

缓激肽预适应人内皮祖细胞移植治疗裸鼠急性心肌梗死

盛祖龙¹,姚玉宇²,黎叶飞²,黄杰²,马根山^{1*}

(¹东南大学附属中大医院心血管内科,江苏 南京 210009;²东南大学医学院,江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:研究内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)经缓激肽(bradykinin, BK)预适应后移植对急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)的治疗作用。方法:细胞分为未经 BK 预适应人 EPCs 组(EPCs 组)、BK 预适应 EPCs 组(BK PC 组)、BK 预适应 EPCs + 艾替班特(HOE140)组(BK PC/HOE 组),双染色法四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测各组增殖情况,予缺氧诱导后 Annexin V-FITC/PI 双染色法及 Hoechst33342 染色法检测各组凋亡情况,同时收集上清液予 ELISA 法检测血管内皮生长因子(VEGF)的表达。体内实验建立裸鼠急性心肌梗死模型,将羧花青荧光染料 DiD 标记的人 EPCs 通过心肌局部注射进行细胞移植到实验组,安慰剂组注入等量生理盐水。分为假手术组、MI + 生理盐水组(安慰剂组)、MI + 单纯干细胞治疗组(EPCs 组)、MI + BK 预适应 EPCs 治疗组(BK PC 组)及 MI + BK 预适应 EPCs + HOE140 治疗组(BK PC/HOE 组)。细胞移植后 10 d 行超声心动图检测心功能。移植后 10 d 处死动物,取心脏标本行相关检查。结果:①与 EPCs 组相比, BK 预适应可促进人 EPCs 增殖;缺氧诱导凋亡后, BK PC 组凋亡率低于 EPCs 组($P < 0.01$),且均可被 HOE140 阻断($P < 0.01$)。同时 BK PC 组上清液中 VEGF 的分泌高于 EPCs 组($P < 0.01$),同样可被 HOE140 所阻断;②细胞移植 10 d 后 BK PC 组左心射血分数(LVEF)明显高于安慰剂组($P < 0.01$)及 EPCs 组($P < 0.01$),且可被 HOE140 阻断($P < 0.01$)。与安慰剂组及 EPCs 组相比, BK PC 组梗死周边区移植细胞存活明显增多,而细胞凋亡显著减少;同样可被 HOE140 所阻断。结论: BK 预适应人 EPCs 后可显著改善裸小鼠 AMI 后的心功能,其疗效明显优于单纯人 EPCs 移植治疗。其治疗效应是通过促进移植细胞存活及抗移植细胞及宿主心肌细胞凋亡等而实现的。

[关键词] 心肌梗死;内皮祖细胞;缓激肽;预适应;细胞凋亡

[中图分类号] R972

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)08-1072-08

doi:10.7655/NYDXBNS20150805

Effect of human endothelial progenitor cells preconditioned with bradykinin on ischemic nude mice hearts

Sheng Zulong¹, Yao Yuyu², Li Yefei², Huang Jie², Ma Genshan^{1*}

(¹Department of Cardiology, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009; ²Medical School, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of intra-myocardial transfer of bradykinin(BK)preconditioning(PC)endothelial progenitor cells(EPCs)in a mouse model of acute myocardial infarction. **Methods:** Cells were divided into three groups:human EPCs (hEPCs)without BK preconditioning group(EPCs group),BK PC hEPCs group(BK PC group),BK PC hEPCs + HOE140(icatibant) group(BK PC/HOE group). *In vitro*, proliferative ability was detected by MTT assay. Apoptosis induced by hypoxia was determined by annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide staining and Hoechst 33342 staining. Cytokine concentrations in supernatant were measured. *In vivo*, hEPCs was labeled with carbocyanine near-infrared dye DiD prior to heart transplantation. Nude mice were allocated to the following treatment groups:sham group,MI + saline group(placebo group),MI + hEPCs group(EPCs group),MI + BK PC hEPCs group(BK PC group),MI + BK PC hEPCs + HOE140 group(BK PC/HOE group). Cardiac function was evaluated by echocardiography and postmortem analysis were assessed 10 days after transplantation. **Results:** *In vitro*, BK PC significantly promoted EPCs proliferation compared with the EPCs group ($P < 0.01$). Cell apoptosis rate post hypoxia was significantly reduced in the BK PC group compared with that in the EPCs group($P < 0.01$),and was blocked by HOE140($P < 0.01$). VEGF level was also significantly up-regulated in the BK PC group compared with that in the EPCs group ($P < 0.01$),and was also blocked by HOE140 ($P < 0.01$). The BK PC group showed robust cell apoptosis inhibition,infarct size reduction,and cardiac function improve-

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30871071,81070085)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:magenshan@hotmail.com

ment *in vivo* and these effects were abrogated by the HOE140. **Conclusion:** Efficacy of BK PC hEPCs on improving cardiac function was greater than those by hEPCs in the mouse ischemia model. Its therapeutic effect could be achieved by promoting cell survival and resisting transplanted cells and host cardiomyocytes apoptosis.

