

急性心肌梗死患者自体骨髓干细胞移植对改善心功能和 VEGF 影响的临床研究

李长江, 尹作民, 王 燕, 刘为生, 滕 军

基金项目: 山东省青岛市科技计划项目(编号:07-2-1-12-nsh)

作者单位: 266042 山东, 青岛市中心医院急救中心

作者简介: 李长江(1971-), 男, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 心血管疾病的介入治疗。E-mail: drlichangjiang@163.com

[摘要] 目的 探讨急性心肌梗死患者自体骨髓干细胞冠状动脉内注射对改善心功能和血管内皮细胞生长因子(VEGF)的影响。方法 将急性心肌梗死住院并行介入治疗的患者 25 例,按照随机分组的原则分为干细胞移植治疗组(10 例)和对照组(15 例),治疗组患者在心肌梗死发生 14 d 后进行冠状动脉内注射自体骨髓干细胞治疗。术前 1 周和术后 6 个月时,二维超声心动图评价患者左室射血分数(EF%),术后第 3、7、14、28、56 天时用酶联免疫吸附法测定患者血清 VEGF 浓度。结果 干细胞移植治疗组与对照组比较,自体骨髓干细胞移植前两组间左室射血分数差异无统计学意义($P > 0.05$),术后 6 个月时治疗组明显高于对照组($P < 0.05$),患者发生再梗死、再次血运重建和死亡的概率两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),而心力衰竭的发生率治疗组少于对照组($P < 0.05$);血清 VEGF 浓度移植治疗组明显高于对照组($P < 0.05$)。结论 急性心肌梗死后通过自体骨髓干细胞冠状动脉内移植能增加患者血清 VEGF 浓度,改善患者的心功能,减少心力衰竭的发生。

[关键词] 急性心肌梗死; 骨髓干细胞; 移植; 心功能; 血管内皮细胞生长因子

[中图分类号] R 542.2 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2010)04-0302-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.04.02

A clinical study about the effect of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell on left ventricular function and VEGF in patients with acute myocardial infarction LI Chang-jiang, YIN Zuo-min, WANG Yan, et al. Emergency Center, Qingdao Central Hospital, Shandong 266042, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell on left ventricular function and the vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with acute myocardial infarction. **Methods** After successful percutaneous coronary intervention (PCI) for acute myocardial infarction, 25 patients were randomly assigned to either a control group ($n = 15$) that received optimum postinfarction medical treatment, or a bone-marrow-cell group ($n = 10$) that received optimum medical treatment and intracoronary transfer of autologous bone-marrow cells 14 days after PCI. Data about left ventricular ejection fraction (LVEF) were obtained by echocardiogram before and at 6 months' follow-up. The serum levels of VEGF were measured by ELISA at 3-day, 7-day, 14-day, 28-day, 56-day time-points after transplatation, respectively. **Results** There was no significant difference between the two groups in LVEF before intracoronary transplantation of autologous bone marrow stem cell ($P > 0.05$). After 6 months, LVEF in treated patients was improved significantly ($P < 0.05$) compared with the control, though there was no significant difference in the rate of re-infarction, re-myocardial perfusion and death. The serum levels of VEGF in patients accepted transplatation were significantly higher than the levels in control patients ($P < 0.05$). **Conclusion** After intracoronary transplantation of autologous bone marrow stem cell in patients with acute myocardial infarction, the left ventricular function could be improved and the heart failure be decreased by the way to increase serum level of VEGF.

[Key words] Acute myocardial infarction; Bone marrow stem cell; Transplantation; Ventricular function; Vascular endothelial growth factor

随着人们生活水平的提高,寿命的延长,缺血性心脏病也呈逐年上升的趋势。心肌缺血和随后的血流再灌注都可以导致心肌细胞损伤,甚至广泛的心肌细胞的死亡和功能丧失。而心肌细胞是终末分化的细胞,已从细胞循环中退出,无法再生,只能通过形成瘢痕组织来进行修复^[1]。骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是来源于骨髓的多能干细胞,能从骨髓中分离,在体内外可被诱导分化成多种特定组织,其中包括心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞^[2,3]。本研究拟进行自体骨髓干细胞移植治疗急性心肌梗死以探讨骨髓干细胞移植治疗急性心肌梗死作用机制中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)所发挥的作用,为干细胞移植疗法在临床的应用提供重要的实验数据和

