

· 基础研究 ·

超声联合一氧化氮微泡介导间充质干细胞移植对心肌梗死大鼠心功能的影响

卞叶萍 童嘉毅 沈祥波 陈龙 杨芳 徐艳娟 闫磊 罗丹 马根山 姚玉宇

【摘要】目的 探讨超声联合一氧化氮(NO)微泡介导间充质干细胞(MSCs)移植对心肌梗死大鼠心功能的影响,并探讨其可能作用机制。**方法** 选用冠状动脉左前降支结扎法制作心肌梗死模型大鼠 28 只,采用随机数字表法将其分为对照组(经尾静脉注入磷酸盐缓冲液)、MSCs 组(经尾静脉注入 MSCs)、普通微泡组(经尾静脉注入普通微泡,同时给予超声干预,然后经尾静脉注入 MSCs)及 NO 微泡组(经尾静脉注入 NO 微泡,同时给予超声干预,然后经尾静脉注入 MSCs),每组 7 只。各组大鼠分别经治疗 4 周后行 M 型心功能彩超检查,计数比较各组大鼠缺血心肌局部平均毛细血管密度,采用蛋白免疫印迹法及实时 PCR 检测各组大鼠心肌局部血管内皮生长因子(VEGF)表达。**结果** 治疗 4 周后发现 NO 微泡组射血分数 $[(56.27 \pm 3.66)\%]$ 较普通微泡组 $[(51.31 \pm 3.22)\%]$ 、MSCs 组 $[(45.81 \pm 3.37)\%]$ 及对照组 $[(43.66 \pm 4.79)\%]$ 均显著提高($P < 0.05$);NO 微泡组心肌缺血区域平均毛细血管密度 $[(45.96 \pm 9.01)$ 个/每高倍镜视野]较普通微泡组 $[(28.07 \pm 4.93)$ 个/每高倍镜视野]、MSCs 组 $[(21.41 \pm 5.27)$ 个/每高倍镜视野]及对照组 $[(18.04 \pm 4.82)$ 个/每高倍镜视野]均显著增加($P < 0.05$)。NO 微泡组 VEGF 相对表达量 (0.67 ± 0.024) 较普通微泡组 (0.54 ± 0.011) 、MSCs 组 (0.44 ± 0.020) 及对照组 (0.12 ± 0.009) 均显著增强($P < 0.05$)。**结论** 超声联合 NO 微泡介导 MSCs 移植治疗心肌梗死大鼠,能进一步提高模型大鼠心功能,其治疗机制可能与促进局部 VEGF 表达、加速梗死区域血管生成有关。

【关键词】 心肌梗死; 干细胞; 超声; 微泡; 一氧化氮

The effect of ultrasound and nitric oxide microbubbles-mediated mesenchymal stem cells transplantation therapy on cardiac function in rats with myocardial infarction BIAN Ye-ping*, TONG Jia-yi, SHEN Xiang-bo, CHEN Long, YANG Fang, XU Yan-juan, YAN Lei, LUO Dan, MA Gen-shan, YAO Yu-yu. * Jiangsu Province Official Hospital, Nanjing 210024, China

Corresponding author: TONG Jia-yi, Email: jytong888@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the effect and possible mechanisms of mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation therapy mediated by ultrasound in combination with nitric oxide (NO) microbubbles (MBs) on cardiac function in rats with myocardial infarction (MI). **Methods** Twenty-eight rats with MI were randomly divided into the following groups by use of random digits table: phosphate buffered saline group (injection of PBS into the tail vein), MSCs group (injection of MSCs into the tail vein), ultrasound + MBs + MSCs group (ultrasound intervention when injection of ordinary MBs into the tail vein followed by injection of MSCs) and ultrasound + NO MBs + MSCs group (ultrasound intervention when injecting NO-MBs into the tail vein followed by injection of MSCs) ($n = 7$, each group). After four weeks, the left ventricular systolic function was evaluated with M-mode ultrasound for each group, capillaries density of myocardial ischemic area was counted in each group, and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was detected by Western blot and real time PCR. **Results** The ejection fraction (EF) of NO-MBs group was significantly higher than the other groups ($P < 0.05$). The number of capillaries in NO-MBs group was also much more than that in the other groups ($P < 0.05$). The expression of VEGF in infarcted zone was much higher in the NO-MBs group than that in the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Ultrasound and NO MBs-mediated MSCs transplantation therapy could improve the cardiac function of rats after MI, and the possible mechanism was the upregulation of VEGF and angiogenesis.

