

Effect of intramyocardial controlled releasing base fibroblast growth factor stent combined with bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation on cardiac repair in porcine acute myocardial infarction models

ZHAO Xiao-bin¹, SHI Rong-fang^{1*}, TANG Kun¹, ZHAO Jian², WANG Ying², LIU Xiao-cheng²

(1. Department of Nuclear Medicine, 2. Department of Cardiovascular Surgery, Teda International Cardiovascular Hospital, Tianjin 300457, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the therapeutic effect of intramyocardial controlled releasing base fibroblast growth factor (b-FGF) stent combined with transplanting bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in porcine acute myocardial infarction (AMI) models. **Methods** Eighteen porcines were divided into three groups (each $n=6$): transmyocardial revascularization (TMR) + naked stent (control group), TMR + b-FGF stent (b-FGF group) and TMR + b-FGF stent + BM-MSCs (b-FGF + BM-MSCs group). Acute myocardial infarction models were induced by ligating the left anterior descending artery in 18 porcine. In the control and b-FGF group, naked stents, b-FGF stents and b-FGF stent + BM-MSCs were implanted into TMR channels in the infarct and border zone. ^{99m}Tc-methoxyisobutylisonitrile (MIBI) myocardial perfusion imaging were performed to evaluate changes in myocardial blood flow, and echocardiography and immunohistochemical studies were also performed. **Results** After 6 weeks, the quality of myocardial infarction, fractional shortening, neovascular density in b-FGF and b-FGF stent + BM-MSCs group were higher than those of control group ($P < 0.05$), and in b-FGF stent + BM-MSCs group was higher than those in b-FGF group ($P < 0.05$). **Conclusion** BM-MSCs combined with controlled releasing intramyocardial b-FGF stent can improve the flow of myocardial infarction area, promote angiogenesis and heart function, and the therapeutic effect which can be evaluated with myocardial SPECT imaging.

[Key words] Bone marrow mesenchymal stem cells; Base fibroblast growth factor; Tomography, emission-computed, single photon; Porcine

碱性成纤维细胞生长因子缓释支架联合骨髓间质干细胞治疗猪心肌梗死的心肌 SPECT 显像

赵晓斌¹, 史蓉芳^{1*}, 唐坤¹, 赵健², 王颖², 刘晓程²

(1. 天津泰达国际心血管病医院核医学科, 2. 心外科, 天津 300457)

[摘要] **目的** 评价心肌 SPECT 显像对碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)缓释支架联合骨髓间质干细胞(BM-MSCs)移植治疗中国实验用小型猪急性心肌梗死的价值。**方法** 中国实验用小型猪 18 头,按完全随机法分为 3 组:机械打孔 + 空白支架(对照组)、机械打孔 + b-FGF 支架(单纯治疗组)、机械打孔 + b-FGF 支架 + BM-MSCs(联合治疗组)。所有猪左前降支均被结扎制作心肌梗死模型。3 组均在梗死区及周边区机械打孔并分别埋入空白支架、b-FGF 支架、b-FGF 支架 + BM-MSCs;术后行心肌 SPECT 显像检测心肌血流的变化,同时还进行超声心动图、免疫组化检查。**结果** 术后 6 周,治疗组梗死心肌质量差值、短轴缩短率、新生血管密度均高于对照组($P < 0.05$),且联合治疗组高于单纯治疗组($P < 0.05$)。**结论** b-FGF 缓释支架联合 BM-MSCs 能够改善心肌梗死区域血流、促进血管生长、提高心功能;心肌 SPECT 显像是评估碱性成纤维细胞生长因子缓释支架联合骨髓间质干细胞治疗急性心肌梗死效果有价值的方法。

[基金项目] 天津市科技发展计划项目(05YFGZSF2900)。

[作者简介] 赵晓斌(1977—),男,山西原平人,硕士,主治医师。研究方向:核心脏病学。E-mail: flxzb@163.com

[通讯作者] 史蓉芳,天津泰达国际心血管病医院核医学科,300457。E-mail: shirf@tedaich.com

[收稿日期] 2009-09-07 **[修回日期]** 2009-11-11

[关键词] 骨髓间质干细胞移植;碱性成纤维细胞生长因子;体层摄影术,发射型计算机,单光子;猪

[中图分类号] R542.2; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2010)03-0410-04

对急性心肌梗死后存在冠状动脉弥漫性病变、传统药物治疗差、而又无经皮冠状动冠介入术(percutaneous coronary intervention, PCI)或冠状动脉搭桥术(coronary artery bypass graft, CABG)适应证患者的治疗一直是临床的难题。动物实验和临床研究证实,使用碱性成纤维细胞生长因子

