



本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：


日期：2010年4月29日

学位论文使用授权声明

本人完全了解中山大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆、院系资料室被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，可以采用复印、缩印或其他方法保存学位论文。

学位论文作者签名：

日期：2010年4月29日

导师签名：

日期：2010年4月29日



心肌干细胞移植对大鼠心肌梗死心电生理影响的研究

专业：内科学（心血管病专业）

博士研究生：郑韶欣

导师：伍卫 教授

中山大学孙逸仙纪念医院

中文摘要

心肌梗死是严重威胁人类健康的疾病之一。心肌梗死导致死亡的原因主要是：心力衰竭和恶性室性心律失常。治疗心肌梗死的主流手段包括：介入治疗，药物治疗和器械治疗。然而心肌梗死死亡率仍较高，有需要寻找新的治疗方法。

随着生物工程学的发展，干细胞（stem cell）替代治疗被认为是一个有前景的治疗方向。现阶段用于治疗心血管疾病的干细胞种类有：骨髓间质干细胞（mesenchymal stem cells, MSCs）、胚胎干细胞（embryonic stem cells, ESCs）、成肌细胞（myoblast）和心肌干细胞（cardiac stem cells, CSCs）等。

在研究中，以上干细胞移植用于治疗心肌梗死均显示良好的效果。然而，干细胞移植后的致心律失常问题引起学者们的关注。基础研究显示：1) MSCs 在体外诱导剂诱导分化为心肌样细胞后， I_{K1} 表达呈明显的不均一性， I_{K1} 电流密度总体上低于正常心室肌细胞，提示有致心律失常可能。2) ESCs 在体外诱导分化为心肌细胞后，能够表现出自发性电活动、延长的动作电位时程和较低的 dV/dt 。3) 成肌细胞移植后不能与宿主心肌细胞实现电耦联，最终肌管的收缩完全独立于宿主心肌细胞。由此可见，干细胞存在致心律失常可能，所以需要寻找一种新的更优越的移植用种子细胞。

既往观点认为，出生后心肌细胞即向终末分化，不能够增殖。然而，Messina 从人和小鼠心脏内成功地分离和培养出 CSCs 改变了这一观点。CSCs 的成功分离和体外培养增殖，为以后临床应用提供了有利的条件。

综上所述，CSCs 是一种有前景的移植用种子细胞。CSCs 来源于心肌组织，体内外都能够分化为心肌细胞，分化后表现出类似成熟心室肌细胞电生理特性。因而，CSCs 用于移植由于其自身特点是否可以降低潜在致心律失常的风险？目

前的研究报道甚少。所以，我们设计了本实验研究。

本实验研究目的是：了解大鼠 CSCs 电生理特性，观察 CSCs 移植后对大鼠心肌梗死心电生理的影响。

第1章 心肌干细胞的分离，培养，鉴定与诱导分化

CSCs 在心肌组织中数量极少。选择一个有效的操作简便的体外分离纯化的方法，在 CSCs 研究中尤为重要。本实验部分应用贴壁分离法对 CSCs 进行体外分离、纯化培养和鉴定，并对 CSCs 进行诱导分化。

1.1 实验目的

建立大鼠 CSCs 体外分离培养方法，为下一步研究 CSCs 离子通道和观察 CSCs 移植对大鼠心肌梗死心电生理的影响提供充足细胞资源。

1.2 材料与方法

取新生 Sprague Dawley(SD)大鼠，在无菌条件下取心脏组织，采取贴壁分离和消化控制相结合办法分离纯化 CSCs，观察细胞形态变化。采用流式细胞仪检测细胞表面抗原：c-kit, CD29, CD90.1, CD11b/c, CD34, CD45 的表达，进行 CSCs 鉴定。以及应用心肌球培养液诱导 CSCs 分化，并行细胞免疫化学检测：肌钙蛋白 I、 α -肌动蛋白和结合蛋白。

1.3 结果

1.3.1 P0 (原代) 及 P1 代(经过 1 次传代) 细胞常有杂质细胞。

P2 及 P3 代时，得到较纯的 CSCs。

1.3.2 流式细胞仪鉴定结果显示：c-kit, CD29, CD90.1 为阳性，CD11b/c, CD34, CD45 为阴性。

1.3.3 CSCs 诱导分化结果：CSCs 经培养液诱导 2 周后，细胞免疫化学染色肌钙蛋白 I (cardiac troponin I)、结合蛋白 (desmin) 和 α -肌动蛋白 (α -Sarcomeric Actin) 为阳性。