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.07.004

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070265/H0222),高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20090092120059)

作者单位:210024 江苏,江苏省级机关医院(卞叶萍);东南大学附属中大医院内科(童嘉毅、沈祥波、陈龙、闫磊、徐艳娟、罗丹、马根山、姚玉宇);江苏省生物材料与器件重点实验室(杨芳)

通信作者:童嘉毅,Email:jytong88@yahoo.com.cn

【Key words】 Myocardial infarction; Stem cells; Ultrasound; Microbubbles agent; Nitric oxide

干细胞移植治疗能从根本上修复坏死、凋亡的心肌组织,改善心功能,开辟了心肌梗死治疗的新前景^[1-2],但如何进一步提高干细胞移植效率是目前亟待解决的问题。近年来有多项研究发现,超声联合微泡干预可增强干细胞移植疗效^[3-7],这些研究所用微泡均为内含全氟显气体的商品化微泡。本课题组前期成功制备出新型一氧化氮(nitric oxide, NO)微泡,且发现超声联合 NO 微泡在体外干预间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)安全、有效,未见明显副反应^[8]。基于上述背景,本研究联合采用超声及新型 NO 微泡介导 MSCs 移植治疗心肌梗死大鼠,并观察对心肌梗死大鼠心功能的影响,同时探讨其可能的作用机制。

材料与方法

一、大鼠 MSCs 分离培养及鉴定

参考文献[9-10]方法,从体外分离培养大鼠骨髓 MSCs,经形态学观察及流式细胞仪检测 CD34、CD45、CD29、CD44 表达从而鉴定细胞,取培养至第三代生长良好的 MSCs,经 0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司)消化、离心收集细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml 备用。

二、大鼠心肌梗死模型制作

参照文献[11]方法,取体重 200~250 g 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 Sprague-Dawley (SD)大鼠 28 只(由东南大学动物实验中心提供),经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,然后连接小动物呼吸机(上海产),开胸后结扎冠状动脉左前降支,并采用心电图、心肌酶谱等手段评价建模成功与否。

三、动物分组与干预

于制模 1 周后采用随机数字表法将 28 只心肌梗死模型大鼠分为对照组、MSCs 组、普通微泡组及 NO 微泡组,每组 7 只。参考 XU 等^[7]报道的方法,各组大鼠分别给予如下干预:首先建立大鼠尾静脉通路,对照组直接从尾静脉注射 2 ml 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)(美国 Gibco 公司产);MSCs 组直接将约 1×10^7 个 MSCs 用 2 ml PBS 液稀释,然后经尾静脉缓慢注入;普通微泡组首先经尾静脉按每千克体重注入 0.1 ml 普通声诺维微泡造影剂(上海博莱科信谊药业有限公司),注入微泡时启动超声治疗仪(北京产),超声干预参数设定为 1 MHz, 2 W/cm²,持续作用 10 min,然后将约 1×10^7 个 MSCs 用 2 ml PBS 液稀释,通过尾静脉缓慢注入;NO 微泡组 MSCs 移植方法及超声干预参数均与普通微泡组相同,仅将普通微泡替换为 NO 微泡(由江苏省生物材料与器件重点实验室提供)。

四、大鼠心功能检查

各组大鼠继续饲养 4 周后,采用 M 型超声心动图(美国 HP 公司)检测各组大鼠左室射血分数(ejection fraction, EF)以了解其心功能改善情况。

五、缺血心肌毛细血管密度检查

于超声检查结束后采用颈椎脱臼法处死大鼠,取心脏沿乳头肌短轴平面切片,行石蜡包埋、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。先在 50 倍显微镜下观察切片以确定血管高密度区,然后在 100 倍光镜下计数毛细血管数量,每只大鼠取 3 张染色切片,每张切片取 3 个典型视野,计算其平均值用以表示大鼠缺血心肌毛细血管密度。

六、血管内皮生长因子检测

1. 蛋白免疫印迹法(Western Blot, WB)检测:提取大鼠心肌组织总蛋白,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(美国 Bio-Rad 公司),转膜过夜后,再经 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)一抗(武汉博士德公司)4℃过夜,后加入辣根过氧化物酶抗体标记二抗,待室温孵育 1 h,洗涤后加入显影剂,暗室显影。采用 Quantity one 图像软件分析电泳条带 VEGF 表达量。

