

文章编号: 0258-7025(2010)06-1654-05

激光心肌血运重建联合血管内皮祖细胞移植 治疗缺血性心脏病

贾宝辉¹ 刘超^{2*} 付莉¹ 徐宏平¹ 倪居¹ 刘宁¹

(¹ 郑州铁路职业技术学院, 河南 郑州 450052)
(² 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052)

摘要 探讨激光心肌血运重建术(TMLR)联合血管内皮祖细胞(EPCs)移植治疗缺血性心脏病。将 18 只杂种犬成功建立急性心肌梗塞(AMI)动物模型后随机分为对照组, TMLR 组和 TMLR+EPCs 组, 每组 6 只。TMLR 组: AMI 后针对缺血区心肌进行激光打孔。TMLR+EPCs 组: TMLR 术后将 EPCs 与藻酸钙载体复合物移植入缺血区心肌激光孔道内。术后 4 周评价心功能和检测缺血区心肌组织新生血管状况。结果表明, TMLR+EPCs 组心肌局部收缩力明显高于对照组和 TMLR 组, 心功能明显改善。TMLR+EPCs 组激光孔道内有新生血管样结构生长, 而 TMLR 组激光孔道内形成纤维化瘢痕。TMLR+EPCs 组较 TMLR 组激光孔道周围新生血管计数明显增多, 并且两组均较对照组明显增多。TMLR 联合 EPCs 及载体复合物移植促进缺血心肌新生血管形成, 增加心肌局部收缩力, 改善心功能。

关键词 医用光学; 激光心肌血运重建; 血管内皮祖细胞; 心肌缺血; 载体复合物; 血管生成

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/CJL20103706.1654

Effect of the Combined Use of Transmyocardial Laser Revascularization and Implantation of Endothelial Progenitor Cells on Canine Ischemic Heart

Jia Baohui¹ Liu Chao² Fu Li¹ Xu Hongping¹ Ni Ju¹ Liu Ning¹

¹ Zhengzhou Railway Technology Vocation College, Zhengzhou, Henan 450052, China

² Cardiac Department of the First Hospital Affiliated Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China

Abstract Objective to determine the effect of transmyocardial laser revascularization (TMLR) in combined with the implantation of endothelial progenitor cells (EPCs) on cardiac function and neovascularization of myocardial ischemia. An operation of acute myocardial ischemia was created. Afterwards, the dogs were randomized into AMI group, TMLR group and TMLR + EPCs receiving TMLR with implantation of EPCs and calcium alginate into channels induced by laser. Four weeks later, all dogs underwent echocardiography and the samples of myocardial ischemia tissue underwent histochemical and immunohistologic analysis. The results show that TMLR + EPCs group regional contractility in the left artial diameter (LAD) territory revealed an improvement versus control and TMLR groups, whereas control and TMLR animals did not show any difference. Neangiogenesis was observed in laser channels in the canine heart subjected to TMLR + EPCs treatment, the remains of clacium alginate appeared in the channels of TMLR + EPCs group, but the fibrosis in TMLR group. The result indicates TMLR in combined with EPCs improve the cardiac regional and global function in acute myocardial ischemia from advancing impariment, and augment neovascularization in channels of ischemic myocardium induced by laser.

Key words medical optics; transmyocardial laser revascularization; endothelial progenitor cells; myocardial ischemia; canine; neovascularization

收稿日期: 2009-08-13; 收到修改稿日期: 2009-10-09

基金项目: 河南省科技厅基础与前沿项目(092300410027, 102300410163)资助课题。

作者简介: 贾宝辉(1969—), 男, 博士, 讲师, 主要从事外科危重病基础方面的研究。E-mail: bhjia@126.com

* 通信联系人。E-mail: liubeilun@sohu.com

1 引言

激光心肌血运重建术(TMLR)在缺血心肌部位用激光直接气化心肌组织,形成多个贯穿心室壁全层的小隧道,以改善缺血心肌的血供^[1]。然而研究证实新建立的激光孔道仅能保持短期的开放,随着孔道内纤维蛋白栓子堵塞,孔道被增生的纤维瘢痕组织所取代,丧失了血液供应能力^[2]。血管内皮祖细胞(EPCs)移植于激光孔道内,可增强激光孔道内新生血管形成,从而增加缺血区血液灌注^[3]。但移植入心肌激光孔道内的EPCs受血流冲击难于驻留在孔道内。