(base fibroblast growth factor, b-FGF) 治疗和自体骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)移植能够增加缺血心肌血流,改善预后。本实验旨在探讨两种方法联合治疗急性心肌梗死的疗效,并采用心肌 SPECT 显像和超声心动图观察心肌血流和心功能的变化。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备与分组 选择中国农业大学引进的中国实验用小型猪 18 头,雌雄不限,体质量 25 ~ 35 kg。采用完全随机设计方法分为 3 组(n 均 = 6):机械打孔 + 空白支架(对照组)、机械打孔 + b-FGF 支架(单纯治疗组)、机械打孔 + b-FGF 支架 + BM-MSCs(联合治疗组)。所有猪均按体质量肌注氯胺酮(10 mg/kg)、咪唑安定(0.2 mg/kg)诱导麻醉,术中吸入体积分数 1% ~ 2% 的异氟醚,以氯胺酮 20 μg/(min · kg)

表 1 三组间心肌 SPECT 显像、FS、新生血管密度比较(̄x ± s)

组别	心肌 SPECT 显像		FS(%)	新生血管密度 (像素/高倍视野)
	梗死心肌质量差值(g)	心肌缺血分值差值(分)		
单纯治疗组	34.33 ± 4.18 *	13.83 ± 2.86 *	31.13 ± 0.99 *	6201 ± 443 *
联合治疗组	46.83 ± 1.72 #	17.00 ± 2.10 #	33.32 ± 1.26 #	6447 ± 403 #
对照组	24.33 ± 2.16	8.33 ± 1.37	27.11 ± 0.71	2654 ± 373

注: * :与对照组比较, P < 0.05; # :与单纯治疗组比较, P < 0.05

静脉滴注维持麻醉。持续心电监护。胸骨正中切口,于前降支中、远端 1/3 交界处丝线结扎。心电监护前壁导联 ST 段有明显抬高且搏动减弱,即认为急性心肌梗死模型成功。术后饲养 6 周。

1.2 制备 b-FGF 缓释可降解支架 选聚己酸内酯、聚乳酸/乙醇酸及致孔剂辅料 Fluronic 68 作为支架原料,聚乳酸 聚乙醇酸 = 50 50 的单体共聚体作为药物缓释载体层。通过高温熔融挤塑、溶剂蚀刻、表面喷涂等工艺,制成外径 3.0 mm、内径 2.8 mm 的双层同心管状支架。应用微型钻头对支架侧壁进行阵列式打孔。真空干燥后切割成 8 ~ 10 mm 的管状支架,单纯治疗组每个支架含人重组 b-FGF 15 μg(相对分子量 14 000,纯度 > 97%),对照组不含任何生物制剂。3 组支架均经 ⁶⁰Co 消毒 24 h, 4℃ 储存备用。

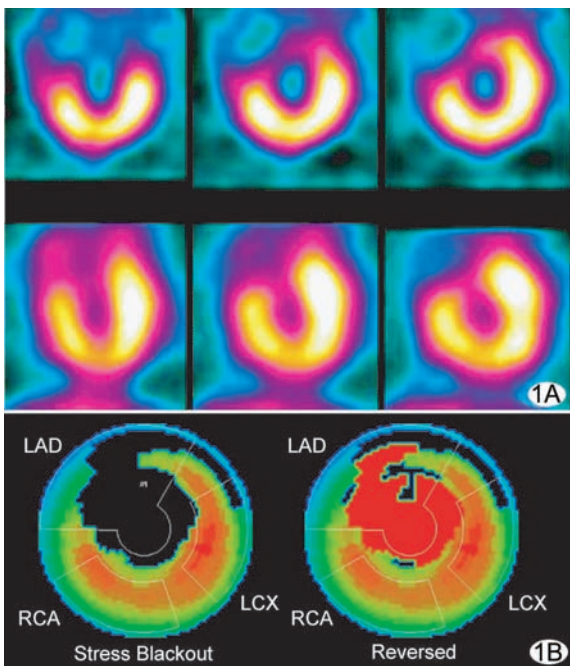


图 1 单纯治疗组梗死早期和梗死晚期心肌显像 A. SPECT 显像,上排为心肌梗死早期显像结果,下排为心肌梗死晚期显像结果; B. 相应靶心图,左侧为心肌梗死早期靶心图,右侧为心肌梗死晚期靶心图。心尖部和前壁灌注缺损区缩小 (LAD:左前降支; RCA:右冠状动脉; LCX:左回旋支)