2. 实时 PCR 检测:采用 Trizol(美国 Invitrogen 公司)试剂提取大鼠心肌组织总 RNA 并测定纯度,进行第一链 cDNA 合成(美国 Fermentas 公司),随后加入到 Realtime PCR Master Mix(SYBR Green)(TOYOBO 公司)反应体系中进行扩增循环,PCR 反应条件如下:94℃反应 5 min,共进行 30 个循环(94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s),最后在 72℃条件下孵化 10 min。 β -actin 引物(136 bp)上游序列为:5'-GCAGAAGGAGATTACTGCCCT-3';下游序列为:5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'。VEGF 引物(94 bp)上游序列为:5'-GCAGCTTGAGTTA-AACGAACG-3';下游序列为:5'-AGTTCCCGAAAC-CCTGAG-3'。

七、统计学分析

本研究所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析,组间比较行单因素方差分析,组间两两比较采用 Student Newman Keuls (S-N-K)检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、治疗后各组大鼠一般情况观察及心功能检测

对照组在干预 2 d 后有 1 只大鼠死亡;MSCs 组在整个实验期间无大鼠死亡;普通微泡组在治疗当天有

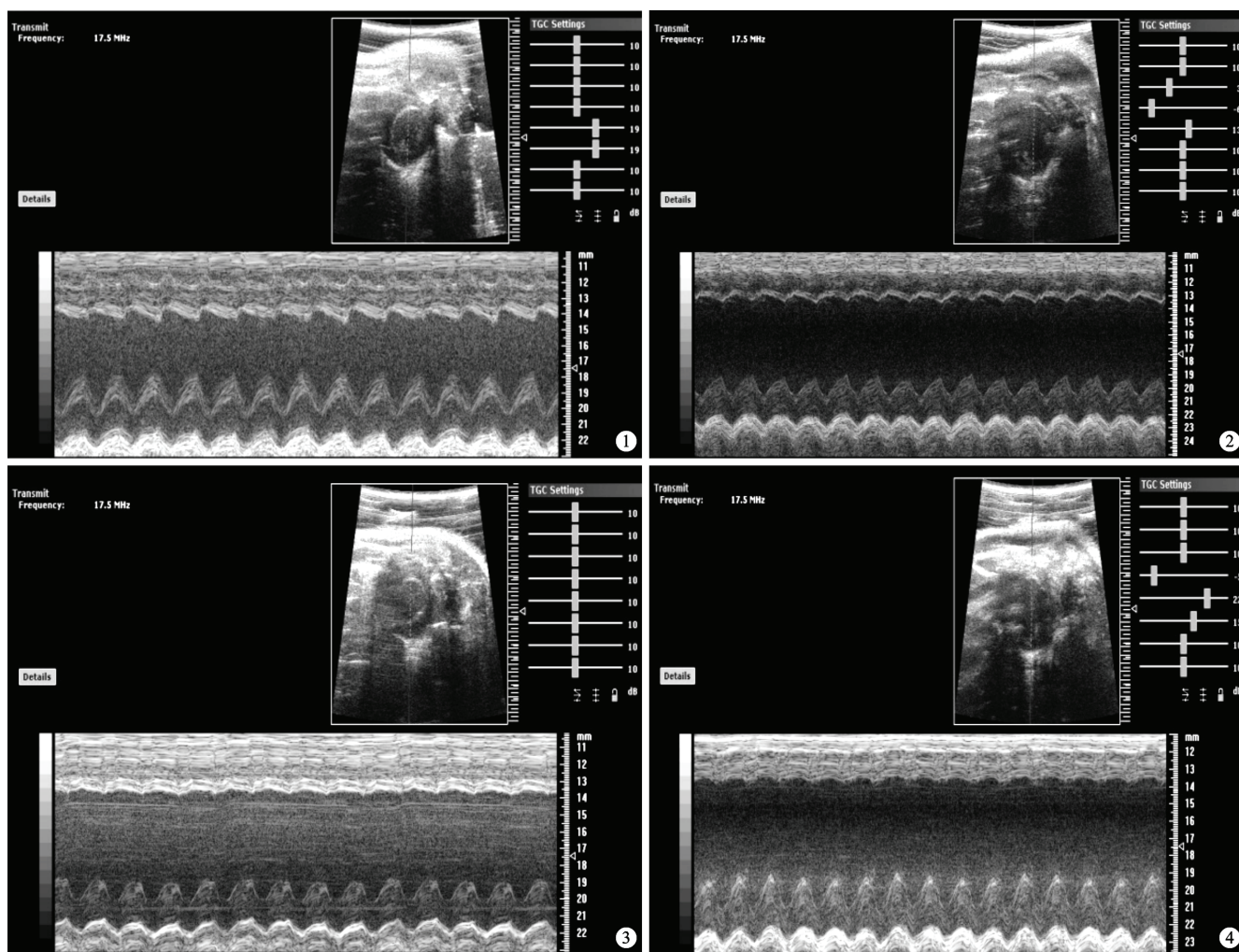


图 1 NO 微泡组 M 型心功能彩超图 图 2 普通微泡组 M 型心功能彩超图 图 3 MSCs 组 M 型心功能彩超图 图 4 对照组 M 型心功能彩超图

1 只大鼠死亡;NO 微泡组在治疗 20 d 时有 1 只大鼠死亡。于 MSCs 移植 4 周后采用 M 型超声心动图检查各组大鼠左室收缩功能,其结果详见图 1-4;进一步分析发现,NO 微泡组 EF 值 $[(56.27 \pm 3.66)\%]$ 较普通微泡组 $[(51.31 \pm 3.22)\%]$ 、MSCs 组 $[(45.81 \pm 3.37)\%]$ 及对照组 $[(43.66 \pm 4.79)\%]$ 均显著提高,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

二、治疗后各组大鼠缺血心肌毛细血管密度比较

NO 微泡组心肌缺血区域平均毛细血管密度 $[(45.96 \pm 9.01)$ 个/每高倍镜视野] 较普通微泡组 $[(28.07 \pm 4.93)$ 个/每高倍镜视野]、MSCs 组 $[(21.41 \pm 5.27)$ 个/每高倍镜视野] 及对照组 $[(18.04 \pm 4.82)$ 个/每高倍镜视野] 均显著增加,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

