

心肌梗死后骨髓间充质干细胞治疗改进心功能及心肺复苏结果的研究

王 彤, 黄子通, 符 岳, 方向韶
(中山大学附属第二医院急诊科, 广东 广州 510120)

摘 要: 【目的】探索大鼠心肌梗死并经骨髓间充质干细胞(MSC)治疗后, 心功能的变化及其后进行的心肺复苏结果的影响。【方法】18 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 随机分为两组, MSC 注射组和磷酸缓冲液(PBS)注射组, 每组 9 只大鼠。先开胸结扎左前降支冠状动脉, 4 周后再次开胸接受 PKH26 荧光标记的悬浮在 PBS 中的 5×10^6 MSC 或仅用 PBS 梗死部位注射治疗, 注射后 2 周及 4 周用超声心动图测量射血分数, 4 周时诱导心室颤动及进行心肺复苏, 测量心肺复苏前及心肺复苏后 4 h 内的血液动力学参数的变化。并在心肺复苏 72 h 后取心肌组织进行病理切片检查。【结果】与注射磷酸缓冲液相比, 注射 MSC 2 周 ($67\% \pm 4\%$ vs $56\% \pm 5\%$, $P < 0.001$) 及 4 周后 ($67\% \pm 6\%$ vs $53\% \pm 3\%$, $P < 0.01$) 射血分数明显提高, 心肺复苏前后的血液动力学参数包括心脏指数、 dp/dt_{40} 、 $-dp/dt$ 、左心室舒张末期压明显改善; 虽然 2 组的复苏成功率没有明显区别, 但 72 h 生存率 2 组比较有明显差异 (58.6 ± 20.6 vs 26.1 ± 21.6 , $P < 0.05$)。心肌组织病理切片发现有大量的 PKH26 标记的细胞存在。【结论】心肌梗死后 MSC 治疗能明显改善心功能, 同时也能明显改善心肺复苏前后的血流动力学参数及 72 h 生存时间。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 心室颤动; 心跳骤停; 心肺复苏; 心肌梗死; 射血分数; 心功能
中图分类号: Q28 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2007)05-0529-06

Myocardial Function and Outcome of Cardiopulmonary Resuscitation in a Rat Model of Myocardial Infarction Treated with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

WANG Tong, HUANG Zi-tong, FU Yue, FANG Xiang-shao

(Department of Emergency, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate myocardial function and outcome of cardiopulmonary resuscitation (CPR) in a rat model of myocardial infarction treated with bone marrow mesenchymal stem cells. 【Methods】A thoracotomy was performed in 18 rats. Myocardial ischemia was induced by ligation of the left anterior descending artery (LAD). 4 weeks later, animals were randomized to receive 5×10^6 MSCs marked with PKH26 in phosphate buffer solution (PBS) or PBS alone as a placebo. Four weeks after MSCs or PBS injection, ventricular fibrillation (VF) and CPR were performed. Ejection fraction (EF) was quantitated two and four weeks after administrating MSCs or PBS. Hemodynamics, including cardiac index (CI), dp/dt_{40} , $-dp/dt$, and LVDP were measured before inducing VF and hourly following return of spontaneous circulation (ROSC). MSCs were counted in $5 \mu\text{m}$ sections obtained from each harvested heart with cryostat. 【Results】Significant improvements in EF, CI, dp/dt_{40} , $-dp/dt$, LVDP followed injection of MSCs prior to inducing VF. Following ROSC, myocardial function and hemodynamic were significantly greater in animals treated with MSCs. Duration of survival were significantly longer in MSCs-treated animals compared PBS-treated animals. 【Conclusion】Myocardial function before and after CPR and survival time after CPR were significantly improved in animals treated with MSCs compared to those which received PBS.

