

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.06.014 [http://www.crter.org]

罗建红, 何学华, 廖金卯, 袁勇华, 胡沙雅. 人脐血间充质干细胞尾静脉移植治疗扩张型心肌病[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6):1029-1036.

人脐血间充质干细胞尾静脉移植治疗扩张型心肌病★

罗建红, 何学华, 廖金卯, 袁勇华, 胡沙雅

湖南师范大学第一附属医院, 湖南省长沙市 410000

文章亮点:

将脐血单个核细胞以较高浓度($1 \times 10^{11} L^{-1}$)接种在 DMEM 培养基中可以在体外成功培养出脐血间充质干细胞, 其免疫表型符合间充质干细胞特征。脐血间充质干细胞移植能促进扩张型心肌病大鼠心功能恢复。

关键词:

干细胞; 干细胞移植; 脐血间充质干细胞; 细胞培养; 细胞移植; 尾静脉; 扩张型心肌病; 心功能; 心肌结构; 阿霉素; 干细胞图片文章

摘要

背景: 体外研究表明人脐血间充质干细胞可分化为自律性跳动的心肌细胞, 而经静脉移植人脐血间充质干细胞治疗扩张型心肌病心力衰竭的报道较少。

目的: 探讨经尾静脉移植人脐血间充质干细胞对扩张型心肌病大鼠心肌结构、心功能的影响。

方法: Wistar 大鼠通过腹腔注射阿霉素诱导扩张型心肌病模型, 扩张型心肌病实验组于造模后 8 周经尾静脉移植人脐血间充质干细胞, 扩张型心肌病对照组注射等量 DMEM 培养基。健康对照组不造模, 于相同时间点注射等体积的生理盐水。

结果与结论: 与健康对照组相比, 扩张型心肌病组心功能明显受损, 且扩张型心肌病实验组受损较扩张型心肌病对照组轻; 移植的细胞有肌钙蛋白 T 的表达。结果提示人脐血间充质干细胞移植能促进扩张型心肌病大鼠心功能恢复, 使心肌组织病变减轻。

罗建红★, 男, 1984 年生, 湖南省新化县人, 汉族, 2012 年湖南师范大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事小儿心血管介入方面的研究。
jhluo@126.com

通讯作者: 何学华, 硕士, 副主任医师, 湖南师范大学第一附属医院, 湖南省长沙市 410000

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2013)06-01029-08

收稿日期: 2012-04-12
修回日期: 2012-05-24
(20120212001/M · S)

Tail vein transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells for treatment of dilated cardiomyopathy

Luo Jian-hong, He Xue-hua, Liao Jin-mao, Yuan Yong-hua, Hu Sha-ya

First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410000, Hunan Province, China

Abstract

BACKGROUND: *In vitro* studies have demonstrated that human umbilical cord blood mesenchymal stem cells can differentiate into autorhythmic myocardial cells. Few studies are reported regarding tail vein transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells for treatment of dilated cardiomyopathy.

OBJECTIVE: To investigate the influences of tail vein transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells on myocardial structure and heart function in a rat model of dilated cardiomyopathy.

METHODS: Dilated cardiomyopathy was induced in Wistar rats by intraperitoneal injection of adriamycin. In the dilated cardiomyopathy group, human umbilical cord blood mesenchymal stem cells were injected into the rats via the tail vein at 8 weeks after dilated cardiomyopathy induction. In the model control group, equal amounts of DMEM were identically injected. In the blank control group, the rats were not subjected to dilated cardiomyopathy induction, but the same amount of physiological saline was injected at the same time point.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the blank control group, the heart function of rats in the dilated cardiomyopathy group and model control group was significantly injured, and the disease severity was milder in the dilated cardiomyopathy group than in the model control group. Troponin T expression was

Luo Jian-hong★, Master,
Physician, First Affiliated
Hospital of Hunan Normal
University, Changsha 410000,
Hunan Province, China
jhluo@126.com

Corresponding author: He
Xue-hua, Master, Associate
chief physician, First Affiliated
Hospital of Hunan Normal
University, Changsha 410000,
Hunan Province, China

Received: 2012-04-12

Accepted: 2012-05-24

detected in the cells of rats receiving tail transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells. These findings suggest that human umbilical cord blood mesenchymal stem cells can promote the recovery of heart function and alleviate the lesion of myocardial tissue in rats with dilated cardiomyopathy.

Key Words: stem cells; stem cell transplantation; umbilical cord blood mesenchymal stem cells; cell culture; cell transplantation; tail vein; dilated cardiomyopathy; heart function; myocardial structure; adriamycin; stem cell photographs-containing paper

Luo JH, He XH, Liao JM, Yuan YH, Hu SY. Tail vein transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells for treatment of dilated cardiomyopathy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(6):1029-1036.