[**Key words**] myocardial infarction; endothelial progenitor cells; bradykinin; preconditioning; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1072-1079]

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后由于心肌缺血、炎症及氧化应激造成细胞坏死和凋亡,导致心室重构、心力衰竭的严重后果。而干细胞移植可以挽救缺血梗死的心肌细胞,以改善心脏功能。作为干细胞的一种,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)在修复心肌缺血损伤方面发挥着重要作用^[1]。然而,本研究中心及国外研究中心均显示 EPCs 移植后,只有很少细胞存活,AMI 后梗死区缺氧环境是导致移植细胞生存力低下和高凋亡率的主要原因^[2-3]。可见,提高移植细胞的生存能力是干细胞治疗所面临的首要问题。

缓激肽(bradykinin, BK)是激肽释放酶-激肽系统中的一种主要的激肽类物质,已证实体内缓激肽受体有 B1 和 B2 两种。B2 受体在外周分布较广,血管/非血管平滑肌及心肌细胞上均有 B2 受体的存在,介导 BK 的心血管保护效应。最近研究表明 EPCs 上高表达 B2 受体,而很少表达 B1 受体,并提出 BK/B2 受体轴是调节 EPCs 归巢的重要体系^[4]。另外,体外研究证实缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)可抵抗缺氧/复氧诱导的骨髓间充质干细胞凋亡^[5],且可刺激循环 EPCs 增加^[6]。而 BK 是 IPC 中一种重要的介质^[7]。因此,本实验在建立裸鼠 AMI 模型的基础上,予 BK 预适应人脐血内皮祖细胞(human EPCs, hEPCs)后移植进行治疗以观察其疗效及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐带血(东南大学附属中大医院产科提供);健康雄性裸小鼠(体重 20~22 g,普通清洁级,购自扬州大学医学院动物实验中心);胎牛血清(Hyclone 公司,美国);EGM-2MV 培养液(Lonza 公司,美国);二甲基亚砜(Biosharp 公司,美国);BK(Sigma 公司,美国);B2 受体拮抗剂艾替班特(HOE140, Peptide 公司,美国);Dil-acLDL(Molecular Probe 公司,美国);FITC-UEA-1(Sigma 公司,美国);DiD 细胞标记液(Invitrogen 公司,美国);Hoechst 33342 染料(Sigma 公司,美国);四甲基偶氮唑蓝(MTT,

Biosharp 公司,美国);AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒(南京铂优生物技术有限公司);TUNEL 凋亡试剂盒(Sigma 公司,美国);ELISA 试剂盒(南京凯基生物公司);Masson 三色染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);流式细胞仪(BD 公司,美国);缺氧盒(Billups-Rothenberg 公司,美国);小动物超声成像系统(Visualsonic 公司,加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的分离、培养及鉴定

无菌采集健康足月分娩新生儿脐带血,产妇均签署知情同意书,每份 40 mL。脐带血采用肝素抗凝, Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞, PBS 离心洗涤细胞 3 次,用含 20%胎牛血清的 EGM-2MV 培养液重悬后计数。以 5×10^5 个/mL 分别接种用于人纤维连接蛋白包被的 25 cm² 的塑料培养瓶中,每孔 3.5 mL,含 5%胎牛血清(FBS)的 EGM-2MV 诱导培养基培养;置 5%CO₂ 持续通气、湿度 95%、37℃恒温培养箱中培养 96 h 后首次换液;每 3 d 换液 1 次,7~10 d 后挑选铺路石样细胞克隆继续培养,每周换液 2 次,留取第 3~5 代细胞进行实验。

细胞培养至 7 d 在含 Dil-acLDL(10 mg/L)的培养液中 37℃避光孵育 4 h,然后以 4%的中性甲醛固定 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后加 FITC-UEA-1(10 mg/L)避光孵育 1 h,再次 PBS 液漂洗后于荧光显微镜(Olympus 公司,日本)下观察细胞荧光染色。另外,将 FITC-CD34、PE-VEGFR2(KDR)抗体加入培养的贴壁细胞中,于 4℃避光孵育 30 min, PBS 清洗后,用加样器反复冲洗成单细胞悬液后,离心后计数 1×10^5 个细胞用 300 μL PBS 悬浮细胞分装后($n=8$)用流式细胞仪进行检测。其中一管不加抗体作为空白对照组。

1.2.2 体外实验分组

细胞分为未经 BK 预适应 hEPCs 组(EPCs 组)、BK 预适应 hEPCs 组(BK PC 组)、BK 预适应 hEPCs + HOE140 组(BK PC/HOE 组)。先给予含 1%胎牛血清的 EBM-2 共孵育 16 h 以使细胞生长同步化,然后加入用 RPMI-1640 改良型培养基配制的 10 nmol/L BK 预适应 10 min,对照 EPCs 组给

予等量同种培养基,其中BK PC/HOE组予BK预适应前加入HOE140(终浓度150 nmol/L)干预30 min。

1.2.3 MTT法

将细胞接种到96孔板内,每孔细胞数为 2×10^3 个,培养液体积200 μL ,每组设6个复孔。培养7 d后,每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$,继续孵育4 h,终止培养,吸弃上清,每孔内加入150 μL 二甲亚砜(DMSO),于微量振荡器充分振荡10 min,使结晶物充分溶解;酶标仪测定 $D(490\text{ nm})$ 。

1.2.4 体外缺氧诱导实验

将EPCs组、BK PC组、BK PC/HOE组细胞置于缺氧盒(含94.9% N_2 、5% CO_2 和0.1% O_2)中缺氧诱导细胞凋亡12 h,正常对照组细胞置于正常氧、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养12 h。其后收集各组细胞,分别采用Annexin V-FITC/PI双染色法及Hoechst 33342染色法检测各组细胞凋亡情况。