Key Words: bone marrow mesenchymal stem cells; ventricular fibrillation; cardiac arrest; cardiopulmonary resuscitation; myocardial infarction; ejection fraction; myocardial function

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):529-534]

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 广东省自然科学基金(5001791)

作者简介: 王 彤(1969-), 男, 湖南双峰人, 在读博士, 主治医师, E-mail: tongwang163@yahoo.com.cn; 黄子通, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: Wang2it@tm.com

近几年来,细胞治疗学的发展非常迅猛,利用细胞移植的方法来增加有功能的心肌细胞的数量,从而改善心功能已成为心血管疾病治疗的新途径^[1,2]。以前的心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR)研究使用的均是健康的动物,且研究的重点放在复苏后药物的选择及各种器械如何改进复苏后血流动力学^[3,4]。但临床实际情况是在 CPR 发生之前病人大多有严重的心脏疾病^[5],因而本课题研究力图尽量接近临床实际,首先结扎左冠状动脉前降支(left anterior descending artery, LAD),造成较严重的心肌缺血及缺血后心功能不全,4周后注射骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs)或磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS),治疗的干预措施提到了 CPR 之前,治疗4周后再诱发心室颤动(ventricular fibrillation, VF)及进行 CPR,观察心肌梗死后 MSCs 治疗对大鼠心功能及 CPR 前后血流动力学的影响,从而为 MSCs 治疗心肌缺血及改善 CPR 的结果提供实验依据。本研究不仅探讨 MSCs 改善心肌梗死后心功能不全,而且是首次探讨心肌梗死后 MSCs 治疗对其后发生的心跳骤停和心肺复苏的血流动力学及生存时间的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

成年 Sprague-dawley 雄性大鼠,6-8个月大小,体质量 450-550 g。

P₃代经 PKH26 (美国 Sigma Aldrich 公司)染色的 MSC。

1.2 主要仪器及材料

红外线 CO₂ 监测仪 (型号 IL200, 美国 Instrumentation Laboratory 公司), 小动物呼吸机 (型号 3500H, 美国 Sechrist 公司), 惠普超声心动图机 (型号 2406A, 美国 Hewlett-Packard 公司), 除颤仪 (型号 Smart, 美国 Philips 公司), 监护仪 (型号 7010, 美国 Tram 公司), CODAS 数据采集系统 (美国 DataQ 公司), 高敏压力转换器 (型号 42584-01, 美国 Abbott Critical Care Systems 公司), PE-50 的塑料导管 (Intramedic PE-50, 美国 Becton-Dickinson 公司), 4-F 塑料导管 (model C-PMS-401J, 美国 Cook Critical Care 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠骨髓 MSC 的分离、培养、传代、鉴定、染色 取 1 月龄 Sprague-Dawley 大鼠, 在无菌条件下小心取出双侧股骨和胫骨, 加入 10 mL DMEM 完全培养液, 无菌注射器反复冲洗骨髓腔, 将冲洗后制成的细胞悬液, 600 ×g 离心 5 min, 重新加入 L-DMEM 完全培养液 10 mL 悬浮细胞后, 移入 25 cm² 塑料培养瓶中, 二氧化碳培养箱中 37 恒温原代培养 (P₀)。以后每 3 d 更换一次完全培养液。当细胞附壁生长至整个底层瓶壁的 90% 以上时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化后按 1:2 比例传代 (为 P₁ 代)。倒置显微镜逐日观察, 重复上述操作, 并记为 P₂、P₃ 代。P₃ 的细胞将用于所有的动物实验。

取生长良好的 P₃ 代细胞, 加入胰蛋白酶消化, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入荧光标记抗体, 4 孵育 30 min, PBS 洗去未标记抗体, 1% 多聚甲醛固定 15 min, 应用流式细胞仪检测细胞表面抗原标记 CD11b/c, CD29, CD44H, CD45, CD90.1。

