

• 临床基础研究 •

人羊膜上皮细胞原位移植对大鼠急性心肌梗死后心功能和心室重构的改善作用

王钰莹¹ 方宁¹ 陈代雄¹ 余丽梅¹ 赵春华²

[摘要] **目的:** 研究人羊膜上皮细胞(hAECs)对急性心肌梗死(AMI)大鼠左心室功能和心室重构的影响及其在AMI区的分化。**方法:** 结扎大鼠左冠状动脉前降支以建立AMI模型,随机分为hAECs移植组(14只)、模型组(12只)和假手术组(12只)。胰酶消化分离hAECs,采用流式细胞仪检测和免疫组织化学染色以鉴定其表型特征。成模后1周经心外膜移植 2×10^6 BrdU标记的hAECs,于移植后不同时间采用超声心动图检查心功能变化,HE和Masson染色观察心肌重构变化,免疫荧光双染色检测hAECs在AMI区的植活与分化。**结果:** ①流式细胞仪检测显示第3代hAECs高表达CD29、CD166、CD73和CK19,低表达或不表达CD34、CD45、CD44、CD80、CD86和HLA-DR;②hAECs移植后1、4和6周,与模型组比较,hAECs移植组射血分数和左室短轴缩短率显著升高(均 $P < 0.01$),舒张期左室前壁厚度和收缩期左室前壁厚度明显增大(均 $P < 0.05$),AMI区心肌纤维化程度明显减轻($P < 0.01$);③hAECs移植后6周,AMI区可见BrdU标记的阳性细胞,移植的hAECs向心肌样细胞分化,连接蛋白-43、 α -辅肌动蛋白和结蛋白表达阳性。**结论:** hAECs移植能改善AMI后心脏功能,减缓心室重构,在AMI区可分化为心肌样细胞。

[关键词] 心肌梗死;人羊膜上皮细胞;移植;心功能

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.02.022

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A

Orthotopic transplanted human amniotic epithelial cells in improving left ventricular function and ventricular remodeling in rats with acute myocardial infarction

WANG Yuying¹ FANG Ning¹ CHEN Daixiong¹ YU Limei¹ ZHAO Chunhua²

(¹Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou, 563003, China; ²Tissue Engineering Center, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Science)

Corresponding author: CHEN Daixiong, E-mail: cellgene@163.com

Abstract Objective: To investigate the effects of human amniotic epithelial cells (hAECs) transplantation on cardiac function and ventricular remodeling of rats with acute myocardial infarction (AMI) and observe the survival and differentiation of hAECs to cardiomyocytes in the AMI zone. **Method:** AMI models were made by left anterior descending artery ligation in male SD rats (200 ± 20)g, and then randomly divided into hAECs transplanted group ($n=14$), model group ($n=12$) and sham operation group ($n=12$). The hAECs were isolated from the human amnion using trypsin digestion method, and then its phenotype was identified by flow cytometry and immunohistochemical staining. Seven days after the AMI, 2×10^6 BrdU-labeled hAECs were injected into the myocardium at the border zone of the AMI. At 1, 4 and 6 week after transplantation, echocardiogram, histopathology, immunohistochemistry and immunofluorescence were performed to observe the changes of ventricular remodeling and cardiac function, as well as the survival and differentiation of hAECs in the AMI zone. **Result:** ①hAECs at passage 3 highly expressed CD29, CD166, CD73 and CK19; weakly expressed CD34, CD44, CD45, CD80, CD86 and HLA-DR. ②Transplantation of hAECs after all increased left ventricular ejection fraction, left ventricular fractional shorting, left ventricular anterolateral wall thickness at diastole, and left ventricular anterolateral wall thickness at systole, and decreased myocardial area (all $P < 0.05$) significantly. ③Six weeks after the transplantation, BrdU-labeled hAECs expressed cardiac-specific protein connexin-43, α -actinin and desmin in the AMI region. **Conclusion:** The hAECs transplantation can improve cardiac function and ventricular remodeling after AMI, and transplanted hAECs can differentiate into cardiomyocyte-like cells.