0 引言

扩张型心肌病是一种非缺血性、以单心室或双心室球形扩大, 并伴有进行性收缩功能减退的疾病, 是引起心力衰竭的原因之一。心力衰竭能否逆转主要取决于心肌细胞、心肌组织水平有无改善。目前常用的药物治疗不能从根本上解决问题, 心脏移植又存在供体短缺、移植后排异等情况, 导致远期存活率低。

目前制备扩张型心肌病动物模型的方法主要有: ①阿霉素静脉或腹腔注射法。②快速心室起搏法。③去甲肾上腺素静脉注射法。④口服呋喃唑酮法。⑤高浓度的甲状腺素法。阿霉素诱导扩张型心肌病模型的方法操作简单, 取材方便, 目前应用较广。

选择合适的移植途径使干细胞定植宿主心肌组织, 这是干细胞移植发挥治疗作用的关键因素。采用直接心肌内注射细胞容易聚集而不能广泛分布; 经冠状动脉注射、胸廓切开心外膜注射操作不方便, 对技术要求高, 且为有创性检查。对于静脉移植治疗是否有效一直备受争议。有作者对静脉移植和心外膜注射两种方法进行了比较, 发现静脉移植同样有改善心功能和缩小梗死面积的效果, 且两者间差异无显著性意义, 静脉注射操作简便、损伤小, 成功率高、更符合临床治疗的实际情况。由此看来采用静脉移植途径, 重复注射提高了移植细胞的数量, 移植细胞在病变心肌中呈散在分布, 避免了心肌局部注射引起移植细胞分布的局限, 造成室壁运动不协调等。

目前, 干细胞移植治疗缺血性心脏病的干细胞来源主要为骨髓间充质干细胞^[1]。而作为移植细胞供体, 脐血间充质干细胞有其特有的优势: ①脐血来源丰富, 易收集, 且不涉及伦理和法律等诸多问题。②脐血在胎盘屏障保护下被病毒与细菌的污染概率低。③脐血间充质干细胞更为原始, 具有更强的增殖分化能力, 免疫原性低, 降低了移植后受体的排斥反应。④脐血可将之低温保存数十年, 不仅可做自体移植治疗相关疾病, 还可以作为异基因移植的供体。因此, 脐血间充质干细胞可作为干细胞替代治疗扩张型心肌病一个细胞来源。实验探讨人脐血间充质干细胞经尾静脉移植后能否在大鼠体内存活、分化以及对扩张型心肌病大鼠左室射血分数、血浆脑利钠肽和心肌结构的影响。

1 材料和方法

设计: 对照观察实验。

时间及地点: 实验于2011-06-01/2012-04-10在湖南师范大学第一附属医院细胞生物学实验室, 形态学实验室, 动物实验室, 分子生物学实验室完成。

材料:

脐血标本: 健康产妇婴儿的脐血, 由湖南师范大学第一附属医院产科提供, 产妇和家属同意用于科学研究。

实验动物: 雌性Wistar大鼠100只, 6-8周龄, 体重180-210 g, 购于湖南省长沙市开福区东创实验动物科技服务中心。

主要试剂和仪器:

Main experimental reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
注射用盐酸多柔比星(阿霉素)	浙江省海正药业股份有限公司, 批号 030702
低糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶	Solarbio
人淋巴细胞分离液	北京索莱宝
胎牛血清、BrdU	GIBCO
大鼠脑利钠肽-ELISA 试剂盒	上海麦莎生物科技有限公司
小鼠抗大鼠 Brdu 单克隆抗体、山羊抗小鼠 IgG、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG、兔抗大鼠 cTnT IgG	北京博奥森生物技术有限公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
石蜡切片机	德国 Leica
彩色病理图文分析系统、生物组织石蜡包埋机、ZT-12M 型生物组织自动脱水机	湖北亚光
超声仪	日本 ALOKA 公司
净化工作台	上海索普仪器
倒置显微镜	日本 OLYMPUS
恒温水浴箱	上海跃进医疗器械厂
CO ₂ 恒温培养箱	Thermo

实验方法:

脐血收集和单个核细胞的分离: 在无菌条件下采集健康产妇婴儿的脐血, 每份70-120 mL, 20 U/mL肝素抗凝, 脐血样本与D-Hank's液1:1体积混匀, 随后缓慢加于淋巴细胞分离液上层, 以2 500 r/min离心15 min, 移液管吸取白膜层界面的人脐血单个核细胞, 见图1, 加PBS后吹打, 加入3倍体积的PBS, 1 000 r/min离心10 min, 洗涤3次, 所分离的单个核细胞用于细胞培养。



