

## · 基础研究 ·

## 曲美他嗪联合骨髓间质干细胞移植治疗急性心肌梗死的实验研究\*

朱刚艳<sup>1</sup>, 徐红新<sup>2</sup>, 田毅浩<sup>3</sup>, 马红梅<sup>1</sup>, 唐世琪<sup>1</sup>, 汪福良<sup>1</sup>, 邬松林<sup>1</sup>

(武汉大学人民医院: 1. 老年病科; 2. 心内科, 武汉 430060; 3. 武汉大学基础医学院解剖教研室, 武汉 430071)

**摘要:**目的 探讨曲美他嗪(TMZ)能否改善骨髓间质干细胞(MSCs)在体外缺氧模型及急性心肌梗死(AMI)大鼠心脏的存活。方法 加入或未加入 TMZ 的 MSCs 在无血清培养基培养并缺氧暴露 12 h, 采用透射电子显微镜和流式细胞仪检查第 3 代 MSCs 的活力和凋亡。30 只 Wistar 大鼠随机分为 AMI 对照组、MSCs 组及(MSCs+TMZ)组, 结扎左冠状动脉前降支制备 AMI 模型。将 MSCs 注入梗死心肌边缘[(MSCs 组和(MSCs+TMZ)组)]。(MSCs+TMZ)组的大鼠在 AMI 前 3 d 开始至 AMI 后 28 d 加喂 TMZ。移植 28 d 后, 超声心动图评估心脏结构和功能。免疫荧光染色检测移植细胞在体内的存活和分化。TUNEL 法检测细胞凋亡。收集 TMZ 治疗开始前和 AMI 后 24、48 h 的血液样本, 测量 C 反应蛋白(CRP)与肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的变化。结果 缺氧培养下, TMZ 处理过的 MSCs 细胞凋亡降低了一半。在体内与 AMI 对照组相比, MSCs 组和(MSCs+TMZ)组的心肌梗死面积显著缩小, 心功能明显改善。与单纯 MSCs 移植相比, TMZ 与 MSCs 移植的组合治疗表现出了更低的干细胞凋亡、更高的干细胞存活、更小的心肌梗死面积和进一步改善的心功能。各组之间 CRP、TNF- $\alpha$  的基线水平并无显著差异, 然而 24 h 时(MSCs+TMZ)组的所有参数均低于 MSCs 组。结论 MSCs 移植添加 TMZ 治疗 AMI 增加 MSCs 存活和心脏功能的恢复上优于单纯 MSCs 移植, 抑制炎症因子表达可能是其机制之一。

**关键词:** 曲美他嗪; 骨髓间质干细胞; 移植; 心肌梗死

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)11-1096-04

The experimental research on the treatment of acute myocardial infarction by trimetazidine and bone marrow mesenchymal stem cells transplantation\*

Zhu Gangyan<sup>1</sup>, Xu Hongxin<sup>2</sup>, Tian Yihao<sup>3</sup>, Ma Hongmei<sup>1</sup>, Tang Shiqi<sup>1</sup>, Wang Fuliang<sup>1</sup>, Wu Songlin<sup>1</sup>

(1. Department of Geriatrics; 2. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

3. Department of Anatomy, Basal Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of trimetazidine (TMZ) on the survival of mesenchymal stem cells (MSCs) in an ex-vitro model of hypoxia and subsequent activities of transplanted MSCs in rat hearts with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** MSCs were cultured in serum-free medium and exposed to hypoxia for 12h with or without TMZ. The viability and apoptosis of MSCs at passage 3 were examined by transmission electron microscope. Thirty wistar rats were divided randomly into 3 groups, including AMI control group, MSCs transplantation group, and TMZ+MSCs group. MSCs were injected into peri-infarct myocardium (MSCs and TMZ+MSCs groups) thirty minutes after coronary artery ligation. The rats in TMZ+MSCs group were additionally fed TMZ from 3 days before AMI to 28 days after AMI. Cardiac structure and function were assessed by echocardiography 28 days after transplantation. The survival and differentiation of transplanted cells were detected by immunofluorescent staining. The cellular apoptosis in the peri-infarct region was detected with TUNEL assay. Blood samples were collected before the start of TMZ therapy and 24h, 48h after AMI, and inflammatory cytokines (CRP, TNF- $\alpha$ ) were measured. **Results** In hypoxic culture, the TMZ-treated MSCs displayed a two-fold decrease in apoptosis under serum-free medium and hypoxia environment. In vivo, cardiac infarct size was significantly smaller, cardiac function significantly improved in the MSCs and TMZ+MSCs groups than those in the control group. Combined treatment with TMZ and MSCs implantation demonstrated a further decrease in MSCs apoptosis, a further increase in MSCs viability, a further decrease in infarct size, and a further improvement in cardiac function, compared with those of MSCs group. The baseline levels of inflammatory cytokines (CRP, TNF- $\alpha$ ) were not significantly different among the groups. However, all parameters at 24h were lower in TMZ+MSCs group than those in MSCs group. **Conclusion** Implantation of MSCs combined with TMZ treatment is superior to MSCs monotherapy for MSCs viability and cardiac function recovery. The inhibition of inflammatory cytokines expression may be the potential mechanism.

