

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.43.021 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

孙娟, 陈晓洋, 张玲, 黄焰. 心肌细胞与胶原材料复合再造组织工程心肌移植心肌梗死大鼠的心肌电生理变化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(43): 8078-8082.

心肌细胞与胶原材料复合再造组织工程心肌移植心肌梗死大鼠的心肌电生理变化*☆

孙娟¹, 陈晓洋², 张玲¹, 黄焰³

¹ 新疆医科大学第一附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; ² 新疆维吾尔自治区人民医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001; ³ 上海华东医院, 上海市 200040

孙娟☆, 女, 1979年生, 陕西省西安市人, 汉族, 2009年新疆医科大学毕业, 博士, 主要从事心律失常的诊断及机制研究。sunjuandee@126.com

并列第一作者: 陈晓洋, 男, 1978年生, 陕西省西安市人, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 俄罗斯族, 2002年石河子大学毕业, 主治医师, 主要从事心脏电生理研究。ShouWANGZHE2046@sina.com

通讯作者: 黄焰, 博士, 副教授, 副主任医师, 上海华东医院, 上海市 200040 yhuang_look@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344(2012)43-08078-05

收稿日期: 2012-01-21
修回日期: 2012-03-15
(2011102502/GW·T)

文章亮点: 应用微电极阵列标测技术分析心肌细胞与胶原材料复合组织工程再造心肌移植心肌梗死大鼠的心肌电生理特性, 发现移植的心肌细胞/胶原复合体能改善心肌梗死大鼠心室肌的收缩功能及电传导时间, 部分修复心脏功能。

关键词: 微电极阵列标测技术; 心肌梗死; 胶原; 组织工程心肌; 场电位; 激活-恢复时间

缩略语: 微电极阵列标测技术: microelectrode arrays, MEA

摘要

背景: 组织工程化心肌组织移植可修复大鼠心肌梗死。

目的: 应用微电极阵列标测技术分析心肌细胞与胶原材料复合组织工程再造心肌移植心肌梗死大鼠的心肌电生理特性。

方法: 将成年 SD 大鼠随机分组: 假手术组、模型组、移植组。后 2 组制作心肌梗死动物模型, 假手术组仅开胸不结扎冠状动脉, 移植组造模后移植心肌细胞与胶原材料复合组织。应用微电极阵列标测技术记录心室肌场电位振幅, 激活-恢复时间及激动传导时间。

结果与结论: ①心室肌场主波振幅: 与模型组相比, 移植组梗死区、对立区及周围区部位增高($P < 0.05$)。②激活-恢复时间: 模型组与移植组梗死区与梗死周边区均明显延长, 且梗死周边区小于梗死区($P < 0.05$)。与模型组相比, 移植组梗死区、对立区及周围区部位激活-恢复时间缩短($P < 0.05$)。③心室前壁激动传导时间: 移植组高于假手术组, 但低于模型组($P < 0.05$)。表明移植的心肌细胞/胶原复合体能改善心肌梗死大鼠心室肌收缩功能及电传导时间, 部分修复心脏功能。

Electrophysiological changes following transplantation of tissue engineered myocardial tissue constructed by the compound of myocardial cells and collagen materials in rats with myocardial infarction

Sun Juan¹, Chen Xiao-yang², Zhang Ling¹, Huang Yan³

Abstract

BACKGROUND: Transplantation of tissue engineered myocardial tissue can repair myocardial infarction in rats.

OBJECTIVE: To study the electrophysiological characteristics after the transplantation of tissue engineered myocardial tissue.

METHODS: Thirty SD rats were evenly divided into three groups: control group, model group and transplantation group. A rat model of myocardial infarction was established in the latter two groups. The control group underwent thoracotomy with no ligation of the coronary artery. The transplantation group was transplanted with the compound of myocardial cells and collagen materials after modeled. Amplitude, activation-recovery interval and activation-conduction duration at local myocardium were recorded with microelectrode arrays technique.

