

人脐血单个核细胞移植对大鼠急性心肌梗死后 血管再生的作用

胡承恒, 杨燕华, 王小庆, 伍贵富, 杜志民, 何小洪
(中山大学附属第一医院心内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨人脐血单个核细胞移植对急性心肌梗死后血管再生的作用。【方法】雄性 Wistar 大鼠 60 只随机分为对照组(心肌梗死)和移植组(心肌梗死+细胞移植)各 30 只。结扎冠状动脉左前降支制作大鼠急性心肌梗死模型,以羟乙基淀粉沉淀加密度梯度离心的方法制备人脐血单个核细胞,并以 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)标记细胞。移植组大鼠模型制作成功后即在梗死区周边注射经分离并标记的人脐血单个核细胞混悬液($2 \times 10^5/\mu\text{L}$),在对照组相同位置注入等量达尔伯克必需培养基(DMEM)。移植 4 周后用左心导管检测血流动力学改变,并取心脏组织行抗第 Ⅲ 因子(vWF)和 BrdU 免疫组化染色,观察毛细血管密度、移植细胞成活情况。并分别在移植后第 4 天、第 7 天、第 14 天、第 28 天取梗死周边区组织作血管内皮生长因子(VEGF)RT-PCR 的半定量研究。【结果】移植组移植的单个核细胞可在梗死心肌内存活。移植组比对照组心功能明显改善,左心室舒张末压(LVEDP)明显降低(21.08 ± 8.10)mmHg vs (30.82 ± 9.59)mmHg, $P < 0.05$;左心室内压力最大上升速率($+dp/dt_{\text{max}}$)明显增快(4.29 ± 1.27)mmHg/ms vs (3.24 ± 0.75)mmHg/ms, $P < 0.05$;最大下降速率($-dp/dt_{\text{max}}$)亦显著提高(3.71 ± 0.79)mmHg/ms vs (3.00 ± 0.49)mmHg/ms, $P < 0.05$ 。移植组梗死区周边毛细血管数显著增加(5.7 ± 0.3)/HP vs (2.3 ± 0.4)/HP, $P < 0.01$ 。VEGF mRNA 表达在移植组于第 7 天明显增加,并持续至第 28 天,对照组于第 4 天及第 7 天可见少量表达,第 14 天与第 28 天明显减弱,两组差异有统计学意义($P < 0.01$)。【结论】人脐血干细胞在未使用免疫抑制剂的条件下可成功移植到大鼠急性心肌梗死区,改善急性心肌梗死大鼠心功能,促进新生血管形成。

关键词: 心肌梗死; 脐带血; 细胞移植; 血管内皮生长因子

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0391-05

Angiogenesis: Contribute to Acute Myocardial Infarction Rats Received Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells Transplantation

HU Cheng-heng, YANG Yan-hua, WANG Xiao-qing, WU Gui-fu, DU Zhi-min, HE Xiao-hong

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most potent angiogenic factor. This study aimed to elucidate the possible role of angiogenesis on the repair of myocardial infarction after human umbilical cord blood mononuclear cells transplantation. 【Methods】60 male Wistar rats were randomized into two groups: (1) control group (acute myocardial infarction, $n=30$), (2) transplantation group (acute myocardial infarction plus cell transplantation, $n=30$). Acute myocardial infarction model was established by ligating rats' left anterior descending artery. Thereafter $2 \times 10^5/\mu\text{L}$ human umbilical cord blood mononuclear cells were injected into the margin area of infarction immediately, while the control group were injected by vehicle. Assessment of left ventricular function was carried out by hemodynamic measurements 4 weeks post acute myocardial infarction, meanwhile the rats were sacrificed for immunohistochemistic examinations. The VEGF expression was assessed by RT-PCR at 4th, 7th, 14th and 28th days post-transplantation. 【Results】The transplanted human umbilical cord blood mononuclear cells survived. Compared with control group, the cell transplantation rats showed a significant reduction of left ventricular end-diastolic pressure (21.08 ± 8.10)mmHg vs (30.82 ± 9.59)mmHg ($P < 0.05$); and showed an increase of