1.2.4.1 Annexin V-FITC/PI双染色法

冷PBS洗涤细胞2遍,50 μL 1 \times Annexin V结合缓冲液悬浮细胞,加Annexin V-FITC 5 μL ,室温避光放置1 \times Annexin V结合缓冲液重悬细胞后,即在流式细胞仪上检测,以Annexin V $^+$ /PI $^-$ 判断为早期凋亡,Annexin V $^+$ /PI $^+$ 判断为晚期凋亡,Annexin V $^-$ /PI $^+$ 判断为坏死细胞。

1.2.4.2 Hoechst 33342染色法

各实验组分别加入Hoechst 33342试剂(终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 反应5 min;直接于倒置荧光显微镜下,紫外光激发,快速观察细胞。并在显微镜($\times 200$)下,各实验组分别随机取5个不同的视野计算细胞凋亡率。每组实验重复3次。结果判定:正常细胞核呈均匀一致的蓝色,而细胞发生凋亡时,会看到凋亡细胞的胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,为亮蓝色,伴有核固缩、碎裂等特征。

1.2.4.3 ELISA检测法

将EPCs组、BK PC组、BK PC/HOE组细胞置于缺氧盒(含94.9% N_2 、5% CO_2 和0.1% O_2)中缺氧诱导细胞凋亡12 h,正常对照组细胞置于正常氧、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养12 h。其后收集各组细胞上清液,采用ELISA试剂盒检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达情况。

1.2.5 近红外染料DiD标记

将 P_3 代hEPCs以0.25%的胰蛋白酶消化,无血清RPMI-1640培养基洗涤3次,RPMI-1640培养基中按 1×10^6 个/mL密度重悬细胞。每1 mL细胞

悬液中加入DiD标记溶液5 μL ,轻摇混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育20 min,离心移去标记液并以PBS洗涤2次。

1.2.6 实验动物与分组

选取健康雄性裸小鼠55只。随机分成5组,即未结扎心肌组织+生理盐水(假手术组, $n=7$),MI+生理盐水组(安慰剂组, $n=12$),MI+单纯干细胞治疗组(EPCs组, $n=12$),MI+BK预适应hEPCs治疗组(BK PC组, $n=12$)以及MI+BK预适应hEPCs+HOE140治疗组(BK PC/HOE组, $n=12$)。

1.2.7 裸小鼠急性心肌梗死模型的建立

实验动物以戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射充分麻醉后,仰面固定四肢和头部,常规消毒铺巾。纤维冷光源灯照射小鼠颈部,无齿镊夹取舌尖,提拉暴露声门以22G静脉留置套管针气管置管,拔除针芯接呼吸机机械通气,见胸廓规律均匀起伏(频率170次/min,潮气量300 μL ,吸呼比为1:1)。左侧胸部4~5肋间切开,分离皮下组织,进入胸腔,剥离心包膜,于左心耳下方1~2 mm从左至右以8-0丝线结扎2 mm的心肌组织(避免穿透右室),见左室壁变白,运动减弱,结合心电图ST段抬高,判定结扎前降支血管闭塞,建模成功。逐层关胸,自然苏醒后撤除气管置管。建模24 h后,行小动物超声心动功能检测,以射血分数(EF) $< 40\%$ 为实验入选标准,进入动物分组。10 d后共有43只裸小鼠完成实验,假手术组存活7只,安慰剂组和EPCs组各存活8只,BK PC组和BK PC/HOE组各存活10只。其中,术中共有5只死于出血及恶性心律失常,术后共有7只死于感染。

1.2.8 超声心动图检测心功能

细胞移植10 d后动物予异氟烷(1.5%)气体麻醉后,仰面固定,经胸壁超声心动图检测心功能。局部涂耦合剂,置30 MHz高频探头于胸骨旁二尖瓣乳头肌腱索水平,获得M型切面图像。测量左室舒张末期内径(LVIDd)、左室舒张末期容积(LVEDV)、左室收缩末期内径(LVIDs)、左室收缩末期容积(LVESV),并计算左室射血分数(LVEF)和左室缩短分数(LVFS),计算公式:LVEF=(LVEDV-LVESV)/LVEDV $\times 100\%$;LVFS=(LVIDd-LVIDs)/LVIDd $\times 100\%$ 。对于不同的个体,vevo770均设置相同的参数。每个测量指标均选取5个连续的心动周期后取平均值得到。

1.2.9 心肌组织学

细胞移植后10 d处死存活动物,取出心脏,横截移植DiD标记细胞的心脏组织一部分行中

性甲醛液固定,制作石蜡切片,行 Masson 染色,以胶原占整个心脏横截面周长比例计为梗死面积。其余部分制作冰冻切片,避光晾干,4℃丙酮固定 10 min;滴加 50 μL 的反应混合液(即刻混合 TdT 酶反应液+荧光标记 dUTP),置于湿盒中 37℃避光反应 60 min,PBS 溶液洗涤 3 min×3 次;1% DAPI 液室温复染 10 min。结果判定:共聚焦显微镜下观察到移植细胞为红色荧光(膜),凋亡细胞呈绿色荧光(核),所有细胞核均为 DAPI 染色,发蓝色荧光。

1.3 统计学方法

用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据均采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用 Fisher's PLSD 法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