理论依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象 选择 2008-01 ~ 2008-12 在我院急救中心因急性心肌梗死住院并行介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)的患者 25 例,其中,男性 14 例,女性 11 例,平均年龄(59.0 ± 6.1)岁。入选标准:(1)持续性胸痛 ≥ 30 min;(2)心电图至少 2 个相邻的胸导联 ST 段抬高 2mm;(3)血清磷酸肌酸激酶的同工酶(CK-MB)或者肌钙蛋白 I(cTnI)升高;(4)持续性胸痛发作 12 h 内成功行急诊 PCI。随机分为治疗组和对照组,两组年龄、性别、临床表现等比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较[($\bar{x} \pm s$), $n(\%)$]

组别	例数	年龄(岁)	性别		ST 段抬高(mm)	胸痛至 PCI 时间(h)	糖尿病	高血压病
			男	女				
治疗组	10	60.0 ± 8.7	6(60.0)	4(40.0)	3.1 ± 0.2	3.5 ± 0.7	6(60.0)	7(70.0)
对照组	15	58.0 ± 4.8	8(53.3)	7(46.7)	3.2 ± 0.1	3.5 ± 0.5	7(46.7)	8(53.3)
t/χ^2	-	0.59	0.11	0.11	0.62	0.50	0.43	0.69
P	-	0.89	0.74	0.74	0.34	0.28	0.51	0.41

1.2 研究方法

1.2.1 研究分组 入选的患者随机分为干细胞移植治疗组(10 例)和对照组(15 例),所有患者均给予阿司匹林、氯吡格雷、低分子肝素抗凝抗血小板治疗并成功实施了急诊 PCI 治疗,治疗组患者在心肌梗死发生 14 d 后进行冠状动脉内注射自体骨髓干细胞治疗。

1.2.2 骨髓间充质干细胞制备 无菌条件下从患者髂后上嵴穿刺抽取骨髓 20 ~ 40 ml,采用密度为 1.073 的 Percoll 分离液应用密度梯度离心法进行骨髓间充质干细胞的分离;将分离后的细胞接种于含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养液中,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中进行培养。移植前收集细胞,应用流式细胞仪对间充质干细胞特异性表面分子 CD44 进行检测。

1.2.3 冠状动脉内自体骨髓间充质干细胞移植 急性心肌梗死后 14 d 时,将培养收集的间充质干细胞悬浮置于 10 ml 含肝素、无胎牛血清的 IMDM 细胞培养液中,采用 over the wire(OTW)导管将细胞悬液分 3 ~ 4 次注入梗死相关动脉。移植过程中严密监测患者有无胸痛及心电图和腔内压力变化情况。

1.2.4 干细胞移植前后对急性心肌梗死患者心功能测定 术前 1 周和术后 6 个月时,二维超声心动图测量患者左室射血分数(EF%)。

1.2.5 干细胞移植后心肌梗死病人血清 VEGF 水平测定 干细胞移植后第 3、7、14、28、56 天时所有对象抽取清晨空腹血 5 ml,应用酶联免疫吸附法(ELISA)对所收集的心肌梗死病人血清 VEGF 水平进行测定。

1.2.6 随访 随访期为 6 个月,以电话和门诊的方式对主要临床心血管事件(心源性死亡、再梗死、心力衰竭和再次再灌注治疗)进行随访。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,固定时间点两组间的比较采用 t 检验,组内不同时间点比较采用重复测量的方差分析;计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者左室射血分数比较 6 个月随访结束时,在观察期内对照组死亡 1 例,干细胞移植治疗组无死亡病例。干细胞移植前左室射血分数两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),术后 6 个月时治疗

组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者左室射血分数比较 ($\bar{x} \pm s, EF\%$)

组别	例数	干细胞移植前	干细胞移植后	<i>t</i>	<i>P</i>
治疗组	10	49.5 ± 4.2	55.8 ± 7.8	2.49	0.03
对照组	14	50.7 ± 4.4	52.6 ± 4.5	2.08	0.06
<i>t</i>	-	0.70	1.30		
<i>P</i>	-	0.99	0.04		

