): 83-84.

(收稿日期: 2010-01-26)

作者单位: 1. 200083 上海, 海军上海水电路干休所门诊部; 2. 200081 上海, 解放军 411 医院

(本文编辑: 潘雪飞)