收稿日期: 2006-02-13

基金项目: 广东省科技厅计划基金资助项目(2003C30603); 广东省自然科学基金资助项目(5001680)

作者简介: 胡承恒(1964-), 男, 湖南新田人, 硕士, 副教授, 硕士生导师. E-mail: huchenghengpcci@yahoo.com.cn

+dp/dt_{max}(4.29 ±1.27) mmHg/ms vs (3.24 ±0.75) mmHg/ms (P< 0.05) and - dp/dt_{max}(3.71 ±0.79) mmHg/ms vs (3.00 ±0.49) mmHg/ms, (P< 0.05), and showed a significant increase of microvessles within the boundary of infarcted myocardium (5.7 ±0.3)/HP vs (2.3 ±0.4)/HP(P< 0.01). The expression of VEGF was markedly higher from 7th days post-transplantation and maintained for 28 days in comparison with the control group (P< 0.01). 【Conclusions】 Human umbilical cord blood mononuclear cells transplantation without immunosuppressant can improve the heart function and promote angiogenesis in acute myocardial infarction rats.

Key words: myocardial infarction; cell transplantation; human umbilical cord blood; VEGF

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2006,27(4):391-395]

干细胞移植治疗急性心肌梗死的机制可能是:干细胞发育而来的肌纤维限制了心室壁变薄及瘢痕组织扩大,干细胞可分泌多种生长因子促进心肌修复和移植物的生长^[1]。干细胞移植后分化为类心肌细胞、类平滑肌细胞、类内皮细胞,共同促进血管再生,使一部分心肌得到存活,限制瘢痕组织扩大;干细胞移植后分化为心肌细胞,参与收缩功能,但以上机制尚未达成充分共识^[2]。本研究将探讨脐血干细胞移植后对心肌梗死周边区毛细血管增生的影响及心功能的改变。

1 材料和方法

1.1 人脐血单个核细胞提取和标记

30份脐血来自中山大学附属第一医院产科,产妇无各种妊娠并发症,无遗传性疾病家族史和血液系统疾病,HIV、乙肝、梅毒等检测阴性,新生儿足月分娩。采血量80~120 mL,6 h内分离。分离方法如下:在50 mL离心管内按5:1比例加入60 g/L羟乙基淀粉(贺斯),静置45 min后,取中间浑浊层,按2:1比例铺在1.077 g/L ficoll-paque分离液上,2000 g离心,吸取中间含单个核细胞的白膜层,PBS洗2次。取2 mL细胞悬液用流式细胞仪检测CD₃₄细胞含量,CD₃₄细胞是人脐血的原始细胞,能向多种成熟细胞分化,包括心肌细胞和毛细血管内皮细胞。移植前将细胞置于含10 μmol/L BrdU(美国Sigma公司)和100 mL/L胎牛血清的L-DMEM培养基(美国GIBCO公司)中,在37℃,饱和湿度和5%CO₂细胞培养箱孵育24 h。

1.2 动物模型制作和细胞移植

Wistar雄性大鼠60只,质量150~200 g,购自中山大学动物中心。大鼠随机分为2组,心肌梗死对照组和心肌梗死+细胞移植组,每组30只。两组均在气管插管后行开胸手术,以5-0手术缝线行左前降支近端结扎,成功标志为左室前壁颜色变

白和活动减弱。结扎成功后,移植组用微型注射器分3点将单个核细胞悬液注射到梗死区与正常心肌交界处,每点注射50 μL(含1×10⁷个细胞),对照组注射等量DMEM培养基。