图 1 人脐血单个核细胞的分离

Figure 1 Isolation of human umbilical cord blood mononuclear cells

人脐血间充质干细胞的培养和传代: 参照文献[2], 将分离的脐血单个核细胞以 $(1.0-2.0) \times 10^8 L^{-1}$ 的浓度接种于含体积分数为10%进口胎牛血清的低糖DMEM培养基中, 置于37 °C、饱和湿度、体积分数为5%的CO₂培养箱中培养。3-5 d后首次半量换液, 可见瓶底有贴壁细胞生长, 换新鲜的低糖DMEM培养基继续培养。根据培养液颜色的变化每2-4 d换液1次。细胞长到铺满瓶底80%面积时吸出培养液, 结束原代培养, PBS洗涤2次后加入0.25%胰蛋白酶消化液, 37 °C下消化3-5 min, 发现细胞回缩、细胞间隙增大后将胰蛋白酶吸出, 加入体积分数为10%的胎牛血清终止消化, 用枪头吹打瓶底未消化脱落的细胞, 将所得细胞悬液按1:2进行培养传代, 3 d后半量换液, 以后每3 d或4 d换液1次, 待细胞铺满瓶底80%左右面积时, 按1:2进行传代培养。

人脐血间充质干细胞的鉴定: 采用上述方法制成细胞悬液, 抗体分别为FITC标记的 CD34, CD45, CD29, CD105, 流式细胞术检测第3代细胞表面抗原CD34, CD45, CD29, CD105的表达情况。

扩张型心肌病大鼠模型的建立: 随机抽取10只Wistar大鼠作为健康对照组, 90只大鼠随机分为扩张型心肌病实验组和扩张型心肌病对照组, 每组45只。参照文献[3]制作扩张型心肌病模型: 将阿霉素(盐酸多柔比星)用无菌用水稀释成1 g/L溶液, 按2.5 mg/kg经腹腔注射, 1次/周, 共8次, 健康对照组腹腔注射等量生理盐水, 于第8周末, 随机抽取健康对照组及扩张型心肌病模型组各5只大鼠检测心功能, 经胸彩色超声心动图测得心功能参数, 以左室射血分数、左室短轴缩短率较正常参考值下降20%-30%作为模型建立的标准。

人脐血间充质干细胞的标记: 细胞移植前, 在培养基中加入终浓度为10 μmol/L的BrdU共培养72 h, 进行细胞免疫荧光染色, 一抗选用鼠抗BrdU抗体, 二抗用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗鼠IgG, 在荧光显微镜下随机选取8-10个视野, 计算细胞标记的阳性率。待检测阳性率后更换新鲜的DMEM培养基后继续培养24 h后进行细胞移植。

人脐血间充质干细胞的移植: 细胞经BrdU标记72 h后用0.25%胰蛋白酶消化, 用含体积分数为10%进口胎牛血清的DMEM培养液终止消化。离心后收集细胞行计数, 将约 $5 \times 10^{10} L^{-1}$ 人脐血间充质干细胞重悬于50 mL无血清培养基中, 冰上保存(不超过1 h) 无菌条件下经尾静脉缓慢注射人脐血间充质干细胞悬液1 mL, 扩张型心肌病对照组注射等体积的DMEM培养基, 健康对照组注射等体积的生理盐水。注射完毕后放回笼里继续饲

养, 每天观察其进食及其活动状态。

心功能的检测: 细胞移植治疗后4周采用日本Aloka 12-14 MHz超声心动图仪检测各组心脏结构及功能。观察各组大鼠左室射血分数、左室缩短分数指标的变化。

血清脑利钠肽水平测定: 细胞移植后4周, 留取全血1.0-1.5 mL, 静置0.5 h以上, 3 000 r/min离心20 min后取血清至1.5 mL EP管中, -80 °C冰箱保存待测。采用双抗夹心ELISA法测定血清脑利钠肽水平。

心肌结构的观察: 取扩张型心肌病实验组及扩张型心肌病对照组左心室心肌标本, 冰冻切片4 °C纯丙酮溶液中固定, 荧光显微镜下观察BrdU标记细胞的分布情况, 一抗用小鼠抗大鼠BrdU单克隆抗体(1:200), 二抗为FITC标记山羊抗小鼠IgG, 将一部分含BrdU标记细胞的切片作苏木精-伊红染色观察移植细胞在光镜下的结构。

