

# 诱导多能干细胞移植后对急性心肌梗死小鼠心律的影响\*★

魏新伟<sup>1</sup>, 张晓刚<sup>2</sup>, 杨梁<sup>3</sup>

## Transplantation of induced pluripotent stem cells for cardiac rhythm in mice with acute myocardial infarction

Wei Xin-wei<sup>1</sup>, Zhang Xiao-gang<sup>2</sup>, Yang Liang<sup>3</sup>

### 文章亮点:

诱导多能干细胞移植后可引起室性早搏的发生, 但未见室速、室颤等恶性心律失常的发生, 可使小鼠梗死区心肌缝隙连接蛋白 43 的表达增加, 进而破坏梗死区域瘢痕所形成的折返环, 增加电位稳定性。

### Abstract

**BACKGROUND:** Induced pluripotent stem cells have been considered as a most promising method for treatment of ischemic heart disease. However, the safety and efficiency of transplantation of induced pluripotent stem cells require further investigation.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of induced pluripotent stem cells transplantation on cardiac rhythm of mice with acute myocardial infarction.

**METHODS:** Acute myocardial infarction mouse models were established and were then randomly divided into acute myocardial infarction group, acute myocardial infarction + saline group, acute myocardial infarction + induced pluripotent stem cells group, and acute myocardial infarction + fibroblasts group. At the same time, a normal control group was designated. The change in the cardiac rhythm of the limb lead II surface electrocardiogram of every group was examined by BL-420 biological function system at 5 minutes, 1, 2, 3 weeks after transplantation of induced pluripotent stem cells. The expression of connexin 43 in each group was detected by immunohistochemical staining and semi-quantitatively analyzed using Image Proplus software.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with acute myocardial infarction and acute myocardial infarction + fibroblast groups, the ratio of ventricular premature in the acute myocardial infarction + induced pluripotent stem cells group was obviously shortened and connexin 43 expression was significantly increased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between acute myocardial infarction group and acute myocardial infarction + fibroblast group. At 2 weeks after transplantation of induced pluripotent stem cells, the ratio of ventricular premature was significantly decreased, thereby the electrical activity of myocardial tissue was improved and the potential stability was enhanced, which leads to increase in connexin 43 expression. However, this phenomenon was not observed in mice receiving transplantation of fibroblasts.

Wei XW, Zhang XG, Yang L. Transplantation of induced pluripotent stem cells for cardiac rhythm in mice with acute myocardial infarction. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(32): 6037-6041.  
[<http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html>]

### 摘要

**背景:** 诱导多能干细胞被认为是治疗缺血性心脏病最具前景的一种方法, 但其移植的安全性、有效性仍需进一步研究。

**目的:** 探讨诱导多能干细胞移植后对急性心肌梗死小鼠心脏节律产生的影响。

**方法:** 建立 ICR 小鼠心肌梗死模型并将其随机分为急性心肌梗死组, 急性心肌梗死+生理盐水组, 急性心肌梗死+诱导多能干细胞组, 急性心肌梗死+成纤维细胞组, 同时设立正常对照组。各组分别于移植诱导多能干细胞 5 min、1 周、2 周、3 周后, 应用 BL-420 生物机能系统检测各组小鼠体表心电图肢体 II 导联心律的变化。免疫组化染色法检测各组小鼠心肌缝隙连接蛋白 43 的表达, 并应用 Image Proplus 软件进行半定量分析。

**结果与结论:** 与急性心肌梗死组和急性心肌梗死+成纤维细胞组比较, 移植 2, 3 周时急性心肌梗死+诱导多能干细胞组小鼠体表心电图 II 导联室性早搏发生率明显减少, 梗死心肌缝隙连接蛋白 43 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), 前两组相比差异无显著性意义。结果说明诱导多能干细胞移植 2 周后可明显减少梗死后小鼠室性早搏发生率, 进而改善心肌组织的电活动并增强其电位稳定性, 可使小鼠梗死心肌缝隙连接蛋白 43 的表达增加, 而成纤维细胞移植的小鼠中则未出现此现象。

**关键词:** 诱导多能干细胞; 移植; 急性心肌梗死; 心律; 室性早搏; 缝隙连接蛋白 43

魏新伟, 张晓刚, 杨梁. 诱导多能干细胞移植后对急性心肌梗死小鼠心律的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(32):6037-6041. [<http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html>]