**Key words:** trimetazidine; bone marrow mesenchymal stem cells; transplantation; myocardial infarction

研究表明, 心肌梗死导致不可逆的心肌损伤和心功能障碍。梗死区残存的心肌细胞逐渐被纤维取代, 形成瘢痕组织。过去几十年来, 缺血性心脏病的治疗已经取得了长足的进步。然而, 尽管应用“最佳”的治疗, 许多患者的症状依然得不到缓解。此外, 大量的患者不适合进行冠状动脉血运重建。所幸的是, 最近的实验结果表明了使用成人骨髓间质干细胞(MSCs)再生受损心肌的可能性。尽管 MSCs 在这种细胞治疗中代表

了自体细胞的合适来源, 但由于细胞移植后存活率低, MSCs 治疗受到限制<sup>[1]</sup>。最近, 有几项研究试图通过体外扩增和(或)体内基因工程来改善 MSCs 的存活率。

曲美他嗪[1-(2,3,4-三甲苯基)哌嗪二氢盐酸盐, TMZ]对缺血心脏有细胞保护作用。在缺血时, TMZ 选择性抑制脂肪酸  $\beta$ -氧化酶, 诱导“代谢转变”从脂肪酸  $\beta$ -氧化到葡萄糖有氧化, 并能维持细胞内 ATP 水平。TMZ 还限制了活性氧组分

诱导的膜损伤,并且它的抗氧化作用保护组织免受自由基损伤。活性氧和一氧化氮介导的损伤会增加如 C 反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 和白细胞介素-8 之类的炎症介质在炎症和缺血时从巨噬细胞的释放。此外, TMZ 限制细胞内酸中毒以及无机磷酸盐、 $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  在心脏组织中的积聚。这些变化与氧的供需改变无关。因此,作者提出应用 TMZ 通过改善梗死区和梗死周围区的微环境,提高移植 MSCs 的存活率,从而改善心肌梗死和晚期心衰的治疗。本研究探讨 TMZ 能否提高 MSCs 在体外缺氧培养中与在 AMI 大鼠模型体内的存活,并讨论其机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 实验材料与主要设备** 膜联蛋白 V/PI 染色试剂盒购自美国 BioVision 公司,抗肌钙蛋白 T 单克隆抗体购自美国 Maxim 制药公司,抗 VIII 因子相关抗原单克隆抗体、二抗与 Cy3 购自美国 Santa Cruz 生物技术公司, TUNEL 试剂盒购自香港罗氏诊断有限公司, TMZ 为法国施维雅公司产品,流式细胞仪为美国 Becton-Dickinson 公司产品,比浊法测定 CRP 的 N Latex CRP mono 为德国贝林诊断公司产品, ELISA 试剂盒购自美国 Biosource 公司,超声心动图检测采用美国 Acuson 公司 sequia 512 型彩色多普勒超声仪。

