

MRI 评价骨髓间质干细胞治疗猪急性心肌梗死效果的实验研究

陆敏杰 赵世华 钱海燕 蒋世良 韦云青 闫朝武 杨跃进 刘玉清

【摘要】 目的 应用 MRI 评价经冠状动脉途径移植猪自体骨髓间质干细胞 (BM-MSCs) 治疗急性心肌梗死 (AMI) 的治疗效果。方法 8 月龄中华小型猪 14 只 [(27 ± 3) kg], 平均分成移植组与对照组。胶圈套扎左前降支第一对角支分叉以远 90 min 后松开, 建成 AMI 模型。心肌梗死后 1 周进行细胞移植, 将干细胞悬液 (移植组: 1×10^6 /ml × 10 ml) 或无血清培养液 (DMEM) (对照组 10 ml) 经微导管注入前降支。AMI 术后 1 周 (基线) 和 MSCs 移植后 6 周 (终点) 各行 1 次 MR 扫描, 评价移植前后心脏形态、功能、心肌灌注及延迟增强。第 2 次 MR 扫描后立即处死动物, 分别行冰冻切片、石蜡切片和电镜观察。结果 与对照组比较, 移植组在移植 6 周后左心室整体功能较前明显改善, 实验组与对照组比较, 左心室平均射血分数 (EF) 值从 (42.7 ± 7.5) % 升至 (50.1 ± 10.1) % ($P < 0.01$), 左心室节段运动异常数平均减少 4 个 ($P < 0.01$)、梗死面积减少 3.2 cm² ($P < 0.01$), 心脏重量指数增加 4.1 g/m² ($P < 0.05$)。病理证实移植组梗死区和梗死周边的病变情况显著轻于对照组, 有大量存活心肌, 纤维化程度显著减轻; 并且可见核大、边集, 胞质丰富的幼稚细胞; 在梗死区和梗死周边区组织的冰冻切片上可见 4-6-二脒基二苯基吲哚 (DAPI) 阳性的移植细胞存活。免疫荧光检测进一步表明大部分 DAPI 阳性细胞表达心肌特异性肌钙蛋白 T (troponin T), 并且表达间隙连接蛋白 43 (connexin 43)。部分 DAPI 阳性细胞表达平滑肌肌动蛋白 (smooth muscle actin) 和血管性血友病因子 (Von Willebrand), 移植组梗死周边区毛细血管密度显著高于对照组 [分别为 (8.7 ± 2.0)、(4.9 ± 1.3) 个/高倍镜] ($P < 0.01$)。结论 MRI 可作为猪 BM-MSCs 在体移植前后评价其治疗效果的可靠影像检查方法。

【关键词】 心肌梗死; 间质干细胞移植; 磁共振成像; 动物实验

MRI assessment of acute myocardial infarction with transplantation of autologous mesenchymal stem cells in swine: an experimental study LU Min-jie*, ZHAO Shi-hua, QIAN Hai-yan, JIANG Shi-liang, WEI Yun-qing, YAN Chao-wu, YANG Yue-jin, LIU Yu-qing. * Department of Radiology, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation on acute myocardial infarction in swine models using MRI. Methods Fourteen Chinese mini-pigs (27 ± 3 kg) were divided into control group (n = 7) and transplantation group (n = 7). Acute myocardial infarction (AMI) model was made by occlusion of the left anterior descending coronary artery for 90 minutes, and then 10 ml autologous MSCs (3×10^6 cell / ml) were injected into LAD by over-wire-balloon catheter after one week. MRI was performed to assess the cardiac function and myocardial perfusion 1 week after AMI and 6 weeks after transplantation. The implanted cells in vitro were analyzed by immunofluorescence. Results The left ventricular ejection fraction (LVEF) in transplantation group was increased from (42.7 ± 7.5) % to (50.1 ± 10.1) %, which was significantly different from that in control group ($P < 0.01$). In addition, the dyskinetic segments in infarcted region and the infarcted area were decreased by 4 and 3.2 cm² respectively ($P < 0.01$), and the left ventricular weight index was increased by 4.1 g/m² in transplantation group ($P < 0.05$) compared with control group. The DAPI-labeled cells in infarcted and peri-infarcted region indicated the survived MSCs. Immunofluorescence also confirmed that those cells expressed cardiomyocyte-specific troponin T, connexin 43 and vessel-specific smooth muscle actin. Capillary density in both infarcted and peri-infarcted region were higher in transplantation group than

the control group ($P < 0.01$). Conclusion MRI is a reliable imaging method for assessing the effects of stem cell transplantation in acute myocardial infarction of swine models.

