

# 自体骨髓单个核细胞心肌移植治疗猪慢性缺血性心脏病的实验研究

祝曙光<sup>1</sup>, 熊利华<sup>1</sup>, 谢鸿发<sup>2</sup>, 萧颂华<sup>2</sup>, 华平<sup>1</sup>, 廖洪映<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第二医院胸心外科, 广东 广州 510120; 2. 香港大学心血管疾病研究所)

**摘要:**【目的】探讨自体骨髓单个核细胞心肌移植对猪慢性缺血心肌心功能的改善和促进血管新生的作用。【方法】小型猪左侧开胸在左冠状动脉回旋支起始部放置 Ameroid 环, 4 周后进行心脏超声波检测、冠状动脉造影和自体骨髓单个核细胞心肌移植, 移植后 4 周进行心脏超声波检测, 免疫组化计数血管密度。【结果】17 只猪中有 16 只猪术后存活 8 周以上, 活体冠状动脉造影显示左冠状动脉回旋支均闭塞。自体骨髓单个核细胞心肌移植组比对照组心功能有显著改善 ( $P < 0.05$ ), 移植组的血管数密度显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。【结论】自体骨髓单个核细胞心肌移植可改善慢性缺血心肌的心功能, 其机理之一是通过改善缺血心肌的血供来实现。

关键词: 骨髓单个核细胞; 细胞移植; 血管密度; 心脏功能

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0293-04

## Improvement of Cardiac Function and Promotion of Angiogenesis after Transplantation of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells to Chronic Ischemic Myocardium in Swine

ZHU Shu-guang<sup>1</sup>, XIONG Li-hua<sup>1</sup>, XIE Hong-fa<sup>2</sup>, XIAO Song-hua<sup>2</sup>, HUA Ping<sup>1</sup>, LIAO Hong-ying<sup>1</sup>

(1. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. The Institute of Cardiovascular Science, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the angiogenic effect and cardiac function improvement after intramyocardial transplantation of the autologous bone marrow mononuclear cells to chronic ischemic myocardium in swine.【Method】Experimental swines underwent thoracotomy and placement of an Ameroid constrictor on the left circumflex branch of coronary artery. Four weeks later, cardiac function was examined by echocardiography, coronary arteriography was completed and autologous bone marrow mononuclear cells was administrated directly into the myocardium in the circumflex branch distribution area. Another four weeks later, cardiac function was examined by echocardiography. The number of microvessel was also counted.【Result】Among 17 operated swines, 16 swines survived more than 8 weeks. Complete occlusion of left circumflex coronary artery were observed in 16 swines by coronary arteriography. The results showed significant improvement of myocardial function and significant high number of microvessel in intramyocardial transplantation animals compared with control group ( $P < 0.05$ ).【Conclusion】Transplantation of the bone marrow mononuclear cells to chronic ischemic myocardium could improve cardiac function and promote myocardial angiogenesis.

Key words: bone marrow mononuclear cells; cell transplantation; vessel density; cardiac function

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):293-296]

缺血性心脏病(IHD)内科治疗效果差,死亡率  
高<sup>[1]</sup>。目前主要治疗方法有冠状动脉旁路移植术

(CABG)、经皮球囊血管扩张术(PTCA)等,虽然取  
得了一定的效果,但仍然存在术后血管的堵塞、再

收稿日期: 2005-10-25

基金项目: 卫生部科研基金资助项目(981093)

作者简介: 祝曙光(1965-)安徽安庆人, 博士生, 副主任医师; 熊利华, 教授, 博士生导师. E-mail: Lihua211@sina.com

狭窄等问题,并且部分病人因冠状动脉弥漫性狭窄不宜做此类手术或因心功能差无法耐受手术。细胞移植为缺血性心脏病心肌梗死的治疗开辟了一条新的途径。骨髓单个核细胞中的造血干细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞、中胚层来源的细胞等分别参与心肌细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和血管的新生,鉴于目前用何种细胞适合进行移植及其相关机理的问题仍未解决,争议很大<sup>[2,3]</sup>,本文拟用猪自体骨髓单个核细胞进行心肌移植,以研究其对猪慢性缺血心肌心功能的影响并探讨其相关机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 慢性心肌缺血动物模型的建立