Key words myocardial infarction; human amniotic epithelial cells; transplantation; cardiac function

* 基金项目:“重大新药创制”同科技重大专项课题(No:2009ZX09503-025);贵州省科技厅计划发展项目(No:黔科合2003JGy005);贵州省科技厅公关项目(No:黔科合SZ字[2009]3017)

¹ 遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室(贵州遵义,563003)

² 中国医学科学院基础医学研究所组织工程研究中心

通信作者:陈代雄, E-mail: cellgene@163.com

急性心肌梗死(AMI)的主要发展变化是左心室重构(LVRM)和心力衰竭,改善心功能和缓解LVRM对于降低AMI的病死率具有重要意义。随着干细胞技术的发展,利用细胞移植改善AMI后心脏功能和恢复受损心肌是目前研究的热点之一。人羊膜上皮细胞(hAECs)表达多种胚胎干细胞标志物,如SSEA-3、SSEA-4,此外还表达多潜能干细胞的转录因子,如SOX-2、Rex-1、Oct-4和Nanog,并具有多系分化的潜能^[1-2]。hAECs易于分离,无伦理争议,所以其在细胞移植和再生医学中潜在的应用价值颇受关注。本研究以大鼠AMI为模型,探讨AMI区边缘心外膜移植hAECs后对心功能和心肌纤维化的影响,以及能否分化成心肌细胞。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

LG-DMEM培养基、胎牛血清(Gibco公司),5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)、BrdU抗体、 α -辅肌动蛋白抗体(Sigma公司);连接蛋白-43(Connexin-43, CX-43)抗体、IgG-FITC、Ig-Texas Red(Santa Cruz公司);细胞核特异性抗体MAB1281、结蛋白抗体(Chebcion公司),免疫组织化学单染试剂盒(Gene Tech公司);小动物呼吸机(ALC-V8S,上海奥尔科特有限公司);心电图机(Cardico 302, Kenz);彩色多普勒超声心动图仪(Sequoia512, ACUSON, 15MHZ)。

1.2 实验动物及分组

实验选用清洁级雄性SD大鼠(体重220~260g),动物购自第三军医大学大坪医院动物实验中心提供[许可证号:SCXK(渝)2007-0005]。将38只SD大鼠随机分为模型组(12只),hAECs移植组(14只)和假手术组(12只)。

1.3 人羊膜上皮细胞分离、培养、鉴定及标记

经产妇知情同意后,无菌条件下取足月剖宫产分娩胎盘,剥离羊膜,放入D-Hank's液中冲洗3遍,将羊膜剪碎至1cm×1cm,用含0.02%EDTA、0.05%胰蛋白酶37℃旋转消化30min,重复3次,收集3次细胞滤液,300目不锈钢网过滤,400×g离心10min,弃上清,细胞沉淀。以 $8 \times 10^5/\text{cm}^2$ 细胞密度接种于含10%FBS和10ng/mlEGF的L-DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养。待原代培养的hAECs长至80%融合后传代。取第3代细胞用流式细胞仪(FCM)检测表面标志CD29、CD44、CD73、CD34、CD45、CD166、HLA-DR、CD80、CD86的表达。将细胞接种于预置盖玻片的24孔培养板中制成细胞爬片,用免疫细胞化学染色法检测CK19。取第3代细胞以 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 细胞密度接种于培养瓶中,待细胞连生面积达50%,立即加入BrdU(终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$),孵育48h,收集标记细胞移植备用。

1.4 大鼠AMI模型制备

结扎左冠状动脉(冠脉)前降支建立AMI模型^[3]。10%水合氯醛(0.35ml/100g)腹腔注射麻醉,颈部切开行气管插管,连通小动物呼吸机(潮气量3ml,呼吸频率80次/min),在心电监护下,于左胸第2~3肋间隙开胸,打开心包,暴露心脏,用6/0号丝线结扎左冠脉前降支。当心肌颜色变浅且活动减弱、心电图出现R波振幅升高、ST段(J点)抬高提示冠脉结扎成功。假手术组大鼠只穿线不结扎冠脉。