**1.2 MSCs 准备** MSCs 从大鼠的股骨和胫骨中分离<sup>[2]</sup>。用 10 mL DMEM 培养液反复冲洗 4 周龄雄性 Wistar 大鼠(约 100 g)的股骨与胫骨,收集来源于骨髓的 MSCs。加入 Percoll 离心液,离心后收集分离液界面上的单个核细胞,洗涤 2 次,重悬于 20% FBS-DMEM 培养液(DMEM 中补充了 20% 胎牛血清和 1% 的抗生素—青霉素和链霉素溶液),并使之以  $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$  铺布在培养瓶中。培养基置于 37 °C 含 5% 二氧化碳的潮湿环境中。48 h 或 72 h 后,丢弃未贴壁细胞,贴壁细胞用 PBS 彻底清洗 2 次。在随后 10 d 里,每 3 天或每 4 天添加和更换新鲜的完全培养基。然后,在 37 °C 用 0.25% 胰蛋白酶和 1 mmol/L EDTA 消化 5 min,收获细胞,并重新铺布在 25  $\text{cm}^2$  的培养皿上,培养 3 d。对第 3 代的 MSCs 进行测试。为了造成缺氧条件,细胞在含或不含 TMZ( $5 \times 10^{-4}$  mol/L)的除氧无血清 DMEM 中于厌氧箱孵育 12 h。

**1.3 炎性细胞因子的测量** 分别在 TMZ 治疗开始前(基线), AMI 后 24、48 h,通过尾静脉采集血样,分离血清, -70 °C 保存直到分析。CRP 通过使用 1:400 稀释样品采用颗粒增强免疫比浊法测定。按照说明书使用 ELISA 试剂盒检测 TNF- $\alpha$ ,用酶标仪检测 450 nm 黄色到蓝色的光强度。

**1.4 透射电子显微镜观察细胞凋亡的形态学特征** 清洗细胞并在含 2% 戊二醛的 0.2 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液中 4 °C 过夜固定,梯度脱水,树脂包埋,并超薄切片。切片用醋酸铀和柠檬酸铅染色,并用透射电子显微镜观察。

**1.5 Annexin V/PI 染色和流式细胞仪凋亡分析** 采用 FITC 标记的膜联蛋白 V/碘化法通过流式细胞仪分析细胞凋亡。

**1.6 MSCs 标记** 在移植当天将无菌的 DAPI 溶液加入到培养基中 30 min,其终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将细胞用 PBS 洗涤 6 次,去除未结合的 DAPI,用 0.25% (W/V) 的胰蛋白酶分离并悬浮在无血清培养基中(浓度  $4 \times 10^7 / 100 \mu\text{L}$ )。

**1.7 AMI 造模,实验分组和 MSCs 移植** 采用 8 周龄雄性 Wistar 大鼠(约 250 g)。研究参考美国国立卫生研究院出版的实验动物饲养使用指南,并经武汉大学实验动物使用管理委员会批准。3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg i. p.)麻醉后,大鼠气管插管,维持正压通气(180 mL/min)并通过 Harvard 呼吸器以室内空气补充氧(2 L/min)。正中左侧外 2 cm 处开胸暴露大鼠

心脏。左冠状动脉前降支通过 5-0 丝线缝合结扎,缝合胸部切口。30 只大鼠随机分为以下 3 个组,每组 10 只:AMI 对照组、MSCs 组和(TMZ+MSCs)组。(TMZ+MSCs)组大鼠于 AMI 3 d 前开始至 AMI 后 28 d 加喂 TMZ,剂量  $2.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。其他动物每天分别喂等量生理盐水。

**1.8 超声心动图测量结构和功能** 使用 Acuson sequia 512 型彩色多普勒超声心动图仪(7v3 探头频率为 3~7 MHz)测量手术前和 AMI 后 28 d 大鼠的超声心动图。前胸部剃毛,记录二维和 M 型图像。

**1.9 组织收集和梗死面积计算** 检测超声心动图后,在心脏舒张期注射 10 mL 停搏液使之停跳。从胸腔取出心脏,从心尖到底部分离左心室并切片,用含 20% 蔗糖的 PBS 溶液保护后包埋。切片厚 8 mm,置于明胶涂层玻片上。将这些切片进行 HE 染色、Masson 三色染色并拍照。通过图像分析软件计算梗死大小(%),为梗死壁的面积与整个左心室面积的比值。

**1.10 免疫荧光分析** 心脏沿短轴切成为 1 mm 的横切块。每组分别随机从梗死区和梗死边缘区选两张切片。每张切片随机选取 5 处观察并利用荧光显微镜对 DAPI 标记细胞计数。比较各组移植 MSCs 的存活数。连续切片分别使用抗肌钙蛋白 T 单克隆抗体、抗 VIII 因子相关抗原单克隆抗体进行染色。二抗与 Cy3 结合进行检测。