健康巴马小型猪(miniswine), 17只(购自广东省肇庆市实验动物科技发展中心), 体质量 30~35 kg, 雌性, 首先肌肉注射麻醉药舒泰(zoletil 9 mg/kg)和赛拉嗪(xylazine 1.5 mg/kg)、阿托品 2 mg 进入基础麻醉, 经口行气管插管, 猪右侧卧位, 按文献[4,7]方法并作改进在左冠状动脉的回旋支起始部套入直径 2.5 mm 的 Ameroid 环(Research Instruments NW, 美国)。术后常规使用长效抗生素土霉素(terramycine/LA) 20 mg/kg, 5 d 肌肉注射 1 次, 术后 4 周进行心脏彩超检查和在 C 型臂 X 线机下(Bv-300PHILIPS, 荷兰)行冠状动脉造影, 并在荧光屏上观察左回旋支是否闭塞以判断动物模型是否成功, 然后, 在 Noga 标测系统(以导管为基础的电-机械标测系统)(Gohuson Company, 美国)的引导下对心肌缺血部位注射自体骨髓单个核细胞或生理盐水。

### 1.2 实验动物分组

第 2 次手术前将存活的 16 只巴马小型猪用随机数字表简单随机方法随机分成 2 组, 自体骨髓单个核细胞移植组 9 只, 对照组 7 只。猪按上述方法麻醉及气管插管, 并肝素化(80 U/kg), 腹股沟区消毒铺巾, 分离解剖出股动脉, 远端结扎, 近端插入 8F 带血管阀导管鞘(Cardis, Gohuson Company, 美国), 由导管鞘置入 7F 的指引导管和 0.038 英寸导丝(Cordis Corporation, 美国), 在 C 型臂 X 线机引导下将导管置于左冠状动脉窦口进行造影。由导管鞘置入心肌定位注射导管(Biosense webster), 在 Noga 标测系统的指导下在缺血心肌与正常心肌交界部位注射自体骨髓单个核细胞或

生理盐水。每只共注射 15 个点, 移植组: 9 只猪注射自体骨髓单个核细胞, 每只猪注射细胞总数为  $1.5 \times 10^8$  的细胞悬液 1.5 mL, 每个点注射 0.10 mL。对照组按照同样的方法注射同量生理盐水。

### 1.3 小型猪骨髓单个核细胞的分离、纯化

于骨髓单个核细胞移植手术前 1 d 下午从猪的髂骨取得骨髓 60 mL, 肝素抗凝, 用 Ficoll 淋巴细胞分离液(Sigma, 美国)用密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞, 放入 DMEM 培养液中, 存放于 37℃, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱。次日(手术日), 生理盐水漂洗细胞 3 次, 并将细胞悬液计数调为  $10^8$ /mL, 骨髓单个核细胞的台盼蓝拒染率中位数 95% (88%~98%), 表明经分离纯化后大部分细胞的活性不受影响。

### 1.4 心脏超声波检测

两组小型猪在接受移植治疗前、移植治疗后 1 个月左右分别进行心脏超声波检测, 肌注 zoletil 9 mg/kg 和 xylazine 1.5 mg/kg, 左侧卧位, 探头置于右侧胸骨旁和剑突下观察进行心脏彩色超声波检查(CFM800-CVIS, VINGMED, 挪威)。检测指标: 心脏收缩功能: 局部室壁收缩速度和幅度、短轴缩短率(fractional shortening, FS)、射血分数(ejection fraction, EF)、节段性室壁收缩期增厚率(regional systolic wall thickening, RSWT), 心脏舒张功能: 二尖瓣 Ev/Av(即二尖瓣舒张早期峰值速度与心房收缩期峰值速度之比)。各项指标进行治疗前后差值的比较。同时观察有无二尖瓣关闭不全、心包积液等。

### 1.5 缺血区心肌切片血管数密度的检测

内皮细胞标志物凝血因子免疫组化染色(兔抗人因子抗体, DAKO, 美国), 显示缺血区心肌组织中血管增生的情况。每只动物心脏组织取 10 张切片, 每张切片随机取 3 个 200 倍视野进行血管计数, 30 个视野的平均血管数作为血管数目, 即血管数密度( $n_{30}$ )。

### 1.6 统计学处理

用 SPSS (12.0) 统计软件对资料进行统计分析。所有计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间的比较采用非配对独立样本 t 检验, 检验水准,  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

17 只小型猪中有 16 只猪存活超过 4 周, 另 1

只猪因肺部感染咳嗽、发热、进食差于术后 21 d 死亡。该动物不包括在统计资料中。

### 2.1 冠状动脉造影

第 1 次手术后 1 个月左右行冠状动脉造影,结果显示左冠状动脉回旋支均闭塞,左前降支通畅(图 1)。

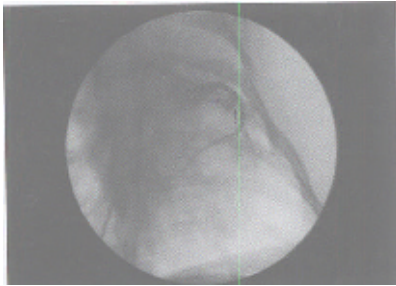


图 1 冠状动脉造影

Fig.1 Coronary arteriography

The arrow above indicated Ameroid constrictor; The arrow below indicated Lcx which could not be seen because of occlusion

