中国科学 C 辑: 生命科学
2007 年 第 37 卷 第 5 期: 558~561
http://www.scichina.com

《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

经冠脉转染肝细胞生长因子促进猪梗死后心衰模型干细胞动员的研究

杨志健[①*] 王 伟[①] 马东超[①] 张友荣[②] 王连生[①] 张郁青[①]
徐顺霖[①] 陈 波[①] 苗登顺[③] 曹克将[①] 马文珠[①]

(① 南京医科大学第一附属医院心内科, 南京 210029; ② 中国军事医学科学院, 北京 100850;
③ 南京医科大学解剖实验室, 南京 210029)

摘要 观察经冠脉转染腺病毒(adenovirus, Ad_5-)携带人肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)对猪心梗后心衰模型中干细胞动员的作用. 12 只苏中幼猪, 随机分成转染 Ad_5-HGF 组(治疗组)和转染未携带肝细胞生长因子的腺病毒载体组(mock-vector 对照组), 每组 6 只. 结扎前降支制成心肌梗死模型, 手术后四周行冠脉造影时给药, 同时行门控心肌灌注显像评价心肌灌注及心功能情况; 给药三周时, 再次行门控心肌灌注显像, 然后处死动物取心脏组织, 酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测肝细胞生长因子蛋白表达; 免疫组化检测基因转染后梗死心肌中干细胞的动员情况. 经冠脉转染 Ad_5-HGF 后心肌高度表达人 HGF 蛋白; 治疗组心肌组织中 $CD117^+$细胞数明显多于对照组, 并且同时表达c-Met; 治疗组心肌血流灌注及左室射血分数(LVEF)较对照组明显改善. 经冠脉转染 Ad_5-HGF 能使心肌高度表达 HGF 蛋白; HGF 能增加动员至缺血区的 $CD117^+$干细胞, 并且该类细胞表达 c-Met; HGF 改善心功能及心肌灌注的作用不仅仅是血管新生, 可能还涉及到对干细胞的动员召集作用.

关键词 冠脉转染 基因治疗 干细胞 梗死后心衰

在缺血性心脏病的基因治疗中, 肝细胞生长因子因其特有的抗凋亡、抗纤维化、血管生成、抗炎的作用, 受到了较多关注 [1~4]. 近来有研究发现HGF-c-Met系统可能类同于SDF-1-CXCR4, 能诱导前体细胞沿浓度梯度定向迁移至梗死区 [5]. 同时有报道, HGF 在体外能诱导骨髓干细胞分化为心肌细胞 [6,7]. 本研究拟用 5 型复制缺陷病毒携带人HGF, 经冠脉转染至梗死心肌中, 评价其在心肌中的表达情况, 并且观察其对$CD117^+$(c-kit)干细胞的动员及对心功能的改善作用.

我们选择$CD117^+$作为干细胞的标记物, 是因为在先前研究中发现, 心梗后动员的干细胞, 其表面标记物在不同的物种之间有着较大的不同(人类 $CXCR4^+/CD34^+/AC133^+/CD45^-$, 小鼠 $CXCR4^+/Sca\text{-}1^+/lin^-/CD45^-$)[5]. 而$CD117^+$ 的细胞可能包括了上述细胞.

在该研究中, 我们采用了经冠脉转染的方法, 主要考虑如果该方法可行, 将易于在今后的临床实验及实践中实行.