取生长良好且已长满瓶底的 P₃ 代细胞 (细胞总量为 1 × 10⁷ 个), 加入胰蛋白酶消化, 600 ×g 离心 5 min 后, 用 PBS 洗涤一次, 再 600 ×g 离心 10 min, 用移液枪将 PBS 吸除干净 (剩余量 < 25 mL), 加入 PKH26 细胞专用液体 0.5 mL, 制成细胞悬液, 迅速加入预先已准备好的已加入 1 μL 荧光物质的 PKH26 细胞专用液体 0.5 mL 中, 混合孵育 4 min, 加入 1% 小牛血清蛋白 1 mL, 终止染色 1 min, 再加入完全培养液 2 mL, 600 ×g 离心 10 min, 去除上清, 加入完全培养液 10 mL 悬浮细胞, 更换新的离心管, 洗涤细胞共 3 次, 显微镜下观察染色效果。

1.3.2 大鼠心肌缺血模型的制备 18 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为实验组和对照组, 每组 9 只动物。在手术的前晚禁食, 但可自由进水。手术当天按 45 mg/kg 给予腹腔内注射喷妥巴比妥麻醉。将手术及电击部位的毛剃干净。用 14 g 的穿刺针套管作为气管导管插入, 用线固定于嘴部皮肤, 防止脱出。置一呼气末 CO₂ 探测导管于气管导管和呼吸机导管之间, 用红外线 CO₂ 分析仪监测呼气末 CO₂ 分压 (P_{ET}CO₂)。调整呼吸机至工作状态, 潮气量为 6.5 mL/kg, 呼吸频率为 100 次/分, FiO₂ = 0.21。使用非侵入性经胸壁超声心动图测量基础心功能后开始机械通气。从左侧第 4 肋间打开胸腔, 暴露心脏。用镊子撕开心包膜, 清楚暴露左前

降支冠状动脉。用带 5/0 细尼龙丝线的小圆针缝扎左前降支冠状动脉 (left anterior descending coronary artery, LAD)。关胸前放入一细塑料软管,便于关胸后引流和吸取气体和渗出的血液。LAD 缝扎成功的标记是肢体心电图 ST 段明显抬高, QRS 波宽大畸形。关胸后继续机械通气并严密观察 EKG 和 CO₂ 波形 1 h, 如有 VF 发生, 立即使用 2 焦的电能量电击除颤, 直到心电图转复为窦性心率为止。1 h 后停止机械通气, 拔除引流管, 按 160 mg/kg 肌肉内注射抗菌素头孢唑啉及止痛药 Ketorolac 0.4 mg/kg。动物苏醒后拔除气管导管, 放回笼内继续喂养。

1.4 实验过程

动物模型制备成功 4 周后, 动物重新麻醉。行气管插管并监测 P_{ET}CO₂。用无创超声心动图检查结扎 LAD 的心功能。随后该动物进行第 2 次开胸手术接受 PKH26 标记的 5 × 10⁶/0.1 mL MSC 或等量的 PBS 从梗死心肌局部注射。放置引流软管、关胸、注射抗菌素及止痛药均与模型制备阶段相同。

注射 MSC 或 PBS 4 周后, 动物被再次麻醉。行气管插管并 P_{ET}CO₂。游离右颈动脉, 用 PE-50 塑料导管插入到达左心室内, 利用高敏感性的压力传感器, 用于测量左心室舒张末期压 (LVDP)、左心室收缩压力上升到 40 mmHg 时的上升速率 (dP/dt₄₀) 和左心室舒张末期压 (-dP/dt)。游离右颈外静脉, 用型号为 4-F 塑料导管插入, 通过上腔静脉到达右心房, 一根尖端导电的绝缘电极由该套管插入, 直到由该电极所引出的心内膜心电图被记录, 说明该导线已接触到了右心室心内膜, 该电极用于诱导 VF 的发生。游离左颈外静脉, 用 PE-50 塑料导管插入, 通过上腔静脉到达右心房, 利用同样高敏感性的传感器测量右房压 (right atrium pressure, RA)。游离右股动脉, 用一根带温度微探针的长 10 cm 直径 0.5 mm 导管 (型号 9030-12-D-34, 美国 Columbus Instruments 公司) 插入, 到达胸主动脉监测和记录中心体温, 亦用于测量心脏指数。测量心脏指数, 每一次用 0.2 mL 温度介于 8~12 的生理盐水, 从该导管注入。心脏指数由专用的计算机及软件计算并记录 (型号 CO-100, 美国 Critical care medicine 研究所)。游离左股动脉, 用 PE-50 塑料导管插入, 到达胸主动脉, 利用同样高敏感性的传感器测量主动脉压。游离左股静脉, 用