### 2.2 心脏超声波检测

心脏超声波检测显示,除心包内有少量积液,均无明显的二尖瓣关闭不全。心脏 M 型超声检查显示移植组左室侧后壁运动较对照组明显增强,二维超声心动图检测显示移植组较对照组室壁明显增厚、运动度增强、心内膜回声也减弱。移植组较对照组的心功能有明显改善。将移植组和对照组移植治疗后超声波检测各指标的数值减去治疗前各指标的数值,然后将所得的差值进行统计分析(表 1)。

表 1 两组动物心脏超声检测各指标治疗前后差值的比较  
Table 1 Difference of figure of respective cardiac functional index between after and before administration

Detection index	Transplantation	Control
l /cm	0.286 ±0.145	0.001 ±0.001
v / cm·s <sup>-1</sup>	0.913 ±0.462	0.004 ±0.005
FS / ( % )	7.200 ±6.056	0.057 ±0.079
EF / ( % )	8.867 ±3.729	0.057 ±0.079
RSWT / ( % )	5.54 ±2.754	0.043 ±0.079
Ev / Av	0.182 ±0.101	0.007 ±0.010

l (motion amplitude of systolic phase of posterior left ventricular wall)/cm; v(motion speed of systolic phase of posterior left ventricular wall)/(cm/s); FS: fractional shortening; EF: ejection fraction; RSWT: regional systolic wall thickening; Ev: peak flow velocity in early diastole; Av: peakflow velocity during atrial systole.

Compare between transplantation group and control group, P < 0.05

### 2.3 病理学检测

病理学改变: 光镜下观察见心肌组织小灶状或片状空泡变性、部分肌纤维溶解,少许炎症细胞浸润等改变,但两组炎症反应差别不明显,心肌间质散在的小灶纤维组织增生以对照组多见。缺血区心肌切片血管数密度检测结果: 血管内皮细胞因子免疫组化染色呈棕黄色,从而显示血管。在 200 倍视野进行血管计数,结果显示移植组血管数密度( $n_{30}=27.89 \pm 6.05$ ),显著高于对照组血管数密度( $n_{30}=18.71 \pm 4.75$ ,  $P=0.005$ ) (图 2)。

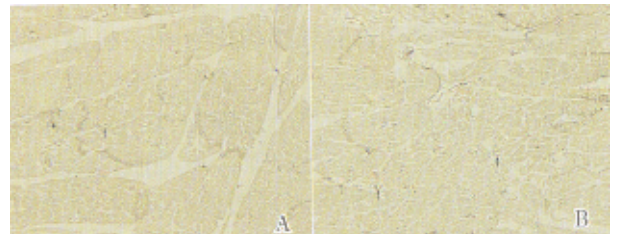


图 2 因子免疫组化染色

Fig.2 Immunohistochemical observation on agent staining( x200)

A:Vessel density is relatively low; B:Vessel density is relatively high

## 3 讨论

骨髓是各种特定组织前体干细胞和内皮祖细胞的存储器官,骨髓干细胞动员进入外周血液,促进组织血液重建,恢复冬眠心肌,改善心功能。骨髓单个核细胞中包含造血干细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞、中胚层来源的细胞等,这些成分分别参与心肌细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和血管的新生,目前究竟那种类型的细胞最合适进行缺血性心肌病变的细胞移植仍在争议之中<sup>[2,3]</sup>。自体骨髓单个核细胞取材容易,以骨髓穿刺法即可取得足够数量的细胞,不需要进行体外扩增。同时有实验证明体外扩增的造血干细胞、内皮祖细胞的归巢能力明显下降<sup>[4]</sup>。因骨髓单个核细胞的各种细胞成分均参与心肌和血管的再生,所以,本研究采用骨髓单个核细胞作为整体进行移植,而不是移植其中的一个亚群,从理论上讲有一定的优势。

本研究选择猪作为实验动物,是因为小型猪的心脏除灵长类以外与人类最为接近,选择 Ameroid 环逐渐缩窄左回旋支建立慢性心肌缺血模型,被认为是迄今为止最好地模拟人类冠状动