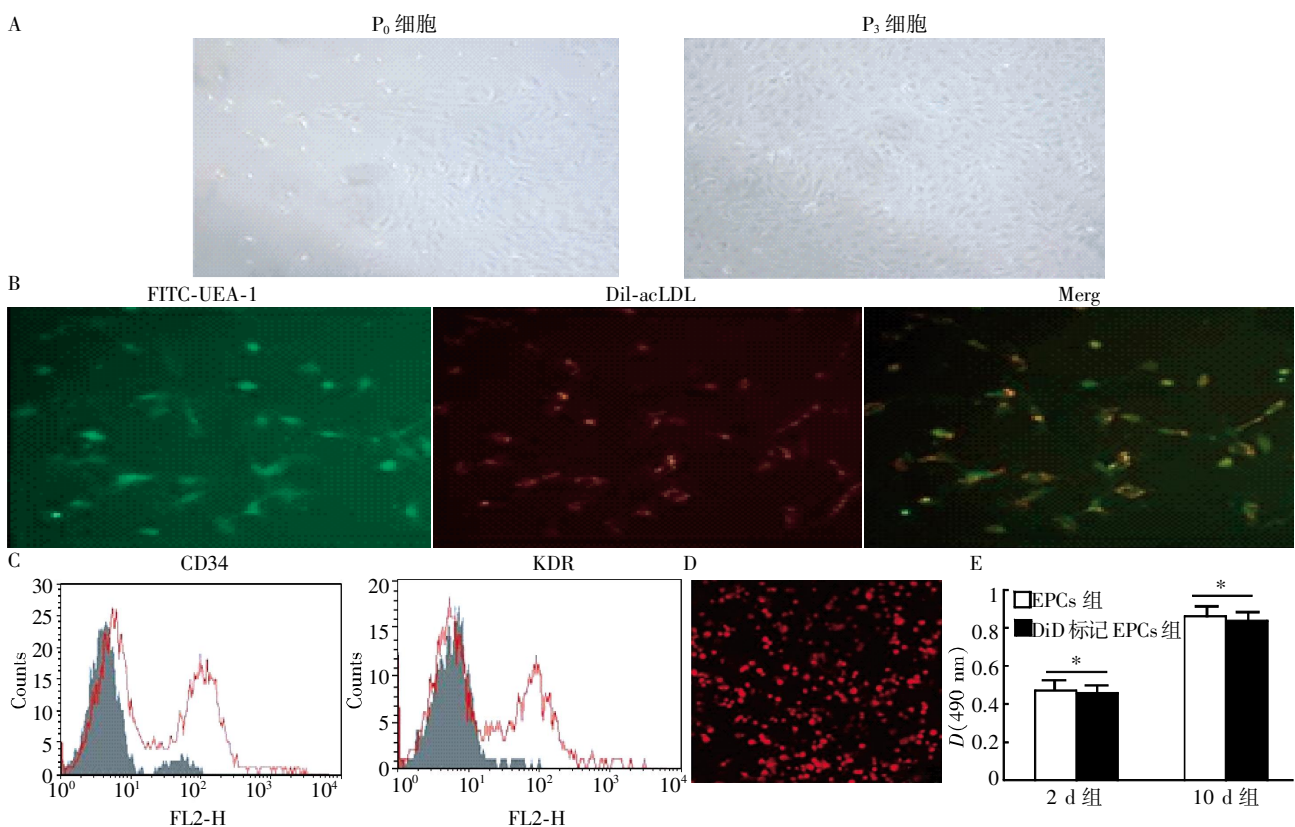
2.1 EPCs 鉴定及近红外染料 DiD 标记 hEPCs

刚分离的单个核细胞呈圆形均匀地悬浮分布,

3 d 后弃去非贴壁细胞,7 d 左右可见少量梭形细胞出现小集落。传至 3 代时细胞呈现为典型“铺路石”样细胞,即晚期内皮祖细胞(图 1A)。培养至 7 d 时,荧光显微镜下观察可见 90% 以上贴壁细胞能摄取 Dil-acLDL 和 FITC-UEA-1 呈红色荧光和绿色荧光双阳(图 1B)。7 d 后贴壁细胞中加入有荧光标记的 CD34 及 KDR 抗体后使用流式细胞仪检测,CD34 阳性率达 $(55.67 \pm 5.21)\%$,KDR 阳性率达 $(48.54 \pm 3.78)\%$ (图 1C),进一步确定所培养细胞为内皮祖细胞 [8]。图 1D 显示 DiD 能有效标记 hEPCs,荧光显微镜下观察其标记率达 100%,且 MTT 比色法显示 DiD 标记对细胞增殖无明显影响(图 1E)。

2.2 BK 预适应对 hEPCs 增殖、凋亡的影响

与 EPCs 组相比,BK PC 组显著增加 hEPCs 增殖能力($P < 0.01$),且可被 HOE140 所阻断(图 2)。在体外缺氧诱导实验中,流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法结果显示,与正常对照组相比,EPCs 组中凋亡细胞显著增多($P < 0.01$);BK PC