研究揭示 TMLR 能明显缓解心绞痛,提高运动耐力。1999 年 4 组前瞻性随机对照研究被报道。一组来自英国应用的是 CO₂ 激光^[4];另三组来自美国,一组使用 CO₂ 激光^[5],另两组使用的是 Ho:YAG 激光^[6,7]。837 例患者被随机分为 TMLR 组($n=409$)和药物治疗组($n=428$),患者年龄和性别分布相同。所有患者心绞痛分级为 CCS III 或 IV 级。研究均显示患者心绞痛症状明显缓解,而心脏事件如急性心肌梗塞和充血性心力衰竭两组之间无显著差异。

然而对于 TMLR 改善缺血心肌血供的机制,近年来一直存在着争议。尽管一些实验研究证实 TMLR 能改善缺血心肌的血供。但越来越多的文献报道,TMLR 后症状的改善并不能用通过激光孔道的直接血供作为其唯一解释,很多动物实验及临床研究甚至提出了相反的结果^[8]。其原因主要在于,新建立的激光孔道被增生的纤维瘢痕组织所取代,孔道很快闭塞,继而丧失了血液供应能力^[9]。

临床和实验研究均证实:相比单一应用 TMLR 或干细胞移植疗法,TMLR 联合干细胞移植治疗缺血性心脏病,能明显增加缺血心肌血供,改善心功能^[10]。Klein 等^[11]报道 2 例终末期冠心病患者,从自体骨髓干细胞中分选出纯度高达 97% 的 CD133⁺ 细胞,然后注入到心肌中,再接受 TMLR 术治疗,结果表明可以有效改善血流灌注,挽救缺血心肌,增强左室功能。

本课题组前期研究已证实:为增加缺血区再血管化,来源于人的 EPCs 移植入裸鼠缺血后肢激光孔道内增加了缺血区肌肉再血管化,同时缺血后肢的血流明显改善^[3]。但是激光心肌血运重建后激光孔道直接与心室腔相通,细胞悬液移植到心脏的激光孔道内后很容易被血流冲失,发生细胞的丢失,移植细胞不能驻留激光孔道内。因此为保证细胞驻留

激光孔道内,需要载体物质将细胞移植入激光孔道。前期体外实验已证实藻酸钙和 EPCs 有良好的生物相容性,不影响 EPCs 体外增殖、分化,也不促使其凋亡^[12]。

本文采用组织工程学原理,将 EPCs 与藻酸钙制备成 EPCs 载体复合物,并移植于缺血心肌激光孔道内,观察其能否增加激光孔道内新生血管形成以及是否增加心肌血供,为更好地将 TMLR 结合 EPCs 移植治疗缺血性心脏病提供依据和临床帮助。

2 实验材料与方法

2.1 实验材料

27 只健康杂种犬,均为雄性,体重 10~15 kg,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。鼠抗犬血管内皮细胞Ⅷ因子相关抗原(vWF)、超敏链霉素抗生物素-过氧化物酶(SP)试剂盒和 3,3-四盐酸二氨基联苯胺(DAB)显色液及胰酶均购自于福建迈新公司。

2.2 急性心肌梗塞动物模型制备及分组

静脉注射戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉,气管插管,呼吸机控制呼吸。于第 5 肋间开胸,在左冠状动脉前降支发出第一对角支处分离并结扎。观察心电图变化,循环稳定后逐层关胸并送动物房饲养。模型制备成功后 3 周,18 只存活动物随机分为 3 组:对照组[急性心肌梗塞(AMI)];TMLR 组;TMLR + EPCs 组。每组 6 只。