1.4 小结

CSCs 可以从心肌中分离，进行体外培养增殖。并且可以在体外诱导分化为心肌细胞。

第2章 心肌干细胞离子通道 mRNA 的表达与电流的检测

由于干细胞存在致心律失常性可能, 干细胞的电生理特性成为研究热点。实验表明: CSCs 分化为心肌细胞后, 表现出和心室肌近似的电生理特性。然而, 大鼠 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下, 其离子通道表达和电生理特性尚不明了。

2.1 实验目的

通过对 CSCs 离子通道 mRNA 表达和 I_{Na} , I_{Ca} , I_{to} 的检测, 了解 CSCs 离子通道表达进程和细胞电生理特性, 为以后研究提供重要的实验资料。

2.2 材料和方法

取 P3 代 CSCs, 提取 RNA。予以逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 CSCs 离子通道 KCNN3, CCHL2a, Kir2.1, Kv4.3, Kv3.1, Kv2.1, Kv1.6, Kv1.3 和 rScn2a1 的 mRNA 表达。膜片钳全细胞记录模式记录 CSCs 是否存在 I_{Na} , I_{Ca} , I_{to} 电流。

2.3 结果

2.3.1 CSCs 离子通道 mRNA: CCHL2a 强表达, Kv4.3、Kv3.1 中度表达, Kv2.1、Kv1.6、Kv1.3、Kir2.1 低表达, KCNN3 和 rScn2a1 极低表达。

2.3.2 膜片钳全细胞记录模式未检测出 CSCs 存在 I_{Na} , I_{Ca} , I_{to} 。

2.4 小结

CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下, 已有离子通道 mRNA 的表达, 但是膜片钳全细胞记录模式未检测出离子电流存在。

第3章 心肌干细胞移植后对大鼠心肌梗死心电生理的影响

随着生物工程学发展, CSCs 的发现和成功分离, 使之成为新的研究热点。CSCs 移植被认为是治疗心脏性疾病最好的种子细胞之一。实验也显示: CSCs 移植后, 对心肌梗死动物的心功能有明显的改善, 但是对心电生理的影响却甚少文献报道。所以本实验旨在观察 CSCs 移植后对心肌梗死大鼠心电生理的影响。

3.1 实验目的

观察 CSCs 移植后对大鼠心肌梗死心电生理的影响。

3.2 材料与方法

26 只雄性 SD 大鼠，建立心肌梗死模型，其中 20 只建模成功。2 周后，20 只心肌梗死大鼠随机分为 2 组，每组 10 只，分别为心肌干细胞移植组和对照组 (PBS 组)。心肌干细胞移植组大鼠予以梗死区心肌内注射 CSCs ($5 \times 10^6/0.1 \text{ ml}$) 0.1ml，对照组大鼠予以梗死区心肌内注射 PBS 0.1ml。6 周后检测以下数据：心室有效不应期，心外膜单极电图激动恢复时间与激动恢复时间离散度，恶性室性心律失常诱发率，室颤阈值 (VFT) 和心肌梗死区、梗死边缘区 CSCs 缝隙连接蛋白 43(Cx43)的表达。