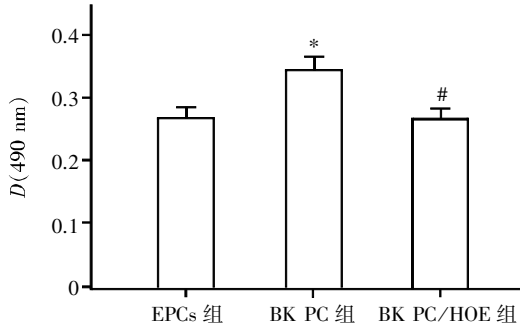


A: 原代及第 3 代 hEPCs($\times 200$); B: hEPCs 的 Dil-acLDL 摄取和 FITC-UEA-1 结合($\times 200$); C: 流式细胞仪检测示 hEPCs 免疫表型 CD34 阳性及 KDR 阳性; D: DiD 标记 hEPCs ($\times 100$; 激发波长 595~800 nm, 发射波长 660~680 nm); E: MTT 法于细胞培养 2 d 和 10 d 检测 hEPCs 及 DiD 标记 hEPCs 增殖, * $P > 0.05$ 。

图 1 hEPCs 鉴定及 DiD 标记 hEPCs

Figure 1 Characterization of cultured hEPCs and the DiD labeling of hEPCs

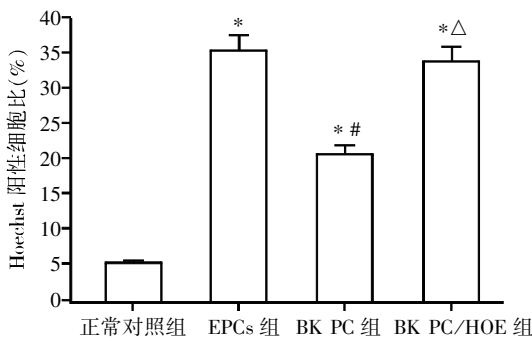
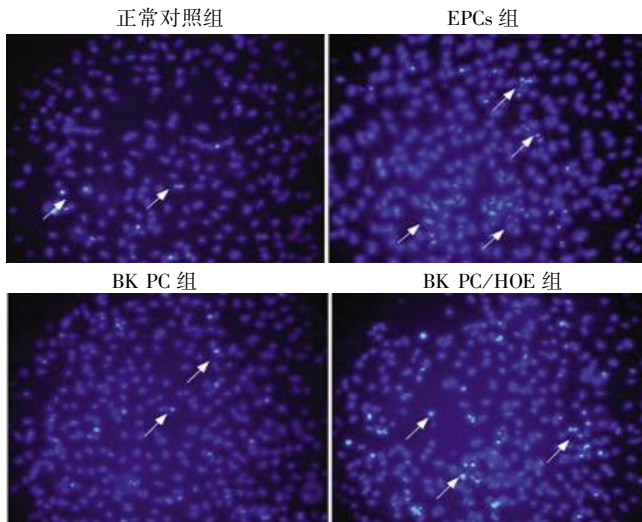
组的 Annexin V 阳性细胞比率显著低于 EPCs 组 ($P < 0.01$); 而 BK PC/HOE 组的 Annexin V 阳性细胞比率显著高于 BK PC 组 ($P < 0.01$) [9]。Hoechst 33342 染色法检测各组细胞凋亡, 得到了相似的结果(图 3)。



与 EPCs 组相比, * $P < 0.01$; 与 BK PC 组相比, # $P < 0.01$ 。

图 2 MTT 法检测各组 hEPCs 增殖

Figure 2 The proliferation of hEPCs detected by MTT assay



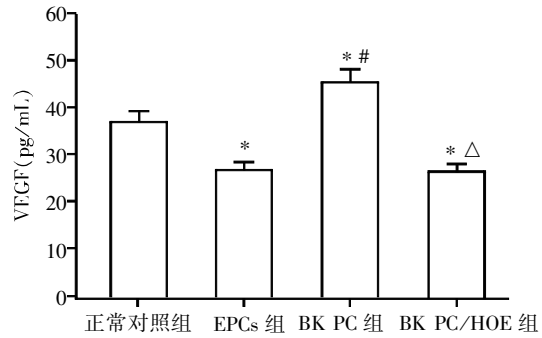
白色箭头示凋亡细胞的胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 为亮蓝色。与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与 EPCs 组比较, # $P < 0.01$; 与 BK PC 组比较, Δ $P < 0.01$ 。

图 3 体外缺氧诱导实验 Hoechst 33342 染色法检测各组 hEPCs 凋亡($\times 200$)及 Hoechst 阳性细胞定量分析

Figure 3 The apoptosis of hEPC detected by Hoechst 33342 staining under hypoxia ($\times 200$) and quantitative analysis of positive cells

2.3 BK 预适应对 hEPCs VEGF 分泌的影响

细胞上清液中 VEGF 的分泌 BK PC 组显著高于 EPCs 组 ($P < 0.01$); 而 BK PC/HOE 组显著低于 BK PC 组 ($P < 0.01$, 图 4)。



与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 EPCs 组比较, # $P < 0.01$; 与 BK PC 组比较, Δ $P < 0.01$ 。

图 4 ELISA 法检测各组 hEPCs 上清液中 VEGF 分泌
Figure 4 VEGF levels in the cell supernatant detected by ELISA assay

2.4 超声心脏功能评价及梗死面积检测

细胞移植 10 d 时心功能检测显示 EPCs 组 LVEF 较安慰剂组明显改善 ($P < 0.01$), 梗死面积显著降低 ($P < 0.01$); 而 BK PC 组 LVEF 较安慰剂组及 EPCs 组改善更加明显 ($P < 0.01$), 梗死面积进一步缩小 ($P < 0.01$), 且 BK PC/HOE 组 LVEF 较 BK PC 组显著降低 ($P < 0.01$), 梗死面积亦显著增加 ($P < 0.01$, 图 5, 表 1)。

