

# 心肌及冠状动脉内移植骨髓单个核细胞对猪缺血心肌侧支血管的生成☆

孙 林, 楚天舒, 白文伟, 汪丽琴, 张 戈, 阮志敏

## Angiogenesis of autologous bone marrow mononuclear cells by intramyocardial and intracoronary transplantation into ischemic myocardium of a swine model of acute myocardial infarction

Sun Lin, Chu Tian-shu, Bai Wen-wei, Wang Li-qin, Zhang Ge, Ruan Zhi-min

### Abstract

**BACKGROUND:** Current evidence exists that intramyocardial transplantation of bone marrow mononuclear cells can promote angiogenesis and blood supply in ischemic myocardium.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of intramyocardial and intracoronary transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium of a swine model of acute myocardial infarction.

**METHODS:** Twenty-two swine models of acute myocardial infarction were randomly divided into four groups. In the intramyocardial transplantation group, immediately after induction of acute myocardial infarction, autologous bone marrow mononuclear cell suspension was injected into the ischemic myocardium. In the intramyocardial transplantation control group, autologous bone marrow mononuclear cell suspension was replaced by Hank's balanced salt solution. In the intracoronary transplantation group, at 1 week after induction of acute myocardial infarction, autologous bone marrow mononuclear cell suspension was injected into the left coronary artery. In the intracoronary transplantation control group, autologous bone marrow mononuclear cell suspension was replaced by Hank's balanced salt solution.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 1 week after transplantation, there were no significant differences in serum levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor between intramyocardial transplantation group and intracoronary transplantation group. The serum levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in intramyocardial transplantation group or intracoronary transplantation group were significantly higher than those in corresponding control group ( $P < 0.01$ ). At 4 weeks after transplantation, there was no significant difference in blood vessel density between intramyocardial transplantation group and intracoronary transplantation group, but it was significantly higher than that in corresponding control group ( $P < 0.01$ ). These findings suggest that intramyocardial and intracoronary transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells can promote angiogenesis and collateral circulation formation in ischemic myocardium in the swines.

Sun L, Chu TS, Bai WW, Wang LQ, Zhang G, Ruan ZM. Angiogenesis of autologous bone marrow mononuclear cells by intramyocardial and intracoronary transplantation into ischemic myocardium of a swine model of acute myocardial infarction. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(23): 4263-4266.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 目前有研究表明, 心肌内直接注射骨髓单个核细胞可以使心肌梗死瘢痕区血管新生, 改善缺血心肌血供。

**目的:** 观察心肌内及冠状动脉内移植自体骨髓单个核细胞对猪急性心肌梗死后缺血心肌侧支血管生成的作用。

**方法:** 22只小型猪制备急性心肌梗死模型后分为4组: 心肌内移植组造模后即刻在缺血心肌内注射自体骨髓单个核细胞悬液; 心肌内对照组同样方法即刻心肌内注射 Hank's 平衡盐溶液; 冠状动脉内移植组在造模后1周, 左冠状动脉内注射自体骨髓单个核细胞悬液; 冠状动脉对照组在造模后1周, 同样方法左冠状动脉内注射 Hank's 平衡盐溶液。

**结果与结论:** 心肌内及冠状动脉内移植骨髓单个核细胞后1周, 血清碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子水平差异无显著性意义, 但明显高于各自对照组( $P < 0.01$ ); 移植后4周, 心肌内移植组与冠状动脉内移植组小血管密度差异无显著性意义, 但明显高于各自对照组( $P < 0.01$ ); 左室舒张末压差异无显著性意义, 但明显低于各组对照组( $P < 0.01$ )。提示心肌内及冠状动脉内移植骨髓单个核细胞均有助于促进猪缺血心肌血管新生及侧支循环形成。

**关键词:** 骨髓单个核细胞; 移植; 缺血心肌; 冠状动脉; 侧支循环; 猪  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.23.017

Department of Cardiovascular Medicine, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Room for Coronary Heart Disease Research, Yunnan Institute of Cardiovascular Disease, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Sun Lin☆, M.D., Associate professor, Department of Cardiovascular Medicine, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Room for Coronary Heart Disease Research, Yunnan Institute of Cardiovascular Disease, Kunming 650101, Yunnan Province, China  
sunlinkm@sina.com

Corresponding author: Ruan Zhi-min, Associate professor, Department of Cardiovascular Medicine, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Room for Coronary Heart Disease Research, Yunnan Institute of Cardiovascular Disease, Kunming 650101, Yunnan Province, China  
ruan\_zhimin@126.com

Received: 2011-11-17  
Accepted: 2012-02-11

昆明医学院第二附属医院心血管内科, 云南省心血管病研究所冠心病基础研究室, 云南省昆明市 650101

孙林☆, 女, 1972年生, 云南省宣威市人, 汉族, 2007年昆明医学院毕业, 博士, 副教授, 主要从事冠心病临床及基础的研究。  
sunlinkm@sina.com