**1.11 脱氧核苷转移酶介导 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL 法)** 切片置于多聚-L-赖氨酸玻片上。脱蜡并水化后,在 21~37 °C 下,蛋白酶 K(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,溶于 10 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 7.6)中孵育组织切片 30 min。切片用 PBS 漂洗 2 次,并与封闭液(0.3% 过氧化氢的甲醇溶液)在室温下孵育 1 h。采用 TUNEL 法检测 DNA 链断裂。细胞凋亡指数(TUNEL 阳性细胞占细胞总数的百分比)至少计算 3 张玻片 27 个视野。由两名非实验相关人员单独进行评估。

**1.12 统计学处理** 所有数据表示为  $\bar{x} \pm s$ 。组间差异采用方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 TMZ 在体外对 MSCs 存活和凋亡的影响** 在透射电子显微镜下,缺氧或血清剥夺诱导 MSCs 逐步缩小,细胞间隙加宽伴微绒毛损伤,线粒体肿胀,粗面内质网扩张,染色质浓缩,随时间延长发生核收缩和核碎裂,见插 II 图 1。利用膜联蛋白 V/PI 染色和流式细胞仪检测定量分析表明,部分 MSCs 在缺氧和血清剥夺环境下出现凋亡和坏死。缺氧 12 h 后,早期凋亡细胞(膜联蛋白 V+/PI-)的比例由 42.64% 大幅下降至 21.7%;同无 TMZ/缺氧和血清剥夺组相比,在有 TMZ/缺氧和血清剥夺组,晚期凋亡细胞的比例(膜联蛋白 V+/PI+)由 6.74% 大幅减低至 2.44%,见插 II 图 2。

**2.2 TMZ 和(或)MSCs 对 AMI 后左室重构和左室功能的影响** 从解剖学上看,心肌修复使左心室游离壁厚度增加了 39%、45%;MSCs 组、(MSCs+TMZ)组与 AMI 对照组相比,透壁梗死面积分别缩小 18% 和 27%。超声心动图研究显示 MSCs 组与(MSCs+TMZ)组的左室舒张末期内径(LVEDD)和左室舒张末期容积(LVEDV)显著小于对照组。AMI 对照组、MSCs 组与(MSCs+TMZ)组的左室舒张末期内径平均值分别为(0.82 $\pm$ 0.05)cm、(0.64 $\pm$ 0.06)cm、(0.51 $\pm$ 0.04)cm。MSCs 组与(MSCs+TMZ)组相对于 AMI 对照组,左室舒张末期容积分别下降了 28% 和 40%。此外, MSCs 组、(MSCs+TMZ)组射血分数分别为(48 $\pm$ 7)%、(59 $\pm$ 6)%,相对于 AMI 对照组(35 $\pm$ 6)%有所提高( $P < 0.05$ )。值得注意的是,在改

表 1 各时间段 CRP、TNF- $\alpha$  的水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	基础值		24 h		48 h	
	CRP(mg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	CRP(mg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	CRP(mg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
AMI 对照组	14.5 $\pm$ 3.2	9.5 $\pm$ 5.2	42.7 $\pm$ 9.3*	28.5 $\pm$ 9.1*	19.5 $\pm$ 3.4	10.1 $\pm$ 5.4
MSCs 组	14.9 $\pm$ 2.4	9.7 $\pm$ 6.8	43.6 $\pm$ 9.8*	27.6 $\pm$ 9.7*	18.7 $\pm$ 2.6	9.8 $\pm$ 5.6
(MSCs+TMZ)组	15.4 $\pm$ 4.5	9.2 $\pm$ 6.3	28.9 $\pm$ 8.7*#	18.9 $\pm$ 8.6*#	16.5 $\pm$ 2.7	9.5 $\pm$ 5.8

\*:  $P < 0.05$ , 与基础值比较; #:  $P < 0.05$ , 与 MSCs 组比较。

善 AMI 后的左室功能方面, (MSCs+TMZ) 组要优于 MSCs 组。

**2.3** TMZ 对 CRP、TNF- $\alpha$  的作用 CRP 和 TNF- $\alpha$  的生化数据见表 1。各组间基础值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与此相反, 心肌梗死 24 h 后 (MSCs+TMZ) 组的所有参数均显著低于 MSCs 组 ( $P < 0.05$ )。