3.3 结果

3.3.1 在程序电刺激 S1S2, S1S2S3 条件下，CSCs 移植后，对心室有效不应期影响无统计学差异。

3.3.2 CSCs 移植后，梗死边缘区和非梗死区的校正激动恢复时间明显缩短，校正激动恢复时间离散度明显下降。

3.3.3 CSCs 移植后，心肌干细胞移植组更难诱发恶性室性心律失常。

3.3.4 CSCs 移植后，梗死区、梗死边缘区和非梗死区 VFT 明显提高。

3.3.5 CSCs 移植组在大鼠梗死区和梗死边缘区都可检测到 Cx43 表达，并且与移植的细胞定位重叠。PBS 组大鼠梗死区和梗死边缘区 Cx43 表达极少。

3.4 小结

3.4.1 CSCs 移植后，可以改善心肌梗死大鼠电生理异常状态，提高 VFT。

3.4.2 CSCs 移植后，能够在定植区表达 Cx43。

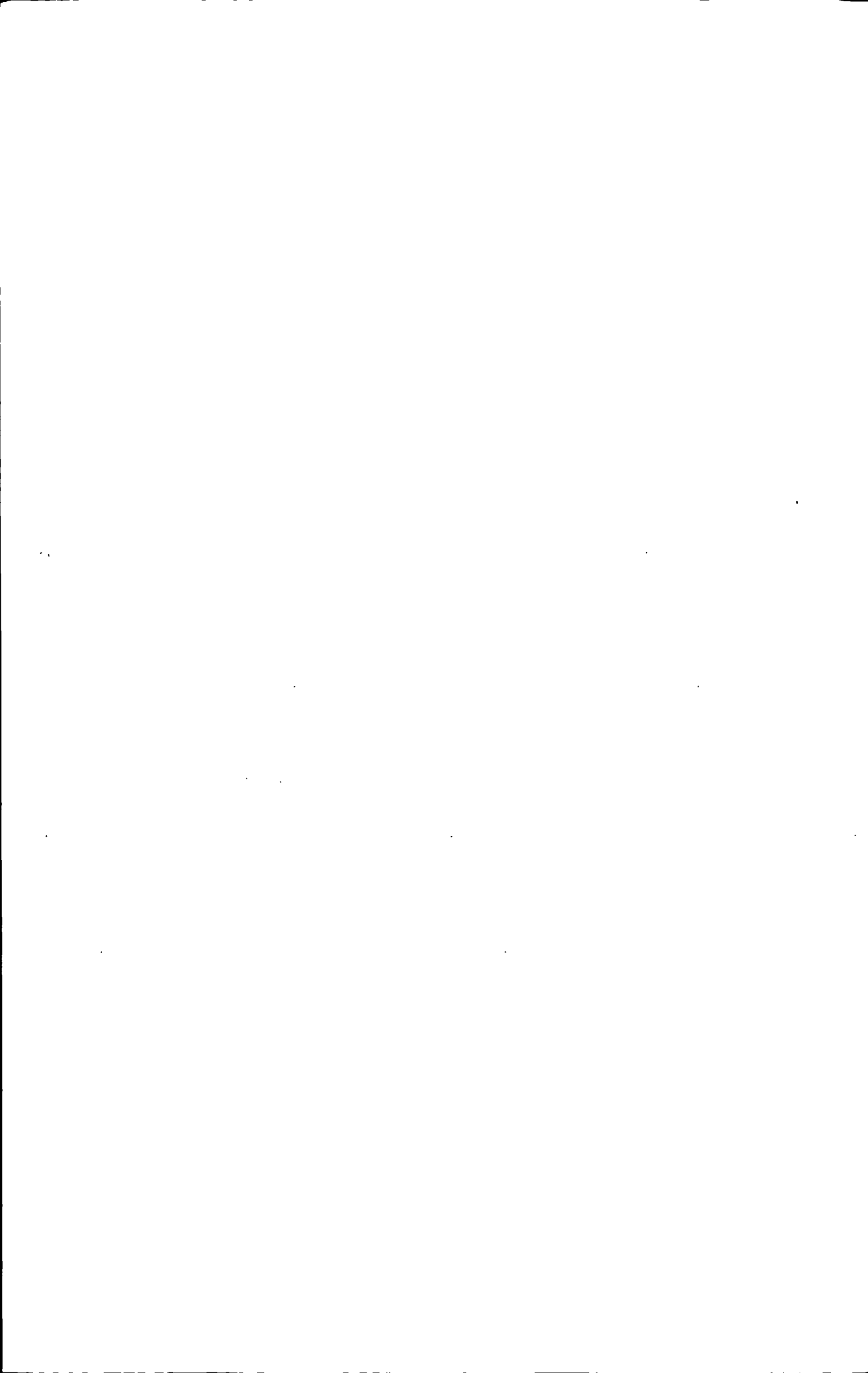
全文结论

1 CSCs 可以从心肌中分离, 进行体外培养增殖。并且可以在体外诱导分化为心肌细胞。

2 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下, 已有离子通道 mRNA 的表达, 但是膜片钳全细胞记录模式未检测出离子电流存在。

3 CSCs 移植后, 可以改善心肌梗死大鼠电生理异常状态, 提高 VFT。

关键词: 心肌干细胞; 移植; 心肌梗死; 离子通道; 电生理学



Cardiac Electrophysiological Effects in Rats with Myocardial Infarction Treated with Cardiac Stem Cells

Major: Medicine (Cardiology)

Ph.D.Candidate: Zheng Shaoxin

Tutor: Prof. Wu Wei

The Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University

ABSTRACT

Myocardial infarction is one of the most dangerous threats to human health. The main death causes of myocardial infarction are heart failure and malignant ventricular arrhythmias. The main treatments of myocardial infarction include intervention therapy, medication and device therapy. However, myocardial infarction mortality is still high; new treatments should be found.

With the development of the biological engineering, stem cell replacement is considered to be a promising therapeutic approach. At this stage, the stem cell lines, including bone marrow mesenchymal stem cells, embryonic stem cells, myoblast, cardiac stem cells (CSCs) and so on, are used for the treatment of cardiovascular disease.