PE-50 塑料导管插入, 到达下腔静脉, 用于静脉血的抽取和回输血液。肢体导联心电图及 P_{ET}CO₂ 由 CODAS 计算机软件连续纪录。在整个实验过程中, 用电热灯泡控制动物的体温在 36.8 (±0.2%)。

当上述手术过程完成以后, 所有的基本参数包括: 射血分数 (ejection fraction, EF), 心脏指数 (cardiac index, CI), 心律 (heart rate, HR), 平均动脉压 (mean artery pressure, MAP), P_{ET}CO₂, RA, LVDP 均采集完毕。诱发 VF 之前 15 min, 开始机械通气, FiO₂ 为 0.21, 室颤之前 5 min, 采集动静脉血液标本用于血气分析。通过右心室心内膜电极, 用 60 Hz 频率电流最大达到 4 mA 的电流诱发室颤。电流必须维持 3 min, 以防止大鼠自动转复为窦性心律。在诱发室颤成功后停止机械通气。在维持总共 6 min 的室颤后, 开始进行 6 min 的胸外按压。在胸外按压开始后, 恢复同步机械通气, 胸外按压的频率为 200 次/分, 机械通气的频率为 100 次/分, 按压与通气的比例为 2:1。调整 FiO₂ 至 1.0。最理想的按压深度为维持冠状动脉灌注压在 25 ± 2 mmHg。经过 6 min 的机械通气和胸外按压, 开始总共 3 个循环, 每个循环 3 次, 每次 2 焦的体外电击除颤。每个循环的间期, 继续胸外按压 30 s, 直到下一个循环或恢复窦性心律为止。自主循环恢复的标志为: 有节律心律的恢复和主动脉平均动脉压维持在 60 mmHg 以上至少 5 min。

恢复自主循环以后继续观察 4 h, 并连续采集所有的参数 (CI, HR, MAP, P_{ET}CO₂, RA, LVDP)。4 h 后停止机械通气, 拔除所有的导管, 并缝合皮肤, 碘酒酒精消毒伤口。动物稍清醒后, 拔除气管插管。注射抗菌素及止痛药均与模型制备阶段相同。实验过程结束后, 连续观察总共 3 d, 3 d 内死亡的动物, 立即开胸摘取整个心脏, 3 d 内存活的动物,

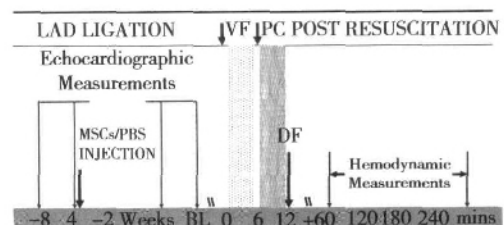


图 1 实验过程

Fig.1 Experimental protocol

LAD: left anterior descending coronary; VF: ventricular fibrillation; PC: precordial compression; DF: defibrillation; BL: baseline; MSC: mesenchymal stem cell; PBS: phosphate buffer solution

在观察期满 3 d 之后, 用过量的喷妥巴比妥腹腔内注射致其死亡, 同样立即开胸摘取整个心脏。所有心脏标本立即放入液氮中冷冻保存用于病理切片。整个实验过程见图 1。

1.5 观察指标

1.5.1 超声心动图 每个动物在结扎 LAD 前(基础值), 结扎 LAD 4 周后(注射 MSC 或 PBS 前)、注射 MSC 或 PBS 后 2 周及 4 周共 4 个时间点采集数据。