**2.4** 移植 MSCs 存活数 植入梗死心肌的 MSCs 存活数目, (MSCs+TMZ) 组多于 MSCs 组 [(198.3 $\pm$ 20.7) : (69.2 $\pm$ 17.8)],  $P < 0.01$ 。

**2.5** 梗死面积和免疫荧光分析 AMI 对照组、MSCs 组与 (MSCs+TMZ) 组的梗死面积分别为 (28 $\pm$ 2)%、(21 $\pm$ 1)% 和 (15 $\pm$ 1)%。统计分析显示, 与 AMI 对照组相比, MSCs 组、(MSCs+TMZ) 组的心肌梗死面积显著缩小 ( $P < 0.05$ )。 (MSCs+TMZ) 组的心肌梗死面积比 MSCs 组进一步缩小 ( $P < 0.05$ )。细胞移植后 28 d, 宿主心肌中可发现 DAPI 标记的细胞, 见插 II 图 3。免疫荧光证实了移植细胞的数量和表型。大部分 DAPI 标记的细胞肌钙蛋白 T 染色阳性, 表明 MSCs 已经分化成为心肌样细胞。DAPI 标记肌钙蛋白 T 阳性的供体细胞与未标记的心肌细胞平行排列于宿主心肌内。 (MSCs+TMZ) 组中 MSCs 源性的心肌细胞比例为 (62 $\pm$ 7)%, 显著高于 MSCs 组 (47 $\pm$ 5)%。此外, 少量 DAPI 标记的细胞第 VII 因子相关抗原染色阳性, 表明有微血管的形成。 (MSCs+TMZ) 组中 MSCs 源性微血管的比例为 (28.5 $\pm$ 4.1)%, 明显高于 MSCs 组 (9.3 $\pm$ 2.7)%。

**2.6** TMZ 对体内细胞凋亡的作用 AMI 对照组和治疗组的缺血区域通过 TUNEL 法发现大量的凋亡细胞。棕色标记的为凋亡细胞的细胞核。MSCs 组的凋亡细胞数量显著高于 (MSCs+TMZ) 组 [(52% $\pm$ 7%) : (38% $\pm$ 3%)],  $P < 0.05$ 。 TMZ 治疗显著降低了凋亡指数 ( $P < 0.05$ ), 见封 3 图 4。

### 3 讨论

人们设想植入成人 MSCs 以治疗心肌梗死的后左室功能不全。然而, AMI 早期复杂的病理变化, 如局部缺血、氧化应激、炎症反应、神经内分泌功能的活化和细胞凋亡等, 不利于移植后 MSCs 的存活和发挥功能。因此, 移植入心肌后 MSCs 有限的存活限制了其再生能力。主要有两种方法来解决这个问题。(1) 是通过热休克、Akt、Bcl-2、成纤维细胞生长因子-2、低氧调节血红素氧合酶-1、亚精胺多糖肾上腺素分化髓质素基因转染等方法<sup>[3-8]</sup>, 对 MSCs 进行移植前的预处理, 增加 MSCs 对缺血、炎症或其他病理反应的耐受性, 从而提高移植后细胞存活率。然而, 预处理的干细胞只能用于实验性研究, 目前不能应用于临床。(2) 是改善移植环境, 使其有利于移植 MSCs 的存活。研究表明 TMZ 对缺血性心肌有细胞保护作用。在缺血时, TMZ 通过诱导“代谢转移”从脂肪酸  $\beta$ -氧化到葡萄糖有氧化, 维持细胞内三磷酸腺苷 (ATP) 水平, 减轻细胞内的酸中毒, 减少心肌组织中无机磷酸盐、Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 的蓄积, 限制活性氧诱导的膜损伤, 保护组织免受自由基的氧化损伤。因此, 设想 TMZ 可能改善 AMI 后的缺血环境, 对移植后 MSCs 的存活、梗死面积的限制、心肌结构和功能的恢复发挥有益作用。本研究中, 在类似于缺血的缺氧和无血清环境下, 评估 MSCs 的存活和凋亡。通过结扎大鼠冠状动脉左前降支制备

