

三种途径移植自体 BM - MNCs 对猪急性心肌梗死后 心功能影响的对比研究

孙 林 张 戈 周 旭 章体玲 左明鲜 楚天舒 光雪峰 杨达宽

摘 要 **目的** 对比研究心肌内、冠脉内及静脉内 3 种途径移植自体骨髓单个核细胞 (BM - MNCs) 对猪急性心肌梗死后心功能的影响。**方法** 3 种途径移植后 4 周观察小血管密度及心功能变化情况。**结果** (1) 3 种途径 BM - MNCs 移植后 4 周小血管密度均明显高于各自的对照组 ($P < 0.01$); 心肌内移植 BM - MNCs 组与冠脉内移植 BM - MNCs 组相比小血管密度无统计学差异, 但明显高于静脉内移植 BM - MNCs 组 ($P < 0.01$)。 (2) 3 种途径 BM - MNCs 移植后 4 周 LVEF 及 FS 均明显高于各自对照组但组间比较无统计学差异; 心肌内移植组和冠脉内移植组 LVEDd 均明显低于对照组, 而静脉内移植组 LVEDd 虽低于对照组但无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论** 3 种途径移植 BM - MNCs 均有助于促进缺血心肌血管新生, 改善左心室收缩功能, 其中心肌内直接注射和冠脉内注射效果相似, 静脉注射较前两种途径移植效果差; 心肌内与冠脉内移植 BM - MNCs 组有减轻心室重构的作用, 但在静脉移植组该作用不明显。

关键词 骨髓单个核细胞 移植 急性心肌梗死 猪

Cardiac Function Study of Autologous BM - MNCs by Intramyocardial, Intracoronary and Intravenous Transplantation Into Ischemic Myocardium of AMI in Swines. Sun Lin, Zhang Ge, Zhou Xu, Zhang Tiling, Zuo Mingxian, Chu Tianshu, Guang Xuefeng, Yang Dakuan. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Yunan 650101, China

Abstract **Objective** To study the effects of autologous bone marrow - derived mononuclear on cardiac function changes cells (BM - MNCs) transplantation by intramyocardial, intracoronary and intravenous. **Methods** Four weeks after transplantation, blood vessels density and heart function were observed. **Results** (1) Blood vessels density in three different deliver BM - MNCs groups were significantly higher than those in control group ($P < 0.01$), which in intramyocardial and intracoronary group were not significant but higher than those in intravenous group ($P < 0.01$). (2) The values of LVEF and FS in three implantation groups were all higher than those in their control groups. But there was no significance among three implantation group for LVEF and FS. LVEDd in intramyocardial and intracoronary group was lower than that in control group, but there was no significance between intravenous group and control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Three ways of implantation can induce angiogenesis in the ischemic myocardium and improve left ventricular systolic function. The therapeutic efficacy is similar in intramyocardial group and intracoronary group, which is better than in intravenous group. Intramyocardial and intracoronary transplantation can attenuate remodeling but these effects can not be observed in intravenous group.

Key words Bone marrow - derived mononuclear cells; Transplantation; Acute myocardial infarction; Swine

随着对冠心病研究的深入, 干细胞移植治疗心肌梗死及心肌梗死后心力衰竭成为研究热点。既往的研究认为心肌细胞不能再生, 当心肌梗死后, 坏死心肌细胞逐渐被纤维组织替代, 形成瘢痕组织, 存活心肌细胞的缺失和心肌重构, 最终导致心力衰竭。近来研究发现, 心肌梗死后病灶边缘及正常心肌组织中有心肌细胞发生有丝分裂, 但数量有限^[1], 但由于心肌梗死部位血供断绝, 如果仅依赖于心肌细胞的分裂增

生, 不可能形成新的心肌组织。随着近年来分子生物学和细胞生物工程技术及骨髓干细胞的研究发展, 目前的研究表明, 移植的干细胞可以分化为心肌细胞, 并能分泌多种生长因子诱导新的血管形成^[2], 使心肌梗死瘢痕区血管和心肌再生, 改善缺血心肌血供, 改善心脏功能^[3]。

应用骨髓干细胞治疗急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 虽然应用前景良好, 但许多问题亟待解决, 例如移植细胞种类、何种移植途径最佳等, 所以应用于临床仍需谨慎, 需要更多的基础研究来支持。本研究通过建立小型猪 AMI 模型, 分离自体骨髓单个核细胞 (bone marrow mononuclear cells,