1.5 人羊膜上皮细胞的移植

模型建立7天后立即进行细胞移植。大鼠二次开胸,暴露心脏,在直视下将移植的细胞注射到心肌梗死区边缘,分5点注射100 μl BrdU标记的hAECs(2×10^6 个细胞),注射完毕后留针20s,缝合关胸。模型组和假手术组以相同的途径注射等体积无血清培养基。

1.6 左心室功能检测

分别于制模前、制模后1W及移植后1、4和6W采用彩色多普勒超声心动图仪检测左室心功能。检测指标为:左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)、舒张期左室前壁厚度(LVAWd)、收缩期左室前壁厚度(LVAWs)、左室舒张末期内径(LVDd)、左室收缩末期内径(LVDs)、左室舒张末期容积(EDV)和左室收缩末期容积(ESV)。所有指标连续测定3次,取平均值。

1.7 病理学检查

完成心功能测定后,立即开胸,取出心脏,PBS冲洗,取左心室,用4%多聚甲醛固定,20%蔗糖溶液脱水,石蜡包埋,切片,行HE染色和胶原纤维Masson染色。显微镜下观察左室组织结构变化,用Image-Pro Plus Version 6.0图像处理系统测量纤维化面积和左室横截面积,计算纤维化面积占左室横截面积的百分比。

1.8 移植细胞检测及心肌细胞标志物的检测

取HE染色同一部位的连续切片,抗BrdU抗体免疫组织化学染色,切片脱蜡水化,行内源性过氧化物酶阻断、DNA变性、山羊血清封闭,BrdU一抗,4℃孵育过夜,再加二抗,DAB显色,镜下观察,细胞核呈棕褐色者为BrdU标记阳性细胞。免疫荧光染色,组织经OCT包埋后连续切片,室温晾干,经Triton X-100作用、山羊血清封闭后,加入细胞核特异性抗体MAB1281与CX-43抗体或 α -辅肌动蛋白抗体或结蛋白抗体的混合抗体,4℃孵育过夜,加入IgG-FITC与IgG-Texas Red混合的二抗,37℃避光孵育2h。甘油封片,荧光显微镜观察。

1.9 统计学处理

采用SPSS13.0软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hAECs 的表型特征

FCM 分析结果显示,分离的 hAECs 高表达 CD29、CD166 和 CD73,低表达或不表达 CD44、CD34、CD45、CD80、CD86 和 HLA-DR(图 1)。免疫组织化学染色显示,hAECs 表达上皮细胞标志 CK19(图 2)。

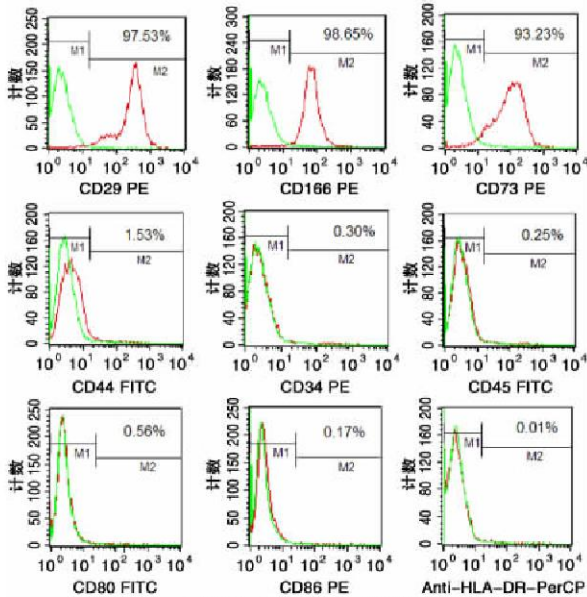
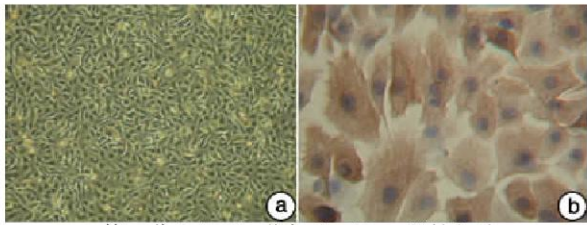