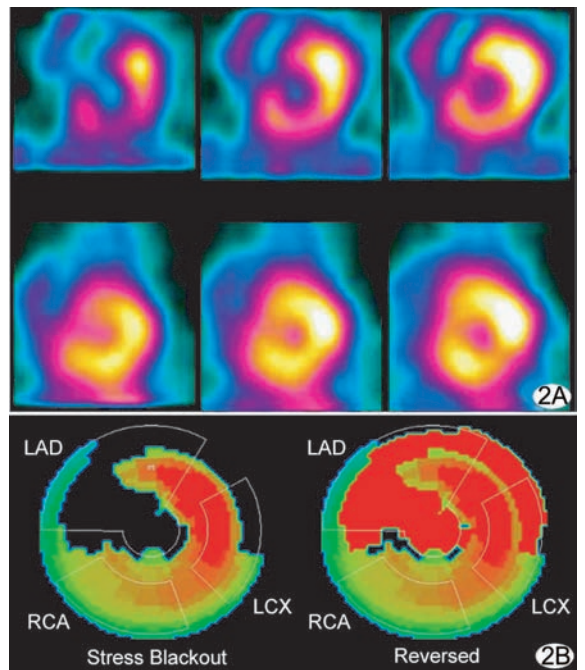


图 2 联合治疗组梗死早期和梗死晚期心肌显像 A. SPECT 显像,上排为心肌梗死早期显像结果,下排为心肌梗死晚期显像结果; B. 相应靶心图,左侧为心肌梗死早期靶心图,右侧为心肌梗死晚期靶心图。心尖部和前壁灌注缺损区缩小,且缩小程度大于单纯治疗组 (LAD:左前降支; RCA:右冠状动脉; LCX:左回旋支)

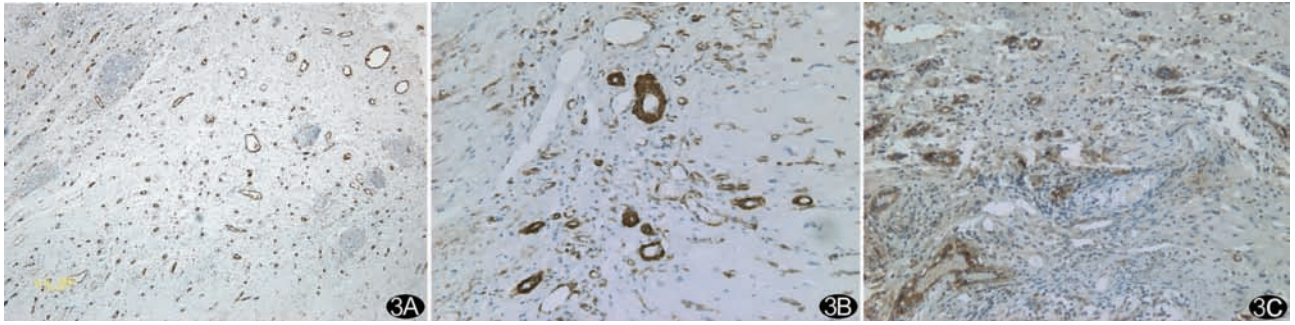


图3 心肌免疫组织化学染色图 A. 对照组; B. 单纯治疗组; C. 联合治疗组。梗死晚期 vWF 染色阳性区域比较, 图中棕色染色颗粒为 vWF 染色呈阳性的内皮细胞, 治疗组数量多于对照组, 联合治疗组数量多于单纯治疗组, 表明联合治疗组新生血管形成数量多于单纯治疗组和对照组 (vWF 染色, $\times 100$)

1.3 骨髓间质干细胞的分离和培养 麻醉动物, 抽取 25 ml 骨髓液, 用 D-Hanks 液适当稀释后计数, 调整骨髓细胞浓度至 10^7 个/ml。向两个离心管内分别加入 Ficoll 试剂和上述骨髓细胞悬液, 以 1800 r/min 的速度离心 20 min。吸取单个核细胞, 用 D-Hanks 液洗涤计数, 并以 1×10^6 个/cm² 的密度接种于培养瓶中, 细胞培养体系含 58% DMEM/F12、40% MCDB-201、2% 胎牛血清、10 ng/ml 表皮生长因子、10 ng/ml 血小板源性生长因子、 $1 \times$ 胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸、 $1 \times$ 亚油酸-牛血清白蛋白、50 μ mol/L β 巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 μ g/ml 青霉素和 100 U/ml 硫酸链霉素, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% 湿度培养箱内培养。将 3~6 代的间质干细胞冻存于液氮罐备用。细胞移植前以 0.01% 胰酶收获细胞。

