

肌肉注射人脐带间充质干细胞健康大鼠心肌组织ki-67、phh3及cTnT的表达

王琪, 张文祥, 王思平, 李自普(青岛大学医学院附属医院, 山东省青岛市 266003)

文章亮点:

- 1 首次观察肌肉注射人脐带间充质干细胞对健康大鼠心肌组织中 ki-67、phh3 及 cTnT 表达的影响。
- 2 结果表明, 经肌肉注射人脐带间充质干细胞对健康大鼠心肌组织中 ki-67、phh3 及 cTnT 的表达无明显影响, 提示肌肉注射人脐带间充质干细胞对健康大鼠心肌组织无致瘤性或损害作用, 为肌肉注射人脐带间充质干细胞治疗扩张性心肌病的安全性提供了理论依据。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 脐带间充质干细胞; 肌肉注射; ki-67; phh-3; cTnT; 心肌组织

主题词:

脐带; 间质干细胞; 注射; 肌肉内; 心肌; 肌钙蛋白 T; Ki-67 抗原

基金资助:

青岛市公共领域科技支撑计划项目[11-2-3-1-(4)-nsh]

摘要

背景: 肌肉注射人脐带间充质干细胞是否会增加正常心肌细胞的再生能力, 对正常心肌是否会产生不良影响, 尚不明确。

目的: 观察肌肉注射人脐带间充质干细胞对健康 Wistar 大鼠心肌组织中 ki-67、phh-3 及 cTnT 表达的影响。

方法: 将 60 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组, 培养液组, 上清液组, 脐带间充质干细胞低、中、高剂量组, 每组分别给予大鼠四肢肌肉注射不同液体, 分别为: PBS、DMEM 培养液、培养人脐带间充质干细胞的上清液、 0.25×10^5 人脐带间充质干细胞、 1.0×10^5 人脐带间充质干细胞、 4.0×10^5 人脐带间充质干细胞, 间隔 4 周共注射 2 次, 第 8 周处死大鼠, 取心肌组织固定、包埋及切片, 应用免疫组织化学方法检测大鼠心肌组织中 ki-67、phh-3 及 cTnT 的表达。

结果与结论: 正常组中 ki-67 在心肌组织细胞胞核呈阴性表达, phh3 在心肌组织细胞胞核呈弱阳性表达, cTnT 在心肌细胞胞浆中呈强阳性表达; 与正常组相比, 培养液组、上清液组及脐带间充质干细胞低、中、高剂量组间 ki-67、phh-3 及 cTnT 的表达差异无显著性意义 ($F=1.076$ 、 0.167 及 0.300 ; $P > 0.05$)。提示经肌肉注射人脐带间充质干细胞或其培养上清液对健康 Wistar 大鼠心肌组织 ki-67、phh-3 及 cTnT 的表达无影响。

王琪, 张文祥, 王思平, 李自普. 肌肉注射人脐带间充质干细胞健康大鼠心肌组织 ki-67、phh3 及 cTnT 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(41): 6671-6677.

Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells via intramuscular injection on the myocardial ki-67, phh3 and cTnT expression in normal rats

Wang Qi, Zhang Wen-xiang, Wang Si-ping, Li Zi-pu (Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: It is unclear whether intramuscular injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells will increase regeneration of normal myocardial cells and play adverse effects on normal myocardium.

OBJECTIVE: To observe the effects of intramuscular injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells on expression of the myocardial ki-67, phh3 and cTnT in normal Wistar rats.

METHODS: A total of 60 male Wistar rats were divided into six groups randomly: normal group, solution group, supernatant group, low concentration group, moderate concentration group, and high concentration group. These groups were intramuscularly injected different liquid, respectively, as follows: PBS, DMEM, the supernatant of human umbilical cord mesenchymal stem cells, human umbilical cord mesenchymal stem cells with amount of 0.25×10^5 , human umbilical cord mesenchymal stem cells with amount of 1.0×10^5 , human umbilical cord mesenchymal stem cells with amount of 4.0×10^5 . After 4 weeks, each rats received the second same intramuscular injections of human umbilical cord mesenchymal stem cells. Four weeks after the second injection, all rates were killed to obtain myocardial tissues which were fixed, embedded and sectioned. Finally, the ki-67, phh3 and cTnT expressions of the myocardium were detected by immunohistochemical technique.

RESULTS AND CONCLUSION: In the normal group, negative expression of the ki-67 was observed in the caryon of myocardial cells, weak positive expression of the phh3 was observed in the caryon of myocardial cells, and positive expression of the cTnT was observed in the caryon of myocardial cells. Compared with the normal group, the expression of the ki-67, phh3 and cTnT in the myocardium had no significant difference among the

王琪, 女, 1988 年生, 河南省开封市人, 汉族, 2013 年青岛大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事儿童心血管疾病研究。现工作于郑州市儿童医院。

通讯作者: 李自普, 博士, 教授, 主任医师, 青岛大学医学院附属医院, 山东省青岛市 266003

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.41.020

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)41-06671-07

稿件接受: 2014-08-08

Wang Qi, Master, Physician, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Corresponding author: Li Zi-pu, M.D., Professor, Chief physician, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Accepted: 2014-08-08

other groups ($F=1.076, 0.167, 0.300; P > 0.05$). Human umbilical cord mesenchymal stem cells or the supernatant of human umbilical cord mesenchymal stem cells via intramuscular injection have no effects on the expression of the ki-67, pnh3 and cTnT in normal Wistar rats.