移植细胞免疫组织化学检测: 大鼠心肌组织制备冰冻切片, 40 g/L多聚甲醛固定; 固定好的玻片保持湿润, 3% BSA封闭0.5 h, 滴加一抗: 小鼠抗大鼠BrdU(1:200), 兔抗大鼠cTnT(1:200), 二抗分别为两种种属的二抗: 山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG, 按二抗提供的程序进行组化染色。

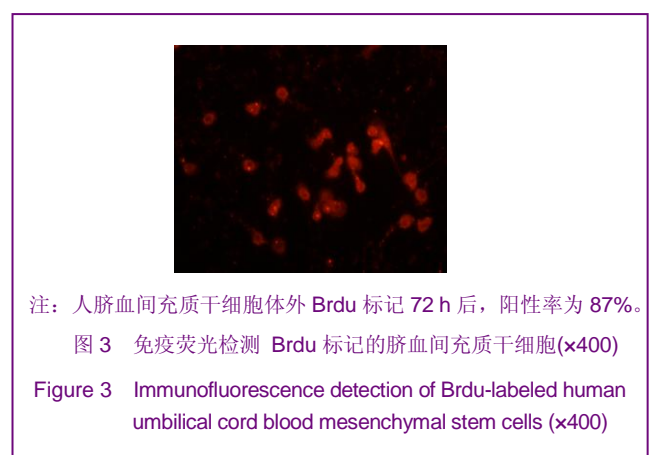
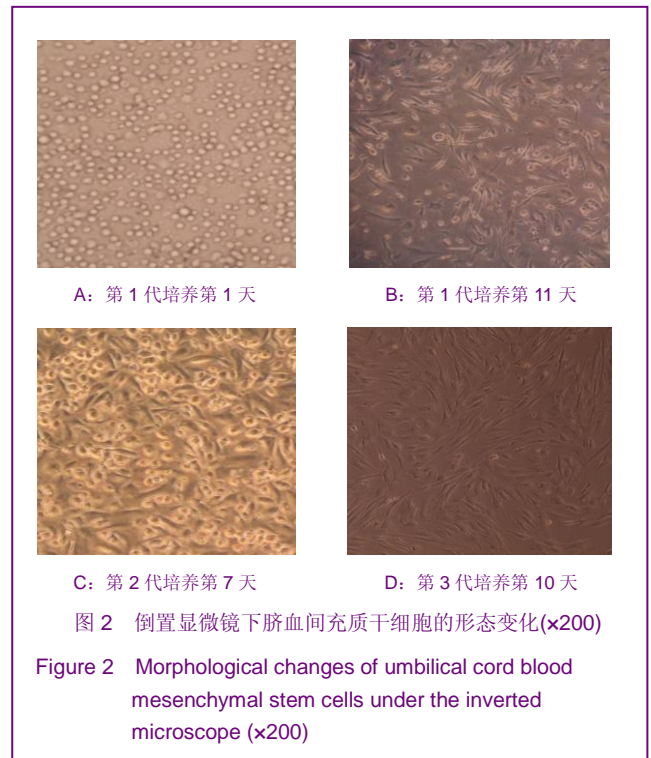
主要观察指标: 治疗前及治疗后4周检测血清脑利钠肽水平, 彩色超声心动图检查评价各组大鼠心功能参数。

统计学分析: 所有数据用SPSS 13.0统计分析软件行t检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

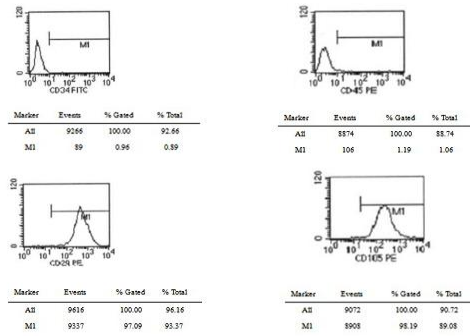
2 结果

2.1 大鼠的一般情况 健康对照组大鼠进食、活动均正常, 体质量稳定增长; 扩张型心肌病对照组大鼠纳差, 活动明显下降, 体质量出现负增长或增长缓慢, 出现蜷卧、脱毛、腹部膨隆等症状和体征。由于阿霉素的急、慢性毒性作用, 实验第8周末扩张型心肌病组(扩张型心肌病实验组19只, 扩张型心肌病对照组20只)大鼠死亡率为43%, 健康对照组未见大鼠死亡。细胞移植4周后, 健康对照组($n=5$): 大鼠的一般状态良好, 体质量逐渐增长, 未出现死亡。扩张型心肌病对照组($n=23$): 大鼠懒动、脱毛、反应差、蜷缩、少食及腹泻等症状, 体质量逐渐下降, 部分大鼠出现腹水, 随着时间的延长, 死亡大鼠逐渐增多, 共死亡14只。扩张型心肌病实验组($n=23$): 人脐血间充质干细胞移植后进食较前增加, 精神状态逐渐好转, 体质量有增长, 但低于健康对照组, 死亡2只。