【Key words】 Myocardial infarction; Mesenchymal stem cells transplantation; Magnetic resonance imaging; Animal experimentation

根据世界卫生组织(WHO)的统计,冠心病及其并发症是世界上最常见的病死原因之一。由于成熟心肌不可再生,目前临床上传统的治疗方案多局限于对存活心肌的挽救,现有治疗手段无法促使心肌再生。近年来随着“心肌再生”或“细胞心肌成形术”(cellular cardiomyoplasty, CCM)特别是干细胞移植研究的深入,干细胞移植有望成为心肌梗死区心肌再生非常有前途的治疗方法^[1-5]。心脏功能与梗死面积是评价急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)干细胞治疗效果最主要的指标,本研究采用 MR 电影及延迟增强扫描评价干细胞治疗猪 AMI 的实验效果。

资料与方法

1. 猪自体骨髓间质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)的分离、纯化、培养和鉴定:选取 8 月龄的中华小型猪 14 只,体重(27 ± 3) kg,雌雄不限,分成 2 组,分别为对照组(7 只)、移植组(7 只)。氯胺酮(30 mg/kg)和西地泮(1 mg/kg)肌内注射麻醉,备皮后于髂前上嵴抽取骨髓 40~60 ml,以连续密度梯度离心分离法(percoll) (1.073×10^3 g/L)离心(450 g, 4, 30 min)分离出单个核细胞,以含 10% 胎牛血清(FCS)的低糖培养液(DMEM)悬浮细胞,按 2×10^5 个/cm² 密度铺于 150 cm² 培养瓶中生长,3 d 后首次换液,除去非贴壁的造血干细胞,以后每 2~3 d 换液 1 次,7~10 d 后贴壁细胞达到 80% 融合,即按 1:3 消化传代。

选取第 3 代 MSCs 置于含载玻片的 6 孔培养板中,达 80% 融合即用于免疫细胞化学分析,检测细胞表面标志物同源区 2(SH-2)、CD29、CD34 和 CD45 的表达情况。

AMI 模型制作:在培养细胞过程中制作 AMI 模型,氯胺酮麻醉后机械通气,术中持续心电监护并连续静脉滴注利多卡因,胸骨左缘第 4 肋间开胸,在第一对角支分叉的稍远端用胶圈套扎左前降支 90 min 后松开,造成 AMI 模型。关胸后常规应用青霉素肌内注射,共 3 d 以预防感染。

2. 细胞准备和移植:心肌梗死后 1 周进行细胞移植,消化搜集 MSCs 以荧光染料 4-6-二脒基二苯

基吡啶(DAPI) 0.05 g/L, 37 孵育 30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 6 次,重新以 DMEM 悬浮 MSCs,血细胞计算板上计算密度,调节细胞密度为 3×10^6 个/ml,共 10 ml 用于移植。

在 DSA 机下进行移植操作,经 3 F 微导管送入指引导管,将细胞悬液(移植组: 1×10^6 个/ml \times 10 ml)或无血清 DMEM(对照组: 10 ml)经微导管注入前降支,肝素盐水冲洗管腔后撤出微导管并行冠状动脉造影。

3. MR 检查:AMI 造模后 1 周(基线)和 MSCs 移植后 6 周(终点)各行 1 次 MR 扫描。本研究采用头先进仰卧体位和屏气法扫描^[6]:功能电影成像(cine),心脏长轴(右心室两腔心、左心室两腔心、四腔心)切面心底至心尖左心室短轴切面,7~8 层,层厚 6 mm,间距 3~4 mm。采用时间调整敏感度编码真实稳态自由进动(TSENSE TrueFISP)左心室短轴电影。心肌首过灌注,采用 TSENSE 平面回波梯度回波(EPI GRE)序列,3~4 层左心室短轴切面 + 1 层四腔心切面,对比剂为钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA) 0.1 mmol/kg,流率 4~5 ml/s,于对比剂注入同时在 60 个心动周期采集图像。首过灌注完成后,立即以 2 ml/s 流率追加 0.1 mmol/kg 剂量 Gd-DTPA,5 min 后行延迟增强扫描,扫描层面包括两腔心、四腔心、心室短轴切面。