收稿日期: 2007-02-01; 接受日期: 2007-04-28
国家高技术研究发展计划"863"计划(批准号: 2001AA217061)和江苏省"兴卫工程"领军人才基金(苏卫科教[2006]50)资助项目
* 联系人, E-mail: enzhijia@yahoo.com.cn

1　材料和方法

1.1　材料

雄性苏中幼猪 12 只, 体重(30±5) kg(江苏省农业科学院提供), 随机分为治疗组和对照组, 每组 6 只; 开胸手术器械(上海医疗器械一厂); 动物呼吸机(浙江医科大学实验仪器厂); 酶联免疫吸附板(Costar公司); 酶标仪(Bio-Rad公司); ECAM+型单光子发射计算机断层扫描仪(SPECT, 德国Siemens); PD-1200 型心电除颤监护仪(美国Zoll公司); $^{99m}TcO_4$(江苏省原子医学研究所); 人HGF单克隆抗体(R&D公司); 重组人HGF(Peprotech EC公司); Rabbit Anti-c- kit, Rabbit Anti-c-Met, S-P免疫检测试剂盒(北京中山试剂公司). 该研究得到南京医科大学伦理委员会批准; Ad_5-HGF和mock vectors按照本实验室已建立方法制备[8].

1.2　方法

(1) 建立猪心梗模型: 猪全麻插管, 机械辅助呼吸, 心电监护. 胸骨正中切口, 暴露心脏. 静脉推注利多卡因、肝素. 选择前降支远端 1/3 处, 用 0~2 号线缝扎. 术中以支配区心肌色泽变苍白及心电图出现病理性 Q 波、ST 段抬高作为制模成功的标志, 整个过程持续心电监护, 于 7 周后, 处死动物, 取心脏肌肉组织行 ELISA 蛋白检测和免疫组化分析.

(2) 给药方法: 于造模后四周, 行冠脉造影术时, 经前降支注入药物, 注射量分别为 Ad_5-HGF (4×10^9 PFU/mL) 1 mL, null-Ad_5 1 mL, 注药后于血管近端球囊封堵约 1~2 min, 以心电监护未出现 ST 段抬高为监测标准.

(3) 心功能检测: 于造模后四周及七周, 用戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉动物, ^{99m}Tc-MIBI 门控心肌灌注显像评价心肌灌注及心功能变化.

(4) ELISA 法检测 HGF 蛋白表达: 称取各组心肌梗死移行区组织 200 mg, 加入 1 mL 匀浆液于 4℃进行匀浆; 4℃, 12000×g 离心 30 min, 取上清进行 ELISA 检测; 将包被液与匀浆液上清以 1∶1 比例混匀, 加入酶联免疫吸附板各孔, 每孔 100 μL, 4℃过夜; 弃包被液体每孔加入 100 μL(含 5%胎牛血清的 PBS)封闭液, 4℃过夜; PBS-T 洗 3 次, 每次 5min; 分别加入工作浓度的抗人 HGF 单克隆抗体(1 μg/mL), 每孔 100 μL, 37℃孵育 1 h; PBS-T 洗之; 分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1∶1000 稀释), 每孔 100 μL, 37℃孵育 1 h; PBS-T 洗之; 加入新鲜配制的 OPD 底物显色液, 每孔 100 μL, 5~10 min 避光显色后, 用 2N H_2SO_4 终止反应, 测波长 490 nm 处光吸收值; 同时用重组人 HGF 标准蛋白作一标准曲线, 以计算 HGF 的表达量.

(5) 免疫组化检测: 肌肉组织标本经常规甲醛固定、石蜡连续切片后, 分别用 c-Kit, c-Met 抗体组化检测(S-P 法), DAB 染色, 苏木素复染. 光镜下观察结果, 计算机图像分析仪摄像.

(6) $CD117^+$细胞计数: 每张切片计数 5 个富集高倍视野(10×40)$CD117^+$细胞数, 共 6 组, 将每个视野的 $CD117^+$细胞数取平均值, 以 $CD117^+$细胞数/mm^2 表示测得值(400 高倍视野等于 0.152 mm^2).

(7) 统计学方法: 计量资料以 $\bar{x}\pm$SD 表示, 采用 t 检验进行统计学分析, P<0.05 表示差异有显著性, 由 SPSS11.5 软件完成.

2　结果

2.1　ELISA 检测蛋白结果

ELISA 检测蛋白发现, 经冠脉转染 Ad_5-HGF 组与对照组相比, 心肌高度表达人 HGF 蛋白(109.3±7.8 ng/mL vs 6.2±2.6 ng/mL, t = 30.685, P<0.01).