通讯作者: 阮志敏, 副教授, 昆明医学院第二附属医院心血管内科, 云南省心血管病研究所冠心病基础研究室, 云南省昆明市 650101  
ruan\_zhimin@126.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225(2012)23-04263-04

收稿日期: 2011-11-17  
修回日期: 2012-02-11  
(20110817013/WL-S)

孙林, 楚天舒, 白文伟, 汪丽琴, 张戈, 阮志敏. 心肌及冠状动脉内移植骨髓单个核细胞对猪缺血心肌侧支血管的生成[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(23):4263-4266. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

目前研究表明, 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<sup>[1]</sup>, 使心肌梗死瘢痕区血管再生, 改善缺血心肌血供, 改善心脏功能<sup>[2]</sup>。

近年来, 在应用骨髓干细胞移植治疗冠心病的基础研究及部分临床研究中取得了令人鼓舞的结果, 但仍然有许多问题亟待解决, 例如: 干细胞移植的安全性, 细胞移植的最佳途径等。细胞移植途径选择心肌内直接注射, 移植的细胞可直接归巢到心肌, 效果确切, 但创伤较大, 临床上一一般配合外科搭桥手术同时进行<sup>[3]</sup>。经冠状动脉内移植是目前最常用的移植方式, 创伤较小, 可通过冠状动脉直接注射到达梗死区, 减少了干细胞的流失。

实验通过建立小型猪急性心肌梗死模型, 分离自体骨髓单个核细胞, 通过心肌内及冠状动脉内进行骨髓单个核细胞移植, 对比研究两种不同的移植途径对缺血心肌侧支血管生成的作用, 为骨髓干细胞移植治疗冠心病提供更多的实验依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2006-05/2007-04在昆明医学院实验中心完成。

**材料:** 小型猪22只, 体质量15~20 kg, 由昆明医学院动物科提供。

**实验方法:**

**急性心肌梗死模型制备:** 戊巴比妥钠30 mg/kg耳缘静脉麻醉小型猪, 无菌条件下开胸结扎冠状动脉左回旋支主要分支, 制成急性心肌梗死模型<sup>[4]</sup>。

**骨髓单个核细胞的提取、分离和标记:** 无菌条件下穿刺小型猪髂后上嵴, 抽取骨髓20~40 mL(心肌内移植组在造模前4 h抽取, 冠状动脉内移植组在造模后1周抽取)。采用密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞, 调整细胞浓度为 $2 \times$

$10^{11} \text{ L}^{-1}$ , 制成干细胞悬液1.0~2.0 mL, 保存备用。移植前加入浓度为50 mg/L的DAPI染色标记, 保存于4 °C冰箱, 染色标记后1 h内移植。

**实验分组及骨髓单个核细胞移植:** 22只小型猪分为4组: ①心肌内移植组( $n=6$ ): 造模后即刻在结扎点附近2 cm范围缺血心肌内分四点注射自体骨髓单个核细胞悬液共1 mL, 细胞数 $2 \times 10^8$ 。②心肌内对照组( $n=5$ ): 造模后, 用同样方法即刻心肌内四点注射Hank's平衡盐溶液共1 mL。③冠状动脉内移植组( $n=6$ ): 造模后1周, 静脉麻醉后在右腹股沟中点偏下1 cm处切开皮肤, 分离右侧股动脉采用Seldinger法置入5F动脉鞘, 用左冠状动脉造影导管找到左冠状动脉开口后, 在开口处缓慢注射自体骨髓单个核细胞悬液2 mL, 细胞数 $2 \times 10^8$ 。④冠状动脉对照组( $n=5$ ): 造模后1周, 用同样方法在左冠状动脉内注射Hank's平衡盐溶液2 mL。

**检测指标:** 移植前及移植后1周通过双抗体夹心ABC-酶联免疫吸附法测定血清碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子的浓度。

**小血管密度检查:** 移植后4周达实验终点处死动物, 取心脏标本, 体积分数为10%甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 用兔抗人VIII因子进行免疫组织化学染色, 光镜下每张切片随机计数10个高倍视野( $\times 100$ ), 分别计数小血管密度(直径 $< 50 \mu\text{m}$ ), 观察血管新生情况。

**冠状动脉造影检查:** 移植后4周及对照组术后4周分别行冠状动脉造影检查, 观察冠状动脉侧支血管形成情况, 造影中监测左室舒张末压。

**主要观察指标:** 心肌内及冠脉内骨髓单个核细胞移植后1周血清碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子水平, 移植后4周小血管密度及冠状动脉侧支循环形成情况。

**统计学分析:** 由第一作者采用SPSS 11.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析和均数间两两比较的方法, 两样本均数比较采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 纳入小型猪22只, 共死亡2只, 其中心肌内移植组及冠状动脉内移植组各死亡1只动物, 模型制备过程中死于室颤, 最终纳入20只动物进入实验。