1.5.2 血液动力学指标的监测 主动脉压、左心室压、心电图、 $P_{Et}CO_2$ 被连续记录。DP/dt₄₀ 和 -dp/dt 由 CODAS 配套的统计学软件计算得出。血气标本在 VF 前, CPR 后 60 min 及 240 min 采集共 3 次。因血气分析导致的失血量由健康大鼠补回。

1.5.3 细胞示踪 使用冰冻切片机 (Micron HM 500 OM) 对每个心脏的结扎梗死部位进行连续切片。切片的厚度为 5 μ m, 切片后立即放在荧光倒置显微镜下 (Olympus I \times 71) 观察并拍片。

1.7 统计分析

组间比较采用方差分析和 Scheffe's 多重比较。复苏成功率及 72 h 的生存率比较使用 χ^2 检验。平均值用均数 \pm 标准差。确定 $P < 0.05$ 差异有显著性意义。

2 结果

2.1 MSC 的鉴定及标记

流式细胞仪分析 P₃ 代培养细胞显示为高纯度的 MSC。超过 98% 的 MSC CD29、CD44H、CD90.1 为阳性, 而少于 6% 的细胞 CD11b/c、CD45 为阳性。极少量造血干细胞表面标记阳性的原因可能与所培养细胞含有极少量杂质细胞及流式细胞仪的检测偏差有关。PKH26 标记后, 超过 95% 的细胞被染色。

2.2 超声心动图结果

在结扎前, 2 组动物之间的 EF 没有显著性差异(表 1)。LAD 结扎后 4 周, 2 组动物的 EF 明显降低 (与结扎前的基础值相比 $P < 0.01$; 4 周时 2 组比较没有统计学差异)。MSC 与 PBS 治疗后 2 周 (67% \pm 4% vs 56% \pm 5%, $P=0.0001$) 及 4 周 (67% \pm 6% vs 53% \pm 13%, $P=0.002$), MSC 治疗组较治疗前比较及与对照组比较 EF 明显改善。

2.3 血液动力学结果

在 MSC 治疗之后 4 周诱发心跳骤停之前及

表 1 射血分数

	Pre MSC		Post MSC	
	Baseline	4 weeks	6 weeks	8 weeks
MSCs	0.74 \pm 0.03	0.56 \pm 0.08 ¹⁾	0.67 \pm 0.04 ^{3), 5)}	0.67 \pm 0.06 ^{4), 6)}
PBS	0.74 \pm 0.04	0.56 \pm 0.05 ²⁾	0.56 \pm 0.05	0.54 \pm 0.13

Values are means \pm SD

1) 4 weeks (MSC) vs Baseline (MSC); $F=34.7$, $P=0.000$; 2) 4 weeks (PBS) vs Baseline (PBS); $F=77.7$, $P=0.000$; 3) 6 weeks (MSC) vs 6 weeks (PBS), $F=25.3$, $P=0.000$; 4) 8 weeks (MSC) vs 8 weeks (PBS), $F=14.5$, $P=0.002$; 5) 6 weeks (MSC) vs 4 weeks (MSC), $F=12.3$, $P=0.003$; 6) 8 weeks (MSC) vs 4 weeks (MSC), $F=9.8$, $P=0.004$

CPR 之后, 2 组的 MAP、HR、 $P_{Et}CO_2$ 以及血气分析的结果均没有显著差别。在 CPR 之前, MSC 治疗组其 CI, dp/dt₄₀, -dp/dt, LVDP 与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$); 在恢复自主循环以后的 4 h 内 (60、120、180、240 min), MSC 组 CI、dp/dt₄₀、-dp/dt、LVDP 与对照组相比依然有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 2)。

2.4 组间生存时间的比较

CPR 后 2 组自主循环恢复的比率没有明显差

表 2 CPR 前后 CI、dp/dt₄₀、-dp/dt、LVDP 的变化

Table 2 Effects of intervention on CI, dp/dt₄₀, -dp/dt, LVDP before onset of cardiac arrest and after resuscitation