AMI 模型, 应用心肌内注射方法移植入 MSCs 和 TMZ, 评估 MSCs 的存活、血管再生与功能恢复。

研究显示在 AMI 对照组和治疗组的缺血区域都可以观察到凋亡细胞 (来自 MSCs 和心肌细胞)。AMI 组 TUNEL 阳性细胞核占所有心肌细胞核总数的比例显著高于治疗组。用 TMZ 治疗 4 周可以显著降低此比例。因此, 与 MSCs 组相比, (MSCs+TMZ) 组植入 AMI 后心肌的 MSCs 存活提高, 生成更多具有心肌细胞特征的细胞。本研究明确 TMZ 可以改善 MSCs 的存活, 抑制体外缺氧、无血清环境下的凋亡, 同时具有刺激血管形成的作用。

AMI 导致显著的左室扩张和室壁变薄。TMZ 给药和 (或) 干细胞移植能部分减轻左室扩张和室壁变薄。干细胞移植和 TMZ 联合治疗能进一步改善左室状况。与 AMI 对照组相比, MSCs 组、(MSCs+TMZ) 组的心肌梗死面积显著缩小, (MSCs+TMZ) 组的心肌梗死面积比 MSCs 组进一步缩小。这些发现与之前的研究结果一致<sup>[9-10]</sup>。在实验研究中, Nobel 等<sup>[9]</sup> 发现用 TMZ 对血液灌流的兔心脏进行预处理, 可以有效缩小心肌梗死面积。另一临床研究发现<sup>[10]</sup>, TMZ 可能减轻进行溶栓治疗的前壁 AMI 患者的再灌注损伤、缩小梗死面积, 并改善 AMI 后的心室重塑。

AMI 常常伴随强烈的免疫炎症反应, 单核巨噬细胞和中性粒细胞迁移聚集至梗死部位, 一方面吞噬坏死组织, 促进梗死部位的修复愈合; 另一方面表达大量的炎症因子, 如 CRP、TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\beta$ 、白细胞介素-6 等, 直接损伤存活的心肌细胞<sup>[11-12]</sup>。非梗死区心肌细胞炎症因子表达也将增加, 同时还将激活自体免疫炎症反应, 进一步损伤心肌, 推动心室重构的发生和发展。近年研究表明, MSCs 具有免疫炎症调节作用<sup>[13]</sup>, 移植到体内后可以调节受体免疫炎症反应, 延缓心肌梗死后心室重塑<sup>[14]</sup>。研究发现<sup>[15]</sup>, 缺血头 24 h 内 CRP 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子水平的增加与心肌细胞死亡有关。同样的, 在本研究中, CRP 和 TNF- $\alpha$  的水平在 24 h 时增加, 48 h 时减少; 心肌梗死 24 h 后 (MSCs+TMZ) 组的炎症因子水平显著低于 AMI 对照组与 MSCs 组。TMZ 显著降低了 CRP 和 TNF- $\alpha$  的水平。因此, 作者推测 TMZ 通过抗炎作用改善心肌细胞存活与心肌功能。

总之, 研究显示, (MSCs+TMZ) 组 MSCs 在体外缺氧条件下及 AMI 模型大鼠体内存活率更高。此外, 移植到缺血区域的 MSCs 存活后可以表达心肌特异性标志物, 促进血管新生。抑制炎症因子的表达可能为其机制之一。TMZ 可能是有效改善 MSCs 存活、抑制心肌缺血性损伤后细胞凋亡的药物, 因此 MSCs 移植联合 TMZ 可能成为治疗心肌梗死和晚期心衰的新方法, 适合 MSCs 移植的 AMI 患者有望延长寿命。

### 参考文献:

- [1] Song H, Kwon K, Lim S, et al. Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions[J]. Mol Cells, 2005, 19(3): 402-407.
- [2] Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal

cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120(5):999-1005.

- [3] Jiang S, Haider HKh, Idris NM, et al. Supportive interaction between cell survival signaling and angiocompetent factors enhances donor cell survival and promotes angiomyogenesis for cardiac repair[J]. *Circ Res*, 2006, 99(7):776-784.
- [4] Li W, Ma N, Ong LL, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(8):2118-2127.
- [5] Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, et al. Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2):H1095-H1104.
- [6] Song H, Kwon K, Lim S, et al. Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions[J]. *Mol Cells*, 2005, 19(3):402-407.
- [7] Tang YL, Tang Y, Zhang YC, et al. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(7):1339-1350.
- [8] Jun-Ichiro J, Nagaya N, Yoshinori M, et al. Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: Benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran[J].