Subject headings: umbilical cord; mesenchymal stem cells; injections, intramuscular; myocardium; troponin T; Ki-67 antigen

Funding: the Scientific Support Program in the Public Domain of Qingdao, No. 11-2-3-1-(4)-nsh

Wang Q, Zhang WX, Wang SP, Li ZP. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells via intramuscular injection on the myocardial ki-67, pnh3 and cTnT expression in normal rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(41): 6671-6677.

0 引言 Introduction

儿童扩张性心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一类以单侧或双侧心腔扩大及心脏收缩功能减退为主要表现的心肌疾病,其病程呈进行性,预后极差,死亡率高,严重危害着儿童的身体健康。目前,仍无特效治疗方案,心脏移植仍是惟一的根治方法,因此创新性探索治疗儿童扩张性心肌病的新方法具有重要的临床意义。近年提出的外源性干细胞移植修复受损心肌为扩张性心肌病患者带来了福音。外源性干细胞进行心肌再生治疗技术已被广泛的研究和应用,其应用的干细胞包括间充质干细胞、脂肪来源的基质干细胞、胚胎干细胞及诱导多能干细胞等^[1]。干细胞治疗技术应用于心脏疾病的适应证包括心肌梗死、特发性扩张性心肌病、糖尿病性心肌病、缺血性二尖瓣返流、心肌致密化不全、儿童心肌病等,而且非缺血性心肌病比缺血性心肌病更能从干细胞治疗技术中获得较大的益处^[2]。儿童扩张性心肌病的病因更多的是炎症或免疫因素,因此,扩张性心肌病患者可能更适合于干细胞治疗技术。新近有学者发现经肌肉注射骨髓间充质干细胞可明显改善心肌病大鼠的心功能^[3]。

间充质干细胞是一类具有自我更新能力的多能分化干细胞,分布在造血组织和许多其他非造血组织中,如骨髓、脐带、脂肪和肝脏等^[4-5]。间充质干细胞可分泌大量生物活性分子,如细胞因子、抗氧化剂、促血管新生物质、营养因子和其他一些蛋白质^[6]。大量研究表明,间充质干细胞分泌的多种营养因子能够减轻心肌损伤,抑制心肌纤维性重构,促进心肌内血管新生,刺激心肌组织中干细胞活性的恢复和增殖,减轻炎症性氧化应激反应等^[7]。上述研究均表明间充质干细胞通过旁分泌或内分泌机制参与心肌损伤后的修复过程。目前关于肌肉注射间充质干细胞的报道较少,临床主要用于治疗肌营养不良性疾病,且这种途径是安全的^[8-10]。因此,设想能否通过肌肉注射人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSC),利用它的营养和旁分泌作用来治疗儿童扩张性心肌病。

人脐带间充质干细胞是位于羊膜被覆上皮、脐血管及两者之间的黏液结缔组织中的一种成纤维样细胞,相较于骨髓间充质干细胞,人脐带间充质干细胞成本较低,来源丰富,不涉及伦理问题,不会随着机体年龄增长和传

代次数增加导致增殖能力和分化能力降低^[11];其为较原始的干细胞,表达某些人胚胎干细胞的特异标志,具有极强的可塑性和更强的扩增能力,而无致癌活性和低免疫原性。人脐带间充质细胞经诱导可分化为心肌样细胞、内皮细胞等^[12-13],已经证实其具有促进血管生成的作用^[14],有助于加速心功能恢复和促进心肌损伤修复。这些优势都提示人脐带间充质干细胞是一类更有潜力的心肌再生的干细胞来源。

对于正常动物模型肌肉注射人脐带间充质干细胞,是否会增加正常心肌细胞的再生能力,对正常心肌是否会产生不良影响,尚不明确。因此,本研究对正常健康大鼠经肌肉注射不同浓度的人脐带间充质干细胞或其细胞培养上清液,检测各组大鼠心肌组织中细胞增殖标记物ki-67和pnh3及心肌组织中cTnT的表达,明确经肌肉注射人脐带间充质干细胞对健康大鼠心肌组织的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2011年9月至2012年9月在青岛大学医学院附属医院SPF级动物实验室和中心实验室完成。

材料:

肌肉注射人脐带间充质干细胞后健康大鼠心肌组织ki-67、pnh3及cTnT表达
实验用主要试剂及设备:

试剂及仪器	来源
ki-67兔抗大鼠单克隆抗体、pnh3兔抗大鼠多克隆抗体、cTnT小鼠抗大鼠单克隆抗体	Abcam公司
PV-9001试剂盒(兔超敏二步法免疫组化检测试剂)、PV-9002试剂盒(小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂)、浓缩型DAB试剂盒	北京中杉金桥公司
恒温箱	上海和呈仪器制造有限公司
微量加样枪	德国Eppendorf公司
低温冰箱	青岛海尔集团
倒置显微镜	德国LEICA公司