1.3 心功能检查

细胞注射4周后,用戊巴比妥钠再次麻醉大鼠,经右侧颈动脉插入左心导管至左心室,与多导生理记录仪相连,记录左心室收缩压(LVSP),舒张末压(LVEDP),左室内压最大上升速率和下降速率(-dp/dt_{max}),并同步记录心电图。

1.4 毛细血管密度检测

对照组及移植组各取8只,每只大鼠取3张切片(4~5 μm),以抗vWF单克隆抗体行免疫组化染色,用Weidner法^[3]检测毛细血管密度:在光学显微镜低倍视野下(×4,×100)扫视整个组织切片,在梗死周边区域选取内皮细胞染色清晰、背景对比良好的视野。在上述指定视野范围内随机选取5个视野以200倍视野(0.72 mm²)计算所有染色的微血管数,取其平均值作为平均血管密度。染色的内皮细胞或内皮细胞簇只要与附近的微血管或其他结缔组织分开,就视为一个微血管,不考虑血管腔的有无作为判断血管的标准。

1.5 RT-PCR

取对照组和移植组各20只大鼠,于移植后第4天,第7天,第14天和第28天分别处死5只,取梗死周边区域组织100 mg作VEGF的RT-PCR半定量分析。100 mg心肌组织和1 mL Trizol (Invitrogen)充分匀浆至组织完全溶解,再按Trizol试剂盒中操作说明提取组织总RNA,并用分光光度计测RNA浓度及纯度。提取的RNA用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit逆转录。逆转录后的cDNA,用Taq DNA polymerase (Takara)进行PCR扩增。VEGF上游引物:5'-TGACCCACGACAGAAGGGGA-3',下游引物:5'-TCACCGCCTTGGCTTGTCACAT-3',用于扩增

VEGF₁₂₀ (360 bp)、VEGF₁₆₄ (492 bp) 和 VEGF₁₈₈ (564 bp)。内参基因为 β -actin, 上游引物: 5'-GTCACCAACTGGGACGAT-3', 下游引物: 5'-GAGGCATACAGGGACAACA-3', 用于扩增 209 bp PCR 产物。PCR 反应条件为: 94 °C 4 min 预变性, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共循环 30 次, 以避免 PCR 平台期。PCR 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外线凝胶成像系统上摄像, 并进行半定量分析。VEGF 和 β -actin 的半定量值均采用以下公式计算: (每个条带的灰度值/背景的灰度值) \times 条带面积, VEGF 的表达指数以 VEGF 灰度/ β -actin 灰度表示。

1.6 移植细胞存活检测

为检测移植细胞的存活性, 移植前细胞用 BrdU 标记好人脐血单个核细胞, 移植后 4 周取 2 只大鼠心脏组织切片, 用抗 BrdU 单克隆抗体行免疫组化染色, 方法按说明书进行, 存活的移植细胞会显示染色阳性。

1.7 统计学分析

测量结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计学处理采用 SAS 软件进行。

2 结果

2.1 移植前 CD₃₄ 阳性细胞含量

脐血经 HES 沉淀加 FicolI 密度梯度离心的方法处理后, 成为单个核细胞, 其中具有分化潜能的 CD₃₄ 阳性细胞得到一定的富集作用, 流式细胞分析结果示: CD₃₄ 阳性细胞占总单个核细胞的 1.5%, 而骨髓单个核细胞中, CD₃₄ 阳性细胞只占 1% 左右。

2.2 干细胞移植对急性心肌梗死大鼠血流动力学的影响

与对照组相比, 移植组 LVEDP 和心率显著下降 ($P < 0.05$), $\pm dp/dt_{max}$ 则明显增快 ($P < 0.05$), LVSP 虽有升高, 但差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 移植组和对照组的血流动力学

Table 1 Hemodynamic measurement of the control group and the transplantation group (n=10, $\bar{x} \pm s$)