2.2 人脐血间充质干细胞培养过程中的形态观察 所取脐血经密度梯度离心后, 可见分离液和血浆之间的单个核细胞白膜层。小心吸出, PBS洗涤后接种于培养瓶, 根据人脐血间充质干细胞的贴壁特性去除悬浮生长的杂细胞, 余下的贴壁细胞为人脐血间充质干细胞, 两三天后可见少量细胞呈长梭形漩涡样生长, 几天后细胞集落逐渐增大, 呈对数形式增殖, 细胞铺满单层, 细胞形态表现为成纤维细胞形态, 见图2。人脐血间充质干细胞体外BrdU标记72 h后, 阳性率为87%, 见图3。



2.3 人脐血间充质干细胞的免疫表型鉴定 结果显示第3代人脐血间充质干细胞弱表达CD34(0.89%)、CD45(1.06%)等造血细胞标志, 高表达CD29(93.37%)、CD105(89.08%)等间充质细胞表面抗原, 见图4, 表明脐血中存在人脐血间充质干细胞。

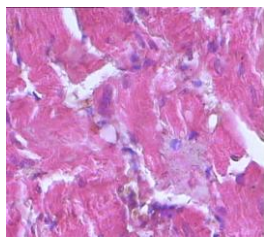


注: 人脐血间充质干细胞弱表达 CD34(0.89%), CD45(1.06%), 高表达 CD29(93.37%), CF105(89.08%)。

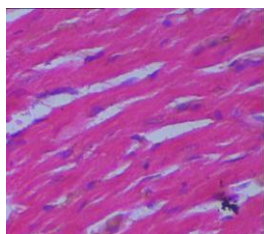
图 4 流式细胞仪结果分析

Figure 4 Flow cytometry analysis

2.4 扩张型心肌病动物模型相关指标检测 扩张型心肌病与健康对照组相比, 出现乏力、精神不振等症状, 进食和活动较少, 鼠毛明显脱落。超声心动图检查显示, 与健康对照组大鼠相比, 扩张型心肌病组左室舒张末期内径、左室收缩末期内径增加, 左室射血分数减小。常规苏木精-伊红染色显示扩张型心肌病组心肌细胞呈水肿、空泡变性, 胞浆中有广泛的颗粒形成; 心肌细胞间质水肿, 并有中性粒细胞和淋巴细胞浸润; 部分肌原纤维溶解, 导致心肌纤维断裂; 间质内可见成纤维细胞的增生, 见图 5A。健康对照组细胞质丰富均匀, 肌纤维排列整齐, 可见横纹, 细胞间隙正常, 无心肌纤维的破坏, 见图 5B。



A: 扩张型心肌病组



B: 健康对照组

图 5 造模第 8 周末大鼠心肌苏木精-伊红染色结果(x400)

Figure 5 Hematoxylin-eosin staining of rat myocardial tissue at the end of wk 8 after dilated cardiomyopathy induction (x400)

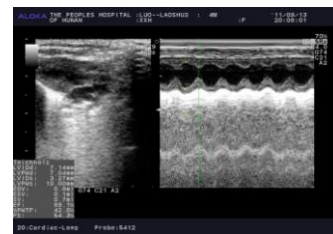
扩张型心肌病组血清脑利钠肽水平较健康对照组明显升高($P < 0.05$), 提示扩张型心肌病模型已成功建立, 见表 1, 图 6。

表 1 造模第 8 周末大鼠超声心动图和脑利钠肽水平测定结果

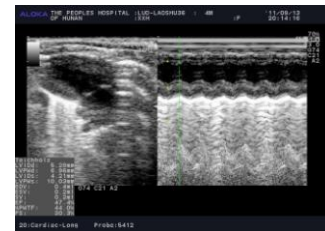
Table 1 Echocardiogram indices and plasma brain natriuretic peptide level at the end of wk 8 after dilated cardiomyopathy induction ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	脑利钠肽(ng/L)	左室射血分数(%)	左室缩短分数(%)
健康对照组	72.25±4.65	76.12±4.37	60.68±1.83
扩张型心肌病组	487.14±12.46 ^a	40.02±2.83 ^a	41.07±1.52 ^a

与健康对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。



A: 健康对照组



B: 扩张型心肌病组

图 6 造模第 8 周末大鼠超声心动图

Figure 6 Echocardiograms of rats at the end of wk 8 after dilated cardiomyopathy induction