2.3 缺血心肌 TMLR 术

AMI 模型制备后第 4 周进行 TMLR 术。动物麻醉后,经原切口进胸,分离粘连,暴露心脏。于第一对角支和心尖之间约 2 cm×4 cm 范围应用激光(Q-switch 1064 nm Nd:YAG 激光,华工)打 20 个孔,激光能量为 140 mJ/cm²,光纤直径为 0.6 mm,脉冲时间为 7 ns,频率为 10 Hz。血搏动性流出证实穿透室壁。出血用 4-0 prolene 线缝合,并将此作为组织取材时的标记。对照组仅开胸暴露心脏后即逐层关胸。

2.4 EPCs-载体复合物制备

EPCs 是一种来源于骨髓的原始细胞,与人类胚胎时期的成血管细胞和人脐带静脉内皮细胞相似,在一定的条件下可诱导分化成为成熟的内皮细胞。EPCs 不仅参与胚胎时期血管生成,而且在出生后的微血管新生、损伤的血管内皮修复和功能维持中起着重要的作用。通过移植自体或动员骨髓中

的 EPCs,可以使损伤后的血管内皮结构和功能快速恢复。因此,EPCs 移植正逐渐被应用于治疗血管相关性疾病,被认为是血管相关性疾病很有前景的治疗措施之一^[13]。

2.4.1 外周血单个核细胞分离

采用密度梯度离心法分离。取 TMLR+EPCs 组动物外周血,经肝素抗凝并加入等量磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.2)稀释后,轻铺于淋巴细胞分离液的表面,离心(800 g,30 min),收集单个核细胞,并用 PBS 洗涤3次。

2.4.2 EPCs 体外培养

培养基为含 20%胎牛血清的 M199,其中含青霉素 100 U/mL,链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,VEGF 10 ng/mL,FGF-b 1 ng/mL,IGF-2 1 ng/mL,抗坏血酸 10^{-4} mol/L,L-谷氨酰胺 1.6 mmol/L。以 M199 重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 mL^{-1} 后接种于培养皿中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数为 5% CO_2 ,饱和湿度条件下培养。4 天后更换培养基。培养 7 天后收集贴壁细胞以及生长在盖玻片上的细胞,经免疫组织化学检查 vWF(+),KDR(+),CD34(+)和 CD31(+)证实为 EPCs。

2.4.3 制备 EPCs-载体复合物

培养 7 天后的 EPCs 用 0.25%胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 15 min,吹打使其分离,加入含 1.5%藻酸钠充分混合,调整细胞浓度为 1×10^9 mL^{-1} ,加入 30 mmol/L 浓度的氯化钙,形成胶冻状 EPCs-藻酸钠(CA)载体复合物。抽取 EPCs-CA 复合物至微量注射器,待用于移植。

2.5 EPCs-载体复合物移植入缺血区心肌激光孔道内

使用微量注射器将 EPCs-CA 载体复合物移植入 TMLR+EPCs 组实验动物激光孔道内。

2.6 超声心动图检查

TMLR 术后 4 周进行超声心动图检查了解心功能改善情况。采取左侧仰卧位在麻醉状态下进行。记录心尖两腔、四腔观图像后,测定左室腔内径(LVD)和左房腔内径(LAD)。采用 Simpson 双平面法计算射血分数(EF)。记录胸骨旁左室短轴 M 型曲线,分析左室短轴缩短率(FS)。

2.7 病理学检查

超声心动图检查后以过量麻醉药处死动物,切取心脏。分离 TMLR 组和 TMLR+EPCs 组标记部位组织及对照组相应区域组织,置于 10%的福尔马林中保存,石蜡包埋,切片,HE 染色。比较 TMLR+EPCs 组和 TMLR 组心肌激光孔道病理

组织学。

2.8 免疫组织化学法检测心肌组织新生血管数

2.8.1 心肌组织血管内皮细胞染色

采用链霉菌抗生物素-过氧化物酶方法(SP法)进行免疫组织化学染色。以 vWF 标记血管内皮细胞。操作步骤严格按试剂盒说明。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