作者单位: 650101 昆明医学院第二附属医院心血管内科/云南省冠心病基础研究室 (孙林、张戈、周旭、楚天舒、杨达宽); 昆明市延安医院心血管内科 (章体玲、左明鲜、光雪峰)

通讯作者: 孙林, 电子信箱: sunlinkm@sina.com

BM - MNCs),通过心肌内、冠脉内及静脉内注射 3 种途径进行 BM - MNCs 移植,对比研究 3 种途径移植自体 BM - MNCs 对猪急性心肌梗死后心功能的影响,为骨髓干细胞移植治疗冠心病提供更多的实验依据。

材料与方法

1. 制备小型猪 AMI 模型:小型猪 32 只,戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉;无菌条件下开胸结扎 LCX 主要分支,制成 AMI 模型^[4]。

2. BM - MNCs 的提取、分离和标记:无菌条件下穿刺小型猪髂后上嵴,抽取骨髓 20 ~ 40ml(心肌内及静脉内移植组在制备 AMI 模型前 4h 抽取,冠脉内移植组在制成 AMI 模型后 1 周抽取)。采用密度梯度离心法分离 BM - MNCs,调整细胞密度为 2×10^8 /ml,静脉移植组需调整细胞密度为 8×10^8 /ml,制成干细胞悬液 1 ~ 2ml,保存备用。移植前加入浓度为 50 μ g/ml 的 DAPI 染色标记,保存于 4℃ 冰箱,染色标记后 1h 内移植。

3. 实验分组及 BM - MNCs 移植方法:小型猪 32 只,分为 6 组:①心肌内移植 BM - MNCs 组($n = 6$):制成 AMI 模型后即刻心肌内注射自体 BM - MNCs 细胞悬液 1ml,细胞数 2×10^8 ;②心肌内盐水对照组($n = 5$):制成 AMI 模型后即刻心肌内注射 Hanks 平衡盐溶液 1ml;③冠脉内移植 BM - MNCs 组($n = 6$):制成 AMI 模型后 1 周,冠脉内注射自体 BM - MNCs 细胞悬液 2ml,细胞数 2×10^8 ;④冠脉对照组($n = 5$):制成 AMI 模型后 1 周,冠脉内注射 Hanks 平衡盐溶液 2ml;⑤静脉内移植 BM - MNCs 组($n = 5$):制成 AMI 模型后即刻静脉内注射自体 BM - MNCs 细胞悬液 2ml,细胞数 8×10^8 ;⑥静脉对照组($n = 5$):制成 AMI 模型后即刻静脉内注射 Hanks 平衡盐溶液 2ml。

4. 观察项目:①超声心动图检查:分别于心肌梗死模型术

前及 MNCs 移植后 4 周行超声心动图检查。测量左心室舒张末期内径(left ventricular end - diastolic dimension, LVEDd)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、短轴缩短率(fraction shortening of short axis, FS)、室间隔厚度(interventricular septum thickness, IVST)及左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPWT),评价左心室收缩功能及心室重构情况;②病理组织学检查:移植后 4 周达实验终点处死动物,取心脏标本,10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,用兔抗人 γ 因子进行免疫组化染色,光镜下每张切片随机计数 10 个高倍视野($100 \times$),分别计数小血管密度(直径 $< 50\mu$ m),观察血管新生情况。

5. 统计学处理:所有数据采用统计程序包 SPSS11.0 进行处理,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析和均数间两两比较的方法,两样本均数的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

结 果

1. 动物情况:小型猪 32 只,共死亡 2 只,其中心肌内移植 BM - MNCs 组及冠脉内移植 BM - MNCs 组各死亡 1 只动物,模型制备过程中死于心室颤动。

2. 超声心动图检查:心肌内移植 BM - MNCs 组和冠脉内移植 BM - MNCs 组移植后 4 周 LVEF 及 FS 均明显高于对照组, $P < 0.01$;静脉内移植 BM - MNCs 组移植后 4 周 LVEF 及 FS 值明显高于对照组, $P < 0.05$;3 种途径 BM - MNCs 移植后 4 周 LVEF 及 FS 组间比较无统计学差异;心肌内移植 BM - MNCs 组和冠脉内移植 BM - MNCs 组移植后 4 周 LVEDd 均明显低于对照组, $P < 0.05$,而静脉内 BM - MNCs 组移植后 4 周 LVEDd 虽低于对照组,但无统计学差异, $P > 0.05$ (表 1)。