RESULTS AND CONCLUSION: ①Compared with the model group, the stationary field amplitude of ventricular myocardium in infarction zone, opposite zone and border zone in the transplantation group were significantly increased ($P < 0.05$). ② Activation-recovery interval in the model group, as well as infarction zone and infarcted border zone in the transplantation group were prolonged variously ($P < 0.05$). While the activation-conduction duration of infarction zone, opposite zone and border zone in the transplantation group were shorten compared with the model group. ③In terms of the activation-conduction duration of left ventricular anterior wall, the transplantation group was higher than the control group, but lower than the model group ($P < 0.05$). These findings suggest that the compound of myocardial cells and collagen materials transplanted can improve the contractile function of the ventricular muscle and electrical conduction time, as well as repair the heart partly.

Sun J, Chen XY, Zhang L, Huang Y. Electrophysiological changes following transplantation of tissue engineered

myocardial tissue constructed by the compound of myocardial cells and collagen materials in rats with myocardial infarction. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(43): 8078-8082.

0 引言

组织工程的目标是结合细胞、生物材料和生物活性分子来制造、修复甚至替代组织和器官。心肌组织工程是组织工程研究领域的热点之一。组织工程技术的核心是利用工程学和生命科学原理与方法,在对细胞进行体外培养的过程中,模拟体内组织发生环境,建立由细胞和生物材料构成的三维空间复合体。这三维空间结构既是细胞生长代谢的场所,也是细胞分化形成新的具有形态和功能组织与器官的基础。微电极阵列技术(microelectrode arrays, MEA)是60位点非侵入性记录组织动作电位的新技术,该技术直接反映电极接触部位心肌细胞的电生理活动,突破了单、双极动作电位记录技术不能有效反映细胞间电信号传导信息的限制^[1]。目前尚未见应用MEA技术研究组织工程化心肌组织进行大鼠心肌梗死部位移植修复心脏功能的研究。本实验采用新生大鼠心肌细胞为种子细胞,复合液态I型鼠尾胶原材料进行组织工程化心肌组织的构建并进行移植,应用MEA技术测定移植的心肌细胞/胶原复合体对心肌梗死大鼠心室肌电生理特性的影响。

1 材料和方法

设计: 随机分组动物实验。

时间及地点: 于2010至2012年在新疆维吾尔自治区人民医院及新疆医科大学第一附属医院完成。

材料:

实验动物及分组: ①健康雌性成年SD大鼠30只,体质量220-250 g。随机分3组:假手术组、模型组、移植组,每组10只。假手术组及模型组大鼠由新疆医科大学动物实验中心提供,动物质量属于一级标准;移植组动物由解放军军事医学科学院动物中心提供。②新生一二天Wistar大鼠100只,由解放军军事医学科学院动物中心提供,动物质量属于一级标准。

改良台式液成分: NaCl 144 mmol/L; KCl 5.0 mmol/L; CaCl₂ 1.8 mmol/L; MgCl₂ 1 mmol/L; NaH₂PO₄ 0.33 mmol/L; glucose 10 mmol/L; HEPES 5.0 mmol/L; pH 值7.4。

主要试剂和仪器:

试剂与仪器	来源
DMEM、胰酶、基底膜基质	美国 Sigma 公司
鸡胚抽提物	自制
胎牛血清	北京元亨圣马生物技术研究所
微电极阵列系统	Microelectrode arrays MEA60 System, MCS GmbH, 德国
心肌细胞/胶原复合物铸膜装置	解放军军事医学科学院基础医学研究所组织工程中心自制

实验方法:

I型胶原的制备: I型胶原参照文献[2]制备。从移植组SD大鼠尾根部切断鼠尾,置于体积分数75%乙醇中浸泡30 min; 无菌条件下撕下尾腱,剪碎。取1.5 g尾腱碎片浸入150 mL 0.1%的醋酸中,置4 °C冰箱,用磁力搅拌机进行搅拌。48 h后离心收集上清即得胶原溶液。制备的胶原溶液用电子天平称出其中所含的胶原量约为1.9 g/L。

