

透明质酸水凝胶包裹骨髓间充质干细胞改善心肌梗死大鼠的心功能 (III)

林峰¹, 程玲², 高勇², 周建业³, 商青青^{2,3}<https://doi.org/10.12307/2023.837>

投稿日期: 2022-11-21

采用日期: 2022-12-24

修回日期: 2023-03-15

在线日期: 2023-04-20

中图分类号:

R459.9; R394.2; Q819

文章编号:

2095-4344(2024)03-00355-05

文献标识码: A

文章快速阅读: 透明质酸水凝胶调节骨髓间充质干细胞旁分泌修复损伤的心肌

实验动物造模:

- (1) 建立雌性大鼠心肌梗死模型;
- (2) 1周后行超声检测, 符合条件者按以下分组行心肌注射。

结论:

移植的细胞通过旁分泌作用促进心脏修复, 透明质酸水凝胶可延长此作用。

分组:

- (1) PBS组: 心肌内注射 50 μ L PBS;
- (2) 透明质酸组: 心肌内注射 50 μ L 透明质酸水凝胶;
- (3) 骨髓间充质干细胞组: 心肌内注射用 50 μ L PBS 溶解的 1×10^6 个骨髓间充质干细胞;
- (4) 透明质酸 + 骨髓间充质干细胞组: 心肌内注射用 50 μ L 透明质酸水凝胶包裹的 1×10^6 个骨髓间充质干细胞。

检测指标:

- (1) 移植后 1 d、1 周、2 周, Western blot 检测梗死区域及周边的基质金属蛋白酶 2、血管内皮生长因子、胸腺素 $\beta 4$ 的蛋白表达水平;
- (2) 移植后 2 周检测移植细胞有无分化。

文题释义:

透明质酸: 是一种线性的糖胺聚糖, 在多种天然组织细胞外基质中含量丰富, 参与细胞黏附、迁移、增殖及分化, 在机体组织水分保持、关节润滑和损伤修复过程中发挥重要作用。透明质酸通过化学交联方法能形成具有一定特性和机械性能的水凝胶。

可注射水凝胶修复梗死心肌的作用机制: ①作为细胞移植的载体, 通过其本身的黏滞性阻止因心脏跳动和静脉回流导致的细胞逃逸, 提高移植细胞的滞留, 并能为移植细胞提供合适的三维立体生长环境, 防止细胞的失巢凋亡, 提高细胞存活率; ②作为蛋白或者生长因子的控制释放载体, 防止这些生物活性分子被体内酶降解, 阻止其一过性释放, 延长生物活性分子在体内的作用时间, 并实现局部用药; ③水凝胶通过材料堆积增加梗死区室壁厚度, 提供力学支撑; ④性能优良的水凝胶能为内源性修复创造条件, 为干细胞植入提供附着支架; ⑤水凝胶降解的活性生物片段招募内源性干细胞, 促进心肌再生。

摘要

背景: 作者前期的研究结果显示透明质酸水凝胶包裹骨髓间充质干细胞显著改善大鼠心肌梗死后心功能。

目的: 探索透明质酸水凝胶及骨髓间充质干细胞促进心肌修复的分子机制。

方法: 分离培养雄性SD大鼠骨髓间充质干细胞, 然后用透明质酸水凝胶包裹骨髓间充质干细胞在培养皿中进行体外三维培养。结扎雌性SD大鼠左冠状动脉前降支制作心肌梗死模型, 1周后行超声检测, 将符合条件的大鼠随机分为4组: ①PBS组($n=12$); ②透明质酸组($n=12$); ③骨髓间充质干细胞组($n=15$); ④骨髓间充质干细胞+透明质酸组($n=15$)。造模1周后将模型鼠行二次开胸, 按照分组将PBS、透明质酸水凝胶、骨髓间充质干细胞、透明质酸水凝胶包裹骨髓间充质干细胞注射到梗死边缘区及梗死区。移植后1 d、1周、2周, Western blot检测梗死区域及周边的基质金属蛋白酶2、血管内皮生长因子、胸腺素 $\beta 4$ 以及c-Kit的蛋白表达水平, 移植后2周免疫荧光检测移植细胞的分化情况。