	BL	60 min	120 min	180 min	240 min
CI					
MSCs	341 \pm 29	332 \pm 62	292 \pm 43	310 \pm 76	316 \pm 71
PBS	296 \pm 45	277 \pm 80	255 \pm 45	238 \pm 86	229 \pm 51
F	13.4	4.7	5.3	5.4	7.3
P	0.003	0.049	0.038	0.038	0.018
Dp/dt ₄₀					
MSCs	7116 \pm 485	5123 \pm 491	5370 \pm 680	5272 \pm 702	5107 \pm 692
PBS	6194 \pm 473	4694 \pm 476	4614 \pm 228	4476 \pm 325	4271 \pm 278
F	13.8	4.8	7.8	7.5	8.9
P	0.003	0.048	0.015	0.017	0.011
-dp/dt					
MSCs	7423 \pm 634	5070 \pm 596	5142 \pm 790	4915 \pm 650	5107 \pm 692
PBS	6290 \pm 696	4514 \pm 350	4383 \pm 894	4069 \pm 532	4003 \pm 351
F	12.7	4.7	5.3	7.6	5.5
P	0.003	0.049	0.039	0.016	0.035
Lvdp					
MSCs	1.5 \pm 0.7	2.0 \pm 1.1	3.7 \pm 2.2	4.9 \pm 3.5	5.5 \pm 2.9
PBS	4.1 \pm 1.4	5.3 \pm 3.3	6.1 \pm 1.8	9.8 \pm 3.4	10.1 \pm 3.6
F	22.4	7.0	5.1	7.5	7.4
P	0.000	0.02	0.042	0.017	0.018

异(表3)。虽然 MSC 治疗组其电击复律的次数要比对照组要少, 但还没有达到统计学差异的程度。但 CPR 后 72 h 生存时间, MSC 治疗组与其对照组相比有统计学差异。达 72 h 生存的动物数目, MSC 治疗组要比对照组多, 但也没有统计学差异。

表3 两组自主循环恢复数量、72 h 生存数量、电击除颤次数、生存时间

Table 3 Number of ROSC, 72 survival, number of defibrillations and duration of survival $\bar{x} \pm s$

	ROSC	Survive to 72	Number of shocks	Duration of survival (h)
Placebo	7/9	1/7	3.9 \pm 2.3	26.1 \pm 1.6
MSC	8/9	4/8	2.0 \pm 1.1	58.6 \pm 20.6
²	0.04	1.11	-	-
P value	0.85	0.29	0.08	0.011

ROSC, return of spontaneous circulation

2.5 病理结果

病理切片的结果显示心肌内大量存在 PKH26 标记的 MSC(图2)。

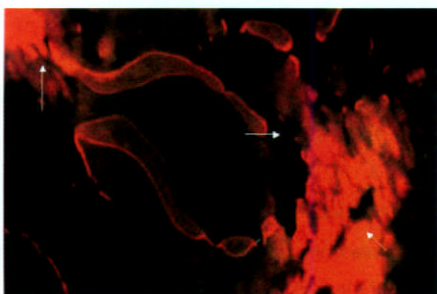


图2 PKH26 红色荧光标记的 MSC 在心肌组织中

Fig.2 PKH26 Labeled MSC in the harvested heart($\times 40$)

3 讨论

在临床实际, 绝大多数心跳骤停和心肺复苏的病例均存在有缺血性心脏病^[6]。为了更接近临床心跳骤停和心肺复苏实际的情况, 在我们的这个研究中, 首先开胸结扎大鼠的左前降支冠状动脉诱导心肌缺血。4 周后通过 B 超确认左心室功能已降低, 所有的动物均随即分组接受 MSC 或 PBS 注射。注射后 2 周及 4 周, 所有 MSC 注射的动物其射血分数均明显得到改善。MSC 注射组的血流动力学参数包括: CI, dp/dt40, -dp/dt, LVDP, 在心跳骤停前及 CPR 后的 4 h 内与 PBS 注射组比较有显著性差异。MSC 注射组 CPR 后生存时间与