2.8.2 结果判定

vWF 结果判定标准:每一个染成棕黄色的、可与周围血管和其他结缔组织区分开来的内皮细胞或内皮细胞簇,均作为一个单一的、可计数的微血管,不论管腔和红细胞出现与否。管腔直径大于 8 个红细胞直径,带有较厚的肌层的微血管均不计数。

新生血管计数方法:先于低倍光镜(40 \times 和 100 \times)下确定 3 个血管着色最密集区域,然后在高倍视野(400 \times)内计血管的数目,取 5 个视野的均值作为新生血管数。分辨不清或染色模糊的细胞不计数。

结果的判定在双盲法下进行,每张切片由两位病理医师分别判定、计数。两人计数相差 10%以上重新计数。数字图像储存在有 Pro soft 软件的计算机中。

2.9 统计分析

采用 SPSS10.0 软件包进行统计分析。新生血管计数用均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示。在多组间比较采用单因素方差分析,多组的两两间比较采用 SNK 检验。以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

3 结 果

第一次手术中 3 只犬死于致死性室颤,6 只于第一次术后 15 天左右死亡,余 18 只犬均于 II 导联出现 ST 段弓背向上抬高,第二次手术时 11 只心电图有病理性 Q 波,两组犬体重无明显差异。

如表 1 所示,急性心肌缺血后 2 个月,三个实验组 LVD 和 LAD 均无统计学差异($P > 0.05$)。FS 和 EF,在对照组,TMLR 组和 TMLR+EPCs 组依次增大。其中 TMLR 组 EF 与对照组之间差异有显著意义($P < 0.05$);TMLR+EPCs 组 EF,FS 与对照组有显著性差异(P 值分别 < 0.05 和 < 0.01);TMLR+EPCs 组 EF 与 TMLR 组之间差异有显著意义($P < 0.01$)。

组织学检查表明 TMLR+EPCs 组激光孔道内有藻酸钠沉积,尚未完全吸收,HE 染色成蓝色改变,如图 1 所示。沉积物周围有血管样结构,Ⅷ因子

表 1 3 组超声检查心功能结果比较($n=6$)Table 1 Comparison of echocardiography among three groups ($n=6$)

Parameters of two-dimensional and M-pattern	AMI group	TMLR group	TMLR+EPCs group
LVD /cm	3.27 ± 0.08	3.26 ± 0.12	3.26 ± 0.11
LAD /cm	2.13 ± 0.09	2.17 ± 0.08	2.10 ± 0.15
FS /%	31.02 ± 2.38	32.09 ± 2.26	34.73 ± 3.84^a
EF /%	47.60 ± 7.54	55.19 ± 1.9^a	$61.00 \pm 4.78^{b,c}$

a: compared with AMI group, $P < 0.05$; b: compared with AMI group, $P < 0.01$; c: compared with TMLR group, $P < 0.05$.

相关抗原染色周围血管样结构内皮细胞呈黄染,如图 2 所示。而 TMLR 组激光孔道内形成纤维化,内皮细胞黄染较轻,如图 3 所示。

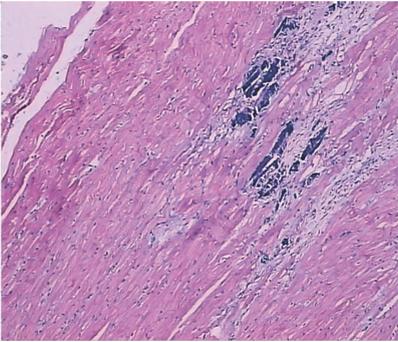


图 1 TMLR+EPCs 组心肌 HE 染色

Fig. 1 H-E staining of myocardium in TMLR+EPCs group

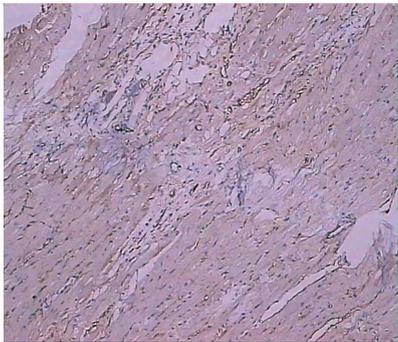


图 2 TMLR+EPCs 组血管内皮细胞Ⅷ因子相关抗原染色(SP 100×)