结果与结论: ①在移植后1周时, 骨髓间充质干细胞组的基质金属蛋白酶2及血管内皮生长因子蛋白表达水平明显高于其他3组($P < 0.05$); 在移植后2周时, 透明质酸组的基质金属蛋白酶2及血管内皮生长因子的表达水平明显低于其他3组($P < 0.05$), 但骨髓间充质干细胞+透明质酸组的基质金属蛋白酶2及血管内皮生长因子表达水平与骨髓间充质干细胞组相比无差异, 这可能反映了透明质酸水凝胶对骨髓间充质干细胞分泌的因子起到缓释作用以至于移植细胞的旁分泌效应得到延长, 这种延长的旁分泌效应抵消了2周时透明质酸水凝胶引发的抑制效应; ②与PBS组相比, 透明质酸组、骨髓间充质干细胞组及骨髓间充质干细胞+透明质酸组的胸腺素 $\beta 4$ 及c-Kit表达水平明显升高($P < 0.05$); ③移植后2周末检测到移植细胞向心肌细胞或血管分化; ④提示: 移植的骨髓间充质干细胞是通过旁分泌作用促进心肌修复, 透明质酸水凝胶延长了移植骨髓间充质干细胞的旁分泌作用。

关键词: 透明质酸; 骨髓间充质干细胞; 心肌梗死; 细胞移植; 心功能; 干细胞

Hyaluronic acid hydrogel-encapsulated bone marrow mesenchymal stem cells promote cardiac function in myocardial infarction rats (III)

Lin Feng¹, Cheng Ling², Gao Yong², Zhou Jianye³, Shang Qingqing^{2,3}

¹Department of Anesthesiology, ²Department of Pain, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China; ³State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China

Lin Feng, Master, Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China

滨州医学院附属医院, ¹麻醉科, ²疼痛科, 山东省滨州市 256603; ³中国医学科学院, 北京协和医学院, 国家心血管病中心, 阜外心血管病医院, 心血管疾病国家重点实验室, 北京市 100037

第一作者: 林峰, 男, 1986年生, 山东省乳山市人, 汉族, 2014年新疆医科大学毕业, 硕士, 主要从事心血管麻醉及心肌缺血相关研究。现工作单位为滨州医学院附属医院麻醉科。

通讯作者: 商青青, 硕士, 主治医师, 滨州医学院附属医院疼痛科, 山东省滨州市 256603; 中国医学科学院, 北京协和医学院, 国家心血管病中心, 阜外心血管病医院, 心血管疾病国家重点实验室, 北京市 100037

<https://orcid.org/0000-0002-3332-2642> (商青青)

引用本文: 林峰, 程玲, 高勇, 周建业, 商青青. 透明质酸水凝胶包裹骨髓间充质干细胞改善心肌梗死大鼠的心功能 (III) [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(3):355-359.



Corresponding author: Shang Qingqing, Master, Attending physician, Department of Pain, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China; State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China; State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China

Abstract

BACKGROUND: Our previous experimental results have shown that hyaluronic acid hydrogel can act as a vehicle for bone marrow mesenchymal stem cell delivery to improve the cardiac function of rats with myocardial infarction.

OBJECTIVE: To explore the molecular mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogel in promoting damaged heart repair.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells from male Sprague-Dawley rats were isolated and cultured, and then hyaluronic acid-encapsulated bone marrow mesenchymal stem cells were cultured *in vitro* in a three-dimensional manner. A model of myocardial infarction was made by ligating the left anterior descending artery of female Sprague-Dawley rats. After 1 week, the model rats were screened by ultrasonic testing and then eligible ones were randomly divided into four groups: PBS group ($n=12$), hyaluronic acid group ($n=12$), bone marrow mesenchymal stem cell group ($n=15$), and hyaluronic acid-encapsulated bone marrow mesenchymal stem cell group ($n=15$). At 1 week after ligation, the model rats underwent the secondary thoracotomy followed by corresponding injections into the infarcted region and its marginal zone. The expression levels of matrix metalloproteinase-2, vascular endothelial growth factor, thymosin β_4 and c-Kit were examined at post-injection day 1, week 1 and week 2 by western blot assay. At post-injection week 2, immunofluorescence staining was used to detect the differentiation of transplanted cells.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The expression levels of matrix metalloproteinase-2 and vascular endothelial growth factor protein in the infarct zone in the bone marrow mesenchymal stem cell group were significantly up-regulated at week 1 compared with the other three groups ($P < 0.05$). At week 2, the hyaluronic acid group had a lower expression of matrix metalloproteinase-2 and vascular endothelial growth factor protein than the other three groups ($P < 0.05$). However, the expression of matrix metalloproteinase-2 and vascular endothelial growth factor protein in the hyaluronic acid+bone marrow mesenchymal stem cell group was not significantly different compared with the bone marrow mesenchymal stem cell group. This was primarily attributable to a prolonged paracrine effect via the controlled release of the hyaluronic acid hydrogel. This prolonged paracrine effect offsets the inhibitory effect induced by hyaluronic acid hydrogel at 2 weeks. (2) Compared with the PBS group, thymosin β_4 and c-Kit expression levels in the hyaluronic acid group, bone marrow mesenchymal stem cell group and bone marrow mesenchymal stem cell+hyaluronic acid group were significantly increased ($P < 0.05$). (3) No differentiation of transplanted cells into cardiomyocytes or blood vessels was detected 2 weeks after transplantation. (4) It is indicated that transplanted bone marrow mesenchymal stem cells promote myocardial repair through the paracrine effect, and hyaluronic acid hydrogel prolongs the paracrine effect of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells.