图 1 hAECs 流式细胞术表型分析

Figure 1 Phenotypic analysis of hAECs by FCM



a: 第 2 代 hAECs 形态; b: CK19 阳性细胞。

图 2 hAECs 免疫组织化学染色

Figure 2 Immunohistochemical staining in hAECs

2.2 hAECs 移植对心功能的影响

与模型组比较,hAECs 移植组左心室前壁收

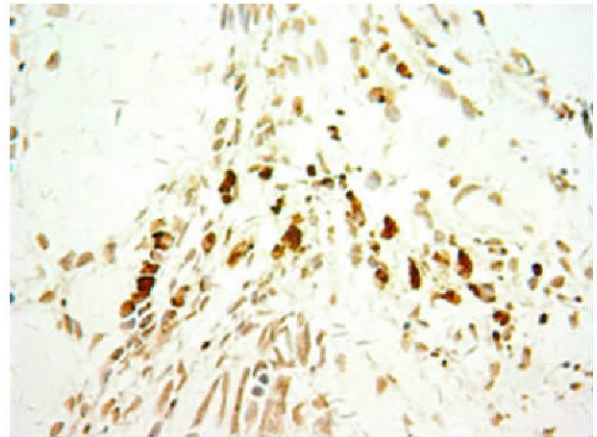
缩显著增强, LVFS 明显增加(图 3);移植后 1、4 和 6 W 所测心功能各项指标均有明显改善(均 $P < 0.05$)(表 1)。

2.3 梗死心肌组织结构变化

心肌梗死区心室壁变薄,心肌正常结构消失,心肌纤维排列紊乱,并被大量胶原纤维取代;HE 染色结果显示,hAECs 移植组炎症细胞明显减少,新生毛细血管增多。Masson 染色结果可见,与模型组 $[(54.08 \pm 3.39)\%]$ 相比,hAECs 移植组 [1、4、6 W 分别为 $(39.46 \pm 0.62)\%$ 、 $(30.51 \pm 2.40)\%$ 、 $(38.22 \pm 0.61)\%$] 梗死后纤维瘢痕面积比率明显小于模型组 ($P < 0.05$)(图 4)。

2.4 hAECs 在梗死区向心肌细胞的分化

心肌免疫组织化学染色和免疫荧光染色显示,心外膜移植后 6 w,心肌梗死区仍可见 BrdU 标记的 hAECs 阳性细胞,人细胞核抗原阳性细胞同时表达 CX-43、 α -辅肌动蛋白和结蛋白,说明移植的 hAECs 在梗死区向心肌样细胞分化。见图 5、6。



hAECs 主要分布在梗死区间质, BrdU 标记阳性细胞核呈棕黄色。

图 5 移植后 6 W 的 BrdU 免疫组织化学染色 ($\times 400$)

Figure 5 BrdU immunohistochemical staining after 6 weeks of hAECs implantation ($\times 400$)