4. 图像分析:左心室短轴电影由心功能专用分析软件(Syngo VD10B, Syngo VX49B, Argus VA60C, Siemens AG, Medical Solutions, Erlangen, Germany)进行分析,计算左心室射血分数(EF)等心功能参数及各节段收缩功能。本研究将收缩期增厚率 $< 50\%$ 为运动障碍,增厚率 $\geq 50\%$ 为运动恢复。于心肌灌注均衡期观察心肌各节段灌注情况,根据美国心脏病协会(AHA)左心室 17 节段分析法肉眼评价灌注缺损。延迟增强根据 AHA 分析法,正常心肌为无信号,高信号为异常信号。

5. 病理检查:第 2 次检测后处死动物,取心脏标本,分别行冰冻切片、石蜡切片和电镜观察,石蜡切片以第 8 因子(Von Willebrand)染色计数毛细血管密度以及苏木精-伊红(HE)、磷钨酸苏木精染色法(PTH)染色,冰冻切片以免疫荧光法染色心肌特异性抗体连接蛋白 43(connexin 43)和心肌肌钙蛋白 T

(cardiac troponin T, cTn-T), 血管壁特异性结构蛋白平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin)和 Von

6. 统计分析: 统计软件采用 SPSS 13.0, 采用 $\bar{x} \pm s$ 描述连续性变量, 分别对实验组与对照组获得左心室功能参数包括, 射血分数(EF)、舒张末容积(EDV)、收缩末容积(ESV)、心搏量(SV)、心输出量(CO)和心肌质量指数(MM), 进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 一般结果: 实验组与对照组均有 1 只动物因麻醉及介入手术并发症死亡, 未完成 2 次 MR 检查, 故未纳入统计分析。其余均完成 MR 检查, 并获得具有诊断价值的 MR 图像, 平均扫描时间 18 min (15 ~25 min)。

2. 心功能: 由于本研究采用 TSENSE TrueFISP 电影, 大大减轻了呼吸运动对图像质量的影响, 所有用于心功能分析的图像无明显呼吸运动伪影(图 1 ~4)。(1) 整体功能, 对照组左心室 EF 值平均增加 1.3% (图 1, 2), 实验组平均增加 7.4% (图 3, 4), 左心室质量指数对照组平均增加 13.1 g/m², 实验组则平均增加 4.1 g/m²。2 组左心室舒张末容积和收缩末容积干预前后差异无统计学意义(表 1)。(2) 局部功能: 实验组治疗前后运动障碍功能恢复的节段较对照组增加 2.8 个/例, 对照组则无明显改善。

心肌灌注与延迟增强: 心肌首过灌注因图像空间分辨率较低, 无法准确评价, 故本研究不作单独分析。延迟增强对照组梗死面积前后对比无明显差异(图 5, 6), 实验组在干细胞移植后梗死面积较移植前减小, 平均减小 3.2 cm², 梗死边缘变不光滑, 局部呈“锯齿征”(图 7, 8)。

表 1 对照组和实验组各 6 只动物左心功能及心肌梗死面积对比结果($\bar{x} \pm s$)

组别	左心室射血分数(%)	舒张末期容积(ml)	收缩末期容积(ml)	运动障碍节段数(个)	左心室质量指数(g/m ²)	梗死面积(cm ²)
对照组						
基线	42.6 ±7.9	57.8 ±5.8	33.5 ±7.6	8.2 ±3.0	64.7 ±6.3	6.6 ±2.0
终点	43.9 ±7.6	66.2 ±5.2	37.3 ±7.6	7.7 ±2.5	77.8 ±7.2	6.7 ±2.1
实验组						
基线	42.7 ± 7.5	55.1 ±8.2	32.1 ± 9.2	8.9 ±3.6	62.3 ±8.6	6.5 ±2.3
终点	50.1 ±10.1 ^a	64.6 ±7.5 ^b	32.9 ±10.2 ^b	4.9 ±1.8 ^a	66.4 ±8.1 ^a	3.3 ±1.8 ^a
² 值						
基线	0.011	0.211	0.039	0.0001	0.007	0.0001
终点	2.408	0.310	0.231	1.4930	3.368	0.0001