*Tissue Eng*, 2007, 13(2):313-322.

- [9] Noble MI, Belcher PR, Drake-Holland AJ. Limitation of infarct size by trimetazidine in the rabbit[J]. *Am J Cardiol*, 1995, 76(6):41B-44B.
- [10] Di Pasquale P, Lo Verso P, Bucca V, et al. Effects of trimetazidine administration before thrombolysis in patients with anterior myocardial infarction: short-term and long-term results[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1999, 13(5):423-428.
- [11] 乔建晶, 李树仁. 骨髓间充质干细胞移植调节心肌梗死后炎症反应的研究现状[J]. *心血管病学进展*, 2010, 31(5):729-732.
- [12] Liao YH, Cheng X. Autoimmunity in myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2006, 112(1):21-26.
- [13] Du YY, Zhou SH, Zhou T, et al. Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction[J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(5):469-478.
- [14] Stagg J, Galipeau J. Immune plasticity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, 20(180):45-66.
- [15] Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, et al. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury[J]. *Int J Cardiol*, 2002, 86(1):41-59.

(收稿日期:2011-11-29 修回日期:2012-01-07)

(上接第 1095 页)

其防止神经细胞凋亡的效果越好。

综上所述,早期大剂量应用纳洛酮治疗弥漫性轴索损伤,可促进患者神经功能恢复及改善预后,同时无明显药物不良反应发生,具有较好的安全性,值得临床推广应用。但由于本研究样本量较小,有关其更可靠的疗效及禁忌证尚有待今后更大样本量的研究加以探讨。

#### 参考文献:

- [1] 段志新,王洪财,吴芳芳,等.大鼠弥漫性轴索损伤后 $\beta$ -淀粉样前体蛋白表达的动态变化[J].*神经损伤与功能重建*, 2009, 4(6):391-393.
- [2] Blumberg PC, Scott G, Manavis J, et al. Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury[J]. *Lancet*, 1994, 344(8929):1055-1060.
- [3] 刘洪恩,孙晓川.  $\beta$ 淀粉样前体蛋白与弥漫性轴索损伤[J]. *创伤外科杂志*, 2005, 7(1):73-75.
- [4] Dan W, Tang WY, Liu FY, et al. The fluctuation of absolute power values of electroencephalogram for evaluation the efficacy of different dose of naloxone in brain injury[J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2005, 9(13):192-195.
- [5] 庄仲伟,费智敏,王勇,等. 弥漫性轴索损伤的诊断与治疗[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2008, 13(5):296-297.
- [6] 江基尧. 弥漫性轴突损伤的概念和病理机制[J]. *中华神经外科杂志*, 2006, 22(11):645-647.
- [7] 江基尧,朱诚. 现代颅脑损伤学[M]. 上海:第二军医大学

出版社, 1999:197-222.

- [8] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京:科学出版社, 1999:881-885.
- [9] Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for betar amyloid precursor protein[J]. *Acta Neuropathol(Berl)*, 1994, 87(1):55-60.
- [10] 潘隆盛,许百男,周定标,等. 大鼠弥漫性轴突损伤早期淀粉样前体蛋白( $\beta$ -APP)表达的实验研究[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(9):899-900.
- [11] 蔡韬,廖达光. 弥漫性轴索损伤的临床诊治分析[J]. *中国现代医生*, 2008, 46(13):49-51.
- [12] 罗良生,李英斌,张健,等. 弥漫性轴索损伤的影像与临床分析[J]. *临床神经外科杂志*, 2008, 5(3):131-132.
- [13] 李建初,袁光华,柳之仪,等. 血管和浅表器官彩色多普勒超声诊断学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999:82.
- [14] 关国梁,黄志雄,林启明,等. 拉罗通对颅脑外伤患者神经功能的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(4):470-471.
- [15] 罗晓阳,章翔,王嘉军,等. 纳洛酮对脑挫裂伤大鼠血浆及海马中内皮素、肿瘤坏死因子和降钙素基因相关肽含量的影响[J]. *中国急救医学*, 1997, 9(2):1650-1652.

(收稿日期:2011-11-18 修回日期:2011-12-17)