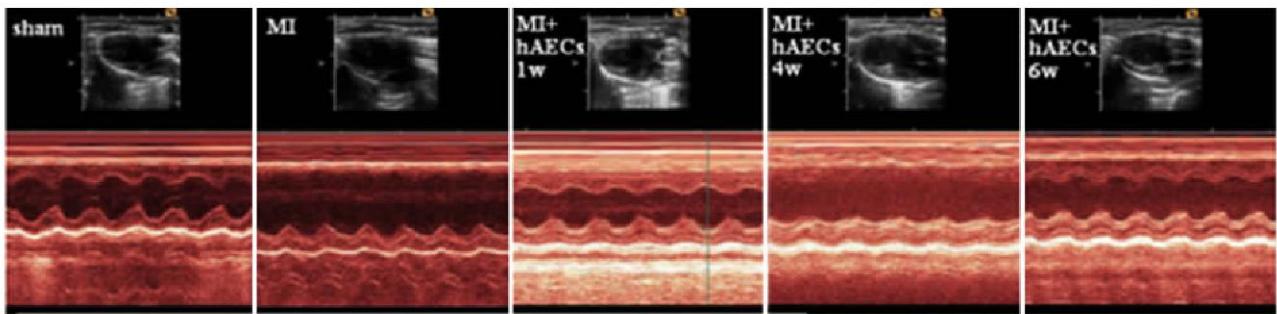


图 3 hAECs 移植后超声心动图

Figure 3 UCG after implantation of hAECs

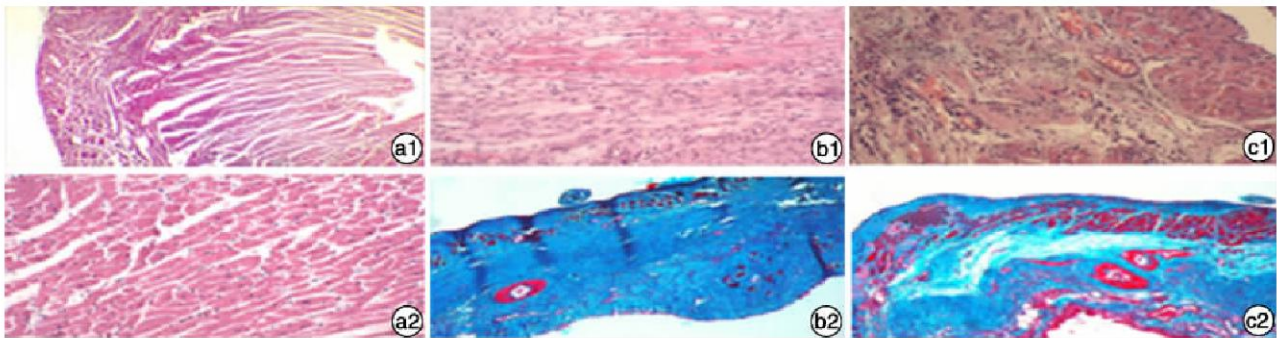
表 1 hAECs 移植后心脏超声检查各指标

Table 1 Transplantation echocardiography indexes after hAECs

$\bar{x} \pm s$

指标	假手术组 (8 只)	模型组			hAECs 移植组		
		1 W(12 只)	4 W(9 只)	6 W(7 只)	1 W(9 只)	4 W(6 只)	6 W(4 只)
EDV/ml	0.44±0.04	1.03±0.07 ¹⁾	1.31±0.12 ¹⁾	1.23±0.13 ¹⁾	0.72±0.05 ²⁾	0.68±0.04 ²⁾	0.57±0.09 ²⁾
ESV/ml	0.11±0.02	0.60±0.06 ¹⁾	0.68±0.08 ¹⁾	0.66±0.08 ¹⁾	0.31±0.04 ²⁾	0.24±0.03 ²⁾	0.18±0.04 ²⁾
LVEF/%	75.77±2.46	43.58±3.45 ¹⁾	51.92±2.93 ¹⁾	48.07±2.09 ¹⁾	63.01±2.79 ²⁾	64.35±2.26 ²⁾	69.87±3.91 ²⁾
LVFS/%	40.05±2.40	19.16±1.91 ¹⁾	23.79±1.40 ¹⁾	21.52±1.13 ¹⁾	30.98±1.87 ²⁾	31.11±1.55 ²⁾	35.53±2.92 ²⁾
LVDd/cm	0.56±0.02	0.77±0.02 ¹⁾	0.83±0.03 ¹⁾	0.81±0.03 ¹⁾	0.67±0.02 ²⁾	0.67±0.01 ²⁾	0.62±0.04 ²⁾
LVDs/cm	0.34±0.02	0.62±0.02 ¹⁾	0.64±0.03 ¹⁾	0.64±0.03 ¹⁾	0.47±0.02 ²⁾	0.46±0.02 ²⁾	0.40±0.04 ²⁾
LVAWd/cm	0.16±0.01	0.08±0.02 ¹⁾	0.07±0.01 ¹⁾	0.08±0.01 ¹⁾	0.13±0.01 ²⁾	0.17±0.01 ²⁾	0.17±0.01 ²⁾
LVAWs/cm	0.23±0.01	0.09±0.01 ¹⁾	0.09±0.01 ¹⁾	0.10±0.01 ¹⁾	0.18±0.02 ²⁾	0.23±0.02 ²⁾	0.24±0.02 ²⁾