实验动物: SPF级健康Wistar大鼠60只,雄性,7周龄,体质量150-200 g,由山东鲁抗医药有限公司提供,批号:SCXK2008002,于青岛大学医学院附属医院动物房饲养,饲养环境符合SPF级标准。

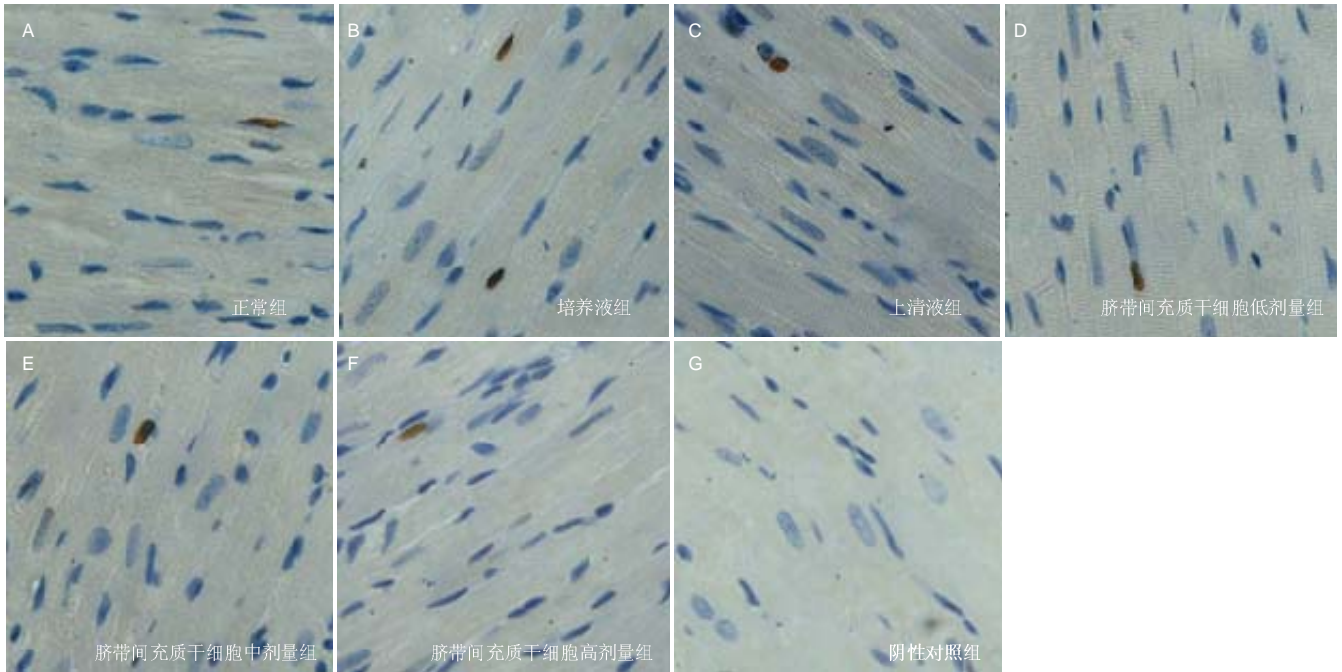


图 1 各组大鼠心肌组织中 ki-67 的表达(x400)

Figure 1 Expression of ki-67 in the myocardial tissue of different group rats (x400)