脉阻塞性疾病的模型<sup>[6]</sup>。Ameroid 环,呈戒指状,外层为金属,内层有效成分为酪蛋白衍生物,在体内吸收水分后,只能均匀地向内收缩,导致血管进行性狭窄甚至完全闭塞,一般需要 2~4 周时间<sup>[4,7]</sup>。本实验在放环 4 周后经冠状动脉血管造影证实左冠状动脉回旋支均闭塞。

心肌在缺血后即可出现左室扩张,缺血局段性运动障碍,缺血区域膨展,左室舒张功能不全,左室收缩功能降低。心功能上表现为心输出量下降,心射血分数下降,二尖瓣  $E_v/A_v$  下降等,左室扩张是心血管死亡率的预测因素,经常被用于实验性治疗是否有效的观察指标<sup>[8]</sup>。电-机械标测系统已被证实能对缺血区域心肌进行定位标测<sup>[9]</sup>。本研究采用猪自体骨髓单个核细胞,在电-机械标测系统标测下经导管进行缺血区域心肌内注射移植细胞,经胸多普勒超声心动图研究发现,左室舒张收缩功能不全有明显的改善,缺血心脏在接受自体骨髓单个核细胞移植后心室超声波显示短轴扩张减轻、局部室壁收缩速度增快、收缩幅度增大、射血分数 EF 和节段性室壁收缩期增厚率增大,移植细胞 1 个月后心脏收缩功能明显改善。

骨髓单个核细胞注射于缺血心肌后,缺血心肌区的血管数密度显著升高,可能与以下因素有关:促进宿主本来就存在的血管系统增殖;骨髓干细胞分化为新生血管内皮细胞和血管平滑肌细胞,直接形成新生血管来供应缺血的心肌<sup>[10]</sup>;移植细胞分泌促进血管生长的细胞因子如血管内皮生长因子(VEGF)等,促进侧枝循环的建立<sup>[11]</sup>。

通过血管新生和本来就存在的血管系统增殖改善局部缺血心肌的血供,有利于缺血区冬眠心肌和顿抑心肌的复苏,提高了冬眠和顿抑心肌功能。另外单个核细胞中的骨髓基质干细胞可能在心脏局部微环境诱导下,分化为心肌细胞,减少了梗死区有功能心肌细胞的下降程度,起到心肌梗死的修复作用,从而使心功能得到改善。

本实验证实骨髓单个核细胞心肌移植对猪慢性缺血心肌心功能有明显改善作用,并能增加心肌缺血区的血管数密度,改善心肌血供,为缺血性心脏病的骨髓干细胞治疗提供了实验依据。

参考文献:

[1] ABBOTT J D, GIORDANO F J. Stem cells and

cardiovascular disease[J]. *J Nucl Cardio*, 2003, 10(4): 403- 412.

- [2] GRIGOROPOULOS N F, Mathur A. Stem cells in cardiac repair[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 14( 6):1-7.
- [3] ROSENSTRAUCH D, POGLAJEN G, ZIDAR N, et al. Stem cell therapy for ischemic heart failure [J]. *Tex Heart Inst J*, 2005, 32(3):339- 347.
- [4] LAGUEN R, MECKERT C P, JANAVEL V G, et al Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid - mediated rhVEGF165 gene transfer[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(24):1676- 1681
- [5] SZILVASSY S J, BASS M J, VANZANT G, et al. Organ - selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by ex vivo expansion[J]. *Blood*, 1999, 93(5):1557- 1566.
- [6] NISHIDA T, SHIMOKAWA H, OI K, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia - induced myocardial dysfunction in pigs in vivo [J]. *Circulation*, 2004, 110 (19): 3055- 3061.
- [7] LAHAM R J, REZAEI M, POST M, et al. Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor - 2 induces neovascularization in porcine model of chronic myocardial ischemia [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292(2):795- 802.
- [8] RIEGGER G A, BOUZO H, PETR P, et al. Improvement in exercise tolerance and symptoms of congestive heart failure during treatment with candesartan cilexetil: Symptom, Tolerability, Response to exercise trial candesartan cilexetil in heart failure (STRETCH) investigators[J]. *Circulation*, 1999, 100(22): 2224- 2230.
- [9] KAWAMOTO A, TKEBUCHAVA T, YAMAGUCHI J I, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2003, 107(3):461- 468.
- [10] CAPLICE N M. The future of cell therapy for acute myocardial infarction [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006, 3 Suppl 1(S1): S129- S132.
- [11] FUKUDA K. Progress in myocardial regeneration and cell transplantation[J]. *Circ J*, 2005, 69(12):1431- 1446.

(编辑 张敏瑞)