Fig. 2 Expression of factor VIII related antigen in endothelial cells of TMLR+EPCs group (SP 100×)

激光孔道周围新生血管计数在对照组($2.78 \pm 0.31, n=6$), TMLR 组($5.13 \pm 0.53, n=6$)和 TMLR+EPCs 组($5.67 \pm 0.78, n=6$)依次增加; TMLR 组和 TMLR+EPCs 组较对照组均明显增多,差异显著($P < 0.05$); TMLR 组和 TMLR+EPCs 组之间差异不显著($P > 0.05$)。

4 讨 论

TMLR 和 EPCs 结合治疗一个月后,左室局部和整体收缩及舒张功能较 TMLR 组改善,表明二者结合治疗较单纯 TMLR 能更好改善左室功能。这

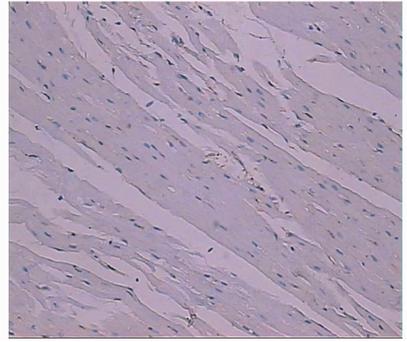


图 3 TMLR 组血管内皮细胞Ⅷ因子相关抗原染色(SP 100×)

Fig. 3 Expression of factor VIII related antigen in endothelial cells of TMLR group (SP 100×)

可能与 EPCs 在激光孔道能形成新生血管,增加心肌血供有关。但本实验观察时间较短,钙盐结晶未完全吸收,仍有待进一步观察长期效果。

5 结 论

AMI 模型制备后 4 周行 TMLR 术,术后将经外周血分离培养获得的 EPCs 与藻酸钙载体复合物移植入缺血区心肌激光孔道内。4 周后采用心脏超声评价心功能,病理组织学和免疫组织化学法检测缺血区心肌组织新生血管状况。结果证实 TMLR 联合 EPCs 及载体复合物移植能促进缺血心肌新生血管形成,增加心肌局部收缩力,改善心功能。

参 考 文 献

- O. M. Muhling, Y. Wang, P. Panse *et al.*. Transmyocardial laser revascularization preserves regional myocardial perfusion: an MRI first pass perfusion study [J]. *Cardiovasc. Res.*, 2003, **57**(1):63~70
- S. Paul, M. Nathan, J. G. Byrne *et al.*. Transmyocardial laser revascularization [J]. *Cardiothorac. Anesth.*, 2004, **18**(1):85~92
- C. Liu, Z. Sun, X. Du *et al.*. Implantation of endothelial progenitor cells into laser-induced channels in rat ischemia hindlimb augments neovascularization [J]. *Ann. Vasc. Surg.*, 2005, **19**(2):241~247
- P. M. Schofield, L. D. Sharples, N. Caine *et al.*. Transmyocardial laser revascularization in patients with refractory angina: a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 1999, **353**(9152):519~524