图注: 图中显示各组大鼠心肌组织中 ki-67 表达结果均呈阴性。

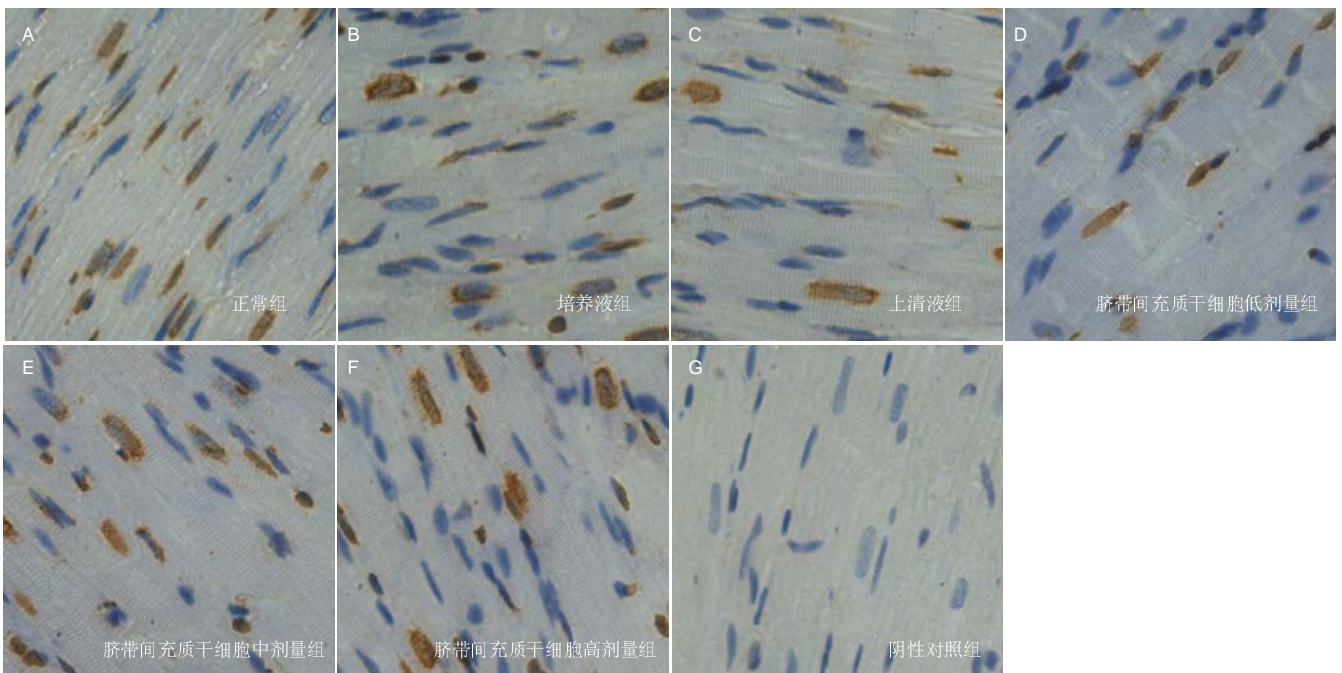


图 2 各组大鼠心肌组织中 pnh3 的表达(x400)

Figure 2 Expression of pnh3 in the myocardial tissue of different group rats (x400)

图注: 图中显示各组大鼠心肌组织中 pnh3 的表达结果均呈弱阳性。

细胞: 人脐带间充质干细胞、人脐带间充质干细胞培养上清液、DMEM培养液均由青岛大学医学院附属医院干细胞中心提供, 实验用的人脐带间充质干细胞均经过微生物检测及流式细胞仪检测, 细胞表型符合间充质干细胞的表型特征: CD34(-), CD45(-), CD90(+), CD105(+), HLA-DR(-)。微生物检测: HIV阴性, 梅毒螺旋体阴性, 丙

型肝炎病毒阴性, 乙型肝炎病毒阴性, 支原体检测阴性, 巨细胞病毒阴性, 真菌培养阴性, 需氧菌培养阴性。

实验方法:

实验动物分组¹⁵⁻¹⁶: 健康Wistar雄性大鼠60只, 随机分为6组, 每组10只, ①正常组: 肌肉注射人脐带间充质干细胞的悬浮液PBS。②培养液组: 肌肉注射人脐带间充

质干细胞的培养液DMEM。③上清液组：肌肉注射培养人脐带间充质干细胞的上清液。④脐带间充质干细胞低剂量组：肌肉注射人脐带间充质干细胞 0.25×10^5 个。⑤脐带间充质干细胞中剂量组：肌肉注射人脐带间充质干细胞 1.0×10^5 个。⑥脐带间充质干细胞高剂量组：肌肉注射人脐带间充质干细胞 4.0×10^5 个。

动物处理方法^[15-16]：将60只Wistar大鼠适应饲养1周。按照分组分别注射不同液体于大鼠四肢肌肉，四肢各注射0.2 mL，每只大鼠共注射0.8 mL。实验第5周的第1天，按第1次的注射方式、注射点及注射剂量给予第2次注射。实验第8周后用10%水合氯醛3 mL/kg将大鼠麻醉后，切取黄豆大小心尖部心肌组织，处理后做免疫组织化学检查。

石蜡包埋与切片：将心肌组织标本进行固定、透明、浸蜡包埋后切片，备行免疫组织化学染色。

免疫组织化学方法检测大鼠心肌ki-67、phh3和cTnT的表达：利用兔超敏二步法免疫组化检测试剂盒(PV-9001)及小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂盒(PV-9002)检测大鼠心肌ki-67、phh3和cTnT的表达。超敏二步法免疫组化步骤如下：切片常规脱蜡至水；脱蜡液I溶液浸泡10 min，脱蜡液II溶液浸泡10 min，无水乙醇浸泡3 min，体积分数为95%乙醇浸泡3 min，体积分数为80%乙醇浸泡3 min，体积分数为70%乙醇浸泡3 min；PBS冲洗3次，每次3 min。

抗原修复：将250 mL的柠檬酸修复缓冲液置于一耐高温容器里，放进微波炉高火加热5 min，使之沸腾；将切片置于其中，微波炉中高火加热10 min，然后自然冷却至室温。