<sup>1</sup>First Department of Cardiology, People's Hospital of Anyang, Anyang 455000, Henan Province, China; <sup>2</sup>Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; <sup>3</sup>ICU of Department of Internal Medicine, Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

Wei Xin-wei★, Master, Attending physician, First Department of Cardiology, People's Hospital of Anyang, Anyang 455000, Henan Province, China  
wxwzs720504@163.com

Corresponding author: Zhang Xiao-gang, M.D., Professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Supported by: Key Program of Medical Science and Technology Research of Chongqing Health Bureau, No. 20090151\*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.32.028

Received: 2012-02-21  
Accepted: 2012-04-18

<sup>1</sup> 安阳市人民医院  
心内一科, 河南省  
安阳市 455000;  
<sup>2</sup> 重庆医科大学附属  
第一医院心内  
科, 重庆市  
400016; <sup>3</sup> 成都市  
第三人民医院内  
科ICU, 四川省成  
都市 610000

魏新伟★, 男,  
1972年生, 河南  
省安阳市人, 汉  
族, 2011年重庆  
医科大学毕业, 硕  
士, 主治医师, 主  
要从事细胞或组  
织心脏移植的电  
生理学研究。  
wxwzs720504@  
163.com

通讯作者: 张晓  
刚, 博士, 教授,  
主任医师, 硕士  
生导师, 重庆医  
科大学附属第一  
医院心内科, 重  
庆市  
400016  
zxcg0233@  
sina.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344  
(2012)32-06037-05

收稿日期: 2012-02-21  
修回日期: 2012-04-18  
(20120221011/M · S)

## 0 引言

鉴于人类胚胎干细胞研究所引发的伦理学问题, 2006年, 日本Yamanaka研究小组将小鼠成纤维细胞成功诱导成多潜能干细胞<sup>[1]</sup>。之后, 诱导多能干细胞的研究和关注度呈爆炸式增长。利用诱导多能干细胞先后在镰刀形细胞贫血症、血友病A、帕金森病、糖尿病等动物疾病模型中进行细胞替代治疗<sup>[2-5]</sup>, 并取得了可喜的进展。这使得诱导多能干细胞在治疗急性心肌梗死方面表现出优越性, 成为当前心肌梗死治疗的研究热点。但是诱导多能干细胞移植治疗心肌损害也是一把双刃剑, 移植后不会发生恶性心律失常、甚至猝死? 这些问题尚需研究。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照观察性动物实验。

**时间及地点:** 实验于2009-09/2010-09在重庆医科大学动物中心实验室完成。

**材料:** 选取8~12周龄雄性ICR小鼠80只, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 体质量25~30 g, 首先取20只正常ICR小鼠为正常对照组, 然后将60只造模成功后的实验小鼠随机分为急性心肌梗死组、急性心肌梗死+生理盐水组、急性心肌梗死+诱导多能干细胞组、急性心肌梗死+成纤维细胞组, 每组15只。

**方法:**

**细胞的准备:** 本实验使用的小鼠诱导多能干细胞系(IP14D-4细胞, Oct-4-GFP<sup>+</sup>)购自中科院动物研究所北京干细胞库, 利用饲养层(SD胎鼠成纤维细胞)进行培养。常规复苏饲养层细胞, 加入高糖DMEM培养基+体积分数为10%胎牛血清, 按 $2 \times 10^6$ /孔接种于12孔培养板, 待细胞融合至90%以上时, 将诱导多能干细胞接种于铺有饲养层细胞的板孔中, 放置于37℃, 体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养12 h, 移植前在显微镜下计数备用。

**急性心肌梗死模型的建立:** 采用开胸后体式镜下永久结扎小鼠左冠状动脉前降支进行造模。10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉。采取

右侧卧位胶布固定, 气管切开后给予机械通气, 参数为呼: 吸比率为1:1, 频率是110次/min, 潮气量1.0~2.0 mL。然后于左前胸第四肋间水平进入胸腔, 小心剪开心包, 左冠状动脉前降支解剖定位于左心耳与右室流出道之间下方3~5 mm处, 体式镜下用8-0丝线穿过前降支近端及其下方少量肌束, 结扎后可见结扎血管供应区域心肌变为苍白, 体表心电图监测示相关至少2个导联ST段抬高大于0.1 mV。逐层关闭胸腔, 缝合胸部切口。观察动物恢复自主呼吸后, 关闭呼吸机。拔除气管插管, 单笼饲养, 注意保暖。手术后即刻及术后3 d, 肌肉注射青霉素 $8 \times 10^4$  U/d以预防感染。