注: 对照组和实验组(细胞移植组)在基线时各指标在 2 组之间差异无统计学意义; 终点时干细胞移植组与对照组比较:

^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.05$

Willebrand 因子, 于激光共聚焦扫描显微镜下观察。

3. 病理及免疫荧光检查: 对照组梗死区内纤维化和炎细胞浸润要比干细胞移植组严重, 对照组梗死区内未见存活心肌, 而移植组可见散在的存活心肌(图 9, 10)。免疫荧光检测进一步表明大部分 DAPI 阳性细胞表达心肌特异性结构蛋白 troponin T (图 11 ~16), 并且表达连接蛋白 connexin43, 说明移植细胞存活、分化为心肌细胞并和宿主心肌细胞形成连接。另外部分 DAPI 阳性细胞表达平滑肌肌动蛋白和 Von Willebrand 因子, 表明移植的 MSCs 参与新生血管的形成。HE、PTH 染色表明, 移植组梗死区和梗死周边的病变情况显著轻于对照组, 有大量存活心肌, 纤维化程度显著减轻, 并且可见核大、边集, 胞质丰富的幼稚细胞; 计数表明移植组梗死周边区毛细血管密度显著高于对照组[分别为(8.7 ± 2.0)、(4.9 ±1.3) 个/高倍镜] ($\chi^2 = 0.570$, $P < 0.01$)。

讨 论

大部分关于骨髓干细胞移植的动物实验及临床试验都报道了干细胞移植可以改善心脏功能、减少梗死面积, 但其中不少研究以超声心动图^[6-8]或核医学^[3, 5, 9-10]作为评价方法, 而无论超声心动图还是核医学均无法准确兼顾上述两方面。本研究采用心脏 MRI 作为干细胞治疗效果的无创影像评价手段, 对干细胞移植前后左心室功能及梗死面积进行定量分析。

1. 心脏功能改变: 由于本研究是在自由呼吸下采集图像, 且猪的呼吸频率较人快, 本研究未采用目前临床常规应用的全局自动校准部分并行采集真实稳态自由进动(GRAPPA TrueFISP) 电影序列, 而是