PBS 注射组相比较有显著性差异。

3.1 选择有基础心血管疾病的动物作为心跳骤停及 CPR 模型的重要性

本研究与之前所有的心肺复苏研究的区别在于, 纵观所有发表的 CPR 文章中, 所使用的基本都是健康的动物, 这与临床的实际情况有很大的区别^[6]。第 2 个不同点在于 CPR 研究的重点在于 CPR 后药物的选择及改善血流动力学设备的改进上^[3]。CPR 学界已经意识到这些问题的存在, 并开始在这方面进行探索。Fang 等人^[9]的研究就使用了左冠状动脉结扎模型诱发心力衰竭后的动物进行心跳骤停及心肺复苏的研究, 本研究就是在此基础上, 对有基础疾病的动物进行干预, 观察其能否改进 CPR 的效果。这为 CPR 的研究提供了一些有益的思路, 使之更贴近临床的实际情况。

3.2 治疗心血管疾病所致心肌细胞凋亡和死亡的理想“种子”细胞

近年来心血管疾病的治疗进展非常迅速, 包括受体阻滞剂及血管转换酶抑制剂的使用, 冠状动脉搭桥术、血管内支架等手术和介入技术的应用, 心血管疾病的患者的平均寿命有所延长、死亡率有所降低, 但仍然有超过 50% 的病人在初次诊断为心力衰竭后的 5 年内死亡^[6]。而引起如此高死亡率的根本原因在于有收缩功能的心肌细胞大量丧失^[7]。虽然心脏本身具有一定的修复能力, 包括体内心肌干细胞的动员和向心肌细胞演变^[8], 心肌细胞本身的肥大, 但仍然抵消不了心肌细胞大量丢失所导致的心功能下降。死亡的心肌区域被没有收缩功能的纤维瘢痕组织所取代。而 MSC 能在体外和体内演变为心肌细胞, 取代因各种原因而死亡的宿主心肌细胞, 因而 MSC 作为一种新的治疗手段, 正逐渐被用于心血管疾病治疗^[9]。

大量实验的和临床的研究证实, MSC 移植能改善缺血性心脏病的心功能^[10]。在 Perin 的研究^[10]中注射 MSC 2 周后其心脏的电及机械功能有显著的改善。在另一个研究中, MSC 注射能增加毛细血管的密度和改善收缩功能。

3.3 MSC 改善心功能及 CPR 后血流动力学结果及生存时间的可能机制

MSC 改善心功能及 CPR 结果的可能机制包括: 移植的 MSC 能在体内演变为心肌细胞, 从而取代因各种原因而死亡的心肌细胞, 从而恢复心功能。在一个关于 MSC 移植的研究中, MSC 移植后 4

周, 所移植的 MSC 已经有心肌细胞的特异性抗原表达, 心肌肌钙蛋白 T 及肌间线蛋白阳性。尤其是所移植的 MSC 能表达连接蛋白-43, 一种能促进心肌细胞闰盘连接的一种蛋白质^[11]。故心功能的改善极有可能是 MSC 分化为心肌细胞的结果。MSC 移植能促进心脏新生血管的形成^[12]。MSC 既能分化为内皮细胞, 也能分化为平滑肌细胞, 而这两种细胞却是血管的主要组成成分。新生血管的形成是一个重要过程。由于血管的形成, 能增加心肌血流的灌注, 挽救因局部缺血而处于冬眠的心肌细胞, 从而减轻心室的扩张及改善心功能。MSC 移植保护和恢复细胞外基质的完整性。由于支持心肌细胞的细胞外基质的损坏, 导致了心室的扩张^[13]。有强烈的证据支持移植的 MSC 能分泌一些基质成分修复受损伤的宿主细胞外基质, 从而恢复宿主心肌细胞的结构支撑, 限制梗死区域的扩大和改善梗死局部的收缩功能^[14]。旁分泌作用在 MSC 移植过程中可能起着非常重要的作用。MSC 移植后能分泌大量的生长因子, 细胞活素、化学趋化因子及其它的蛋白质。干细胞所分泌的这些蛋白质类物质对组织的修复具有不可估量的作用^[1]。最新的研究显示, MSC 至少分泌 34 种蛋白质, 其中有 9 种蛋白质在 5-杂氮胞苷的诱导下发生了明显的变化^[15]。