三、治疗后各组大鼠心肌 VEGF 表达比较

通过 Western Blot 电泳发现,NO 微泡组 VEGF 条带表达最强、范围最广(图 5);灰度定量分析结果显示,NO 微泡组 VEGF 相对表达量 (0.67 ± 0.024) 较普

通微泡组 (0.54 ± 0.011) 、MSCs 组 (0.44 ± 0.020) 及对照组 (0.12 ± 0.009) 均显著增强,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。实时 PCR 检查也得到类似结果,如 NO 微泡组 VEGF 相对表达量 (7.41 ± 0.43) 较普通微泡组 (2.91 ± 0.27) 、MSCs 组 (2.28 ± 0.29) 及对照组 (1.04 ± 0.08) 均显著增强,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

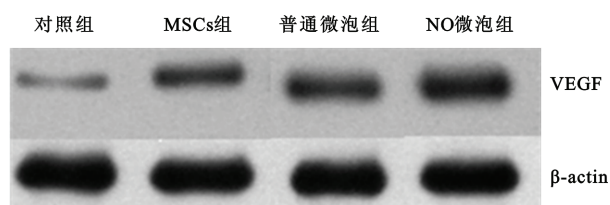


图 5 各组大鼠 Western Blot 电泳图分析

讨 论

心肌梗死后大量心肌细胞发生不可逆性坏死及纤维化,最终导致心功能持续恶化。相关研究表明,干细

胞移植能从根本上修复心肌梗死病灶,改善心功能,临床应用前景广阔^[1-2]。MSCs 因具有取材方便、多向分化潜能、低免疫原性等优点而成为广泛应用的种子细胞^[12-13],然而目前的移植技术并不能使 MSCs 达到足够理想的治疗效果,故如何进一步提高 MSCs 移植效率是目前亟待解决的重要问题之一。

超声微泡最初只是在超声诊断领域作为超声对比剂使用^[14],近年来多项研究发现,超声微泡在辅助干细胞移植治疗心肌梗死方面表现出较好的应用前景^[3-7]。超声辐照使微泡在心肌局部破裂,可提高局部血管通透性、增强相关细胞因子表达、促进梗死区域新生血管形成从而改善心功能^[15]。然而上述研究所用微泡均为内含全氟显气体的商品化微泡,鲜见有微泡携带对心血管系统具有保护性作用的气体。NO 是体内重要的第二信使,具有广泛的生理功能(特别是针对心血管系统)^[16],但由于 NO 半衰期短且极易被氧化,限制了其基础及临床应用。考虑到微泡是一种新型生物学载体^[17],本研究将 NO 包裹进微泡制成新型 NO 微泡;另外本课题组在前期体外研究中发现超声联合这种新型 NO 微泡对 MSCs 增殖、凋亡以及细胞周期等均无显著影响,提示该疗法对移植体内的 MSCs 无明显副作用^[8]。采用超声治疗组织损伤是近年发展起来的新技术,已有大量研究报道低强度聚焦超声在治疗不同类型慢性软组织损伤方面具有确切疗效^[18],但鲜见涉及治疗心肌梗死方面的基础及临床报道。基于上述背景,本研究拟联合应用超声及新型 NO 微泡介导 MSCs 移植治疗心肌梗死模型大鼠,并观察治疗后大鼠心功能改变,同时探讨其相关作用机制。