Key words: hyaluronic acid; bone marrow mesenchymal stem cell; myocardial infarction; cell transplantation; cardiac function; stem cell

How to cite this article: LIN F, CHENG L, GAO Y, ZHOU JY, SHANG QQ. Hyaluronic acid hydrogel-encapsulated bone marrow mesenchymal stem cells promote cardiac function in myocardial infarction rats (III). *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(3):355-359.

0 引言 Introduction

近年来, 细胞治疗展现出修复受损心脏、阻止心室重塑进展的优良潜能, 进而改善心肌梗死存活者的预后^[1-5]。研究表明尽管骨髓来源细胞移植修复受损心脏是安全的^[6-7], 但是临床试验显示射血分数只有轻度提高(0-5%)^[8-10], 这远远不能达到临床要求。低移植率是限制细胞治疗效果的一个重要因素^[11], 课题组前期研究发现透明质酸水凝胶提高了移植细胞的滞留及存活率^[12], 使得心肌梗死部位早期(2周之内)有更多的细胞参与损伤心肌的修复过程, 透明质酸联合骨髓间充质干细胞组梗死区室壁厚度最厚、心肌细胞面积最小、瘢痕少、胶原沉积减少、新生血管增多, 而且存活心肌增多, 取得了最大修复受损心脏的效应^[13]。

目前认为关于骨髓间充质干细胞移植带来的心脏获益主要归因于骨髓间充质干细胞的旁分泌作用^[14], 这种作用主要是指移植的骨髓间充质干细胞分泌细胞因子动态改变心肌微环境, 促进修复^[15], 其分泌的细胞因子主要分为4种^[16]:

①血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子1、成纤维细胞生长因子2、血小板衍生生长因子等促进血管再生; ②基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9等调控细胞外基质重塑; ③胸腺素 β_4 、成纤维细胞生长因子、粒细胞集落刺激因子、胰岛素样生长因子1、巨噬细胞集落刺激因子等促进内源性干细胞增殖、招募及存活; ④血红素氧合酶1、肝细胞生长因子、诱导型一氧化氮合酶、白细胞介素6等参与免疫调节。

该研究拟进一步探索透明质酸水凝胶及骨髓间充质干细胞促进心肌修复的分子机制, 选取了心室重塑、血管新生以及内源性干细胞迁移的代表性因子基质金属蛋白酶2、血管

内皮生长因子、胸腺素 β_4 , 在透明质酸水凝胶及骨髓间充质干细胞注射后1 d、1周及2周时采用Western blot检测梗死及周边区这些指标的蛋白表达水平, 免疫荧光检测移植的细胞分化情况。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 移植前后对比观察动物实验, 利用单因素方差分析多组蛋白水平的变化。

1.2 时间及地点 实验于2014年1月至2018年1月在北京协和医学院阜外心血管病医院心血管疾病国家重点实验室和滨州医学院附属医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康雄性三四周龄的SPF级SD大鼠20只, 体质量60 g左右, 用于分离骨髓间充质干细胞; 健康雌性6-8周龄SD大鼠54只, 体质量220 g左右。所有大鼠均由北京大学医学部提供, 许可证号: SCXK(京)2001-0012, 动物饲养环境为清洁级。