2.5 人脐血间充质干细胞移植对大鼠心功能的改善与健康对照组大鼠相比, 扩张型心肌病实验组与扩张型心肌病对照组心功能及心脏结构均有明显改变, 表现为心室腔扩大, 左室舒张末期内径、左室收缩末期内径升高, 左室射血分数、左室缩短分数降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 而扩张型心肌病实验组与扩张型心肌病对照组相比, 虽然心室腔没有明显减小, 但左室收缩末期内径下降, 左室射血分数和左室缩短分数升高($P < 0.05$), 见表 2, 图 7。扩张型心肌病实验组较扩张型心肌病对照组血清脑利钠肽水平下降差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表 3。

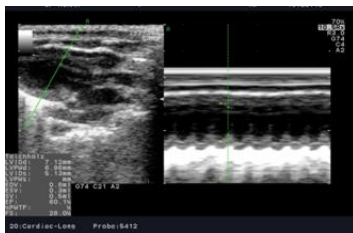
表 2 各组治疗前后超声心动图变化

Table 2 Echocardiogram changes before and after treatment ($\bar{x}\pm s$)

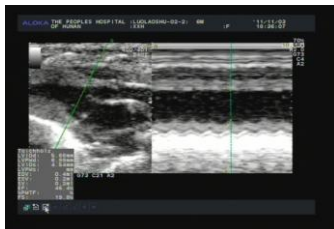
组别	左室射血分数(%)	
	移植前	移植 4 周
健康对照组	76.12±4.37(n=5)	78.14±3.64(n=5)
扩张型心肌病对照组	41.06±2.73(n=23)	32.52±4.42 ^{ab} (n=9)
扩张型心肌病实验组	40.02±2.04(n=23)	62.36±4.72 ^{abc} (n=21)

组别	左室缩短分数(%)	
	移植前	移植 4 周
健康对照组	60.68±1.83(n=5)	61.34±2.42(n=5)
扩张型心肌病对照组	41.07±1.52(n=23)	35.41±2.75 ^{ab} (n=9)
扩张型心肌病实验组	41.04±1.74(n=23)	48.61±3.36 ^{abc} (n=21)

与健康对照组比较, ^a $P < 0.05$, 与移植前比较, ^b $P < 0.05$, 与扩张型心肌病对照组比较, ^c $P < 0.05$ 。



A: 扩张型心肌病实验组



B: 扩张型心肌病对照组

图 7 脐血间充质干细胞移植后 4 周大鼠超声心动图

Figure 7 Echocardiograms at 4 wk after tail vein transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells

表 3 各组治疗前后血清脑利钠肽水平变化

Table 3 Plasma level of brain natriuretic peptide before and after treatment ($\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	n	移植前	移植 4 周
健康对照组	5	78.02±6.84	76.03±5.27
扩张型心肌病对照组	9	502.46±28.06	592.58±35.74 ^{ab}
扩张型心肌病实验组	21	513.35±27.33	364.22±30.27 ^{ab}

与健康对照组相比, ^a $P < 0.05$, 与移植前相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.6 植入细胞的组织荧光及免疫组化检测 人脐血间充质干细胞移植后4周免疫荧光染色显示: 在左心室心肌中发现散在分布的标记BrdU的移植细胞(绿色), 阳性细胞的细胞核呈长梭形, 荧光强度均匀, 无核固缩现象, 其长轴方向与宿主心肌纤维走行方向平行。荧光纤维镜下见散在分布的阳性细胞核为绿色。免疫组化见移植细胞核为棕黄色, 大鼠自身心肌细胞核为蓝色。免疫组化观察移植后心肌cTnT呈阳性表达。扩张型心肌病实验组心肌可见散在分布、细胞核为棕黄色, 胞质中可见棕黄色肌原纤维结构的移植细胞, 见图8。

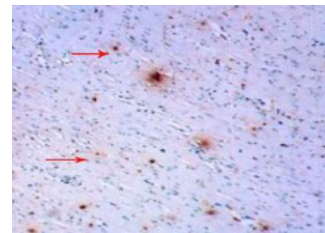


图 8 BrdU 标记的脐血间充质干细胞移植 4 周后心脏组织的免疫组织化学检测(x200)

Figure 8 Immunohistochemical detection of myocardial tissue at 4 wk after transplantation of BrdU-labeled umbilical cord mesenchymal stem cells (x200)