2.2　门控心肌灌注显像检测心功能结果

心功能检查, 治疗组与对照组 4 周时比较, 无统计学差异(t=–0.202, P>0.05). 治疗组 7 周与 4 周比较, LVEF 值有较明显增加(t=–7.934, P<0.05), 治疗组与对照组 7 周时比较, LVEF 亦有明显增加(t=6.514, P<0.01), 见表 1.

表 1　转染 Ad5-HGF 对心功能的影响(n=6, $\bar{x}\pm$SD)

组别	4 周 LVEF(%)	7 周 LVEF(%)
治疗组	32.1±1.7[a)]	43.9±4.3[b)c)]
对照组	32.3±2.0	30.4±2.8

a) P>0.05 治疗组与对照组 4 周时比较; b) P<0.05, 治疗组 7 周与 4 周比较; c) P<0.01, 治疗组与对照组 7 周时比较

2.3　免疫组化 $CD117^+$、c-Met 细胞结果

免疫组化显示经冠脉转染 Ad_5-HGF 组血管周围出现较多$CD117^+$细胞, 其每平方毫米的数量明显高于对照组(56.80±3.6 vs 27.71±1.4, t=22.449, P<0.01)(图 1); 连续切片显示表达 $CD117^+$的细胞同时也表达 c-Met 阳性(图 2).

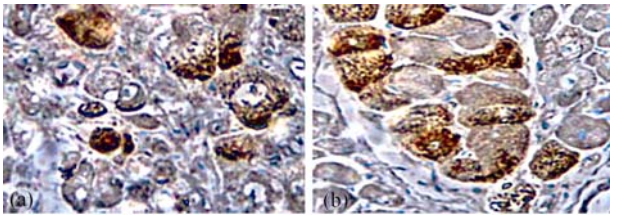

图 1 CD117 抗原的免疫组化检测

(a) 较少的 $CD117^+$ 细胞分布在对照的心肌缺血区; (b) 在 Ad_5-HGF 组, $CD117^+$ 细胞的数目增加并且在缺血部位的血管周围的心肌呈巢式聚集(DAB, 10×40 显微镜放大)

3 讨论

肝细胞生长因子是间充质来源的多能细胞因子, 与受体c-Met 结合并激活该受体的酪氨酸激酶活性后, 可起促进细胞迁移、形态发生、造血、抗纤维化、血管生成、抗凋亡和组织再生等作用 [9~12]. 对肝细胞生长因子改善梗死后心衰和慢性缺血性心肌病的各种动物实验研究方兴未艾[1~4,13~14], 包括在我们先前的研究中发现经冠脉转染肝细胞生长因子能促进猪梗死心肌中侧枝循环的生长和心功能的改善 [15]. 在这些研究中, 认为肝细胞生长因子能发挥有益作用的机制主要为抗凋亡、生血管、抗纤维化、抗炎等. 而在本研究中, 我们第一次探讨了另一种机制: 动员干细胞.

实验结果显示在转染了HGF的猪心肌小血管周围出现较多呈巢状聚集的$CD117^+$细胞, 连续切片免疫组化检测表明它们同时表达c-Met^+阳性. 在对照组也出现散在分布的$CD117^+$细胞, 但没有聚集成巢状的富集区域. $CD117^+$(c-Kit^+)为干细胞标志性抗原之一, 多项研究发现将骨髓来源的$CD117^+$细胞注射到梗死心肌, 均能明显改善心功能, 促进新生血管生长, 甚至可能原位分化为心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞 [16,17]. 我们的重要发现在于: (ⅰ)在对照组梗死 7 周后的心肌组织中仍能发现散在分布的$CD117^+$细胞, 提示自身动员干细胞修复机制并不是只出现于急性心梗后较短的时间段内; (ⅱ) 经冠脉转染HGF组, 较对照组出现较多在小血管周围呈巢状聚集的$CD117^+$细胞, 并且该类细胞同时表达c-Met (HGF受体), 就我们所知, 这是第一次在动物心梗模型体内中证实了HGF对干细胞的动员作用.