实验方案经阜外医院动物实验伦理委员会批准, 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 实验用主要试剂、设备 DMEM培养液及胎牛血清(Gibco, 美国); 磷酸盐缓冲液(Sigma, 美国); CM-DIL(Invitrogen, 美国); IX70型倒置相差荧光显微镜(Olympus, 日本); 组织切片机、冰冻切片机(Leica, 德国); 荧光封固剂(含DAPI)(北京中山金桥生物公司); 透明质酸水凝胶试剂盒(HyStem Hydrogel)(Bio Time Inc., 美国)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养及标记 麻醉后采用颈椎脱臼法处死三四周龄雄性 SD 大鼠，取股骨和胫骨，用 5 mL 注射器吸取 DMEM 细胞培养液反复冲洗骨髓腔，尽量将冲出的块状骨髓冲散。将冲出的骨髓液接种于培养瓶内，在体积分数为 5%CO₂、37 °C 细胞培养箱内原代培养，24 h 后首次换液，以后每隔 2 d 换液 1 次，达 70%–80% 融合时以 1 : 2 的比例传代。收集第 2 代细胞，加入 1 g/L 的 CM-DIL 5 μL 进行细胞标记，37 °C 孵育 5 min，混匀后 4 °C 冰箱放置 15 min 后备用。

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定：

细胞来源	大鼠的股骨骨髓和胫骨骨髓
原代培养方法	全骨髓贴壁培养
基础培养基	DMEM 细胞培养基
添加材料	含体积分数 10% 胎牛血清 +1% 链霉素 / 青霉素
原代培养时间	原代培养至 24 h 首次换液，以后每隔 2 d 换液 1 次，培养 5 d 传代
细胞传代	第 5 天左右细胞可达到 70%–80% 融合，此时用预热的 0.25% 胰蛋白酶溶液以 1 : 2 的比例进行消化传代。每隔 5 d 传 1 代，共传 2 代，实验选取第 2 代对数增长期的骨髓间充质干细胞
细胞鉴定	流式鉴定
伦理学批准	该实验经过阜外医院动物实验伦理委员会批准

1.4.2 透明质酸水凝胶的制备 透明质酸水凝胶试剂盒 HyStem Hydrogel 内含冻干状固体 HyStem™(经巯基修饰的透明质酸)、Extralink™(聚乙二醇二丙烯酸酯)和脱气去离子水 3 个组分，按照说明书制作 0.8% 的透明质酸水凝胶。用 1 mL 注射器向 HyStem 管形瓶中添加 1.0 mL 去离子水，用注射器向 Extralink 管形瓶中添加 0.5 mL 去离子水，将 Extralink 和 HyStem 按照 1 : 4 比例混合，20 min 内完成凝胶化。封装细胞时，混合液先反应 10 min，然后用移液枪吹吸溶液，使细胞在凝胶中均匀分布，再进行移植。

1.4.3 大鼠心肌梗死模型的制作^[17] 将雌性 SD 大鼠麻醉开胸后结扎前降支，以心脏前壁局部颜色转为苍白为标准。结扎后 1 周，使用超声心动图筛选符合条件的大鼠，心肌梗死入选标准是短轴缩短率小于 30%。

1.4.4 动物分组及体内移植 将符合条件的大鼠随机分为 4 组：① PBS 对照组 ($n=12$)：心肌内注射 50 μL PBS；② 透明质酸组 ($n=12$)：心肌内注射 50 μL 透明质酸水凝胶；③ 骨髓间充质干细胞组 ($n=15$)：心肌内注射用 50 μL PBS 溶解的 1×10^6 个骨髓间充质干细胞；④ 骨髓间充质干细胞 + 透明质酸组 ($n=15$)：心肌内注射用 50 μL 透明质酸水凝胶封装的 1×10^6 个骨髓间充质干细胞。造模 1 周后将模型鼠行二次开胸，按照分组将移植注射到梗死边缘区及梗死区，移植新鲜配制，5 min 内注射完毕。

1.4.5 免疫印迹杂交 (Western blot) 移植后 1 d、1 周、2 周，按实验计划取相应数量的大鼠 (每个时间点每组 4 只大鼠)，经吸入七氟醚后腹腔注射戊巴比妥钠处死，取出心脏，

选取梗死区及周边区进行检测，利用均质破碎仪将心肌组织匀浆，取上清 2 μL 用于蛋白浓度测定，100 °C 加热 5 min 进行蛋白样品变性，用 Nu-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质，将胶从电泳装置上卸下后，浸泡于转膜缓冲液中，室温孵育 5 min，转膜结束后，漂洗显色，按需要将膜进行裁剪，5% 牛奶封闭液室温封闭 2 h，封闭硝酸纤维素膜上的非特异性免疫球蛋白结合位点，用封闭液稀释特定浓度的抗体，将膜放入杂交袋中，加入适量稀释好的一抗 [抗血管内皮生长因子 (1 : 1 000)、抗基质金属蛋白酶 2 (1 : 2 500)、抗胸腺素 β4 (1 : 250)、抗 c-Kit (1 : 250)]，4 °C 孵育过夜，洗膜，辣根过氧化物酶封口，室温孵育 2 h，洗膜 4 次，等体积加入 A 液和 B 液化学发光液，混匀后铝箔纸包裹待用。用 Quantified one 光度仪 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 检测曝光情况，并用 Quantity One 图像分析软件进行灰度扫描，以 GAPDH 为内参，对结果进行校正，进行统计分析。