2.5 共聚焦成像评估 BK 预适应促进移植细胞存活及细胞抗凋亡效应

通过共聚焦显微镜下观察 DiD 标记的移植细胞及 TUNEL 阳性心肌细胞, 评估移植细胞存活及心肌细胞的抗凋亡能力。结果显示, 与安慰剂组及 EPCs 组相比, BK PC 组中的移植细胞在移植后 10 d 明显增多, TUNEL 阳性心肌细胞显著减少, 而 HOE140 干预后阻止了 BK 预适应后的促移植细胞存活效应, 并使 TUNEL 阳性心肌细胞显著增加(图 6)。

3 讨论

本研究结果发现, BK 预适应 hEPCs 后可明显改善裸小鼠 AMI 后的心功能, 其疗效明显优于单纯 hEPCs 移植治疗。其治疗效应是通过促进移植细胞存活、抗移植细胞及宿主心肌细胞凋亡等而实现, 使用 HOE140 干预后可明显减弱其对 AMI 的治疗效果。

目前, 治疗性血管生成(therapeutic angiogene-

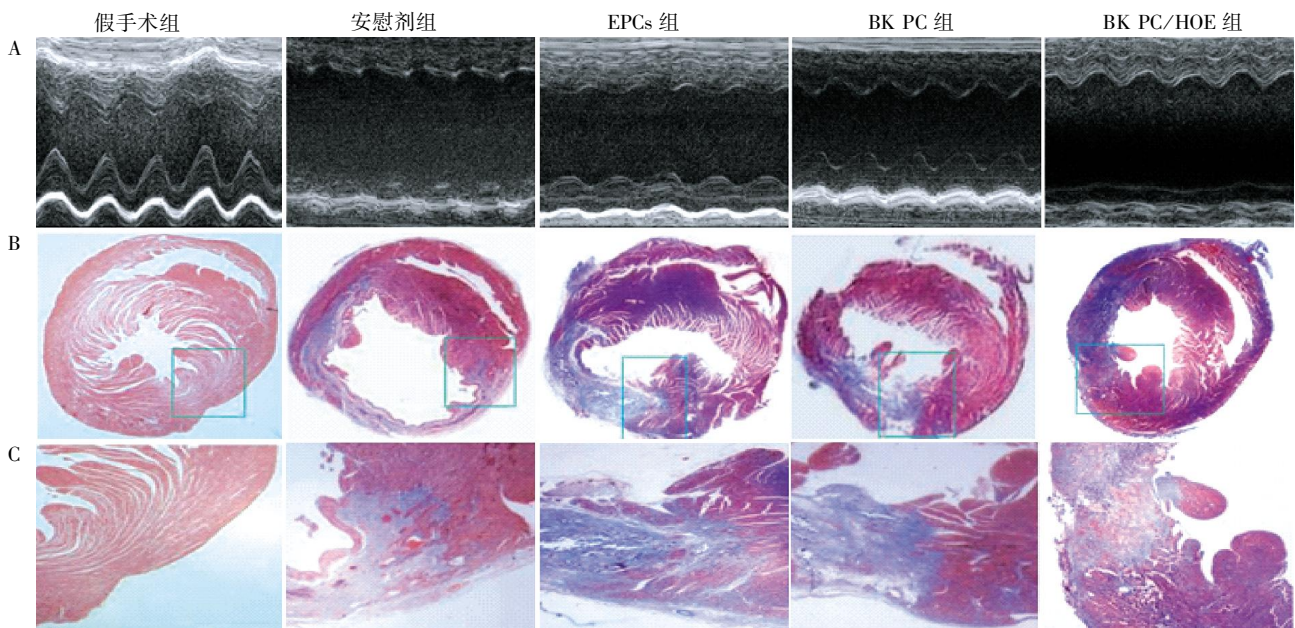


图 5 超声心动图(A)检测各组心功能变化以及横断面 Masson 染色(B,×10;C,×100)显示梗死面积

Figure 5 Cardiac function(A) and infarct size measurements(B,×10;C,×100)

表 1 细胞移植 10 d 后心功能及梗死面积

Table 1 Effects of BK preconditioning on cardiac function and infarct size at 10 days following myocardial infarction (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	LVEF	LVFS	梗死面积
假手术组(n=7)	81.25 ± 1.27	48.97 ± 1.84	-
安慰剂组(n=8)	27.64 ± 2.34	12.52 ± 1.05	43.24 ± 4.13
EPCs 组(n=8)	34.76 ± 2.45*	16.57 ± 1.47*	36.02 ± 2.78*
BK PC 组(n=10)	42.51 ± 4.21**	25.82 ± 2.71**	27.37 ± 2.64**
BK PC/HOE 组(n=10)	34.23 ± 1.46 [△]	17.03 ± 0.94 [△]	35.72 ± 3.01 [△]