在缺血性心脏病基因治疗中, 关于 HGF 抗凋亡、抗纤维化、促血管生成的作用已有较多研究, 而其对干细胞作用的研究刚刚兴起. 有多个研究发现 HGF 对间充质干细胞的增殖、迁移和分化均有影响, 延长

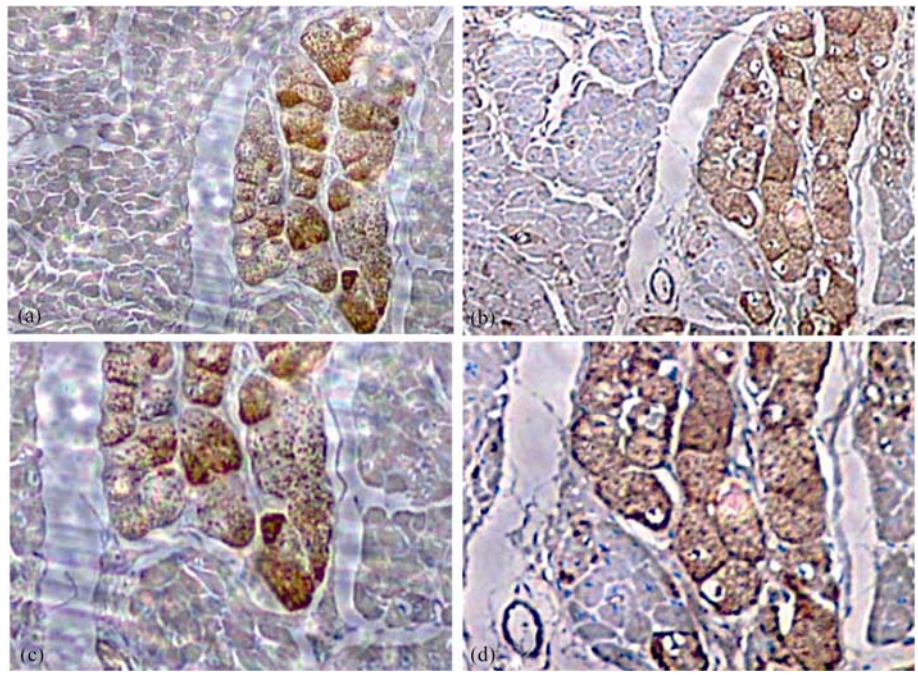

图 2 连续切片中 CD117 与 c-Met 共同表达的免疫组化检测

(a), (b) $CD117^+$细胞, DAB 染色; (a) 10×20 显微镜放大; (b) 10×40 显微镜放大. (c), (d) c-Met^+细胞, DAB 染色; (c) 10×20 显微镜放大; (d) 10×40 显微镜放大

HGF对间充质干细胞处置时间, 甚至能诱导间充质干细胞分化并表达心肌细胞特异标志物(GATA-4, MEF2C, TEF1, desmin, alpha MHC, beta MHC, nestin)的细胞[6, 7, 18]. Kucia等人[5]在小鼠出生后骨髓中发现存在表达早期心肌谱系标记物细胞的游动库(Nkx2.5/Csx, GATA-4, MEF2C), 这些细胞能在心梗后动员到外周血中, 并在体外能依赖SDF-1-CXCR4, HGF-c-Met, 和LIF-LIF-R作用, 诱导定向至梗死心肌组织匀浆中; Beltrami等人[19]的研究中发现心脏中可能存在$Lin^{-}CD117^{+}$的干细胞, 其有着自我更新及多能分化的能力, 当把此类细胞注射到缺血心肌中, 分化成了具有心肌特性的细胞. 基于上述发现, 本实验已经观察到HGF在体内对$CD117^{+}$干细胞的动员及对心功能的改善作用, 但我们没有探讨$CD117^{+}$干细胞的来源问题(骨髓或心脏原位).