染色：①PBS冲洗3次，每次3 min。②擦拭干净组织周围PBS，体积分数为3% H_2O_2 去离子水室温孵育10 min，以阻断内源性过氧化物酶。③PBS冲洗3次，每次3 min。④擦拭干净组织周围PBS，滴加适当比例稀释的一抗(ki-67按1:100稀释，phh3按1:100稀释，cTnT按1:200稀释)，阴性对照滴加PBS，37℃恒温箱孵育90 min，PBS冲洗3次，每次3 min。⑤滴加试剂1(Polymer Helper)，37℃恒温箱孵育20 min，PBS冲洗3次，每次3 min。⑥滴加试剂2(Poly-HRP anti-Rabbit IgG)，37℃恒温箱孵育20 min，PBS冲洗3次，每次3 min。⑦滴加DAB显色工作液3 min，自来水冲洗终止显色，苏木精复染3 min，0.5%盐酸乙醇溶液分化10 s，0.5%氨水返蓝10 s。⑧依次经体积分数为70%乙醇、体积分数为80%乙醇、体积分数为95%乙醇及无水乙醇脱水，各1 min。⑨依次经脱蜡液I，脱蜡液II透明，各5 min。

封固：擦去切片周围多余的脱蜡液，切勿干涸，迅速滴加适量中性树脂，再加盖玻片封固。

采集切片图片并分析：采用普通光学显微镜及LEICA倒置显微镜对各组切片进行阅片及采集。

结果判定：ki-67和phh3免疫组化阳性染色均呈棕黄色颗粒或弥漫分布，均定位于细胞核；在高倍镜($\times 400$)下每

张切片均随机观察5个视野，计数200个细胞/视野，共计1 000个细胞；以阳性细胞数百分比进行半定量分析；阳性细胞数0%–5%为阴性，>5%判定为阳性，其中6%–20%为弱阳性(+)，21%–50%为阳性(++)，>50%为强阳性(+++)。

cTnT免疫组化阳性结果表达于细胞浆，呈棕黄色颗粒或弥漫分布；正常心肌组织中，cTnT在细胞浆中呈强阳性表达，如有表达强度减弱或消失即为染色脱失。利用专业图形分析软件Image-Pro Plus 6.0对心肌细胞行平均吸光度测定。

主要观察指标：各组心肌细胞中ki-67、phh3、cTnT的表达。

统计学分析：采用SPSS 17.0软件对实验数据进行统计学分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，采用LSD(least significant difference)-*t*检验进行多样本均数之间的两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义， $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 ki-67在各组心肌细胞中的表达 ki-67免疫组织化学阳性染色定位于细胞核内，以在细胞核内出现棕黄色或棕褐色颗粒即为阳性。

正常心肌组织ki-67呈阴性表达。在正常组、培养液组、上清液组、脐带间充质干细胞低、中及高剂量组大鼠心肌组织中ki-67表达结果均呈阴性，各组间ki-67阳性表达率差异无显著性意义($F=1.076$, $P > 0.05$)，见表1，图1。

2.2 phh3在各组心肌组织中的表达 phh3免疫组织化学阳性染色定位于细胞核内，以在细胞核内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达。

正常心肌组织phh3呈弱阳性表达。在正常组、培养液组、上清液组、脐带间充质干细胞低、中及高剂量组大鼠心肌组织中phh3的表达结果均呈弱阳性，各组间phh3阳性表达率差异无显著性意义($F=0.167$, $P > 0.05$)，见表1，图2。

表1 各组大鼠心肌组织中 ki-67、Phh3 和 cTnT 表达阳性率
Table 1 The positive rates of ki-67, phh3 and cTnT in myocardial tissue of different group rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	ki-67(%)	Phh3(%)	cTnT(A)
正常组	2.03±2.00	9.42±1.47	0.113 5±0.026 8
培养液组	0.88±0.83	9.04±1.01	0.109 3±0.018 4
上清液组	1.68±1.65	9.21±2.13	0.110 4±0.017 4
脐带间充质干细胞低剂量组	2.00±1.37	9.34±1.39	0.105 2±0.017 5
脐带间充质干细胞中剂量组	1.32±1.15	9.59±0.82	0.106 7±0.025 7
脐带间充质干细胞高剂量组	1.16±1.05	9.27±1.20	0.114 6±0.015 1
<i>F</i>	1.076	0.167	0.300
<i>P</i>	0.384	0.973	0.910

2.3 cTnT在各组心肌组织中的表达 cTnT免疫组化阳性结果表达于心肌细胞胞浆，呈棕黄色颗粒或弥漫分布。正

常心肌组织cTnT呈阳性表达。在正常组、培养液组、上清液组、低剂量组、中剂量组及高剂量组大鼠心肌细胞中cTnT的表达结果均呈阳性, 各组间cTnT阳性表达率差异无显著性意义($F=0.300$, $P > 0.05$), 见表1, 图3。

3 讨论 Discussion

近年来, 儿童扩张性心脏病在全世界范围内发病率逐渐增多, 国内发病率约为84/10万人, 已经成为充血性心力衰竭的主要原因之一, 一旦出现心力衰竭症状预后极差, 致残率及病死率均很高, 目前内外科治疗效果均不令人满意, 药物只能改善症状, 无法解决根本问题, 所以干细胞移植技术作为可能替代的治疗手段, 日益受到各国学者的重视。越来越多的研究证实, 干细胞通过分泌生长因子、细胞因子或其他信号分子, 即通过营养或旁分泌作用来介导心肌修复^[17], 包括促进新生血管形成, 抑制纤维化重塑, 抑制细胞凋亡及趋化组织干细胞并刺激其进行有丝分裂, 或减轻炎症氧化应激反应等^[18]。有研究表明通过注射培养干细胞条件培养基, 亦可提高心脏功能促进心肌修复, 有效支持了干细胞旁分泌的观点^[19]。