2.2 两组患者随访期间不良心血管事件发生比较患者发生再梗死、再次血运重建和死亡的概率两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，而心力衰竭的发生率治疗组少于对照组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 4 两组患者干细胞移植后不同时间点(d)血清 VEGF 浓度比较 ($\bar{x} \pm s, pg/ml$)

组别	例数	3 d	7 d	14 d	28 d	56 d	<i>F</i>	<i>P</i>
治疗组	10	102.5 ± 21.1	188.5 ± 23.1	211.5 ± 13.3	215.5 ± 25.0	112.6 ± 23.5	134	0.00
对照组	14	95.5 ± 12.0	170.3 ± 15.7	198.1 ± 16.2	188.5 ± 26.2	108.3 ± 25.74	105	0.00
<i>t</i>	-	0.60	2.35	2.16	2.58	0.43		
<i>P</i>	-	0.55	0.03	0.04	0.02	0.67		

3 讨论

3.1 对于急性心梗患者,治疗的目标在于尽快建立再灌注从而挽救尽可能多的心肌,但是如果再灌注不能及时生效,由于心肌细胞的大量丧失,将会出现心室重构、心力衰竭等一系列病理生理变化。尽管其后的药物、介入或手术治疗能够改善心肌的血供,可使症状好转或缓解,使闭塞的血管再通,但没有一种能代替坏死心肌的功能。虽然近来的研究显示,心肌梗死后心肌细胞有发生分裂增生的能力^[4,5],但这些细胞数量极少,不能有效地减少心室重构的有害作用和修复心肌组织。如何增加心肌梗死区具有完整收缩功能的心肌细胞数量成为治疗心肌梗死后心力衰竭的关键所在。人们试图利用移植具有自我复制与分化能力的干细胞到心肌梗死区,使之存活并定向分化为有功能的心肌细胞以改善和恢复心脏功能。因此,近年来干细胞移植成为心梗治疗研究的一个热点。

3.2 干细胞移植是将供体干细胞移植入受损心肌组织中,生长并重建心肌以代替纤维组织,进而刺激血管的再生,改善局部微循环环境,从而改善心脏功能的一种新疗法。骨髓间质干细胞(MSC)是来源于骨髓的多能干细胞,能从骨髓中分离,在体内外可被诱导分化成多种特定组织,其中包括心肌细胞、内

表 3 两组患者随访期间不良心血管事件发生比较 [$n(\%)$]

组别	例数	再梗死	再次再灌注治疗	心力衰竭	死亡
治疗组	10	1(10.00)	1(10.00)	0(0.00)	0(0.00)
对照组	15	1(6.67)	1(6.67)	5(33.33)	1(6.67)
χ^2	-	0.09	0.09	4.17	0.69
<i>P</i>	-	0.76	0.76	0.04	0.41

2.3 两组患者干细胞移植后不同时间点(d)血清 VEGF 浓度比较 干细胞移植治疗后第 7、14、28 天,治疗组血清 VEGF 浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$),第 3、56 天时两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

皮细胞和平滑肌细胞。经冠脉内注射是一种安全的干细胞移植方法,可通过球囊导管选择性的注入梗塞相关动脉^[6],其方法可行性强,而且损伤性较小,适合多数心梗患者,此方法能使所有的细胞在第一时间经过梗塞和梗塞周围组织。Strauer 等^[6]在 10 例急性心梗患者使用自体骨髓单核细胞经冠脉内注射 3 个月后,观察到左室功能较对照组改善,并且梗塞面积明显缩小,移植时和随访期内未见到任何不良反应。Wollert 等^[7]在 30 例已行冠脉成形术的急性心梗患者同时经冠脉内注射自体骨髓单核细胞,6 个月后发现患者的心功能较对照组明显改善,也未增加如诱发心律失常、支架再狭窄等不良事件的发生率,电生理检查在刺激引起室性心动过速方面与对照组无明显差异,这些都证实了干细胞移植的安全有效性。国内也已进行有关的临床实验,并获得了成功。陈绍良等^[8]研究入选 69 例急性心梗发作 12 h 内的患者,经球囊扩张术或支架置入术后随机分为两组,34 例患者在 18 d 后接受冠脉内注射自身体外培养的骨髓间质干细胞,3 个月后射血分数、梗死区心室壁运动速度均明显改善,且较对照组有显著意义。