心肌细胞的分离^[3]: 新生Wistar大鼠100只,于体积分数75%乙醇中浸泡处死。无菌条件下取心室肌组织,剪成1 mm³大小,置于培养瓶中,用DMEM清洗2次。加入0.1% 胰酶置于37 °C水浴中消化8 min,轻轻吹打组织,吸取上清,加入血清终止消化。剩余组织重复以上操作,直到组织消化完全。用200目不锈钢网过滤收集上清,离心收集细胞,加入含体积分数10%血清的DMEM培养液,用吸管吹打均匀后放置于体积分数5% CO₂、37 °C培养箱中培养1 h,以去除成纤维细胞。收集未贴壁细胞,其中主要为心肌细胞。

组织工程化心肌条带的制备: 1.9 g/L液态I型胶原与2×DMEM等比例混合,用0.1 mol/L NaOH调为中性,再加入10%基底膜基质。将心肌细胞与上述混合物混合,使其终浓度为2×10¹⁰ L⁻¹;

¹First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China

Sun Juan☆, Doctor, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
sunjuandee@126.com

Chen Xiao-yang, Attending physician, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
ShouWANGZHE2046@sina.com

Sun Juan and Chen Xiao-yang contributed equally to this study.

Corresponding author: Huang Yan, Doctor, Associate professor, Associate chief physician, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China
yhuang_look@126.com

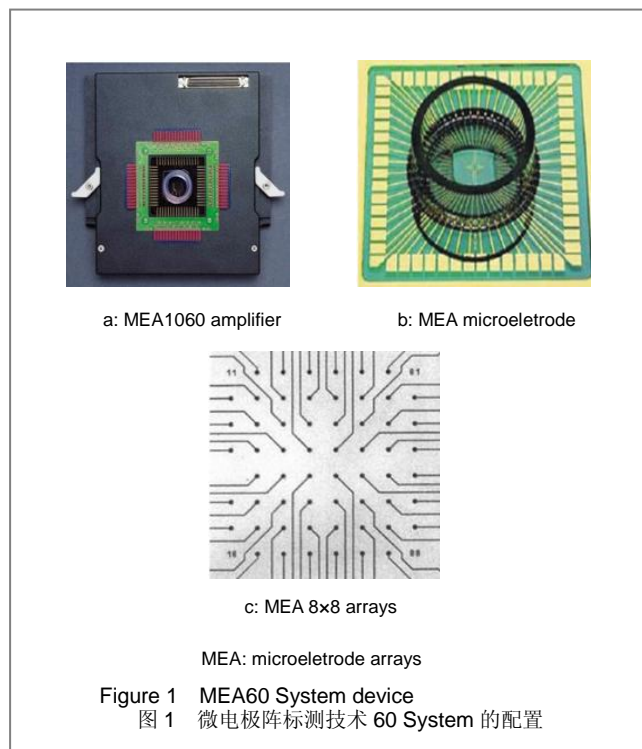
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30960105*

Received: 2012-01-21
Accepted: 2012-03-15

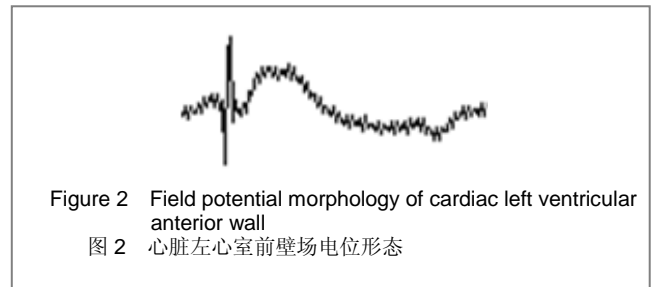
加入环形槽中, 置体积分数5% CO₂、37 °C培养箱中, 60 min后加入培养液。心肌细胞/胶原混合液即可在槽中凝固成带状的心肌细胞/胶原复合物。共制备15条心肌条带。心肌条带在槽中培养7 d后, 移出复合物条带, 条带套在静态拉伸装置的两平行金属圆杆上, 调整两金属杆间距离, 使条带受到幅度为10%的静态拉伸, 并继续体外培养7 d^[4]。