1.4.6 免疫荧光染色 移植后 2 周，对心肌冰冻组织切片进行免疫荧光分析，以 5 μm 厚度连续切片，冰冻切片用 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min，PBS 轻轻冲洗，体积分数为 10% 山羊血清 +0.3% Triton X-100 37 °C 封闭 1 h，擦干不洗，加入稀释的一抗 [Tnt (1 : 500), vWF (1 : 1 000), SMA (1 : 2 000)] 4 °C 孵育过夜，37 °C 水浴复温 45 min，PBS 轻轻冲洗，加入二抗 37 °C 孵育 1 h，PBS 轻轻冲洗，用含 DAPI 的封片剂封固，激光扫描共聚焦显微镜观察拍照。如 DAPI 与 CM-DIL 同时阳性者为移植的细胞，移植的细胞如表达 Tnt 或 vWF 或 SMA，则表明移植的细胞向心肌细胞或血管分化。

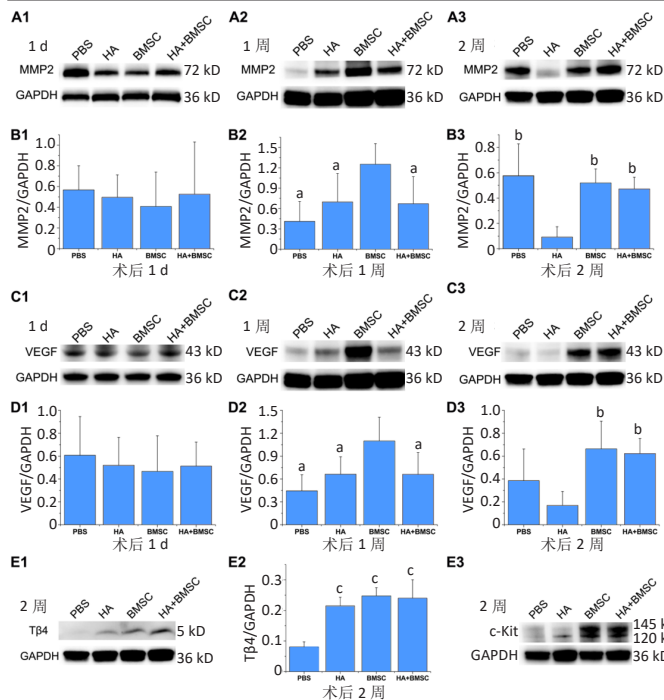
1.5 主要观察指标 基质金属蛋白酶 2、血管内皮生长因子、胸腺素 β4 以及 c-Kit 的蛋白表达水平；移植的细胞分化情况。

1.6 统计学分析 结果数据表示为 $\bar{x} \pm s$ ，多组比较用单因素方差分析，进一步两两比较用 SNK 检验。应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经滨州医学院附属医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入 54 只 SD 大鼠，均进入结果分析。

2.2 基质金属蛋白酶 2、血管内皮生长因子蛋白表达 在注射后 1 d 时，4 组之间基质金属蛋白酶 2、血管内皮生长因子蛋白表达水平无统计学差异；在注射后 1 周时，骨髓间充质干细胞组的基质金属蛋白酶 2、血管内皮生长因子蛋白表达水平明显高于其他 3 组 ($P < 0.05$)；在注射后 2 周时，与骨髓间充质干细胞组及骨髓间充质干细胞 + 透明质酸组相比，透明质酸组的基质金属蛋白酶 2、血管内皮生长因子蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$)，然而骨髓间充质干细胞 + 透明质酸组的基质金属蛋白酶 2、血管内皮生长因子蛋白表达水平却没有下调，与骨髓间充质干细胞组相比无差异 ($P > 0.05$)，见图 1。这可能反映了透明质酸水凝胶对骨髓间充质干细胞分泌的因子起到缓释作用以至于移植细胞的旁分泌效应得到延