**2.2 移植后1周各组碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子水平** 心肌内及冠状动脉内移植骨髓单个核细胞后1周, 血清碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子水平差异无显著性意义, 但明显高于各自对照组( $P < 0.01$ )。心肌内对照组碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子水平明显高于冠状动脉对照组( $P < 0.05$ ), 见表1。

表1 移植后1周各组碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子水平比较  
Table 1 Comparison of basic fibroblast growth (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) between groups at 1 wk after transplantation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ , ng/L)

Group	bFGF	VEGF
Intramyocardial transplantation control	48.62±9.21	41.58±9.38
Intramyocardial transplantation	138.34±17.24 <sup>a</sup>	121.07±19.94 <sup>a</sup>
Intracoronary transplantation control	22.52±8.82 <sup>b</sup>	20.34±6.27 <sup>b</sup>
Intracoronary transplantation	114.20±13.52 <sup>a</sup>	102.63±15.26 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs. corresponding control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. intramyocardial transplantation control group

**2.3 移植后4周各组小血管密度** 心肌内移植组与冠状动脉内移植组相比小血管密度差异无显著性意义, 但明显高于各自对照组( $P < 0.01$ ), 见表2。

表2 移植后4周各组小血管密度比较  
Table 2 Comparison of blood vessel density between groups at 4 wk after transplantation ( $\bar{x} \pm s$ , vessels/mm<sup>2</sup>)

Group	Blood vessel density
Intramyocardial transplantation control	46.33±8.21
Intramyocardial transplantation	91.13±11.04 <sup>a</sup>
Intracoronary transplantation control	38.21±6.05
Intracoronary transplantation	90.62±12.46 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs. corresponding control group

**2.4 冠状动脉造影结果** 心肌内及冠脉内移植骨髓单个核细胞后4周, 冠状动脉造影显示两组冠状动脉侧支循环形成效果相似, 心肌内及冠状动脉内移植组侧支循环形成较各自对照组明显, 冠状动脉侧支血流达3级, 即对比剂进入, 并使靶心外膜血管完全显影。心肌内移植组与冠状动脉内移植组移植后4周左室舒张末压差异无显著性意义, 但明显低于各组对照组( $P < 0.01$ ), 见表3。

表3 移植后4周各组左室舒张末压比较  
Table 3 Comparison of left ventricular end-diastolic pressure (LVDEP) between groups at 4 wk after transplantation ( $\bar{x} \pm s$ , kPa)

Group	LVDEP
Intramyocardial transplantation control	3.075±0.861
Intramyocardial transplantation	1.242±0.645 <sup>a</sup>
Intracoronary transplantation control	3.000±0.794
Intracoronary transplantation	1.056±0.608 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs. corresponding control group

## 3 讨论

目前有研究表明, 心肌内直接注射骨髓单个核细胞可以使心肌梗死瘢痕区血管新生, 改善缺血心肌血供。Kamihata等<sup>[5]</sup>结扎冠状动脉左前降支制成小型猪急性心肌梗死模型, 1 h后在梗死心肌周围的缺血心肌内注射骨髓单个核细胞总量 $1 \times 10^8$ , 3周后观察局部毛细血管密度显著增加, 心功能明显改善, 梗死面积缩小。冠状动脉造影发现细胞移植组侧支循环明显增加。通过mRNA水平检测发现骨髓单个核细胞移植组血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子及血管生成素1明显高于对照组, 该实验证实心肌内注射骨髓单个核细胞是安全有效的。Kanamori等<sup>[6]</sup>报道了通过结扎冠状动脉左回旋支第一分支制成小型猪急性心肌梗死模型, 模型制成后立即在梗死心肌周围的缺血心肌内多点注射自体骨髓单个核细胞( $1.2 \times 10^8$ ), 观察3周发现骨髓单个核细胞移植组血管密度增加, 心肌侧支循环及心功能明显改善。

本实验也得到了类似的研究结果。心肌内骨髓单个核细胞移植后4周, 移植组小血管密度明显高于对照组( $P < 0.01$ ), 冠状动脉侧支循环形成较对照组明显, 表明心肌内骨髓单个核细胞移植有助于促进缺血心肌血管新生, 促进侧支循环的建立。实验发现移植后1周血清碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子的浓度明显高于对照组及移植前水平( $P < 0.01$ ), 提示骨髓单个核细胞可能以自分泌或旁分泌的方式促进碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子的分泌, 从而促进血管生长<sup>[7-8]</sup>。心肌内对照组血清碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子的浓度虽然明显低于移植组, 但明显高于移植前水平( $P < 0.01$ ), 提示心肌内机械刺激也可促进碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子的分泌, 但远远不如心肌内骨髓单个核细胞移植后碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子升高的水平。