Group	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	+dp/dt _{max} (mmHg·ms ⁻¹)	- dp/dt _{max} (mmHg·ms ⁻¹)	HR (min ⁻¹)
Control	128.4 \pm 22.6	30.8 \pm 9.6	3.2 \pm 0.8	3.0 \pm 0.5	450 \pm 32
Transplantation	129.3 \pm 13.8	21.1 \pm 8.1	4.3 \pm 1.3	3.7 \pm 0.8	412 \pm 25
t	0.10	2.31	2.33	2.40	2.99
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 RT-PCR 半定量分析结果

大鼠心肌以表达 VEGF₁₆₄ 和 VEGF₁₈₈ 为主, 在两组, VEGF₁₂₀ 均呈微弱表达 (图 1)。移植组 VEGF₁₆₄ 和 VEGF₁₈₈ 表达于第 7 天明显增加, 并持续至第 28 天, 对照组于第 4 天及第 7 天可见少量表达, 第 14 天和第 28 天已基本不表达 (表 2)。

2.4 免疫组化染色结果

抗 vWF 免疫组化染色检测梗死周边区毛细血管数量, 结果示梗死周边区平均血管密度明显增加 (图 2), 移植组为 (5.7 \pm 0.3)/高倍视野, 对照组为 (2.3 \pm 0.4)/高倍视野, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。抗 BrdU 染色后, 在移植组细胞核呈 BrdU 染色阳性的细胞散在分布于梗死周边区, 呈深褐色, 表明移植的人脐血单个核细胞在心肌内存活。部分 BrdU 染色阳性的细胞形态呈扁平状, 并参与到底血管壁的组成 (图 3)。对照组梗死区及其周边均未检测到 BrdU 阳性的移植细胞。

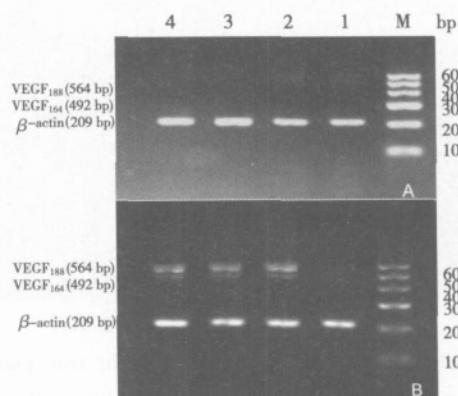


图 1 PCR 检测对照组和移植组大鼠 VEGF 的表达
Fig.1 RT-PCR analysis of VEGF in the control group and the transplantation group

A: control group; B: transplantation group; Lane 1: the expression of VEGF₁₆₄ (492 bp) and VEGF₁₈₈ (564 bp) in the 4th days post-transplantation; Lane 2: the expression of VEGF in the 7th days post-transplantation; Lane 3: the expression of VEGF in the 14th days post-transplantation; Lane 4: the expression of VEGF in the 28th days post-transplantation

表 2 对照组和移植组 VEGF 的 RT-PCR 半定量结果

Table 2 Semi-quantitation of VEGF in the control group and transplantation group (n=5, $\bar{x} \pm s$)

VEGF	Group	Days post transplantation			
		4th	7th	14th	28th
VEGF ₁₆₄	Control	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.00	0.00
	Transplantation	0.05 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.17 ± 0.05
	t	0.01	7.64	7.47	7.30
VEGF ₁₈₈	P	>0.05	<0.01	0.00	0.00
	Control	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.005	0.00	0.00
	Transplantation	0.08 ± 0.01	0.54 ± 0.13	0.53 ± 0.14	0.49 ± 0.08
t	0.58	6.92	7.47	12.87	
P	>0.05	<0.01	0.00	0.00	