LVEF:左心室射血分数;LVFS:左心室短缩率。与安慰剂组比较,* $P < 0.01$;与 EPCs 组比较,** $P < 0.01$,与 BK PC 组比较,[△] $P < 0.01$ 。

sis)作为挽救缺血心肌的一条重要途径成为研究的热点。AMI 后 EPCs 从骨髓动员并迁移至缺血部位,参与血管新生等修复过程。临床研究已经证实 EPCs 移植治疗 AMI 可能通过促进血管生成及组织再生而改善心功能^[10],但干细胞移植治疗 AMI 仍存在较多问题。其中重要的原因之一是移植的干细胞在梗死区域会因为局部恶劣环境的作用而大量死亡,从而影响细胞移植效果。目前,越来越多的研究采用预适应的策略以改善干细胞功能,它是一种单纯物理方法,操作简便。已有研究证实 IPC^[11]及药物性预适应(pharmacologic preconditioning, PP)^[12]均可提高心肌梗死中移植干细胞的存活。在 IPC 中,BK 通过活化 B2 受体来减少梗死面积^[13]。BK 是早期及延迟 IPC 的一种调节因子^[7]。先前实验研究^[14]及临床研究^[15]均证实 BK 预适应可明显改善缺血后的心功能。然而,BK 预适应干细胞是否对干细胞具有保护效应,目前未见报道。本研究采用 BK 预适应 hEPCs,结果显示其可促进 hEPCs 增

殖,且可抑制 hEPCs 凋亡;有研究同样证实 BK 可促进血管平滑肌细胞、内皮细胞增殖^[16-17],以及抑制心肌细胞凋亡^[18-19];此外,这些效应可被 B2 受体阻断剂 HOE140 所阻断,提示 BK 预适应是通过 B2 受体发挥效应的,这与 Kränkel 等^[4]研究结果是一致的。

羰花青染料 DiD 常用来作为荧光示踪剂,本实验中将摄取有 DiD 的 hEPCs 细胞移植到裸鼠体内^[20],10 d 后在荧光显微镜下观察到 BK PC 组由 DiD 所产生的红色荧光明显强于 EPCs 组,提示在该组干细胞有更多存活可能。而且,通过共聚焦显微镜,还观察到 BK PC 组梗死周边区域移植细胞及宿主心肌细胞凋亡明显降低;且 BK PC 组的心功能较单纯 EPCs 组明显改善,提示移植细胞存活增加及细胞凋亡减少是梗死区修复的表现之一。另外,体外实验中发现缺氧诱导凋亡后,BK 预适应 hEPCs 分泌 VEGF 的能力明显强于安慰剂组及 EPCs 组,有研究认为通过分泌有效的细胞因子如 VEGF 等可

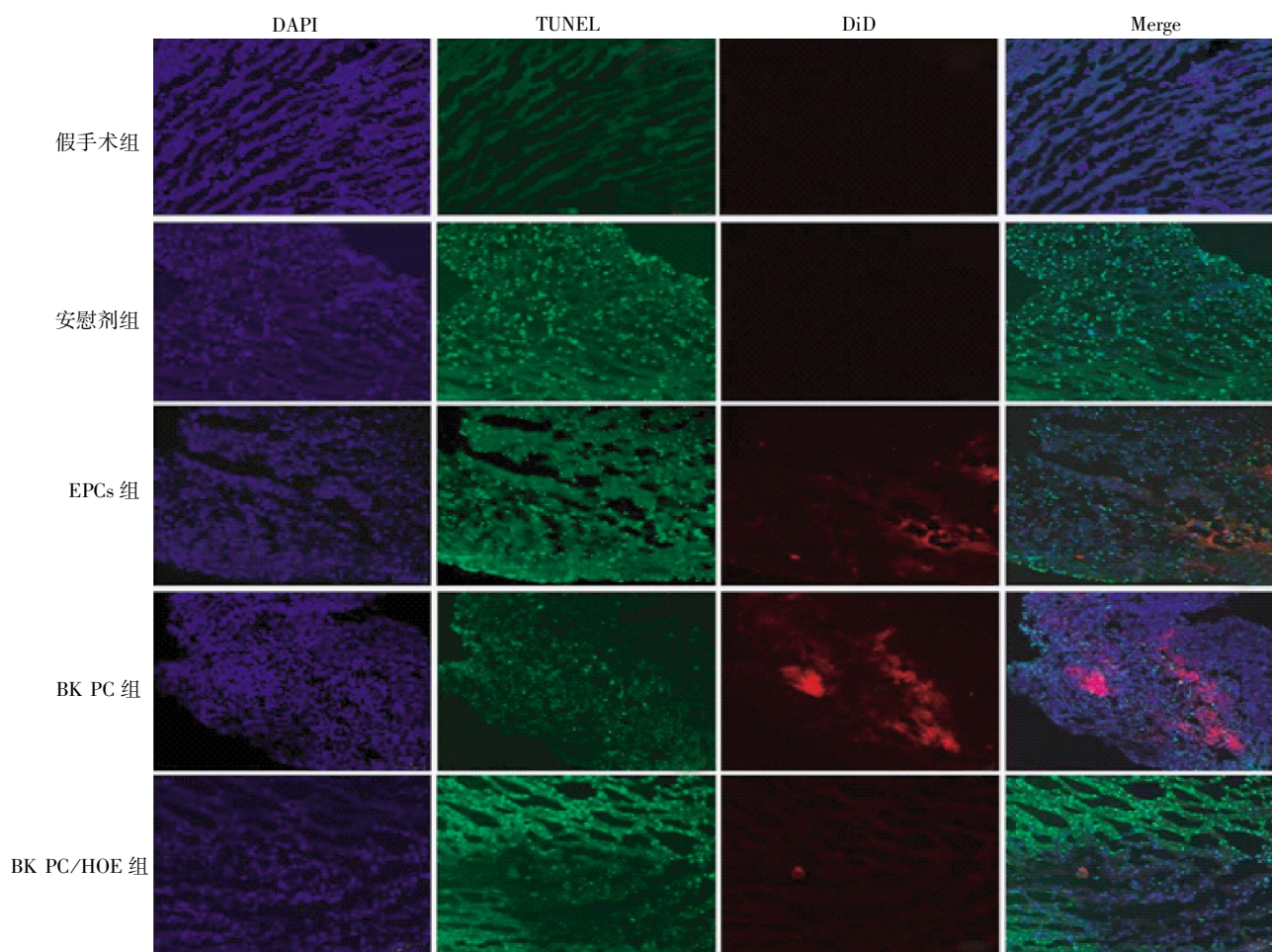


图6 共聚焦显微镜下观察各组 DiD 标记的移植细胞及 TUNEL 阳性心肌细胞 (×200)