2001年德国杜塞尔多夫大学医学院Stauer等<sup>[9]</sup>进行了世界上首例经冠状动脉骨髓干细胞移植, 效果良好。经冠状动脉注射法是目前最常用的移植方式, 自从Stauer进行了第一例经冠状动脉骨髓干细胞移植, 众多的临床研究均采用该方法。在部分经冠状动脉细胞移植的实验报道中, 采用over-the-wire灌注球囊扩张阻断冠状动脉血流, 然后经球囊内通道快速注射骨髓细胞的移植方法, 持续阻断血流3 min左右, 目的是促进细胞进入冠状动脉微循环并贴壁, 并防止细胞被前向血流冲离冠状动脉系统<sup>[10]</sup>。但是在急性心肌梗死后, 较长时间阻断冠状动脉血流可能加重心肌损伤, 诱发室颤, 导致动物死亡, 因此实验采用经造影导管缓慢注射的方法, 达到了骨髓细胞到达心肌梗死区的目的, 使操作更加简便安全, 费用更低廉。

实验发现冠状动脉内骨髓单个核细胞移植后4周, 移植组小血管密度明显高于对照组( $P < 0.01$ ), 冠状动脉侧支循环形成较对照组明显, 表明冠状动脉内骨髓单个核细胞移植可以促进缺血心肌血管新生, 促进冠状动脉侧支循环的建立。移植后1周血清碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子的浓度明显高于对照组及移植前水平( $P < 0.01$ ), 提示骨髓单个核细胞可能以自分泌或旁分泌的方式促进了碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮细胞生长因子的分泌, 从而促进了血管新生。

本实验将冠状动脉内骨髓单个核细胞移植时间选择在急性心肌梗死后1周进行, 结果发现移植效果良好。部分研究者认为急性心肌梗死后1周左右的梗死区微环境有利于移植细胞归巢和临床作用的发挥<sup>[11-12]</sup>, 此时心脏处于修复期, 缺血心肌自身促血管生长因子如碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮细胞生长因子等表达达高峰, 能够放大移植的骨髓干细胞促血管生成效应, 更有利于缺血心脏的修复。经冠状动脉移植细胞分布比较分散, 与心肌内注射呈片状分布不同, 原因是经冠状动脉移植的细胞分布区域远远大于直接注射移植所分布的区域, 这种分布特点可能是经冠状动脉移植对局部梗死心肌的修复效果不如直接注射移植效果显著的原因之一。而本实验发现这两种途径移植效果差别不大, 可能与冠状动脉内移植的时机选择在心肌梗死后1周, 而心肌内移植时机是在心肌梗死后即刻, 后者炎症反应重, 可能影响了移植的效果, 表现出与冠状动脉移植效果差别不大。

心肌内直接注射效果确切, 多数移植细胞可以直接定植于心肌梗死区域, 但创伤较大, 经冠状动脉注射法创伤较小, 可通过冠状动脉直接注射到达梗死区, 是目前最常用的移植方式, 具有广阔的临床应用前景。

#### 4 参考文献

- [1] Silva GV. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111(2):150-156.
- [2] Goodchild TT, Robinson KA, Pang W, et al. Bone marrow-derived B cells preserve ventricular function after acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009; 2(10):1005-1016.
- [3] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361(9351):45-46.
- [4] Sun L, Xiong GC, Guang XF, et al. Kunming Yixueyuan Xuebao. 2006;27(3):1-3.  
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[J].昆明医学院学报,2006,27(3):1-3.
- [5] Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands and cytokines. *Circulation*. 2001;104(9):1046-1052.
- [6] Kanamori T, Watanabe G, Yasuda T, et al. Hybrid surgical angiogenesis: omentopexy can enhance myocardial angiogenesis induced by cell therapy. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(1):160-168.
- [7] Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003;361(9351):47-49.
- [8] Fang J, Chen L, Fan L, et al. Enhanced therapeutic effects of mesenchymal stem cells on myocardial infarction by ischemic postconditioning through paracrine mechanisms in rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2011, Jun 29. [Epub ahead of print]
- [9] Strauer BE, Brehm M, Zeus T. Myocardial regeneration after intracoronary transplantation of human autologous stem cells following acute myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001;126(34-35):932-938.
- [10] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002; 106(15):1913-1918.
- [11] Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002; 106(24):3009-3017.
- [12] 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 (9429):141-148.

#### 来自本文课题的更多信息—

**作者贡献:** 第一作者和通讯作者进行实验设计, 实验实施及成文为第一作者, 实验评估为第二、三作者, 资料收集为第四作者, 第五作者和通讯作者审校, 通讯作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。