传统观点认为, 心脏是一个缺乏自我更新和分化的干细胞池, 心肌细胞具有不可再生性, 且受损后的心肌细胞无法进行自我复制, 只能形成瘢痕组织进行修复。然而, Kajstura等^[20-21]研究者证实在人类正常心肌组织中, 每100万个细胞里面约有14个处于有丝分裂, 且在缺血性心脏病及扩张性心脏病病理情况下, 处于有丝分裂期的细胞数约是正常的10倍。因而表明成人心脏不是终末分化器官, 但因其数量极其有限, 增殖很微弱, 不能弥补大面积心肌损伤后的增殖需求, 因而不可能治疗扩张性心脏病。研究表明干细胞心肌再生治疗可以通过干细胞移植促进心肌细胞再生、防止心室重构和改善心功能。Shabbir等^[3]给予心肌病仓鼠肌肉注射骨髓充质干细胞, 利用骨髓充质干细胞的营养和旁分泌作用, 可以增加心肌细胞的分化增殖。

人脐带间充质干细胞具有多能干细胞的特点, 具有强大的自我更新能力, 体外扩增后仍保持着低免疫原性, 且无致瘤性, 而脐带作为产房的医疗废物, 来源丰富, 取材方便, 无伦理学问题, 故本研究选择人脐带间充质干细胞作为干细胞移植的种子细胞。对于干细胞移植途径, 选择一种有效、创伤性小、安全性高、无需麻醉、操作简单及可重复大量给予种子细胞的方法是非常重要的, 本实验经肌肉注射人脐带间充质干细胞, 利用人脐带间充质干细胞的营养和旁分泌作用, 观察经肌肉注射人脐带间充质干细胞对健康Wistar大鼠心肌组织的安全性。国内有学者研究显示将人脐带间充质干细胞移植到梗死大鼠心肌后, 人脐带间充质干细胞可在大鼠体内存活并转化为心肌细胞^[22]。对于将人脐带间充质干细胞移植至健康大鼠心肌, 是否对心肌细胞产生影响, 增加正常心肌细胞的增殖分化, 目前

尚无报道, 本研究利用细胞增殖标记物ki-67和pHh3, 观察肌肉注射人脐带间充质干细胞对健康大鼠心肌细胞再生的影响。

ki-67是一种与细胞增殖密切相关的核抗原, 它的表达与细胞增殖密切相关, 是调节细胞周期不可缺少的组成部分, 可作为评价细胞生长分数的增殖指标, 近年来, ki-67广泛应用于肿瘤的生物学研究, 被认为是判断肿瘤危害性的最具有前途的细胞增殖标记, 可反映肿瘤细胞的增殖活性^[23]。Beltrami等^[24]研究显示, 在心肌梗死周边心肌组织中细胞增殖指数ki-67的阳性率约为4%, 而在距心肌梗死较远的心肌组织中ki-67阳性率约为1%左右。Shabbir等^[3]报道在扩张型心肌病仓鼠的心肌组织中, ki-67阳性指数为5%左右, 给予肌肉注射骨髓间充质干细胞后, 心肌组织中ki-67阳性表达率为7.5%左右。经肌肉注射人脐带间充质干细胞后, 是否会增加健康大鼠心肌ki-67阳性指数的表达率, 使正常心肌组织中有丝分裂的细胞增多, 从而产生致瘤性? 本研究结果显示在健康大鼠心肌中ki-67阳性指数为1%~2%, 与已有报道相符合, 且健康大鼠在肌肉注射人脐带间充质干细胞或细胞培养上清液后, 心肌组织中ki-67阳性指数表达率各组之间差异无显著性意义, 提示经肌肉注射人脐带间充质干细胞或细胞培养上清液不会增加正常大鼠心肌组织中ki-67的异常表达。

pHh3是构成细胞染色体的一种核心组蛋白, 连同其他组蛋白形成真核细胞染色体的核心蛋白组分。pHh3在细胞分裂间期不表达, 在有丝分裂过程中染色质凝聚时达到高峰, 因此可以作为细胞有丝分裂的标记物^[25-26]。Shabbir等^[3]研究显示在扩张型心肌病仓鼠的心肌组织中, pHh3阳性指数约为0.07%, 给予肌肉注射骨髓间充质干细胞后, 心肌组织中pHh3阳性表达率约为0.1%。经肌肉注射人脐带间充质干细胞后, 是否会增加对健康大鼠心肌的pHh3阳性指数的表达率, 使正常心肌组织中有丝分裂的细胞增多。本研究结果显示, 在正常组大鼠心肌组织中pHh3的阳性表达率为9%左右, 与正常组相比, 经肌肉注射不同剂量人脐带间充质干细胞组及细胞培养上清液组中pHh3的表达差异无显著性意义, 提示经肌肉注射人脐带间充质干细胞或其细胞培养上清液不会增加健康大鼠心肌组织中pHh3的异常表达。本研究结果显示pHh3的阳性表达率与已有报道不一致, 考虑可能与实验过程中pHh3兔抗大鼠多克隆抗体浓度的选择, DAB染色时间长短及人为操作等原因相关, 但本研究实验过程中各组实验条件相同, 且为同一人操作, 与正常组相比, 其他各组间pHh3的表达差异无显著性意义, 可提示对健康大鼠经肌肉注射人脐带间充质干细胞或其细胞培养液不会增加pHh3的异常表达。

cTnT是国际公认的心肌损伤的生物学标记物, 用于心肌梗死的诊断和急性冠脉综合征患者的危险度分级^[27]。在正常情况下, cTnT不能通过完整的心肌细胞膜进入外周血