Figure 6 Confocal immunofluorescent images of DiD-labeled hEPCs and TUNEL positive cardiomyocytes in cryosections of the myocardium (×200)

保护移植细胞免于凋亡^[21],因此本文推测移植入体内的干细胞的旁分泌作用在抑制移植细胞及宿主心肌细胞凋亡从而改善心功能方面发挥了一定作用,而BK预适应干细胞后进一步增强了其旁分泌功能。

总之,本研究结果初步提示BK预适应干细胞移植可以增加干细胞移植的效果,有望成为AMI治疗的新方法。

[参考文献]

[1] Atluri P, Miller JS, Emery RJ, et al. Tissue-engineered, hydrogel-based endothelial progenitor cell therapy robustly revascularizes ischemic myocardium and preserves ventricular function [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 148(3): 1090-1097

[2] Yao Y, Sheng Z, Li Y, et al. Tissue kallikrein-modified human endothelial progenitor cell implantation improves cardiac function via enhanced activation of akt and increased angiogenesis [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(5): 577-

591

[3] Chen X, Gu M, Zhao X, et al. Deterioration of cardiac function after acute myocardial infarction is prevented by transplantation of modified endothelial progenitor cells overexpressing endothelial NO synthases [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(2-3): 355-365

[4] Kränkel N, Katare RG, Siragusa M, et al. Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential [J]. *Circ Res*, 2008, 103(11): 1335-1343

[5] Wang HJ, Zhang D, Tan YZ, et al. Autophagy in endothelial progenitor cells is cytoprotective in hypoxic conditions [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(7): C617-C626

[6] Bo CJ, Chen B, Jia RP, et al. Effects of ischemic preconditioning in the late phase on homing of endothelial progenitor cells in renal ischemia/reperfusion injury [J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(2): 511-516

[7] Baxter GF, Ebrahim Z. Role of bradykinin in precondi-

- tioning and protection of the ischaemic myocardium[J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 135(4): 843-854
- [8] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. *Blood*, 2000, 95(3): 952-958
- [9] Sheng Z, Yao Y, Li Y, et al. Bradykinin preconditioning improves therapeutic potential of human endothelial progenitor cells in infarcted myocardium[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81505
- [10] Marfella R, Rizzo MR, Siniscalchi M, et al. Peri-procedural tight glycemic control during early percutaneous coronary intervention up-regulates endothelial progenitor cell level and differentiation during acute ST-elevation myocardial infarction; effects on myocardial salvage[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 3954-3962
- [11] Sarkar K, Cai Z, Gupta R, et al. Hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity in endothelial cells is required for acute phase cardioprotection induced by ischemic preconditioning [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(26): 10504-10509
- [12] Liu X, Wang JA, Ji XY, et al. Preconditioning of bone marrow mesenchymal stem cells by prolyl hydroxylase inhibition enhances cell survival and angiogenesis in vitro and after transplantation into the ischemic heart of rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(5): 111
- [13] Kositprapa C, Ockaili RA, Kukreja RC. Bradykinin B2 receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(7): 1355-1362
- [14] Feng J, Li HL, Rosenkranz ER. Bradykinin protects the rabbit heart after cardioplegic ischemia via NO-dependent mechanisms[J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(6): 2119-2124
- [15] Leeser MA, Stoddard MF, Manchikalapudi S, et al. Bradykinin-induced preconditioning in patients undergoing coronary angioplasty[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, 34(3): 639-650
- [16] Yang CM, Lin MI, Hsieh HL, et al. Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 203(3): 538-546
- [17] Guevara-Lora I, Labeledz A, Skrzeczynska-Moncznik J, et al. Bradykinin and des-Arg10-kallidin enhance the adhesion of polymorphonuclear leukocytes to extracellular matrix proteins and endothelial cells[J]. *Cell Commun Adhes*, 2011, 18(4): 67-71
- [18] Yeh CH, Chen TP, Wang YC, et al. Cardiomyocytic apoptosis limited by bradykinin via restoration of nitric oxide after cardioplegic arrest[J]. *J Surg Res*, 2010, 163(1): e1-e9
- [19] Feng J, Bianchi C, Sandmeyer JL, et al. Bradykinin preconditioning improves the profile of cell survival proteins and limits apoptosis after cardioplegic arrest[J]. *Circulation*, 2005, 112(9 suppl): I190-I195
- [20] Li Y, Yao Y, Sheng Z, et al. Dual-modal tracking of transplanted mesenchymal stem cells after myocardial infarction[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 815-823
- [21] Dai Y, Xu M, Wang Y, et al. HIF-1 α induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6): 1036-1044

[收稿日期] 2015-01-13