尽管本研究中 MSC 注射组的复苏成功率比 PBS 对照组的复苏成功率要高, 电击复律的次数比 PBS 对照组要低, 但均没有统计学差异。其中的原因可能是结扎 LAD 后 2 个月可能还没有造成严重的心力衰竭; 同时, 心室颤动维持 6 min, 以及 CPR 持续 6 min, 可能还不足以造成非常严重的打击。但复苏后的 72 h 生存时间 MSC 治疗组与 PBS 对照组相比有显著性差异。这与我们预先的设想相吻合。

最后, 部分研究者报道应用干移植后, 会发生心律失常等并发症^[10, 16]; 但我们在整个研究过程中未发现有任何不良反应。

我们的研究结果提示: MSC 移植不仅改善了心肌梗死后的心功能, 而且改善了 CPR 前后的血液动力学结果及延长了 CPR 后的生存时间, 因而 MSC 可能成为心肌梗死治疗的潜在的重要治疗措施之一。

参考文献:

[1] PERIN E C. The use of stem cell therapy for cardiovascular disease [J]. *Tex Heart Inst J*, 2005, 32(3): 390-392.

- [2] WOLLERT K C, DREXLER H. Clinical applications of stem cells for the heart [J]. *Circ Res*, 2005, 96(2): 151-163.
- [3] WEIL M H, SUN S. Clinical review. Devices and drugs for cardiopulmonary resuscitation -- opportunities and restraints [J]. *Crit Care*, 2005, 9 (3): 287-290.
- [4] EWY G A, KERN K B, SANDERS A B, et al. Cardiocerebral resuscitation for cardiac arrest [J]. *Am J Med*, 2006, 119 (1): 6-9.
- [5] FANG X, TANG W, SUN S, et al. Cardiopulmonary resuscitation in a rat model of chronic myocardial ischemia [J]. *J Appl Physiol*, 2006, 101(4): 1091-1096.
- [6] BELTRAMI A P, URBANEK K, KAJSTURA J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(23): 1750-1757.
- [7] JAIN M, PFISTER O, HAJJAR R J, et al. Mesenchymal stem cells in the infarcted heart [J]. *Coronary Artery Dis*, 2005, 16(2): 93-97.
- [8] VAN VLIET P, SLUIJTER J P, DOEVENDANS P A, et al. Isolation and expansion of resident cardiac progenitor cells [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007, 5 (1): 33-43.
- [9] MINGUELL J J, ERICES A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006, 231(1): 39-49.
- [10] PERIN E C. Stem cell therapy for cardiovascular disease [J]. *Tex Heart Inst J*, 2006, 33(2): 204-208.
- [11] NAGAYA N, KANGAWA K, ITOH T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2005, 112(8): 1128-1135.
- [12] DAI W, HALE S L, MARTIN B J, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects [J]. *Circulation*, 2005, 112(2): 214-223.
- [13] FEDAK P W, SZMITKO P E, WEISEL R D, et al. Cell transplantation preserves matrix homeostasis: a novel paracrine mechanism [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 130 (5): 1430-1439.
- [14] SAM J, ANGOULVANT D, FAZEL S, et al. Heart cell implantation after myocardial infarction [J]. *Coron Artery Dis*, 2005, 16(2): 85-91.
- [15] YE N S, CHEN J, LUO G A. Proteomic profiling of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine [J]. *Stem Cells Dev*, 2006, 15(5): 665-676.
- [16] 韦育林, 伍卫, 王景峰, 等. 骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌细胞及其内向整流钾电流特征 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(4): 396-399.

(编辑 孙慧兰)