- 5 E. D. Jansen, M. Frenz, K. A. Kadipasoaglu *et al.*. Laser-tissue interaction during transmyocardial laser revascularization [J]. *Ann. Thorac. Surg.*, 1997, **63**(3):640~647
- 6 O. H. Frazier, R. J. March, K. A. Horvath *et al.*. Transmyocardial revascularization with a carbon dioxide laser in patients with end-stage coronary artery disease [J]. *N. Engl. J. Med.*, 1999, **341**(14):1021~1028
- 7 N. Yamamoto, T. Kohmoto, A. Gu *et al.*. Angiogenesis is enhanced in ischemic canine myocardium by transmyocardial laser revascularization [J]. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1998, **31**(6):1426~1433
- 8 G. Lutter, K. Sarai, E. Nitzsche *et al.*. Evaluation of transmyocardial laser revascularization by following objective parameters of perfusion and ventricular function [J]. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2000, **48**(2):79~85
- 9 Huang Ping, Liu Chengyi, Xu Xiaoyang *et al.*. Photobiomodulation action of the marginal irradiation of high intensity KTP laser irradiations on monolayer skin fibroblasts [J]. *Chinese J. Lasers*, 2005, **32**(5):723~728
- 黄平,刘承宜,徐晓阳等. 强激光束边缘对单层皮肤成纤维细胞的光生物调节作用[J]. *中国激光*, 2005, **32**(5):723~728
- 10 E. Ibrahim, J. Ligntner, D. G. Pennington *et al.*. Cellular cardiomyoplasty and transmyocardial laser revascularization for chronic ischemic heart [J]. *FASEB J.*, 2006, **20**(3):A315
- 11 H. M. Klein, A. Ghodsizad, A. Borowski *et al.*. Autologous bone marrow-derived stem cell therapy in combination with TMLR. A novel therapeutic option for endstage coronary heart disease; report on 2 cases [J]. *Heart. Surg. Forum.*, 2004, **7**(5):E416~419
- 12 Liu Chao, Xu Jing, Luo Hong *et al.*. Study on injectable endothelial progenitor cells-carrier composite [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2007, **17**(2):151~155
- 刘超,徐敬,罗鸿等. 可注射血管内皮祖细胞-载体材料复合物的体外研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2007, **17**(2):151~155
- 13 A. Kawamoto, D. W. Losordo. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration [J]. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2008, **18**(1):33~37

光 学 界 百 科 全 书

——《光学手册》(新版)面世在即

五十年前,随着第一台红宝石激光器的问世,光学进入到一个全新的领域和崭新的发展时代。五十年间,光学界发生了史无前例、翻天覆地的变化,毫不夸张地说,光学已经深入到我们社会生活的每一个角落,影响着所有人的生活。

如今,从事光学研究的学者越来越多,光学专业的学生越来越多,应用光学的行业也越来越多。此时,一本内容丰富全面、涵盖光学领域所有学科的**光学百科全书**成为相关人士日益迫切的需求。在这种需求下,新版《光学手册》应运而生,经历六年反复酝酿,四年悉心编撰,该书将于近期与广大读者见面。

新版《光学手册》是原《光学手册》(25章,230万字)的修订版。原书出版于1986年,出版后得到了严济慈、王大珩、龚祖同等老一辈科学家的高度评价,称之为填补国内空白,“一本兼顾光学工作者和非光学科技工作者的参考书”,手册迄今仍是许多光学技术人员案头必备的权威参考书。

但是,在原《光学手册》出版后的25年间,光学理论和技术飞速发展,发生了质的飞跃,完成了从传统光学向现代光学的转变。现代光学包涵传统光学、光电子学和光子学。原书中全部章节内容需要更新,新发展起来的涉及光学的边缘学科需要增添。因此,新版《光学手册》绝非传统意义上的修订,而是一个创新的版本。

“一本有国际影响力的能反映时代脉搏的观念创新的学术性工具书”——这是编者对新版《光学手册》的定位。

新版《光学手册》包含38章、49个光学学科、460万余字,其内容精深到位,基本涵盖了目前光学领域所涉及的所有学科,为光学工作者和非光学科技人员提供了几乎所有光学分科的基本概念、基本原理、基本方法、基本公式和基本数据,翔实而新颖,实用而方便,可谓内容丰富,近乎**光学百科全书**而更为精深之,实属又一部高水平学术专著。在本书中,诸如电磁光学、纳米光子学、生物光子学、瞬态光学、同步辐射光学、太赫兹波光学、中子光学、非成像光学及自由曲面光学、近场光学和金属表面等离子体光学之类新兴光学学科也将与大家见面。