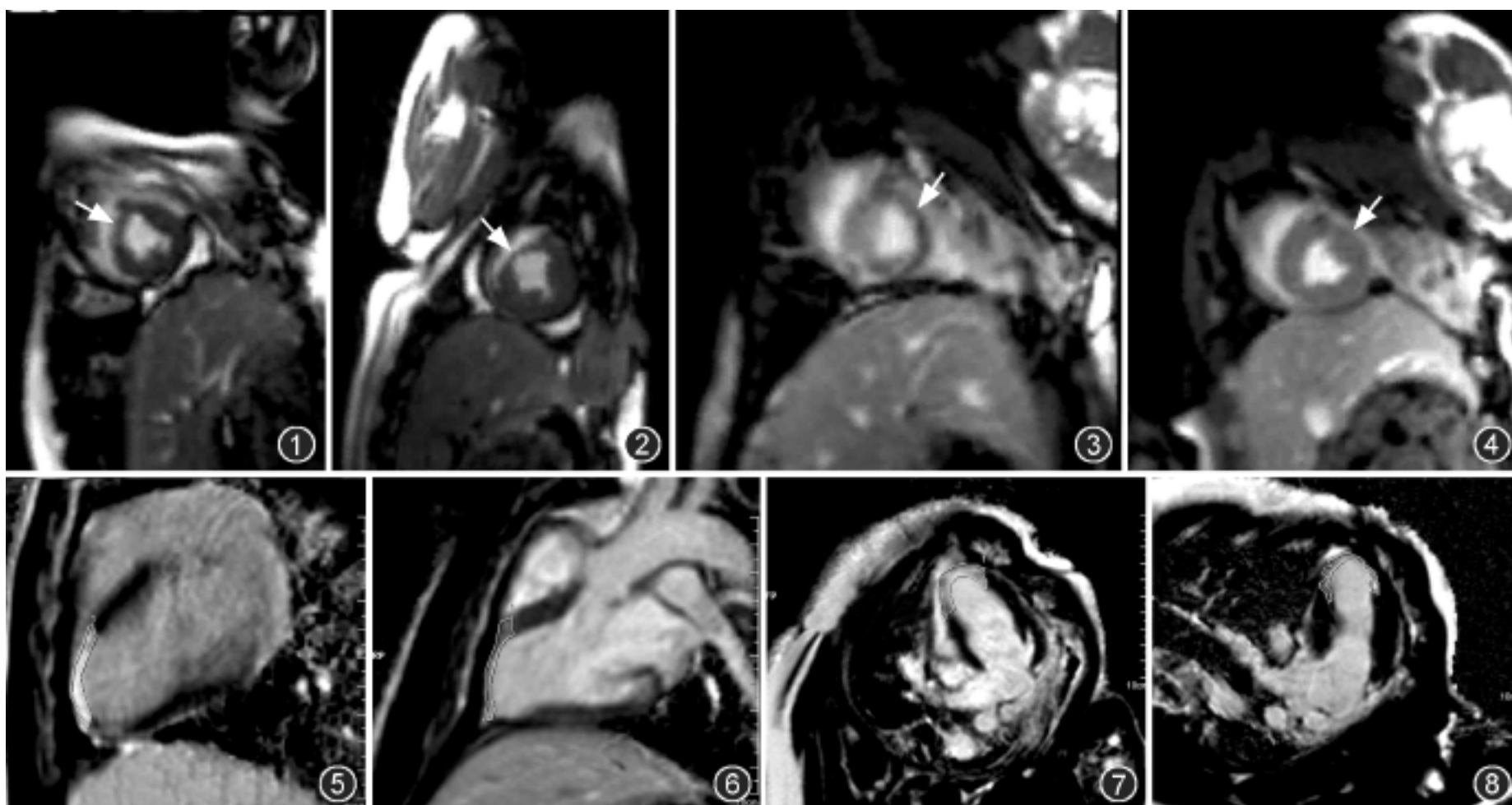


图 1,2 对照组注射安慰剂前(图 1)、后(图 2)左心室短轴舒张末与收缩末时间调整敏感度编码真实稳态自由进动(TSENSE TrueFISP)电影序列,提示术前室间隔近心尖部(箭)及毗邻左心室前壁室壁运动减弱节段于术后无明显改善(箭) 图 3,4 为实验组干细胞移植前(图 3)、后(图 4)左心室短轴舒张末与收缩末 TSENSE TrueFISP 电影序列,提示术前室间隔近心尖部(箭)及毗邻左心室前壁室壁运动减弱节段于术后明显改善(箭) 图 5,6 为对照组注射安慰剂前、后心肌延迟增强序列图像,异常强化的梗死面积无明显变化,由 1.75 cm^2 (图 5)变为 1.62 cm^2 (图 6) 图 7,8 为实验组注射干细胞前后心肌延迟增强序列图像,异常强化的梗死面积明显变小,由 4.33 cm^2 (图 7)缩小为 2.66 cm^2 (图 8),梗死区边缘变不规则,局部呈“锯齿样”改变