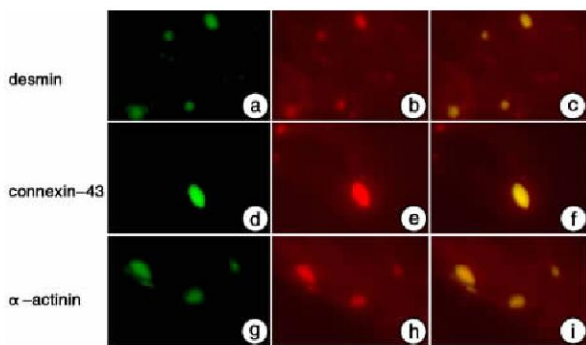
与假手术组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组同时点比较,²⁾ $P < 0.05$ 。



上排为 HE 染色($\times 200$);下排为 Masson 染色($\times 100$)。a1、a2 为假手术组,b1、b2 为模型组,c1、c2 为 hAECs 移植组。

图 4 hAECs 移植后梗死心肌组织病理变化

Figure 4 Pathological changes in myocardial infarcted tissue



a、d、g:hAECs 表达人细胞核抗原的阳性细胞(绿色荧光);b、e、h:hAECs 移植后表达心肌特异性蛋白、连接蛋白 CX-43、 α -辅肌动蛋白和结蛋白(红色荧光);c、f、i:前两列的复合图像。

图 6 免疫荧光染色($\times 400$)

Figure 6 Immunofluorescence staining($\times 400$)

3 讨论

hAECs 被覆于羊膜的羊水面,呈单层排列生长,具有上皮样结构,主要采用胰酶消化法提取。如果分离方法不当,容易造成羊膜其他细胞如间充质细胞的污染,影响实验结果评判,因此应对 hAECs 进行鉴定。本实验 FCM 和免疫组织化学染色结果表明,所分离的目标细胞表达 CD29、

CD166、CD73 和 CK19,说明具有上皮表型特征;但不表达 CD34、CD45 和 CD44,可排除血细胞和间充质细胞的污染,说明本实验中作为移植的供体细胞是纯度较高的 hAECs。

hAECs 具有免疫豁免特性,不表达 MHC-I 类和 II 类抗原,能分泌多种免疫抑制因子如 MIF、TGF- β 、IL-10、IL-6 等^[4-7]。本实验提取的 hAECs 不表达 HLA-DR,也不表达共刺激分子 CD80(B7-1)、CD86(B7-2),提示 hAECs 移植不会引发宿主免疫应答反应。实验进一步证明,在未使用任何免疫抑制剂的情况下,原位移植后 6 W 梗死区仍可见 BrdU 标记的 hAECs,说明即使是异种间移植,hAECs 也具有较强的免疫耐受。

hAECs 的可塑性已被很多体外研究所证实。在体外诱导条件下,hAECs 可定向分化成神经细胞、肝细胞、心肌细胞、胰腺样细胞、成骨及软骨细胞等^[8-12]。Miki 等^[12]报道采用抗坏血酸诱导 hAECs,在诱导第 14 天可见心肌特异转录因子和心肌特异性基因 GATA-4、Nkx2.5、MLC-2A、MLC-2V、 α -辅肌动蛋白等表达。本研究室前期研究报道,用 5-氮杂胞苷和抗坏血酸磷酸盐培养液诱导后,hAECs 表达 NKx2.5、GATA-4、 α -肌球蛋白重链 mRNA,同时可检测到心肌特异性蛋白结蛋白