**诱导多能干细胞的移植:** 用微量注射器吸取浓度为 $2 \times 10^{10}$  L<sup>-1</sup>的诱导多能干细胞悬液10 μL, 于结扎后30 min内, 在缺血坏死区周围分4个点, 每个点2.5 μL, 注射入心肌肌层。

**心电图及电生理检查:** 将3个1 mL注射器针头分别插入小鼠右上肢、左上肢及左下肢皮下, 依次连接红、白、黑色电极至多导电生理仪, 采用BL-420生物机能系统, 分别于各个时间点检测体表心电图肢体II导联小鼠心脏节律的变化, 所采集数据均经BL-420生物机能系统内部存储、测量、处理。

**取材及指标检测:** 末次电生理检查后, 迅速开胸切取心肌梗死区心肌组织, 用40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm厚连续切片, 免疫组织化学染色法检测心肌缝隙连接蛋白43的表达情况, 应用免疫组织化学图像分析系统(Image-Pro Plus)选择400倍下5个不同视野计算平均吸光度值, 取平均值作为缝隙连接蛋白43表达的相对量。

**主要观察指标:** 分别于诱导多能干细胞移植后5 min、1周、2周、3周用电生理仪记录体表心电图肢体II导联的心率及节律的变化, 观察有无室性早搏, 并进行记录及分析。用免疫组织化学染色方法对诱导多能干细胞移植后心肌梗死区组织学变化即心肌缝隙连接蛋白43平均吸光度值进行测定及分析。

**统计学分析:** 应用SPASS 16.0软件包进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用秩和检验(Kruskal-Wallis Test),  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

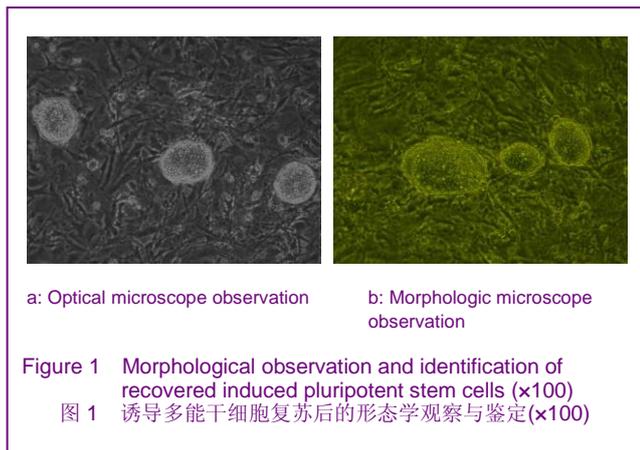
## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 建立小鼠急性心肌梗死模型手术过程中、手术1 h内因为操作不当或者手术并发症死亡的约占1/3, 术后1 d内死亡动物约占1/6, 手术后24 h内死亡动物不计入实验组, 未死亡动物入组, 不足样本量需补足。

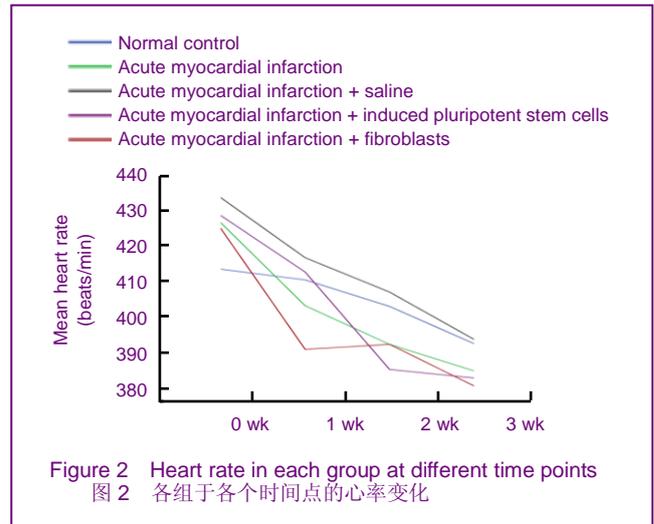
实验各亚组实际动物数目:

组别	实验	实验	实验
	1周	2周	3周
急性心肌梗死组	14	9	4
急性心肌梗死+生理盐水组	13	8	3
急性心肌梗死+诱导多能干细胞组	14	9	4
急性心肌梗死+成纤维细胞组	14	9	4