大鼠心肌梗死模型的制作: 将模型组与移植组SD大鼠采用10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)静脉滴注麻醉, 仰卧固定于实验台上, 沿胸骨正中开胸, 剪开心包, 充分暴露心脏, 在左心耳至心尖的1/2处以5-0号无菌缝线结扎前降支, 以心电图 I、II、aVL导联ST段抬高0.1 mV作为手术成功的标志。缝合切口后置笼中饲养, 1周后移植组大鼠再次开胸, 暴露心脏左心室前壁, 分离心包与心肌梗死区粘连, 将组织工程化心肌条带用1号丝线将其四角缝合至心肌梗死区, 使之与梗死区紧密相贴。假手术组大鼠仅开胸, 不结扎冠状动脉。各组造模后给予常规饲料4周后行相关电生理检测。

MEA系统记录场电位: MEA是在一块50 mm×50 mm的透明石英玻璃中央0.78 mm×0.78 mm区域以8×8阵列的形式镶嵌入60个氮化钛电极, 电极尖端直径10 μm, 相邻电极间隔100 μm。电极由绝缘导线连接向外延伸, 连接放大器。将Ag/AgCl电极置于灌流液中作为参考电极, 见图1。



使用软件MC-Rack处理场电位参数, 见图2。



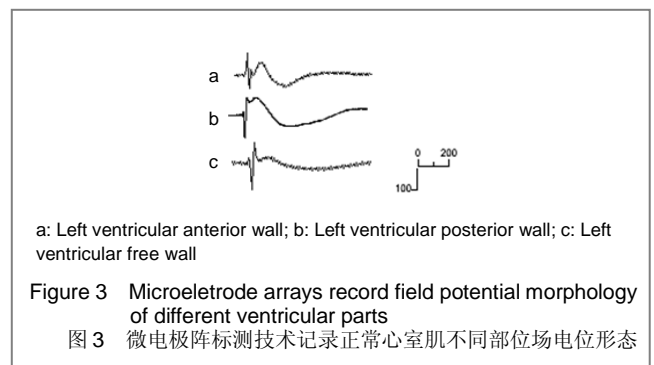
大鼠水合氯醛(3 mL/kg)腹腔麻醉, 5-7 min后开胸剪取心脏, 用Langendorff灌流心脏模式、速度以1.5 mL/min灌注心脏, 将心脏放入MEA可灌流电极阵皿, 由TCO2温控仪控温在37 °C下, Langendorff心脏灌流30 min, 自发窦性节律稳定后观察大鼠整体心脏, 记录局部心室肌场电位形态。

主要观察指标: 各组心室肌场电位振幅及激活-恢复时间与激动传导时间。

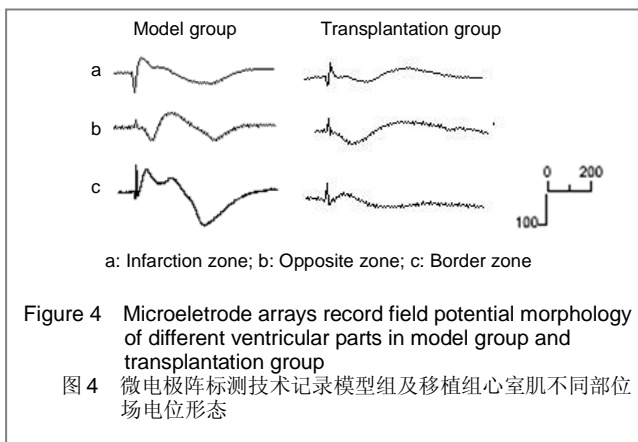
统计学分析: 用SPSS 13.0统计软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用完全随机化设计两独立样本的t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。心室肌不同部位电生理指标比较采用单因素方差分析检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