和 α -辅肌动蛋白阳性表达^[13]。这些研究表明, hAECs 具有向心肌细胞分化的潜能。本实验结果发现, 未经体外诱导的 hAECs 经心外膜下移植后 6 W, 心肌梗死及周边区域可见人细胞核抗原阳性细胞, 且该细胞同时表达心肌特异性蛋白 CX-43、 α -辅肌动蛋白和结蛋白, 说明 hAECs 在受损心肌原位可分化为心肌样细胞。

左室重构是 AMI 致心功能严重障碍的主要原因, 其特异性变化为坏死心肌细胞丢失, 伴随肉芽组织及梗死区周围新生血管形成。重构最后形成无收缩功能的纤维瘢痕, 最终因心室腔压力增大、扩张, 导致心功能进一步恶化发展成心力衰竭。本实验 AMI 模型具有典型的左心室重构特征, 且心功能严重受损。与模型组比较, hAECs 移植组梗死区存活的心肌组织较多, 纤维化程度较模型组明显减轻, 表明左心室重构减轻或延缓。彩色多普勒超声心动图结果显示, hAECs 移植后, 左心室前壁厚度较模型组明显增加, 反映左心室收缩功能的 LVEF 和 LVFS 也明显提高, 表明 hAECs 移植后可改善 AMI 后心脏功能并增加梗死区心室壁厚度。

本实验结果发现, hAECs 移植后 AMI 区炎性细胞浸润明显减轻, 这可能与延缓心室重构有关。hAECs 促进 AMI 后心肌修复和改善心功能的机制并不清楚。hAECs 是否通过旁分泌作用分泌炎症抑制因子和营养因子, 通过增强机体免疫力, 或抑制 AMI 后的炎症反应, 以及抑制心肌细胞凋亡, 促进心肌细胞增生和血管形成等机制值得进一步探讨。

参考文献

- [1] SONCINI M, VERTUA E, GIBELLI L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007, 1: 296-305.
- [2] PAROLINI O, ALVIANO F, BAGNARA G P, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 300-311.
- [3] 王钰莹, 方宁, 陈代雄, 等. 不同途径移植人羊膜上皮细胞对心肌梗死大鼠心脏的保护作用 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2013, 32(6): 476-481.
- [4] SAKURAGAWA N, MISAWA H, OHSUGI K, et al. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 232: 53-56.
- [5] INSAUSTI C L, BLANQUER M, BLEDA P, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells [J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25: 91-98.
- [6] LI H, NIEDERKORN J Y, NEELAM S, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 900-907.
- [7] TERADA S, MATSUURA K, ENOSAWA S, et al. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy [J]. *Cell Transplant*, 2000, 9: 701-704.
- [8] NIKNEJAD H, DEIHIM T, AHMADIANI A, et al. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 506: 22-27.
- [9] ZHOU J, YU G, CAO C, et al. Bone morphogenetic protein-7 promotes chondrogenesis in human amniotic epithelial cells [J]. *Int Orthop*, 2011, 35: 941-948.
- [10] MU Y, CAO G, ZENG Q, et al. Transplantation of induced bone marrow mesenchymal stem cells improves the cardiac function of rabbits with dilated cardiomyopathy via upregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236: 1100-1107.
- [11] SCHINKOTHE T, BLOCH W, SCHMIDT A, et al. In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 199-206.
- [12] MIKI T, LEHMANN T, CAI H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 1549-1559.
- [13] 张路, 方宁, 陈代雄, 等. 人羊膜上皮细胞有向心肌样细胞分化的特性 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(3): 401-405.

(收稿日期: 2013-06-21 修回日期: 2013-11-23)