图注：图 A1-A3 为注射后不同时间点各组 MMP2 表达的 Western blot 图片；B1-B3 为与 A1-A3 相对应的各组 MMP2 表达水平 (B2: 与 BMSC 组比较, $^aP < 0.05$; B3: 与 HA 组比较, $^bP < 0.05$)；C1-C3 为注射后不同时间点各组 VEGF 表达的 Western blot 图片；D1-D3 为与 C1-C3 相对应的各组 VEGF 表达水平 (D2: 与 BMSC 组比较, $^aP < 0.05$; D3: 与 HA 组比较, $^bP < 0.05$)；E1 为注射后 2 周各组 Tβ4 表达的 Western blot 图片；E2 为注射后 2 周各组 Tβ4 表达水平 (与 PBS 组比较, $^cP < 0.05$)；E3 为注射后 2 周各组 c-Kit 表达的 Western blot 图片。HA: 透明质酸; BMSC: 骨髓间充质干细胞

图 1 | Western blot 检测梗死及周围区域的基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、血管内皮生长因子 (VEGF)、胸腺素 β4 (Tβ4) 及 c-Kit 前体蛋白表达水平
Figure 1 | Western blot assay detection of matrix metalloproteinase-2 (MMP2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and thymosin β4 (Tβ4) and c-Kit precursor protein expression levels in the infarct and surrounding areas

长, 这种延长的旁分泌效应抵消了 2 周时透明质酸水凝胶引发的抑制效应。

2.3 胸腺素 β4 及 c-Kit 前体蛋白表达水平 研究表明胸腺素 β4 是一个小的肌动蛋白整合肽, 能通过招募内源性 c-Kit⁺ 的祖细胞到梗死区域内修复受损心肌^[18]。在注射后 2 周, 与 PBS 组相比, 其他 3 组的胸腺素 β4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$)。同时, 透明质酸组、骨髓间充质干细胞组及骨髓间充质干细胞 + 透明质酸组的 c-Kit 前体 (120 kD) 蛋白表达水平也明显上调, 见图 1。

2.4 移植细胞的分化 移植后 2 周, 免疫荧光检测发现移植的骨髓间充质干细胞没有同时表达 Tnt, 见图 2, 说明未向心

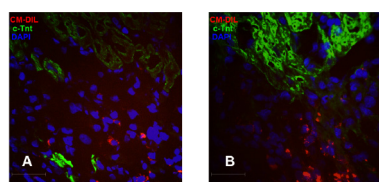
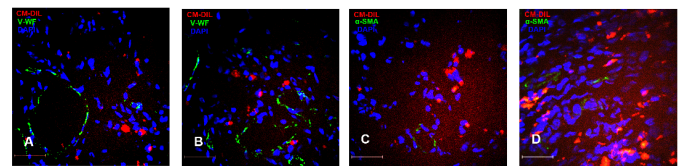


图 2 | 移植后 2 周移植细胞 (红色的 CM-DIL 及蓝色的 DAPI) 未表达 c-Tnt (绿色)
Figure 2 | Transplanted cells (red CM-DIL and blue DAPI) did not express c-Tnt (green) 2 weeks after transplantation

肌细胞分化; 移植的细胞也未同时表达血管内皮细胞特异的 vWF 和血管平滑肌细胞特异的 SMA, 见图 3, 说明移植的细胞未向血管分化。



图注：图 A, C 为骨髓间充质干细胞组; B, D 为骨髓间充质干细胞 + 透明质酸组 (标尺 100 μm)
图 3 | 移植后 2 周移植细胞 (红色的 CM-DIL 及蓝色的 DAPI) 未表达 vWF (绿色) 及 SMA (绿色)
Figure 3 | Transplanted cells (red CM-DIL and blue DAPI) did not express vWF (green) and SMA (green) 2 weeks after transplantation

3 讨论 Discussion

该研究从分子水平证实了透明质酸水凝胶作为骨髓间充质干细胞移植的载体促进了大鼠心肌梗死后心脏修复及心功能的改善。在移植后 1 周时, 骨髓间充质干细胞组的基质金属蛋白酶 2 及血管内皮生长因子蛋白表达水平明显升高, 在移植后 2 周时, 透明质酸组的基质金属蛋白酶 2 及血管内皮生长因子蛋白表达水平明显下降, 但骨髓间充质干细胞 + 透明质酸组的基质金属蛋白酶 2 及血管内皮生长因子蛋白表达水平却没有下降, 且与骨髓间充质干细胞组相比无差异, 表明移植的细胞通过旁分泌作用促进心脏修复, 透明质酸水凝胶延长了细胞的旁分泌作用。