- 2.1 实验动物数量分析 30只SD大鼠均进入结果分析。
- 2.2 模型制作结果 在造模成功4周后, 解剖心脏, 模型组可见梗死区颜色苍白, 与非梗死区分界明显, 表明心肌梗死模型制作稳定; 移植组可见组织工程化心肌条带覆盖梗死区, 部分心肌条带与心肌梗死区融合成一体。
- 2.3 正常心脏组织不同部位场电位形态及激活-恢复时间 正常大鼠心室除极波形多为三向波, 呈RS、rSR'型。左心室主波振幅值(485.00±21.21) mV。前壁激活-恢复时间为(235.00±7.07) ms, 后壁激活-恢复时间为(241.70±7.64) ms, 游离壁激活-恢复时间为(235.00±5.00) ms, 见图3。



2.4 模型组及移植组心室肌不同部位场电位形态、振幅及激活-恢复时间 心肌梗死大鼠心室不同部位除极波形差异较大。模型组心室前壁以QR或qR为主, R波圆钝, 振幅(135.00±7.07) mV; 心室后壁及游离壁以R波为主, 振幅分别为(175.00±15.00), (92.50±15.54) mV。心肌梗死区心室肌除极及复极时间明显延长, 激活-恢复时间达到(390.00±26.77) ms。在心室肌不同部位, 模型组梗死区激活-恢复时间明显延长, 梗死周边区激活-恢复时间也延长, 但小于梗死区激活-恢复时间($P < 0.05$)。移植组心室前壁主要以QR或qR为主。心室后壁(心肌梗死对立面)及游离壁(梗死周围区)以Rs或R波为主, 见图4。



与模型组梗死区、对立区及周围区相比, 移植组3区主波振幅增高($P < 0.05$)。与模型组梗死区、对立区及周围区相比, 移植组3区激活-恢复时间缩短($P < 0.05$)。在心室肌不同部位, 移植组梗死区及梗死周边区激活-恢复时间延长, 但小于模型组($P < 0.05$), 见表1。

表1 模型组和移植组心室肌场电位振幅及激活-恢复时间比较
Table 1 Comparison of the amplitude and activation-recovery interval in the model and transplantation groups ($\bar{x} \pm s$)

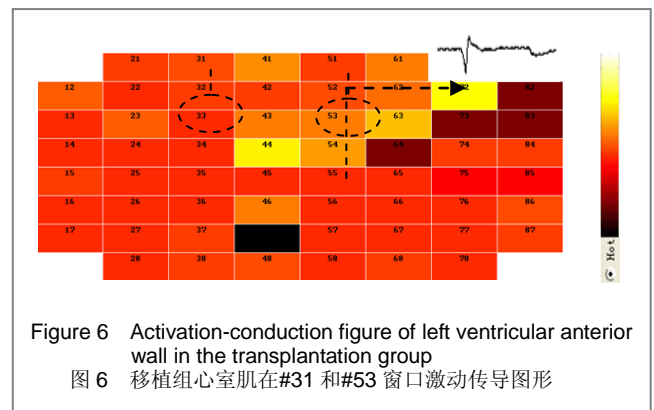
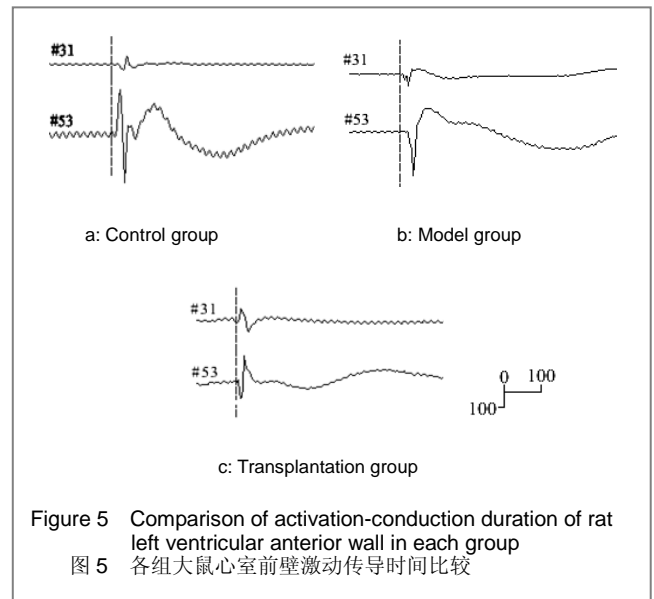
Group	Amplitude (mV)		
	Infarction zone	Opposite zone	Border zone
Model	135.20±7.07	175.23±15.00	92.52±15.54
Transplantation	177.50±3.54 ^a	240.47±14.14 ^a	180.74±30.00 ^a