心肌梗死区域血管新生是一个非常复杂的过程,需多种因子对其进行调控,现已发现 VEGF 是重要的促血管新生因子^[19]。本研究结果显示,NO 微泡组大鼠经治疗后其心功能显著改善,明显优于普通微泡组、MSCs 组及对照组,同时 NO 微泡组心肌组织 VEGF 表达强度最高,其心肌缺血区域毛细血管密度亦较其余各组显著增加,由此推测超声联合 NO 微泡介导 MSCs 移植可能是通过促进局部 VEGF 表达,加速局部血管形成,改善心肌血流灌注等途径提高 MSCs 移植疗效。

综上所述,本研究结果表明超声联合 NO 微泡干预有助于 MSCs 移植疗效提高,进一步改善心肌梗死模型大鼠心功能,其治疗机制可能与增强局部 VEGF 表达,从而促进梗死区血管新生有关。需要指出的是,本研究仅在大鼠体内进行实验,且动物数量偏少,离临床研究及应用仍有相当距离,且超声干预的理想参数仍需进一步摸索,故所得结论具有一定局限性,需在后续实验中进一步完善、明确。

参 考 文 献

- [1] Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res*, 2001, 91: 92-102.
- [2] Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Stem cells after myocardial infarction. *Herz*, 2006, 31: 127-136.
- [3] 童嘉毅, 马根山, 冯毅, 等. 超声波促骨髓间充质干细胞心肌内归巢的实验研究. *中国心血管病研究*, 2008, 6: 771-773.
- [4] 李金鸽, 童嘉毅, 冯毅, 等. 超声辐照微泡增效骨髓间充质干细胞移植治疗心肌梗死. *中国组织工程与临床康复*, 2009, 13: 4421-4425.
- [5] Song X, Zhu H, Jin L, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances the efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation and cardiac function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36: 267-271.
- [6] Ghanem A, Steingen C, Brenig F, et al. Focused ultrasound-induced stimulation of microbubbles augments site-targeted engraftment of mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47: 411-418.
- [7] Xu YL, Gao YH, Liu Z, et al. Myocardium-targeted transplantation of mesenchymal stem cells by diagnostic ultrasound-mediated microbubble destruction improves cardiac function in myocardial infarction of New Zealand rabbits. *Int J Cardiol*, 2010, 138: 182-195.
- [8] Li P, Tong J, Yang F, et al. Effects and mechanisms of ultrasound-mediated nitric oxide microbubbles on migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Heart*, 2011, 97: s65.
- [9] 覃基政, 韩晓冬. 骨髓间充质干细胞体外培养及其归巢机制. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14: 7555-7559.
- [10] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytherapy*, 2006, 8: 315-317.
- [11] Bader M. Rat models of cardiovascular diseases. *Methods Mol Biol*, 2010, 597: 403-414.
- [12] Schuleri KH, Boyle AJ, Hare JM. Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, 180: 195-218.
- [13] Dai W, Hale SL, Martin BJ, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*, 2005, 112: 214-223.
- [14] Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol*, 1968, 3: 356-366.
- [15] 卞叶萍, 童嘉毅, 宋佳贤, 等. 超声联合微泡辅助干细胞移植治疗心肌梗死的研究进展. *中华物理医学与康复杂志*, 2012, 34: 627-629.
- [16] Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, et al. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci*, 2007, 81: 779-793.
- [17] Kang ST, Yeh CK. Ultrasound microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design. *Chang Gung Med J*, 2012, 35: 125-138.
- [18] 柳学勇, 冉春风, 刘盼, 等. 低强度聚焦超声与普通超声治疗创伤性膝关节炎的疗效比较. *中华物理医学与康复杂志*, 2011, 33: 927-929.
- [19] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep*, 2008, 41: 278-286.

(修回日期: 2013-03-26)

(本文编辑: 易 浩)