2.7 移植人脐血间充质干细胞后心肌结构的改变 荧光显微镜下可见体外BrdU标记的人脐血间充质干细胞散在分布于大鼠心肌中, 见图9。

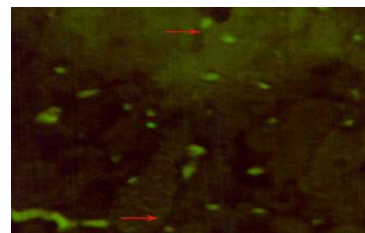
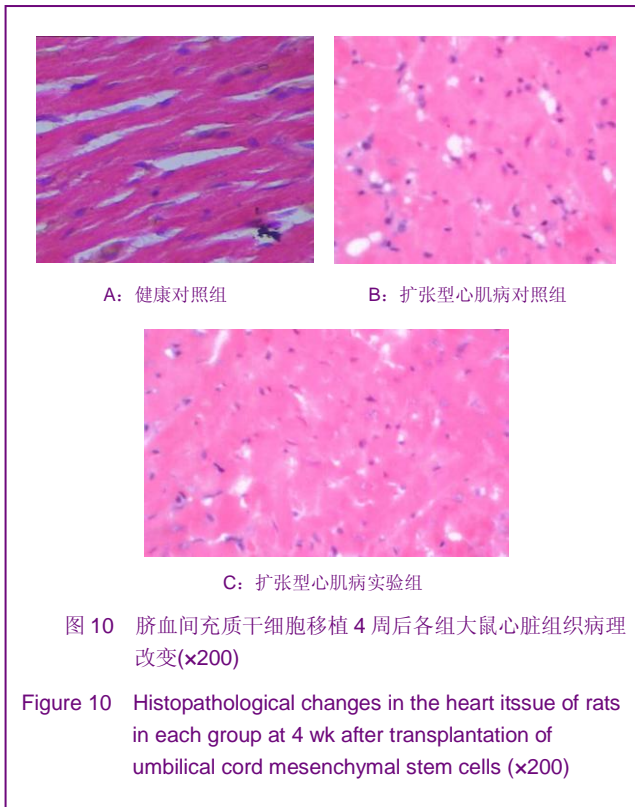


图 9 BrdU 标记的脐血间充质干细胞移植 4 周后心脏组织的免疫荧光检测(x200)

Figure 9 Immunofluorescence detection of myocardial tissue at 4 wk after transplantation of BrdU-labeled umbilical cord mesenchymal stem cells (x200)

在常规苏木精-伊红染色下见这些细胞呈柱状, 与周围的大鼠心肌走行一致, 卵圆形核位于细胞中央, 细胞质丰富, 染色接近大鼠心肌细胞。健康对照组大鼠心肌细胞无水肿及坏死, 扩张型心肌病对照组可见心肌细胞呈广泛空泡变性和水肿改变, 扩张型心肌病实验组大

鼠心肌细胞水肿坏死减轻, 见图10。



3 讨论

脐血是脐带内近胎儿侧血管内的血液, Nakahata^[4]研究发现人脐血含有丰富的造血干细胞。其后Erices等^[5-6]将脐血中分离的单个核细胞于体外培养时获得了贴壁细胞即间充质干细胞。诸多研究表明间充质干细胞表达多种间叶祖细胞的相关抗原^[7], 形态呈成纤维细胞样, 其免疫表型和生物学特性与骨髓间充质干细胞相似, 经检测发现其具有向心肌细胞、神经细胞、脂肪细胞分化的特性。

实验结果也证明, 脐血单个核细胞在适宜的培养条件下可体外生长和传代, 能够获得形态均一的间充质干细胞。流式细胞仪检测脐血间充质干细胞免疫表型, 高表达CD105、CD29等间充质细胞相关的表面抗原标记物, 弱表达CD34、CD45等造血细胞标志。这表明间充质干细胞是存在于脐血中且不同于造血干细胞的一群未分化状态的非定向干细胞, 此与已有研究基本一致^[8-10]。

已有报道应用脐血干细胞治疗缺血性心肌病提供可借鉴的依据^[11-13]。国内胡承恒等^[14]实验研究表明,

脐血单个核细胞在未使用免疫抑制剂的条件下能改善急性心肌梗死大鼠的心功能。国内外类似的实验研究均观察到移植的脐血间充质干细胞能改善心肌缺血后的心功能^[15-16], 同时显著缩小心肌梗死的面积, 增加心室的顺应性。大部分的研究表明移植细胞可以在受体心肌组织内增殖形成肌样组织, 限制心室扩张改善心肌功能^[17-18]。