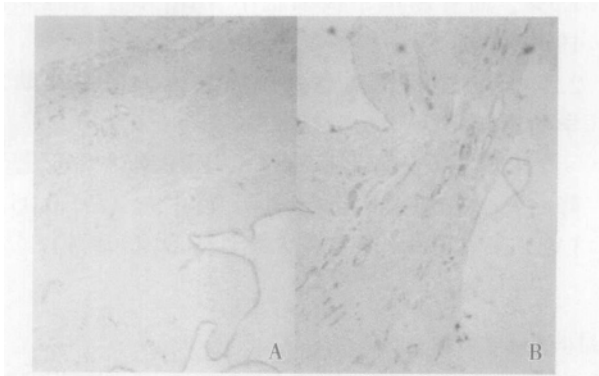


图 2 急性心肌梗死 4 周后, 心肌组织抗 vWF 免疫组化染色
Fig.2 Immunohistochemical staining for vWF in 4 weeks post-transplantation(×200)
A: control group; B: transplantation group

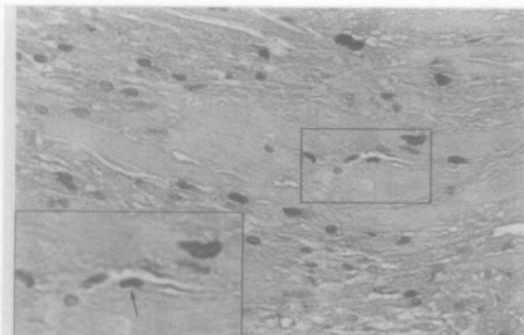


图 3 抗 BrdU 免疫组化染色结果
Fig.3 BrdU immunostaining result of the transplantation group composed of the BrdU positive cells shows some of the BrdU positive cells form the new capillary

3 讨论

多个临床研究证明干细胞移植治疗急性心肌梗死可明显改善心功能, 但干细胞分化为可同步

收缩的心肌细胞这一观点受到越来越多的挑战。不少实验证实, 移植后干细胞通过促进血管再生, 促进梗死后心脏毛细血管增生及有效侧支循环的建立, 从而保护存活心肌, 改善心肌供血, 抑制凋亡, 限制重构, 从而改善心功能^[4]。

成人体内含有大量的血管内皮细胞, 但绝大多数都处于静止期, 没有分化及增殖功能, 缺血和缺氧可诱发毛细血管再生, 其重要机制是上调 VEGF 及其受体的表达^[5]。VEGF 可增加毛细血管壁通透性, 激活基质降解金属蛋白酶, 促进内皮细胞的增殖和迁移, 是最重要的促血管生成因子^[6]。VEGF 经转录水平剪切产生 5 种变体, 分别为 VEGF₁₂₀, VEGF₁₄₄, VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈ 和 VEGF₂₀₅, 在心肌组织中, 以表达 VEGF₁₈₈ 为主 (>50%)。

本研究显示: 脐血干细胞移植至急性心肌梗死大鼠后经 BrdU 免疫组化染色证实有脐血干细胞存活, 毛细血管明显增多并且心功能改善变化一致。

移植组大鼠心肌组织中 VEGF 表达第 7 天始明显高于对照组, 以 VEGF₁₈₈ 变化最明显, VEGF₁₈₈ 几乎均与细胞表面或基质结合^[7], 可通过整合素 $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ 和其他 α_v 整合素与内皮细胞发生粘附, 对于诱导内皮细胞的迁移和维持内皮细胞的存活具有重要意义^[8]。移植组 VEGF 持续高表达至第 28 天, 对照组于第 14 天起已基本不表达, 可见移植后血管形成并不单纯是心梗后缺血或炎症反应所致的血管生成 (angiogenesis) 作用, 在原有血管系统基础上, 血管内皮细胞迁移、分化和增殖, 形成血管通道, 而且血管发生 (vasculogenesis) 也参与其中^[9]。“血管发生”指多能的间充质细胞首先分化为内皮祖细胞, 由内皮祖细胞原位分化、组装成实心的内皮细胞索, 进而形成血管腔的过程。再者,