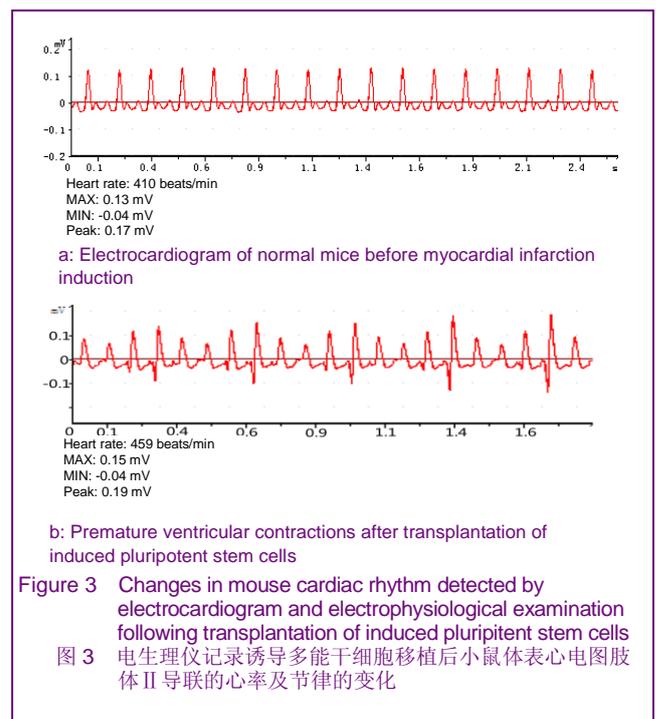
**2.2 诱导多能干细胞复苏后的形态学观察及鉴定** 光学显微镜下可见诱导多能干细胞形似鸟巢, 呈椭圆形或团状生长, 图1a。荧光显微镜下诱导多能干细胞发出绿色荧光, 图1b, 因所购小鼠诱导多能干细胞系为IP14-4细胞, 鉴定显示Oct-4-GFP<sup>+</sup>, 呈未分化状态。由于GFP由Oct-4基因启动, 而Oct-4是诱导多能干细胞诱导生成的重要转录因子之一, 移植后1周观察可见荧光已淬灭。采用ALP染液对诱导多能干细胞进行染色, 其胞质着红棕色或有咖啡色颗粒。



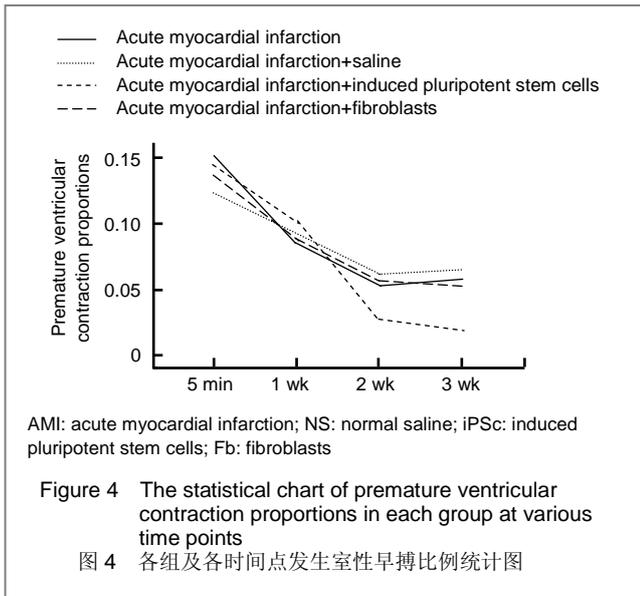
**2.3 诱导多能干细胞移植对急性心肌梗死组小鼠心率的影响** 急性心肌梗死+诱导多能干细胞组小鼠移植后5 min心率明显增快, 与其他组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 但诱导多能干细胞移植后1, 2, 3周心率与急性心肌梗死组相应时间点比较却明显变慢, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。急性心肌梗死+诱导多能干细胞组移植后3周心率与移植后2周比较则无明显差异, 见图2。



**2.4 诱导多能干细胞移植对急性心肌梗死小鼠室性早搏的影响** 诱导多能干细胞移植后5 min可记录到室性早搏, 见图3。



诱导多能干细胞移植后5 min, 各组数据秩和检验的(Kruskal-Wallis Test)得: 急性心肌梗死、急性心肌梗死+生理盐水、急性心肌梗死+诱导多能干细胞、急性心肌梗死+成纤维细胞4组之间差异无显著性意义( $P=0.068$ ); 移植后1周, 各组数据秩和检验(Kruskal-Wallis Test)得: 4组之间差异无显著性意义( $P=0.116$ ); 移植后2周, 急性心肌梗死+诱导多能干细胞组早搏数较其他3组明显减少, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 移植后3周, 急性心肌梗死+诱导多能干细胞与其他3组差异亦有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图4。