表 1 3 种途径 BM - MNCs 移植后 4 周心功能比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	LVEDd(mm)	LVEF(%)	FS(%)	IVST(mm)	LVPWT(mm)
心肌内盐水对照组($n = 5$)	37.20 $\pm$ 6.07	45.18 $\pm$ 5.04	27.10 $\pm$ 3.57	7.87 $\pm$ 1.16	11.92 $\pm$ 1.32
心肌内移植 MNCs 组($n = 5$)	27.55 $\pm$ 3.17 [●]	67.00 $\pm$ 5.20 [☆]	42.38 $\pm$ 5.26 [☆]	6.78 $\pm$ 0.59	9.57 $\pm$ 1.31
冠脉对照组($n = 5$)	37.82 $\pm$ 6.96	47.21 $\pm$ 6.32	27.31 $\pm$ 4.07	7.37 $\pm$ 1.45	11.78 $\pm$ 1.51
冠脉内移植 MNCs 组($n = 5$)	27.27 $\pm$ 2.38 [●]	65.84 $\pm$ 4.94 [☆]	43.21 $\pm$ 5.49 [☆]	6.94 $\pm$ 0.62	9.47 $\pm$ 1.05
静脉对照组($n = 5$)	37.58 $\pm$ 5.84	46.34 $\pm$ 5.94	29.34 $\pm$ 3.86	7.02 $\pm$ 1.18	10.94 $\pm$ 2.19
静脉内移植 MNCs 组($n = 5$)	29.82 $\pm$ 3.26	62.75 $\pm$ 5.08 [●]	40.28 $\pm$ 4.73 [●]	6.51 $\pm$ 0.71	10.06 $\pm$ 2.16

与对照组比较,[☆] $P < 0.01$;与对照组比较,[●] $P < 0.05$

3. 小血管密度对比:3 种途径 BM - MNCs 移植组小血管密度均明显高于各自的对照组, $P < 0.01$ 。3 种途径对照组间比较小血管密度无统计学差异, $P > 0.05$ 。心肌内移植 BM - MNCs 组与冠脉内移植 MNCs 组相比小血管密度无统计学差异,但明显高于

静脉内移植 BM - MNCs 组, $P < 0.01$ (表 2)。

讨 论

本研究发现通过心肌内、冠脉内及静脉内 3 种途径移植 BM - MNCs 组小血管密度均明显高于各自的对照组($P < 0.01$),其中心肌内移植 BM - MNCs 组与

表 2 3 种途径移植 BM - MNCs 4 周后

小血管密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	小血管密度 (条/平方毫米)
心肌内盐水对照组 ($n=5$)	46.33 $\pm$ 8.21
心肌内移植 MNCs 组 ($n=5$)	91.13 $\pm$ 11.04 ^{▲△}
冠脉对照组 ($n=5$)	38.21 $\pm$ 6.05
冠脉内移植 MNCs 组 ($n=5$)	90.62 $\pm$ 12.46 ^{▲△}
静脉对照组 ($n=5$)	35.14 $\pm$ 7.06
静脉内移植 MNCs 组 ($n=5$)	68.25 $\pm$ 9.54 [▲]

与所有对照组比较, [▲] $P < 0.01$; 与静脉内移植 MNCs 组比较, [△] $P < 0.01$

冠脉内移植 BM - MNCs 组相比小血管密度无统计学差异, 但明显高于静脉内移植 BM - MNCs 组 ($P < 0.01$), 提示心肌内移植与冠脉内移植两种途径促血管新生效果相似, 静脉移植也有效, 但疗效不如前两种途径, 可能与静脉移植归巢到宿主心肌的移植细胞较少有关, 要获得相同的疗效可能需要加大移植细胞的数量。