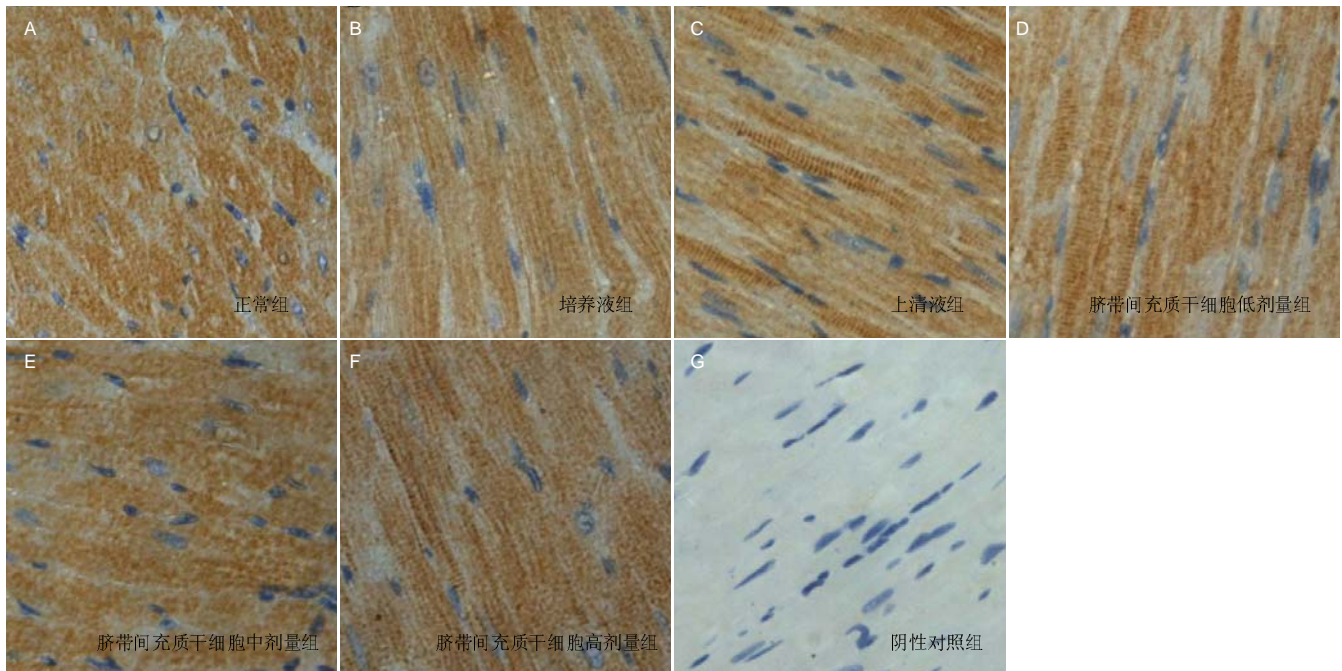


图3 各组大鼠心肌组织中 cTnT 的表达(x400)

Figure 3 Expression of cTnT in the myocardial tissue of different group rats (x400)

图注: 图中显示各组大鼠心肌组织中 cTnT 的表达结果均呈阳性。

中, 当心肌细胞在缺氧缺血变性坏死时, 游离的cTnT首先释放入血, 继而结合状态的cTnT持续的释放入血, 其释放动力学特点是血中出现时间早、持续时间长、峰值浓度高^[28], 已成为评价心肌损伤的特异性指标。Fishbein等^[29]研究在心肌缺血的动物模型中, 心肌组织缺血30 min内可检测到丢失的cTnT, 早于心肌坏死的病理组织学诊断, 是心肌坏死的早期标志, 而在非缺血心肌组织中并未发现cTnT缺失。在临床实践中, 已经证实心肌坏死时, cTnT的检测较常规CK-MB的测量值更加精确^[30-31]。通过免疫组织化学方法检测正常心肌组织中cTnT呈强阳性表达, 即无cTnT的丢失; 若存在心肌损害, 则cTnT的表达即会减弱或消失。本研究结果显示: 经肌肉注射人脐带间充质干细胞或其细胞培养液给予健康Wistar大鼠后, cTnT在大鼠心肌细胞胞浆中的免疫组织化学表达呈强阳性结果, 染色均匀, 无脱失, 提示肌肉注射人脐带间充质干细胞或其细胞培养液不会诱导健康大鼠心肌组织中cTnT的异常表达。