目前大量的动物实验以及临床试验均表明骨髓间充质干细胞移植可以改善心肌梗死后心功能, 减轻心室重塑, 促进血管生成^[2, 19]。这种细胞移植治疗的机制主要有 2 个方面: 分化作用及旁分泌作用。分化作用是指移植的骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞及血管的内皮细胞和平滑肌细胞, 替代受损心肌。骨髓间充质干细胞作为成体干细胞, 其在体内能否向心肌细胞分化备受争议。有学者指出: 即使骨髓间充质干细胞可以分化为心肌细胞, 这种发生率也是罕见的, 以至于不能形成有意义的肌肉块^[14]。该研究显示移植的细胞未向心肌细胞及血管分化。目前认为关于骨髓间充质干细胞移植带来的心脏获益主要归因于骨髓间充质干细胞的旁分泌作用^[14, 16], 这也就合理解释了在移植细胞数量少的情况下, 依然可观察到移植细胞促进血管生成以及心功能改善^[20]。

研究表明在修复受损心脏中, 移植的细胞通过分泌某些因子改变梗死区域的微环境, 放大宿主相关的内源性信号通路, 导致利于修复与再生的因子表达上调^[21-22]。该研究中的 Western blot 结果也表明了移植细胞的旁分泌效应。尽管特定的内源性信号通路及利于修复与再生的因子来源超越研究的范围, 但骨髓间充质干细胞组梗死区微环境中的代表性修复因子如基质金属蛋白酶 2、血管内皮生长因子及胸腺素 β4 的表达水平上调。移植后 2 周时, 与 PBS 对照组比, 骨髓间充质干细胞组的基质金属蛋白酶 2 及血管内皮生长因子表达水平没有统计学差异, 透明质酸水凝胶组的基质金属蛋白酶 2 及血管内皮生长因子蛋白表达水平却下调, 但是, 骨髓间

充质干细胞 + 透明质酸组的基质金属蛋白酶 2 及血管内皮生长因子蛋白表达水平并没有下调, 这主要归因于透明质酸水凝胶的缓释作用。溶解在 PBS 中的骨髓间充质干细胞分泌的因子呈一过性释放, 在体内很快被蛋白酶解, 随之丧失生物活性^[23]。多项研究表明透明质酸水凝胶作为缓释系统, 有能力保持细胞因子或者蛋白的生物活性, 抑制其一过性释放, 提高细胞因子或者蛋白的利用率^[24-26]。前期超声心动图及组织学评价均表明骨髓间充质干细胞 + 透明质酸组的心脏获益最大, 优于单纯移植细胞组^[12-13], 这进一步说明透明质酸水凝胶延长了移植的骨髓间充质干细胞的旁分泌效应。此次研究的不足之处是没有选取移植后更长时间去探索细胞因子的表达水平, 作者推测在某个更长的时间点上骨髓间充质干细胞 + 透明质酸组的细胞因子表达量会显著高于单纯移植细胞组, 这在以后的研究中会被探索。移植细胞的旁分泌作用对心肌修复的贡献有多少尚有待进一步研究。

此次研究中透明质酸组的胸腺素 $\beta 4$ 与 c-Kit 前体表达上调反映了透明质酸水凝胶能影响梗死区域的微环境, 通过招募内源性 c-Kit⁺ 祖细胞促进心肌再生进而修复梗死心肌, 这可能归因于具有生物活性的透明质酸水凝胶的降解片段。

此次研究提示移植细胞的旁分泌作用动态影响了心肌的微环境, 促进心脏修复, 透明质酸水凝胶延长了细胞的旁分泌作用, 透明质酸水凝胶可招募宿主内源性干细胞, 修复梗死区, 由骨髓间充质干细胞与透明质酸水凝胶组成的复合物在心肌梗死治疗方面有较好的应用价值, 值得进一步研究。

致谢: 感谢阜外心血管病医院 & 心血管疾病国家重点实验室刘学文及李君老师提供技术上的帮助。

作者贡献: 第一、五作者负责进行实验实施、论文撰写, 第二、三、五作者负责实验数据分析处理实验设计, 第五作者进行实施负责细胞培养、指标检测, 第四作者负责数据和文章的校对。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] LI Z, HU S, CHENG K. Chemical Engineering of Cell Therapy for Heart Diseases. *Acc Chem Res.* 2019;52(6):1687-1696.

[2] KATARZYNA R. Adult Stem Cell Therapy for Cardiac Repair in Patients After Acute Myocardial Infarction Leading to Ischemic Heart Failure: An Overview of Evidence from the Recent Clinical Trials. *Curr Cardiol Rev.* 2017;13(3):223-231.