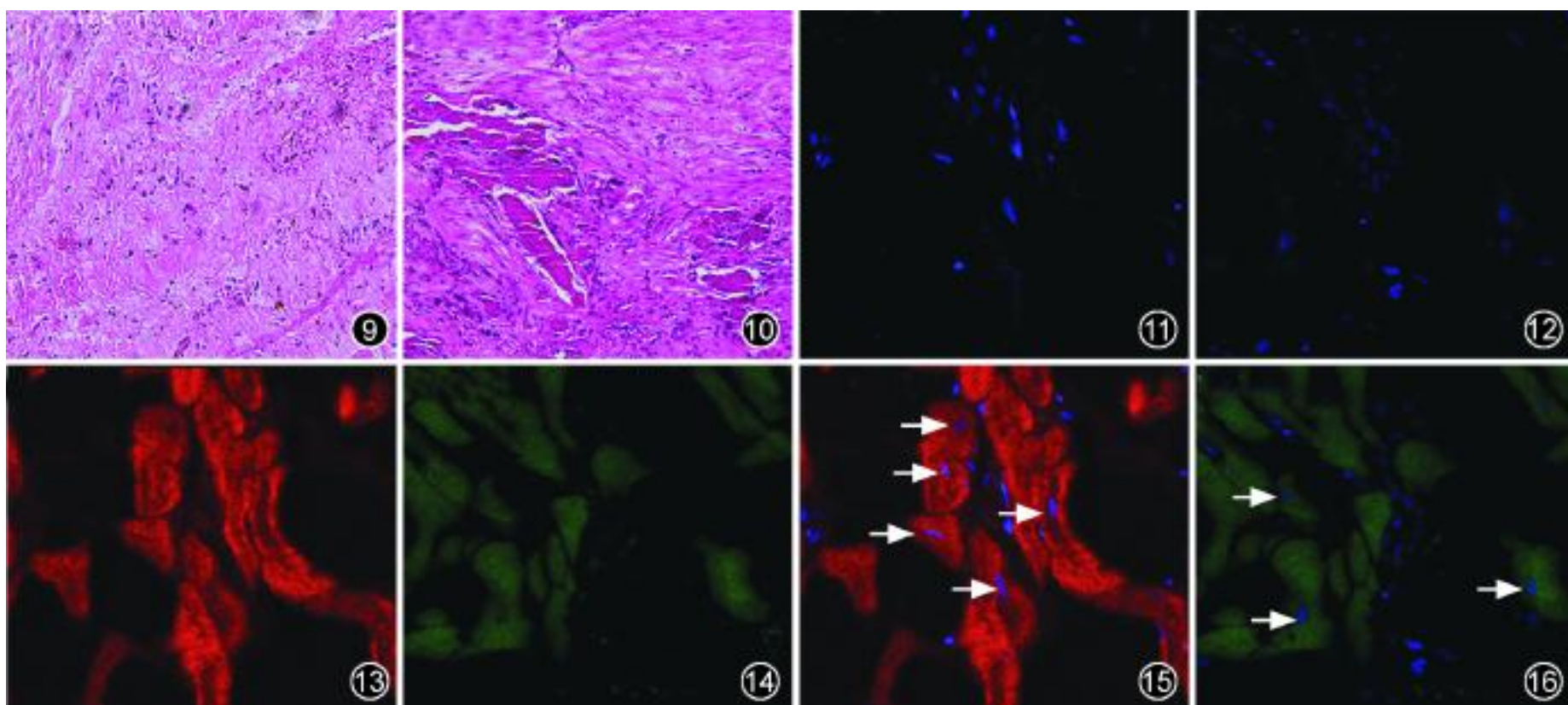


图 9,10 为对照组(图 9)与实验组(图 10)病理切片,可见对照组梗死区内严重纤维化和炎性细胞浸润,未见存活心肌;而在细胞移植组梗死区内纤维化则显著减轻,炎性细胞浸润减少,且可见散在的存活心肌(HE $\times 400$) 图 11~16 移植细胞在体分化的免疫荧光图片,图 11,12 为 4-6-二脒基二苯基吡啶(DAPI)所染而着蓝色的细胞核,即在移植之前已经用 DAPI 标记的干细胞(MSCs);图 13,14 为梗死区有心肌特异性的横纹肌肌动蛋白和心肌肌钙蛋白 T(cTn-T)亚单位的表达;图 15,16 为图 11,12 和图 13,14 的重叠,可见有部分心肌细胞核为蓝色着色,这些心肌细胞就是移植而来的 MSCs 分化而成(箭)

采用具有有效抑制呼吸运动伪影的 TSENSE TrueFISP 电影^[11]。TSENSE 技术不但使每 1 帧图像

的线圈敏感性信息与图像同时采集并参与 MR 图像的重组,减少了扫描时间,而且每 1 帧图像的线圈敏

感性信息自动校正,避免了因线圈移动、呼吸运动等所致的空间敏感性编码的偏移,减少伪影。虽然采用前瞻性心电门控技术,但研究表明,其与常规的屏气 GRAPPA TrueFISP 电影对心功能的评价无明显统计学差异^[11]。