实验也显示人脐血间充质干细胞体内移植后可在大鼠心肌内归巢定植, 表达心肌特有蛋白, 向“心肌样”细胞分化, 提高扩张型心肌病受损心肌的左室射血分数, 降低血清脑利钠肽水平, 改善心肌病理损害, 其原因可能与移植的人脐血间充质干细胞分化为心肌样细胞, 刺激自分泌、旁分泌以改变心脏局部微环境促进心肌细胞生成和新生血管形成等有关^[19-21]。而且在不使用免疫抑制剂的情况下未见明显排斥反应, 为扩张型心肌病的治疗研究提供了一种有效的方法。但目前细胞移植后也会出现心律失常等不良反应^[22], 有研究提示骨髓间充质干细胞移植后可能会抑制扩张型心肌病心电紊乱的进展^[23]。引起心律失常其原因可能与细胞移植后表达心肌连接蛋白Cx43^[24-25], 与宿主心肌细胞形成电-机械收缩有关。但是本文仅为短期动物实验研究, 观察时间短, 对于远期治疗效果很难做出明确的评价, 距离临床应用还有距离, 有待于大量实验及多中心的临床研究来证实。

作者贡献: 实验设计为何学华, 实验实施为罗建红, 实验评估为廖金卯, 资料收集为袁勇华、胡沙雅。罗建红成文, 何学华审校, 罗建红对文章负责。

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: 脐血由湖南师范大学第一附属医院产科提供, 产妇和家属同意用于科学研究, 并获得湖南省人民医院医学伦理委员会批准。

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。

4 参考文献

- [1] 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.

- [2] Wang C, Xu Y, Song WG, et al. Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi. 2007;23(5):466-468.
王超, 徐蕴, 宋文刚, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞分离培养方法的建立及其表型分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(5): 466-468.
- [3] Shah HR, Vaynblat M, Ramdev G, et al. Experimental cardiomyopathy as a model of chronic heart failure. *J Invest Surg.* 1997;10(6):387-396.
- [4] NAKAHATAT, Expansion of hematoPoietic Progenitors. In: Bajus JL, et al. eds, Education Program of the 26th Congress of The International Society of Haematolog Singa Pore. 1996: 29-302.
- [5] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000; 109(1):235-242.
- [6] Kim JW, Kim SY, Park SY, et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol.* 2004;83(12): 733-738.
- [7] Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7(11):581-588.
- [8] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294-1301.
- [9] Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, et al. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2006;24(3):679-685.
- [10] Huang JL, Yang SX. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(47):9367-9370.
黄景玲, 杨水祥. 人脐血源性间充质干细胞向心肌细胞的诱导分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(47):9367-9370.
- [11] Leor J, Guetta E, Feinberg MS, et al. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells.* 2006;24(3):772-780.
- [12] Henning RJ, Abu-Ali H, Balis JU, et al. Human umbilical cord blood mononuclear cells for the treatment of acute myocardial infarction. *Cell Transplant.* 2004;13(7-8):729-739.
- [13] Ma N, Ladilov Y, Moebius JM, et al. Intramyocardial delivery of human CD133+ cells in a SCID mouse cryoinjury model: Bone marrow vs. cord blood-derived cells. *Cardiovasc Res.* 2006;71(1):158-169.
- [14] Hu CH, Wu GF, Wang XQ, et al. Zhonghua Xinxueguanbing Zazhi. 2006;34(7):587-590.
胡承恒, 伍贵富, 王小庆, 等. 人脐血单个核细胞移植治疗大鼠急性心肌梗死的实验研究[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(7):587-590.
- [15] Sadat S, Gehmert S, Song YH, et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;363(3):674-679.
- [16] Siepe M, Akhyari P, Lichtenberg A, et al. Stem cells used for cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34(2):242-247.
- [17] Tura BR, Martino HF, Gowdak LH, et al. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - MiHeart Study. *Trials.* 2007;8:2.
- [18] Soares MB, Lima RS, Rocha LL, et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol.* 2004;164(2):441-447.
- [19] Schannwell CM. Stem cell therapy for cardiovascular diseases. Experiences in Düsseldorf. *Dtsch Med Wochenschr.* 2008;133 Suppl 8:S274-279.
- [20] Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, et al. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells.* 2008;26(9):2201-2210.
- [21] Boilson BA, Gulati R. Stem cell therapy for the heart: a perspective. *Transl Res.* 2010;155(1):3-5.
- [22] Cranefield PF. Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ Res.* 1977;41(4):415-423.
- [23] Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *J Physiol.* 2004;555(Pt 3):617-626.
- [24] Leobon B, Garcin I, Menasche P, et al. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13): 7808-7811.
- [25] Price MJ, Chou CC, Frantzen M, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol.* 2006; 111(2):231-239.