1.4 b-FGF 缓释支架和干细胞移植治疗方法 制作急性心肌梗死模型成功后, 在预先缝好的荷包内使用机械打孔器在梗死区域内及周边打 3 个孔, 孔径 3.0 mm, 每孔埋入 1 枚支架后打结, 避免出血, 同时将缓释支架缝线固定于心肌表面以防止脱落。联合治疗组使用 1 ml 微量注射器将 2×10^7 干细胞间隔缓慢注入梗死心肌及其周边区域。

1.5 心肌 SPECT 显像 关胸后经耳缘静脉注射心肌显像剂 ^{99m}Tc-甲氧基异丁基异腈 (MIBI) 11.1~14.8 MBq/kg, 1 h 后行第一次心肌灌注断层显像, 所用仪器为 GE Millennium VG-5, 配低能通用型准直器, 每帧采集 25 s, 共采集 30 帧, 矩阵 64 \times 64, 放大倍数 2.0。采用滤波反投影重建原始图像。重建前滤波选 butter-worth, critical frequency 取 0.52, power 取 5.0。饲养 6 周后采用同样条件行第 2 次心肌 SPECT 显像。两次显像均在麻醉状态下进行, 妥善保定实验猪, 确保采集过程中无位置移动。

使用计算机自带软件 Emory Toolbox 计算两次心肌显像的梗死心肌质量差值和心肌缺血分值差值。心肌缺血分值计算方法: 计算机自动将心肌靶心图划分为 20 个节段, 按 5 分法对心肌血流受损程度评分: 0 分表示正常; 1 分表示轻度减低; 2 分表示中度减低, 3 分表示重度减低, 4 分表示无血流。

1.6 超声检查 饲养 6 周后使用 GE Vivid 7 超声心动图测定短轴缩短率 (fraction shortening, FS)。

1.7 组织学检查 缓释支架成功埋入 6 周后处死动物, 取心肌组织标本经常规甲醛固定、石蜡切片后, 行 vWF 血管内皮

细胞染色进行免疫组织化学检测, 以 Image Pro Plus 图像分析软件量化各组的新生血管密度。

1.8 统计学分析 使用 SPSS 11.5 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用成组资料的 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

心肌 SPECT 显像、FS、新生血管密度结果见表 1。治疗组梗死心肌质量差值显著高于对照组 ($t_{\text{单纯治疗组}} = 5.03, P < 0.05; t_{\text{联合治疗组}} = 25.42, P < 0.05$)。联合治疗组梗死心肌质量差值高于单纯治疗组 ($t = 6.60, P < 0.05$)。治疗组心肌缺血分值差值显著高于对照组 ($t_{\text{单纯治疗组}} = 5.06, P < 0.05; t_{\text{联合治疗组}} = 11.40, P < 0.05$)。联合治疗组心肌缺血分值差值高于单纯治疗组 ($t = 3.12, P < 0.05$)。治疗后典型的心肌灌注变化见图 1、2。治疗组 FS 显著高于对照组 ($t_{\text{单纯治疗组}} = 8.12, P < 0.05; t_{\text{联合治疗组}} = 10.52, P < 0.05$)。联合治疗组 FS 高于单纯治疗组 ($t = 3.35, P < 0.05$)。治疗组新生血管密度显著高于对照组 ($t_{\text{单纯治疗组}} = 15.01, P < 0.05; t_{\text{联合治疗组}} = 15.13, P < 0.05$)。联合治疗组新生血管密度高于单纯治疗组 ($t = 1.01, P < 0.05$)。不同组别典型新生血管密度的变化见图 3。

3 讨论

心肌梗死后采用干细胞移植和成血管生长因子治疗是当前研究热点, 其中 b-FGF 和 BM-MSCs 被较广泛地应用于动物和临床研究中^[1-2]。

b-FGF 与特定的受体结合, 促进血管内皮细胞和平滑肌细胞增殖, 形成新生血管。Yamamoto 等^[3]发现 b-FGF 能使微血管密度和侧支循环血流量增加。Padua 等^[4]发现 b-FGF 对损伤心肌有保护作用。国内研究^[5]证实使用纤维蛋白胶控制释放 b-FGF 能够改善缺血心肌的供血。本实验通过特殊工艺制成缓释 b-FGF 支架, 通过机械打孔埋入孔区, 行心肌 SPECT 显像发现与对照组相比, b-FGF 治疗组心肌血流灌注增加, 梗死质量减少, 超声心动图和免疫组化检查证实心功能改善且微血管形成明显 ($P < 0.05$)。