Group	Activation-recovery interval (ms)		
	Infarction zone	Opposite zone	Border zone
Model	390.03±26.77	310.08±25.00	378.32±7.64
Transplantation	276.70±7.64 ^a	270.01±10.00 ^a	255.05±5.00 ^a

^a $P < 0.01$, vs. model group

2.5 各组大鼠心室前壁激动传导时间比较 将#31和#53窗口作为观察窗口, 测量3组实验大鼠心室前壁激动传导时间分别为: 假手术组(6.50±2.12) ms, 模型组

(17.50±3.54) ms, 移植组(9.13±1.31) ms, 见图5, 6。



与模型组相比, 移植组激动传导时间明显缩短($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来, 德国科学家体外构建工程化心肌组织进行大鼠体内移植后, 证实移植后大鼠心脏功能得到明显改善, 移植物存活并发生血管化, 与宿主天然心肌组织形成了电生理偶联。在心肌组织工程的研究中, Eschen hagen等^[5]将鸡胚胎心肌细胞接种到胶原凝胶上, 在体外形成了可以收缩的心肌网络结构。Freed等^[6]将新生鼠心肌细胞接种到PGA上培养, 形成了可以收缩的心肌组织复合物。Leor等^[7]将胎儿心肌细胞接种到多孔明胶支架上, 并将复合物植入至心肌梗死瘢痕区, 结果发现移植物内有广泛新生血管形成, 未出现左室扩张、心功能不全等症状。本实验用液态胶原为支架, 以新生大鼠心肌细胞作为种子细胞, 构建了心肌细胞/胶原复合物, 并移植到心肌梗死大鼠模型, 应用MEA技术研

究心肌细胞/胶原复合体对心肌梗死大鼠心室肌电生理特性的影响。

本实验中采用MEA技术测定并比较3组大鼠左心室场电位的振幅。场电位振幅越高,说明心脏收缩功能越好。模型组场电位振幅低于假手术组,说明心肌梗死后大鼠收缩功能受损,导致心功能不全。移植组场电位振幅也出现降低,但高于模型组,说明心肌细胞/胶原复合体可改善左心室收缩功能。作者用Langendorff灌流心脏,用MEA技术记录左心室不同部位场电位的激活-恢复时间,结果显示,心肌梗死对心室肌不同部位激活-恢复时间的影响较大,其中梗死区及梗死周边区激活-恢复时间明显延长,后壁激活-恢复时间明显缩短。因梗死区上有存活细胞,数量较少,不能进行正常、有效的电兴奋活动,激活-恢复时间明显延长,即除极-复极过程缓慢。而周边区处于半暗带区,尚存有正常生理功能的心肌细胞,激活-恢复时间延长,但低于梗死区。心室肌后壁完全是正常心肌组织部分,激活-恢复时间基本正常。模型组激活-恢复时间与假手术组相比明显延长,而移植组激活-恢复时间与模型组相比明显缩短,说明心肌细胞/胶原复合体通过修复心肌梗死区结构功能进一步影响其电生理改变,导致心肌除极及复极时间缩短。