3.3 通常认为骨髓干细胞的作用机制主要与细胞分化、细胞融合、血管新生等因素有关,而 VEGF 在

血管生成过程中起着非常重要的作用。Wang 等^[9]的研究发现,ST 段抬高急性心肌梗死的病人,血清中 SDF-1 (stromal-derived factor-1)、VEGF (vascular endothelial growth factor) 和 FGF-2 (fibroblast growth factor 2) 均升高。也有研究者认为,骨髓细胞可作为一种支持细胞,分泌血管生长因子,促进宿主内皮细胞和平滑肌细胞增殖分化,增强血管新生和血管生成^[10,11]。VEGF 最初被认为是一种增加血管通透性的细胞因子,此后大量研究发现其有多种生物学活性^[12,13]。其中,VEGF 对促进血管内皮细胞增殖作用具有高度特异性,是迄今为止发现的唯一血管内皮细胞特异性的有丝分裂原^[14]。有研究显示在缺血性心脏病过程中,可刺激侧枝血管形成即所谓的“治疗性血管新生”^[15]。

3.4 作为一项刚刚发展起来的技术,干细胞移植治疗心肌梗死已受到广泛的关注。在本研究中,自体骨髓干细胞通过冠脉内注射的方法移植到心肌生长,在6个月的观察期未看到对再梗死、再灌注的发生率、心源性死亡的发生率有显著性影响,与研究的样本量少、观察时间短有关系。但是,仍然发现有能够改善心肌梗死后患者的心功能、减少心力衰竭的发生的作用。自体骨髓干细胞移植后第7天开始血清 VEGF 水平开始上升,在大约2周时达到高峰,之后逐渐下降,2个月后与对照组无差异。移植到心肌的 MSC 分泌大量血管活性因子,尤其是 VEGF,能够刺激梗死区平滑肌细胞、心肌细胞等的增生,微血管的生长,从而修复坏死的心肌组织,改善心脏功能。目前的动物实验和临床研究结果令人鼓舞,已经证实人类梗死的心肌进行自身成体干细胞移植是切实可行的,但还需更大规模的临床试验研究彻底评估其疗效和安全性。

参考文献

- 1 Deten A, Volz HC, Briest W, et al. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction; experimental studies in rats [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55(2): 329-340.
- 2 Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(8): 875-884.
- 3 Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal cells for cel-

- lular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120(5): 999-1005.
- 4 Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344 (23): 1750-1757.
- 5 Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(1): 5-15.
- 6 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans [J]. *Circulation*, 2002, 106 (15): 1913-1918.
- 7 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: randomised controlled clinical trial [J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 141-148.
- 8 Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiol*, 2004, 94(1): 92-95.
- 9 Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention [J]. *Heart*, 2006, 92(6): 768-774.
- 10 Zhang D, Zhang F, Zhang Y, et al. Erythropoietin enhances the angiogenic potency of autologous bone marrow stromal cells in a rat model of myocardial infarction [J]. *Cardiology*, 2007, 108(4): 228-236.
- 11 Bonaros N, Rauf R, Werner E, et al. Neovascularization after combined transplantation of skeletal myoblasts and angiopoietic progenitors leads to increased cell engraftment and lower apoptosis rates in ischemic heart failure [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2008, 7(2): 249-255.
- 12 Servos S, Zachary I and Martin JF. VEGF modulates NO production; the basis of a cytoprotective effect? [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 41(3): 509-510.
- 13 曼淑梅,张冬平,张丕英,等.脑血管病与 VEGF 关系的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2004, 14(10): 36-39.
- 14 Nishikawa R, Cheng SY, Nagashima R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human brain tumors [J]. *Acta Neuropathol*, 1998, 96(5): 453-462.
- 15 Pearlman JD, Hibberd MG, Chuang ML, et al. Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis [J]. *Nat Med*, 1995, 1(10): 1085-1089.

[收稿日期 2010-02-01][本文编辑 韦挥德 刘京虹]