综上所述, 本研究发现经肌肉注射人脐带间充质干细胞对健康大鼠心肌组织中ki-67、phh3及cTnT的表达无明显影响, 提示肌肉注射人脐带间充质干细胞或其细胞培养上清液对健康大鼠心肌组织无致瘤性或损害作用。

致谢: 感谢青岛大学医学院附属医院中心实验室的帮助。

作者贡献: 实验设计为通讯作者, 实验具体实施为第一、二、三作者, 评估为通讯作者, 均经过正规培训。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical

issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 人脐带间充质干细胞-是位于羊膜被覆上皮、脐血管及两者之间的黏液结缔组织中的一种成纤维样细胞, 其为较原始的干细胞, 表达某些人胚胎干细胞的特异标志, 具有极强的可塑性和更强的扩增能力, 而无致瘤活性和低免疫原性。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Nesselmann C, Kaminski A, Steinhoff G. Cardiac stem cell therapy. Registered trials and a pilot study in patients with dilated cardiomyopathy. *Herz*. 2011;36(2):121-134.
- [2] Forte E, Chimenti I, Barile L, et al. Cardiac cell therapy: the next (re)generation. *Stem Cell Rev*. 2011;7(4):1018-1030.
- [3] Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, et al. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296(6): H1888-1897.
- [4] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834.
- [5] Tolar J, Le Blanc K, Keating A, et al. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2010;28(8):1446-1455.
- [6] Gnecci M, Zhang Z, Ni A, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11): 1204-1219.
- [7] Uemura R, Xu M, Ahmad N, et al. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 2006;98(11):1414- 1421.

- [8] Liu Y, Yan X, Sun Z, et al. Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev.* 2007;16(5):695-706.
- [9] Shabbir A, Zisa D, Leiker M, et al. Muscular dystrophy therapy by nonautologous mesenchymal stem cells: muscle regeneration without immunosuppression and inflammation. *Transplantation.* 2009;87(9):1275-1282.
- [10] Yang XF. Stem cell transplantation for treating Duchenne muscular dystrophy. *Neural Regen Res.* 2012; 7(22): 1744-1751.
- [11] Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem.* 2001; 82(4):583-590.
- [12] Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One.* 2013;8(8):e72604.
- [13] Nartprayut K, U-Pratya Y, Kheolamai P, et al. Cardiomyocyte differentiation of perinatally-derived mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2013;7(5):1465-1469.
- [14] Maureira P, Marie PY, Yu F, et al. Repairing chronic myocardial infarction with autologous mesenchymal stem cells engineered tissue in rat promotes angiogenesis and limits ventricular remodeling. *J Biomed Sci.* 2012;19:93.
- [15] 王思平. 肌肉注射异种脐带间充质干细胞对健康Wistar大鼠心肌 VEGF、cTnI 表达及血清 VEGF、HGF、IGF-1 和 GM-CSF 的影响[D]. 青岛: 青岛大学, 2012.
- [16] 张文祥. Wistar 大鼠肌肉注射异种脐带间充质细胞的安全性研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2012.
- [17] Gnechi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol.* 2012;57(1): 48-55.
- [18] van den Akker F, Deddens JC, Doevendans PA, et al. Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(2):2449-2458.
- [19] Mohammadi Gorji S, Karimpour Malekshah AA, Hashemi-Soteh MB, et al. Effect of mesenchymal stem cells on Doxorubicin-induced fibrosis. *Cell J.* 2012;14(2):142-151.
- [20] Kajstura J, Leri A, Finato N, et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8801-8805.
- [21] Kajstura J, Leri A, Castaldo C, et al. Myocyte growth in the failing heart. *Surg Clin North Am.* 2004;84(1):161-177.
- [22] 何洪燕, 林晓波, 应文娟, 等. 人脐带间充质干细胞经体内定植并向心肌样细胞分化的研究[J]. *中国输血杂志*, 2009, 22(3):188-191.
- [23] Ozaki K, Yamagami T, Nomura K, et al. Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. *J Vet Med Sci.* 2007;69(11):1117-1121.
- [24] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344(23):1750-1757.
- [25] Ribalta T, McCutcheon IE, Aldape KD, et al. The mitosis-specific antibody anti-phosphohistone-H3 (PHH3) facilitates rapid reliable grading of meningiomas according to WHO 2000 criteria. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(11):1532-1536.
- [26] Tapia C, Kutzner H, Mentzel T, et al. Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(1):83-89.
- [27] Apple FS, Collinson PO, IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem.* 2012;58(1):54-61.
- [28] Katus HA, Remppis A, Scheffold T, et al. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1991;67(16):1360-1367.
- [29] Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, et al. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Pathol.* 2003;12(2):65-71.
- [30] Heeschen C, Deu A, Langenbrink L, et al. Analytical and diagnostic performance of troponin assays in patients suspicious for acute coronary syndromes. *Clin Biochem.* 2000;33(5):359-368.
- [31] Pagani F, Bonetti G, Panteghini M. Comparative study of cardiac troponin I and T measurements in a routine extra-cardiological clinical setting. *J Clin Lab Anal.* 2001; 15(4):210-214.