我们观察到 c-Met 作为 HGF 特异性受体, 同时在 $CD117^{+}$细胞中表达, 而且治疗组相比于对照组更显著地出现 $CD117^{+}$细胞聚集, 均表明了 HGF 在猪心梗模型中切实起到了动员干细胞的作用. 心功能和心肌灌注的改善可能主要在于 HGF 抗凋亡、抗纤维化、促血管生成的作用, 但我们认为其动员干细胞的作用也肯定发挥了一定效应, 并且可能参与到上述的有益作用中.

经本研究, 我们发现经冠脉转染 Ad_5-HGF 能促进 $CD117^{+}$干细胞动员及改善猪心肌梗死后心功能. 下一步实验需要观察这部分由 HGF 动员的干细胞的最终转归是否类同于体外实验, 能否在 HGF 及“环境依赖”作用诱导下分化为心肌细胞.

参　考　文　献

1 Vasant J Y, Joseph W, Pirolli T J, et al. Induction of angiogenesis and inhibition of apoptosis by hepatocyte growth factor effectively treats postischemic heart failure. J Card Surg, 2005, 20: 93—101[DOI]

2 Azuma J, Taniyama Y, Takeya Y, et al. Angiogenic and antifibrotic actions of hepatocyte growth factor improve cardiac dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy. Gene Ther, 2006, 20, [Epub ahead of print]

3 Li Y, Takemura G, Kosai K I, et al. Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. Circulation, 2003, 107: 2499—2506[DOI]

4 Ahmet I, Sawa Y, Yamaguchi T. Gene transfer of hepatocyte growth factor improves angiogenesis and function of chronic ischemic myocardium in canine heart. Ann Thorac Surg, 2003, 75: 1283—1287[DOI]

5 Kucia M, Dawn B, Hunt G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. Circ Res, 2004, 95: 1191—1199. [DOI]

6 方天翎, 闵 军, 邓小耿, 等. 肝细胞生长因子诱异骨髓间质干细胞分化为心肌细胞. 中国病理生理杂志, 2004, 20: 1167—1170

7 Forte G, Minieri M, Cossa P, et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration and differentiation. Stem Cells, 2006, 24: 23—33 [DOI]

8 Duan H F, Wu C T, Wu D L, et al. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. Mol Ther, 2003, 8: 467—474. [DOI]

9 Comoglio P. Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells. In: Goldberg I D, Rosen E M, eds. Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor (HGFSF) and the C-met Receptor, Basel, Switzerland: Birkauser-Verlag, 1993: 131—165

10 Matssumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239: 639—644[DOI]

11 Boros P, Miller C M. Hepatocyte growth factor: A multifunctional cytokine. Lancet, 1995, 345: 293—295[DOI]

12 Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. Kidney Int, 2001, 59: 2023—2038

13 Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, et al. Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: Induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. Circulation, 2004, 110: 1650—1657[DOI]

14 Shirakawa Y, Sawa Y, Takewa Y, et al. Gene transfection with human hepatocyte growth factor complementary DNA plasmids attenuates cardiac remodeling after acute myocardial infarction in goat hearts implanted with ventricular assist devices. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130: 624—632[DOI]

15 Wang W, Yang Z J, Ma D C, et al. Induction of collateral artery growth and improvement of post-infarct heart function by hepatocyte growth factor gene transfer. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27: 555—560[DOI]

16 Kocher A A, Schuster M D, Szabolcs M J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone- marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nature Medicine, 2001, 7: 430—436[DOI]

17 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infracted myocardium. Nature, 2001, 410: 701—705[DOI]

18 Neuss S, Becher E, Woltje M, et al. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. Stem Cells, 2004, 22: 405—414[DOI]

19 Beltrami A P, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell, 2003, 114: 763—776[DOI]