持续高表达的 VEGF 可能与其他促血管再生因子(如 bFGF)协同促进平滑肌细胞形成,参与“动脉生成”过程,成为结构典型的动脉,功能与形态更加稳定^[10],改善心肌缺血。

与其它干细胞来源相比,如骨髓干细胞(造血干细胞,间充质干细胞及边缘细胞),骨骼肌卫星细胞及胎心细胞等,脐血干细胞有不少优点。首先,脐血干细胞富含内皮祖细胞,对血管发生具有重要作用^[11]。而且,脐血干细胞中的有效成份不会因年龄的增长而衰减。此外,脐血中 T 淋巴细胞比较原始,抗原表达弱而不充分,自然杀伤细胞活性较弱。Pesce 等^[12]认为由于移植的细胞不成熟,其抗原呈递不理想,不足以刺激抗异种抗体的产生。脐血免疫系统的原始性是其用于移植的一大独特优势。

本实验在未用免疫抑制剂下移植后脐血干细胞仍可存活并发挥作用,异种移植后细胞存活并分化还可能归因于宿主微环境的作用。ZHANG 等^[13]证实心肌梗死后早期(3 d 内)VEGF 表达会短暂轻度上调,VEGF 除了对移植后干细胞有保护作用,还和缺血缺氧微环境(所谓细胞-细胞机制及细胞-基质机制)一起诱导干细胞向内皮祖细胞以及血管内皮细胞分化。

因此,脐血是一种非常有潜力的干细胞资源,随着脐血库的建立及规范化管理,脐血有望成为将来干细胞移植治疗的最可靠和最稳定的细胞来源。

参考文献:

- [1] TANG Y L, ZHAN Q, QIN X, et al. Aracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction [J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 80(1): 229- 236.
- [2] MATHUR A, MARTIN J F. Stem cells and repair of the heart[J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 183- 192.
- [3] WEIDNER N, SEMPLE J P, WELCH WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1):1- 8.
- [4] BOTTA R, GAO E, STASSI G. Heart infarct in NOD-SCID mice: therapeutic vasculogenesis by transplantation of human CD34+ cells and low dose CD34+KDR+cells[J]. *FASEB J*, 2004, 18(12):1392- 1394.
- [5] GRUNSTEIN J, MASBAD J J, HICKEY R, et al. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(19):7282- 7291.
- [6] MATSUMOTO R, OMURA T, YOSHIYAMA M, et al. Vascular endothelial growth factor - expression mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(6):1168- 1173.
- [7] HERVE M A, BUTRAU- LOZANO H, MOURAH S, et al. VEGF189 stimulates endothelial cells proliferation and migration in vitro and up- regulates the expression of Flk- 1/KDR mRNA[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 309(1): 24- 31.
- [8] HUTCHING S H, ORTEGA N, PLOUET J, et al. Extracellular matrix- bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survived through integrin ligation[J]. *FASEB J*, 2003, 17(11):1520- 1522.
- [9] SCHEINOWITZ M. Therapeutic myocardial angiogenesis: Past, present and future[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 264(1- 2):75- 83.
- [10] WERNER N, NICKENIG G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells, limitations for therapy [J]. *Arterioscler Thromb Biol*, 2006, 26 (2) : 257- 266.
- [11] DROETTO S, VIALE A, PRIMO L, et al. Vasculogenic potential of long term repopulating cord blood progenitors[J]. *FASEB J*, 2004, 18(11):1273- 1275.
- [12] PESCE M, ORLANDI A, GRAZIA M. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood- derived stem cells in ischemic limb tissues[J]. *Circ Res*, 2003, 93(1):51- 62.
- [13] ZHANG S, ZHANG P, GUO J, et al. Enhanced cytoprotect1 and angiogenesis by bone marrow cell transplantation may contribute to improved ischemic myocardial function [J]. *Europ Cardio- thoracic Surg*, 2004, 25(2):188- 195.

(编辑 黄小延)