2.4 诱导多能干细胞移植后梗死心肌缝隙连接蛋白43的表达 免疫组织化学染色结果显示, 诱导多能干细胞移植后1周, 缺血坏死区周围可见诱导多能干细胞植入, 移植后2周, 急性心肌梗死+诱导多能干细胞组心肌梗死区缝隙连接蛋白43平均吸光度值(0.173±0.051)明显高于急性心肌梗死组(0.016±0.003,  $P < 0.05$ ), 而急性心肌梗死+成纤维细胞组缝隙连接蛋白43的表达(0.017±0.005)与急性心肌梗死组相比则差异无显著意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

急性心肌梗死是由于梗死相关冠状动脉闭塞引起冠状动脉血流和心肌需氧不平衡而导致心肌损害。通过特定的基因组合与转染可以将已分化的体细胞诱导重编程为多潜能干细胞<sup>[1]</sup>。此项新兴技术为干细胞移植治疗的研究注入了新的活力, 拥有巨大的潜在应用价值。但是诱导多能干细胞治疗心肌损害也是一把双刃剑。其有利的方面表现为: 首先, 诱导多能干细胞不仅使移植中的免疫排斥问题迎刃而解, 也绕开了人类胚胎干细胞研究带来的伦理问题。其次, 有研究发现, 将诱导多能干细胞移植入急性心肌梗死模型小鼠心脏后, 诱导多能干细胞在2周后实现融合, 4周后明显有助于改善受损心脏的结构和功能。相比之下, 普通成纤维细胞则无此功效<sup>[6]</sup>。诱导多能干细胞能够阻止受损心脏功能损伤进程, 并在心脏受损部位再生组织<sup>[6]</sup>。其不利的因素表现为: 移植后可能导致畸胎瘤生成<sup>[7]</sup>。再者移植后是否产生恶性心律失常? 甚至猝死? 这些问题都需要一一解答。

虽从诱导多能干细胞生成机制来看, 很容易形成致瘤性, 有研究发现c-Myc基因的导入具有明显的致瘤性<sup>[8]</sup>。但无论动物还是人类体内心肌发生肿瘤很少, 临床上的观察亦证实了这一点。考虑其原因可能为心脏不断收缩产生电活动, 机械活化作用可抑制心肌肿瘤产生; 另外心肌处在一个高分化细胞环境中, 不易形成肿瘤。本实验从小鼠心肌形态学实验结果观察看,  $2 \times 10^{10} L^{-1}$ 浓度的诱导多能干细胞移植后实验小鼠可正常存活, 未致造模后小鼠心肌发生肿瘤。说明采用一定数量级诱导多能干细胞直视下移植是安全的。没有室速、室颤等恶性心律失常的发生。

诱导多能干细胞移植后引发的室性早搏的原因分析: ①触发活动: 诱导多能干细胞悬液注射本身就是一种不良刺激, 从而引发炎症反应, 导致局部触发活动。其次因为移植区域为梗死边缘区, 其细胞具有电生理的异质性, 容易引起电活动紊乱, 进而导致室性早搏发生。②自律性增加: 诱导多能干细胞移植后其固有起搏能力虽不能克服正常节律, 但密度较高的区域可能具有起搏潜能, 从而自律性增加, 导致室性早搏。③折返形成: 由于诱导多能干细胞与宿主心肌细胞动作电位的异质性, 以及多点移植均有可能造成折返形成, 从而引发室性早搏的发生。

诱导多能干细胞移植后未发生室速、室颤的原因分析: ①一定数量级诱导多能干细胞悬液多点注射所造成不良刺激相对较弱, 引发炎症反应不足以引起宿主电活动严重紊乱。②诱导多能干细胞可以通过旁分泌作用调整效应持续时间, 而心肌细胞也具有旁分泌作用调整存活诱导多能干细胞离子通道的作用<sup>[9]</sup>, 从而降低诱导多能干细胞致恶性心律失常发生的可能。任何关于诱导多能干细胞导致心律失常的作用都不能忽略诱导多能干细胞同时具有潜在抗心律失常的事实。这种抗心律失常作用主要源于它具有改善缺血、减少梗死心肌面积以及改善左室重构的作用, 由此控制内源性心律失常发生。