尽管关于干细胞移植与分化机制的基础研究尚未取得一致的结果,但诸多干细胞移植的临床研究^[1,2,4,6]均认为干细胞移植可以改善心脏功能。本研究与国内外多个临床与动物实验研究结果基本一致^[2,4,6,12]。

2. 梗死面积变化:亮的即是死的 (bright is dead) 已经成为 MR 延迟增强序列判断梗死心肌的金标准^[9],由于 MRI 较正电子发射计算机断层摄影 (SPECT) 具有更高的空间分辨率,不但能够判断梗死的程度(心内膜下梗死或透壁性梗死),而且经后处理可以直接测量梗死面积。本研究采用了相位敏感反转恢复快速梯度回波序列,不必人工选择反转时间(TI),不但可以大大减少扫描时间,而且梗死心肌与存活心肌的对比要比传统无相位敏感反转恢复快速梯度回波对比鲜明。本研究发现,细胞移植组 6 周后梗死面积减少,梗死边缘变不规则,局部呈“锯齿”状改变,其机制可能与梗死区周边各部分干细胞分布或心肌再生不均有关。

3. 临床应用前景:多数 MSCs 的研究表明,移植骨髓间充质干细胞获得了令人鼓舞的阳性结果,但目前该方法仍处于临床实验阶段,国际上报道的成体干细胞治疗晚期心脏病患者仅数百例并缺乏长期随访。移植 MSCs 是否会导致心律失常、成瘤性^[13-14]甚至排斥反应等不良后果尚待更大规模临床观察的验证。本研究 Cine MRI 结合延迟增强扫描可作为 BM-MSCs 在体移植前后评价其治疗效果的可靠影像学方法,并经病理与免疫组织化学证实。

4. 本研究局限性:(1) 作为动物实验,其病理生理情况并不一定反映人体真实情况;(2) 随访时间为 6 周,无法评价 MSCs 移植的中远期效果;(3) 本研究样本量较小;(4) 因为实验材料所限,本研究未

能用超顺磁氧化铁粒子标记干细胞,无法用 MR 直接在体探测干细胞的动态分布情况。

参 考 文 献

- [1] Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2003, 108:2212-2218.
- [2] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 2004, 364:141-148.
- [3] 何苗, 祁春梅, 武维恒, 等. 骨髓间质干细胞治疗家猪急性心肌梗死的 SPECT 显像. *中华核医学杂志*, 2006, 26:165-167.
- [4] Sch chinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44:1690-1699.
- [5] 赵翠萍, 沈景霞, 方春晓, 等. 幼鼠骨髓干细胞移植对心肌梗死大鼠心功能影响的实验研究. *中华心血管病杂志*, 2006, 34: 591-592.
- [6] Assmus B, Sch chinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002, 106:3009-3017.
- [7] Limbourg FP, Ringes-Lichtenberg S, Schaefer A, et al. Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment. *Eur J Heart Fail*, 2005, 7: 722-729.
- [8] Cho SW, Gwak SJ, Kim IK, et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment enhances the efficacy of cellular cardiomyoplasty with transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in infarcted myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340:573-582.
- [9] Lauerma K, Niemi P, H nninen H, et al. Multimodality MR imaging assessment of myocardial viability: combination of first-pass and late contrast enhancement to wall motion dynamics and comparison with FDG PET-initial experience. *Radiology*, 2000, 217:729-736.
- [10] Stocum DL. Stem cells in CNS and cardiac regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 93: 135-159.
- [11] 赵世华, 陆敏杰, 张岩, 等. 1.5 T 高端 MR 在心血管病诊断中的应用. *中华放射学杂志*, 2005, 39:577-581.
- [12] van den Bos EJ, Thompson RB, Wagner A, et al. Functional assessment of myoblast transplantation for cardiac repair with magnetic resonance imaging. *Eur J Heart Fail*, 2005, 7:435-443.
- [13] Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, 2005, 65:3035-3039.
- [14] Cheng TM, Shi CM, Su YP. Spontaneous malignant transformation of adult stem cell in vitro culture proliferation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2005, 85:1883-1884.

(收稿日期:2007-09-28)

(本文编辑:任晓黎)