移植后 4 周, 心肌内移植 BM - MNCs 组和冠脉内移植 BM - MNCs 组 LVEF 及 FS 均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 静脉内移植 BM - MNCs 组 LVEF 及 FS 也明显高于对照组 ($P < 0.05$), 3 种途径 LVEF 及 FS 组间比较无统计学差异, 提示 3 种途径移植 BM - MNCs 均能改善左心室收缩功能, 疗效无明显差异。移植后 4 周, 心肌内移植 BM - MNCs 组和冠脉内移植 BM - MNCs 组 LVEDd 均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 而静脉内移植 BM - MNCs 组 LVEDd 虽低于对照组, 但无统计学差异 ($P > 0.05$), 提示心肌内移植与冠脉内移植两种途径对缩小心腔大小, 减轻心室重构有明确疗效, 但在静脉移植组该作用不明显。

Makela 等^[5]的实验发现 BM - MNCs 注入心肌梗死后猪的缺血心肌内, 3 周后发现标记的细胞可以归巢到梗死区域的心肌。Yip 等^[6]报道应用 BM - MNCs 可以改善心肌梗死后 SD 大鼠的左室收缩功能。BM - MNCs 改善心功能可能的机制: (1) BM - MNCs 直接分化为血管内皮细胞和平滑肌细胞, 形成新的血管。(2) 移植的干细胞通过自分泌或旁分泌的方式分泌一些细胞因子, 促进缺血区域新生血管的形成, 改善灌注、改善冬眠心肌和顿抑心肌功能^[7]。(3) 由于 BM - MNCs 是一个含有多种干细胞成分的混合细胞群, 和骨髓中某种纯化的细胞相比, 可提供细胞之间相互依赖、分化的诱导微环境^[8]。(4) BM - MNCs 在心肌内存活并与心肌细胞间形成电收缩耦联而同步收缩。BM - MNCs 有较强的细胞因子

分泌功能, 可促进细胞增生和血管形成。新生的血管可以促进侧支循环的建立, 冠脉侧支循环形成和开放, 可改善心肌缺血, 并且可提高移植细胞的存活率, 从而减轻心室重构并使心功能得到改善。

目前对于静脉移植 BM - MNCs 的研究报道较少, 其中多数采用大鼠作为实验对象, 本研究发现经静脉移植自体 BM - MNCs 是有效的, 有促进缺血心肌血管新生, 改善左心室收缩功能的作用^[9], 与部分研究结果相似^[10]。Nagaya^[11]等报道经静脉移植 BM - MSCs 到大鼠急性梗死心肌内, 移植细胞数 5×10^6 , 4 周后发现移植组毛细血管密度明显增多, 心肌梗死面积缩小, 心功能明显改善。国内马军等^[12]将 MSCs 经外周静脉移植到大鼠缺血心肌内, 研究结果发现经静脉移植的 MSCs 能归巢到缺血心肌, 并少量表达心肌及血管内皮细胞的特异性蛋白标志, 能明显上调心脏局部 VEGF 的表达, 促进缺血心肌血管新生, 能有效改善心肌梗死后的心功能。

本研究结果表明, 3 种途径移植 BM - MNCs 均有助于促进缺血心肌血管新生, 具有改善缺血心肌收缩功能的作用, 其中心肌内直接注射和冠脉内注射效果相似, 静脉注射较前两种途径移植效果差。经静脉移植虽然简单易行, 但移植的细胞数量较前两者多, 效果却是有限的。

参考文献

- 1 Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2001, 344:1750 - 1757
- 2 Pittenger MF, Mackay AM, Beek SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 (5411): 143 - 147
- 3 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410:710 - 715
- 4 孙林, 熊国昌, 光雪峰, 等. 开胸结扎猪冠状动脉建立急性心肌梗死动物模型的研究. *昆明医学院学报*, 2006, 27(3): 1 - 3
- 5 Makela J, Ylitalo K, Lehtonen S, *et al.* Bone marrow - derived mononuclear cell transplantation improves myocardial recovery by enhancing cellular recruitment and differentiation at the infarction site. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 134(3): 565 - 573
- 6 Yip HK, Chang LT, Wu CJ, *et al.* Autologous bone marrow - derived mononuclear cell therapy prevents the damage of viable myocardium and improves rat heart function following acute anterior myocardial infarction. *Circ J*, 2008, 72 (8): 1336 - 1345
- 7 Burchfield JS, Iwasaki M, Koyanagi M, *et al.* Interleukin - 10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction. *Circ Res*, 2008, 103(2): 203 - 211
- 8 Szilvassy SJ, Bass MJ, Van Zant G, *et al.* Organ - selective homing

- defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cell and is compromised by ex vivo expansion. *Blood*, 1999, 93:1557 - 1566
- 9 孙林,张戈,左明鲜,等. 经静脉移植自体骨髓单个核细胞治疗猪急性心肌梗死的实验研究. *中国心血管杂志*, 2009, 14(4):49 - 52
- 10 Price MJ, Chou CC, Frantzen M, *et al.* Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol*, 2006, 111(2):231 - 239
- 11 Nagaya N, Fujii T, Iwase T, *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287: H2670 - H2676
- 12 马军,葛均波,张少衡,等. 静脉移植骨髓间质干细胞改善大鼠梗死心脏功能. *中国临床医学*, 2004, 11(2):151 - 153
- (收稿:2009 - 09 - 29)
- (修回:2009 - 12 - 03)

原发性肾小球疾病患者血清、尿 Cystatin C 与肾脏病理变化的关系

孙秀丽 其木格 陈爱珍

摘要 目的 探讨在不同病理类型原发性肾小球肾炎(PGN)患者血清、尿 Cystatin C(CysC)水平的差异性及其与肾脏病理变化的关系。**方法** 对行经皮肾穿刺患者检测血清和尿中的 Cystatin C,分别与肾小球评分以及肾小管间质评分进行相关性分析。**结果** 在不同病理类型 PGN 中发现,IgA 肾病(IgAN)、局灶增生性肾小球病(FSGS)、膜性肾病(MN)患者的血清、尿 Cystatin C 浓度与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),血清 Cystatin C 与肾小球评分有高度相关性,尿 Cystatin C 与其相关性相对弱,而与肾小管间质评分的强相关性要优于血清 Cystatin C。**结论** 在肾脏病理评估中,任一检测血清 Cystatin C 或尿 Cystatin C 均能很好地反映慢性肾脏病(CKD)的病理情况,尤其对肾小管间质病变有很大的临床意义。

关键词 血清 Cystatin C 尿 Cystatin C 肾脏病理

Correlation of Serum Cystatin C, Urinary Cystatin C and Renal Pathology in Primary Glomerulonephritis Patients of Different Pathological Types. Sun Xiuli, Qi Muge, Chen Aizhen. Department of Nephrology, Baotou Central Hospital, Neimenggu 014040, China

Abstract Objective To investigate the variability of serum Cystatin C concentration and urinary Cystatin C concentration in primary glomerulonephritis patients of different pathological types, and to study the correlation with renal pathological changes. **Methods** Urinary Cystatin C was detected before renal biopsy. The two indexes were processed by correlation analysis with glomerulus scores and renal tubulointerstitial scores respectively. **Results** The differences of Serum Cystatin C concentration and urinary Cystatin C concentration in IgA nephropathy(IgAN) group, focal segmental glomerulosclerosis group and membranous nephropathy group existed statistical significance as compared to normal control ($P < 0.05$). The level of serum Cystatin C was highly correlated with glomerulus scores, which had an advantage over the level of urinary Cystatin C and glomerulus scores. But the strong relationship between urinary Cystatin C concentration and renal tubulointerstitial scores was better than that between serum Cystatin C concentration and renal tubulointerstitial scores. **Conclusion** The detection of serum Cystatin C or urinary Cystatin C may both reflect pathological changes of chronic kidney disease well. Especially, it has important clinical significance about estimating renal tubulointerstitial damage, in spite of the difference of serum Cystatin C and urinary Cystatin C laying particular emphasis on renal pathology.

Key words Serum Cystatin C; Urinary Cystatin C; Renal pathology

Cystatin C 是近年来用来评价肾功能早期损害的一个标志物,近年来有研究表明,血清 Cystatin C 与肾病综合征病理进展程度高度相关,因此,本实验我们同时检测原发性肾脏病患者血清、尿的 Cystatin C,观

察其与肾脏病理变化的关系,以探讨不同病理类型原发性肾脏病患者肾脏病理变化的检测指标,及其对评价肾功受损程度方面是否存在差别。

材料与方法

1. 研究对象:(1)正常对照组:正常对照组为 16 例体检合格者,男女性各 8 例,年龄 17 ~ 57 岁,平均 (35.37 ± 11.87) 岁,均无肾脏病。(2)病例组:选择 2007 年 1 月 ~ 2008 年 1 月