从诱导多能干细胞移植的有效性方面来看: 诱导多能干细胞能够恢复心脏病发作后缺失的心肌功能, 阻止受损心脏功能损伤进程, 并在心肌受损部位再生组织<sup>[2]</sup>。而成纤维细胞移植后则无此功效。本实验证实了诱导多能干细胞移植后可明显减少小鼠急性心肌梗死后室性早搏的发生率, 从电生理角度进一步证实了诱导多能干细胞移植后可改善小鼠梗死心肌组织的电活动并增强其电位稳定性。更有新近的研究报道将1型长Q-T间期综合征家族患者的皮肤成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞, 其不仅分化为心肌细胞, 还保持了心肌细胞特殊的

电生理特性及遗传病基因的特征<sup>[10]</sup>。

由缝隙连接蛋白43构成的缝隙连接通道是心肌细胞之间实现电耦联及化学信息交换的重要结构基础,其主要作用是形成细胞间快速的电冲动,保证心脏整体电活动同步性和协调性<sup>[11-12]</sup>。缝隙连接蛋白43发生重构,必然会引起心肌细胞的电耦联障碍,导致室性心律失常的发生<sup>[13]</sup>。目前诱导多能干细胞移植后能否与宿主细胞形成一个有收缩功能的相对电独立体系,尚缺乏系统观察。移植细胞与宿主心肌是否能够产生缝管连接,目前的研究结果尚未报道。本实验初步证实了诱导多能干细胞移植后可使小鼠心肌梗死区心肌缝隙连接蛋白43的表达增加。可能是诱导多能干细胞移植后增加电活动稳定性主要原因之一,也与未引起恶性心律失常具有一定关系。

综上所述,诱导多能干细胞一定数量级移植后可正常存活,未见宿主心肌发生肿瘤。再者移植后可引起室性早搏的发生,但未见室速、室颤等恶性心律失常的发生。其次可使小鼠心肌梗死区心肌缝隙连接蛋白43的表达增加,进而破坏梗死区域瘢痕所形成的折返环,增加电位稳定性,可能与诱导多能干细胞移植后未引起恶性心律失常具有一定关系。但其临床应用之路还很漫长,有许多技术难题亟待解决:如诱导多能干细胞移植后的致瘤性<sup>[7]</sup>;提高诱导多能干细胞的转化率,为其临床应用提供最佳的种子细胞;建立高效、安全、实用的制备人诱导多能干细胞的方法等。诱导多能干细胞移植对心律失常的影响及临床使用的有效性和安全性,还需要进一步大规模的临床试验证实。

#### 4 参考文献

- [1] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.
- [2] Tateishi K, He J, Taranova O, et al. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 2008;283(46):31601-31607.
- [3] Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009;137(1):13-17.
- [4] Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2009;120(5):408-416.
- [5] Chen Y, Amende I, Hampton TG, et al. Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(4):H1653-1658.
- [6] Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2009;120(5):408-416.
- [7] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313-317.
- [8] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 2009;461(7260):86-90.
- [9] Boink GJ, Rosen MR. Regenerative therapies in electrophysiology and pacing: introducing the next steps. *J Interv Card Electrophysiol*. 2011;31(1):3-16.
- [10] Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1397-1409.
- [11] Park DJ, Freitas TA, Wallick CJ, et al. Molecular dynamics and in vitro analysis of Connexin43: A new 14-3-3 mode-1 interacting protein. *Protein Sci*. 2006;15(10):2344-2355.
- [12] Haider HKH, Ashraf M. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):H2557-2567.
- [13] Amino M, Yoshioka K, Tanabe T, et al. Heavy ion radiation up-regulates Cx43 and ameliorates arrhythmogenic substrates in hearts after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2006;72(3):412-421.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 重庆市卫生局医学科学技术研究重点项目(20090151), 课题名称“细胞或组织心脏移植的电生理研究”。

**作者贡献:** 第一作者进行实验设计、实验实施及评估, 资料收集为第一、二作者。第一作者成文, 通讯作者审校, 第一作者及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。

**文章要点:** 诱导多能干细胞移植后能改善急性心肌梗死小鼠受损心脏的结构和功能, 但其移植的安全性、有效性尚需评估, 其移植后对心脏电活动稳定性及心脏节律的影响尚不明确。诱导多能干细胞移植治疗心肌损害也是一把双刃剑, 移植后会不会发生恶性心律失常、甚至猝死? 这些问题尚需研究。