[3] SANO T, ISHIGAMI S, ITO T, et al. Stem Cell Therapy in Heart Disease: Limitations and Future Possibilities. *Acta Med Okayama.* 2020;74(3):185-190.

[4] ZHANG J, BOLLI R, GARRY DJ, et al. Basic and Translational Research in Cardiac Repair and Regeneration: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2021;78(21):2092-2105.

[5] ISHIGAMI S, SANO T, KRISHNAPURA S, et al. An overview of stem cell therapy for paediatric heart failure. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2020;58(5):881-887.

[6] LALU MM, MAZZARELLO S, ZLEPNIG J, et al. Safety and Efficacy of Adult Stem Cell Therapy for Acute Myocardial Infarction and Ischemic Heart Failure (SafeCell Heart): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(12):857-866.

[7] BOLLI R, SOLANKHI M, TANG XL, et al. Cell therapy in patients with heart failure: a comprehensive review and emerging concepts. *Cardiovasc Res.* 2022;118(4):951-976.

[8] KLYACHKIN YM, IDRIS A, RODELL CB, et al. Cathelicidin Related Antimicrobial Peptide (CRAMP) Enhances Bone Marrow Cell Retention and Attenuates Cardiac Dysfunction in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *Stem Cell Rev Rep.* 2018;14(5):702-714.

[9] SANGANALMATH SK, BOLLI R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res.* 2013;113(6):810-834.

[10] LIEW LC, HO BX, SOH BS. Mending a broken heart: current strategies and limitations of cell-based therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):138.

[11] YAO Y, LIAO W, YU R, et al. Potentials of combining nanomaterials and stem cell therapy in myocardial repair. *Nanomedicine (Lond).* 2018;13(13):1623-1638.

[12] 商青青, 周建业, 李凯, 等. 透明质酸水凝胶包裹骨髓间充质干细胞改善大鼠心肌梗死后心功能 [J]. *中国组织工程研究.* 2018,22(5):675-679.

[13] 商青青, 周建业. 透明质酸水凝胶包裹骨髓间充质干细胞改善心肌梗死大鼠的心功能 (II) [J]. *中国组织工程研究.* 2020,24(34):5559-5563.

[14] BAREEQA SB, BIBI F, AHMED SI, et al. Advancement in Stem Cell Therapy for Ischemic Myocardial Cell: A Systematic Review. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2018;12(4):282-290.

[15] MOUNT S, KANDA P, PARENT S, et al. Physiologic expansion of human heart-derived cells enhances therapeutic repair of injured myocardium. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):316.

[16] MICHLER RE. The current status of stem cell therapy in ischemic heart disease. *J Card Surg.* 2018;33(9):520-531.

[17] ZHOU Q, ZHOU JY, ZHENG Z, et al. A novel vascularized patch enhances cell survival and modifies ventricular remodeling in a rat myocardial infarction model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;140:1388-1396.e1-3.

[18] POH KK, LEE PSS, DJOHAN AH, et al. Transplantation of Endothelial Progenitor Cells in Obese Diabetic Rats Following Myocardial Infarction: Role of Thymosin Beta-4. *Cells.* 2020;9(4):949.

[19] POGLAJEN G, FRLJAK S, ZEMLIČ G, et al. Stem Cell Therapy for Chronic and Advanced Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2020;17(5):261-270.

[20] PASSIER R, VAN LAAKE LW, MUMMERY CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature.* 2008;453(7193):322-329.

[21] LI H, WU F, HUANG G, et al. Cardiomyocytes induced from hiPSCs by well-defined compounds have therapeutic potential in heart failure by secreting PDGF-BB. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):253.

[22] YU H, LU K, ZHU J, et al. Stem cell therapy for ischemic heart diseases. *Br Med Bull.* 2017;121(1):135-154.

[23] CAI S, LIU Y, ZHENG SHU X, et al. Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* 2005;26(30):6054-6067.

[24] HAMILTON M, HARRINGTON S, DHAR P, et al. Hyaluronic Acid Hydrogel Microspheres for Slow Release Stem Cell Delivery. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021;7(8):3754-3763.

[25] CHIRCOV C, GRUMEZESCU AM, BEJENARU LE. Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(1):71-76.

[26] PÉREZ LA, HERNÁNDEZ R, ALONSO JM, et al. Hyaluronic Acid Hydrogels Crosslinked in Physiological Conditions: Synthesis and Biomedical Applications. *Biomedicines.* 2021;9(9):1113.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, YJ)