BM-MSCs 是骨髓基质细胞的少量组成部分, 可诱导分化为心肌细胞、内皮细胞、成骨细胞和脂肪细胞等。本实验采用 b-FGF 缓释支架与 BM-MSCs 移植联合治疗急性心肌梗死, 通过心肌 SPECT 显像等检查发现联合疗效好于单纯 b-FGF 治

疗,其原因可能在于 BM-MSCs 与 b-FGF 治疗心肌梗死的机制有协同性。Jiang 等^[6]从 BM-MSCs 中分离出多能干细胞祖细胞, Schwartz 等^[7]进一步证实该细胞能够向三个胚层的细胞分化。此外, Tang 等^[8]给鼠梗死区移植 BM-MSCs 发现 BM-MSCs 能够通过旁分泌机制分泌 b-FGF。本实验联合治疗组新生血管密度和心功能改善程度均高于单纯治疗组 ($P < 0.05$), 原因不仅与 BM-MSCs 移植后分化为内皮细胞促进新生血管生长有关, 可能还与使用干细胞后通过旁分泌机制分泌细胞因子与支架内释放的 b-FGF 协同作用有关。Dai 等^[9]报道 BM-MSCs 分化为心肌细胞在移植后 3~6 个月才能表现出来。本实验使用心肌 SPECT 显像观察到, 在 BM-MSCs 移植后 6 周有治疗效果, 其原因可能是 BM-MSCs 分化为内皮细胞促进微血管形成的结果, 而非分化为心肌细胞所引起。

本实验中对对照组也有新生血管形成, 分析原因首先是机械损伤后心肌炎性修复促成新生血管形成; 二是心肌缺血时内皮细胞祖细胞会从骨髓中动员, 促进血管再生^[10]。

本实验主要使用心肌 SPECT 显像研究联合 b-FGF 缓释支架与 BM-MSCs 治疗实验性急性心肌梗死的疗效, 并通过定量指标进行评价, 证实这种方法能够促进血管生长, 提高心功能, 且联合治疗疗效优于单纯 b-FGF 治疗。心肌 SPECT 显像是一种应用广泛的检测心肌血流灌注以及评价心脏功能的检查方法, 具有敏感、直观、可重复性好以及能够定量等优点, 比有创的冠状动脉造影检查侧支循环更加敏感, 且能反映心肌的血流灌注情况, 值得在心血管疾病诊治中推广。本实验的不足在于未进行门控采集, 因此无法测定左心室收缩末期容积、左心室舒张末期容积和左心室功能。

[参考文献]

[1] Wang Y, Liu XC, Zhao J, et al. Degradable PLGA scaffolds with basic

fibroblast growth factor: experimental studies in myocardial revascularization. *Tex Heart Inst J*, 2009, 36(2): 89-97.

- [2] Cao F, Sun D, Li C, et al. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur Heart J*, 2009, 30(16): 1986-1994.
- [3] Yamamoto T, Suto N, Okubo T, et al. Intramyocardial delivery of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin hydrogel microspheres enhances collateral circulation to infarcted canine myocardium. *Jpn Circ J*, 2001, 65(5): 439-444.
- [4] Padua RR, Sethi R, Dhalla NS, et al. Basic fibroblast growth factor is cardioprotective in ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*, 1995, 143(2): 129-135.
- [5] 朱向明, 王新房, 谢明星, 等. FG 控制 bFGF 在激光心肌隧道内释放对急性缺血心肌冠脉侧支循环及心肌内血流影响的实验研究. *中国医学影像技术*, 2004, 20(7): 1014-1017.
- [6] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.
- [7] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002, 109(10): 1291-1302.
- [8] Tang YL, Zhao Q, Qin X, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg*, 2005, 80(1): 229-236.
- [9] Dai W, Hale SL, Martin BJ, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*, 2005, 112(2): 214-223.
- [10] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, 5(4): 434-438.

《中国医学影像技术》引证报告

据中国科学技术信息研究所 2009 年版中国科技期刊引证报告(核心版)对 1868 种期刊的统计, 2008 年《中国医学影像技术》的主要指标和在军事医学与特种医学、医学影像学类期刊中的排名如下:

- 1 总被引频次 2371, 排名第二。
- 2 影响因子 0.550, 排名第四。
- 3 总分 59.8, 排名第二。
- 4 学科扩散指标 0.80。
- 5 学科影响指标 0.84。