MEA技术通过对多个心肌细胞电活动的同步记录,测定同一起搏细胞或不同起搏细胞产生的兴奋传导到不同电极之间的时间差异,可以计算出兴奋的传播方向、途径及传导速度,并了解信号在细胞之间传递的情况^[8]。1994年起,陆续有研究将大鼠胚胎心肌细胞移植到大鼠心肌梗死区,发现移植的心肌细胞存活并完全分化成熟,且移植的心肌细胞与相邻宿主细胞之间可产生明确的闰盘联系^[9];胚胎心肌细胞移植能明显提高梗死后左心室功能,移植细胞的弹性成分可限制梗死后左心室的扩张^[10]。本实验检测不同观测窗口心室肌激动传导时间,计算两个窗口的激动传导时间差值,结果证实,假手术组激动传导时间最短,模型组激动传导时间明显延长,移植组延长时间短于模型组。结果说明心肌细胞/胶原复合体可修复梗死心肌细胞间的连接,明显增强心肌细胞间电传导特性的恢复。通过MEA技术检测心肌梗死大鼠心室肌场电位的振幅,激活-恢复时间及激动传导时间,研究显示3个电生理指标之间具有相关性。心肌梗死大鼠心肌收缩功能减低,场电位振幅降低;因心肌坏死,收缩速度变慢,激活-恢复时间延长;心室肌不同部位收缩力及速度的不均一导致心室肌不同部位电活动不同步继而激动传导时间延长。移植的心肌细胞/胶原复合体覆盖于心肌梗死区,部分代替梗死组织,

并与梗死周边区的活组织融合,形成有效组织结构连接和电连接,减轻心室重构,增强瘢痕区弹性,改善心室肌同步收缩功能。

采用细胞治疗方法,如将干细胞、骨骼肌细胞等直接注入受损心肌组织,可修复小块心肌组织缺损,对大块心肌组织的缺损修复就必须构建心肌组织样小块。本实验发现移植的心肌细胞/胶原复合体能改善心肌梗死大鼠心室肌收缩功能及电传导时间,部分修复心脏功能。

4 参考文献

- [1] Stett A,Egert U,Elke G.Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. Anal Bioanal Chem. 2003;377(3):486.
- [2] E Z. Beijing: Beijing Publishing House, 1995. 56. 鄂征.组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1995: 56.
- [3] Wang T,Yu ZB, Xie MJ,et al.Disi Junyi Daxue Xuebao. 2003; 24(2):feng2. 王涛,余志斌,谢满江,等.新生大鼠心肌细胞培养技巧[J].第四军医大学学报,2003,24(2):封2.
- [4] Le Coz F,Funcck-Brentano C,Morell T,et al.Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the effects of oral and intravenous administrations of dofetilide on ventricular repolarization.Clin Pharmacol Ther.1995;57:533-542.
- [5] Eschenhagen T,Fink C,Remmers U,et al.Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system.FASEB J.1997; 11(8): 683-694.
- [6] Freed LE,Langer R,Martin I,et al.Tissue engineering of cartilage in space. Proc Natl Acad Sci U S A.1997;94(25): 13885-13890.
- [7] Leor J,Aboulaflia-Etzion S,Dar A,et al.Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium?Circulation.2000;102(19 Suppl 3): III56-61.
- [8] Wolfram HZ,Christine F,Dirk K,et al. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. Biotechnol Bioeng.2000;68(1):106-114.
- [9] Soonpaa MH,Koh GY,Klug MG,et al.Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium.Science.1994;264 (5155):98-101.
- [10] Leora J,Patterson M,Quinones MJ,et al.Transplantation of fetal myocardial myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat:a potential method for repair of infarcted myocardium. Circulation.1996; 94 (9 Suppl):S II 332 - S II 336.

来自本文课题的更多信息—

基金声明: 国家自然科学基金资助项目 (30960105)。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。