In the animal experiments, stem cells for the treatment of myocardial infarction have shown good results. However, in the animal experiments and clinical trials of myoblast, there were cases of arrhythmias. Therefore, the stem cell electrophysiological properties were paid more and more attention. Basic studies shown 1) Bone marrow mesenchymal stem cells were induced in vitro to differentiate into cardiomyocytes, I_{K1} expression was significant heterogeneity; I_{K1} current density was generally lower than the normal ventricular muscle cells, which suggested that it might be an Arrhythmogenic; 2) Embryonic stem cells were induced to differentiate to cardiomyocytes in vitro, demonstrating spontaneous electrical activity, prolonged action potential duration and the lower dV / dt ; 3) After the transplantation of myoblast, the myoblast could not achieve electrical coupling with cardiomyocytes. Finally, muscle contraction tube was completely independent of the host cardiomyocytes. These shown that these stem cells might induce arrhythmias, so that a new superior seed cells for transplantation should be found.

It was previously thought that terminal differentiation of cardiomyocytes happened after birth. However, the fact that Messina successfully separated CSCs from human and mouse heart and cultured them in vitro had changed this view. The success of CSCs being isolated and cultured in vitro created advantageous conditions

for the future clinical applications. The source of stem cells for treatment of their corresponding organs of the disease was considered to be the best choice.

In conclusion, CSCs are a promising cells for transplantation. Experiments show that when CSCs are induced to differentiate into cardiomyocytes, it shows similar electrophysiological properties with the mature cardiomyocytes. However, whether the CSCs can decrease the risk of arrhythmias has not been reported.

Therefore, this study aims to detect the myocardial electrophysiological properties of CSCs, and observe the cardiac electrophysiology in the rats with myocardial infarction treated with CSCs.

Chapter 1 The separation, culture, identification and induction to CSCs

There is a small number of CSCs in the heart. Choosing a simple and effective proliferation measurement is particularly important for CSCs research. In this part, CSCs are isolated by adherence separation, purified, cultured and identified in vitro. CSCs are also induced to differentiate to cardiomyocytes.

1.1 Objective

To find out the rat CSCs isolation method to provide cellular resources for further studies of the CSCs ion channels and the observation of the effects in rats with cardiac infarction treated with CSCs.

1.2 Materials and methods

Hearts are taken from the newborn Sprague Dawley (SD) rats in sterile conditions. CSCs are isolated by adherence separation and control of detached time, and the cell morphology are observed. The surface antigens of CSCs are detected, including c-kit, CD29, CD90.1, CD11b / c, CD34, CD45, to identify the CSCs. And the CSCs are induced by the cardiosphere-growing medium(CGM), and are detected troponin I, α -actin and Desmin by immunochemistry method.

1.3 Results

1.3.1 CSCs, mixed with other cells, can be observed in P0 and P1 generation. Pure CSCs can be observed in P2 and P3 generation.

1.3.2 The detection of flow cytometry shows that c-kit, CD29, CD90.1 are positive, while CD11b / c, CD34, CD45 are negative.

1.3.3 Results of CSCs induction: 2 weeks after the induction by the CGM, immunochemical staining troponin I (cardiac troponin I), α -actin (α -Sarcomeric Actin) and Desmin are positive.

1.4 Summary

CSCs can be isolated from the myocardium and cultured in vitro, proliferating efficiently. It also can be induced to differentiate into cardiomyocytes.

Chapter 2 CSCs mRNA expression of ion channels and currents detection

Because stem cells are likely to be arrhythmogenic, the electrophysiological characteristics of stem cells become a research hotspot. Experiments show that when CSCs are induced to differentiated into cardiomyocytes, it shows the similar electrophysiological properties with the mature cardiomyocytes. However, the ion channels expression of CSCs and electrophysiological characteristics are not clear.

2.1 Objective

The mRNA expression of CSCs ion channels and the I_{Na} , I_{Ca} , I_{to} currents are detected to find out the process of ion channels expression and the CSCs electrophysiological properties, which provide the important experiment data for the future research.

2.2 Materials and Methods

RNA from P3 generation of CSCs is extracted to detect the CSCs ion channels mRNA expression, including KCNN3, CCHL2a, Kir2.1, Kv4.3, Kv3.1, Kv2.1, Kv1.6, Kv1.3 and rScn2a1, by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR). The patch clamp whole cell recording records whether there are ion currents in the CSCs.

2.3 Results

2.3.1 CCHL2a has strong expression; Kv4.3 and Kv3.1 have moderate expression; Kv2.1, Kv1.6, Kv1.3, Kir2.1 have low expression; KCNN3 and rScn2a1 have very low expression.

2.3.2 The patch clamp whole cell recording mode fails to record the ion currents in the CSCs.

2.4 Summary

The mRNA of ion channels express in CSCs, but the ion currents could not be detected by the patch clamp whole cell recording.

Chapter 3 Cardiac electrophysiological effects in rats with myocardial infarction treated with CSCs

With the development of biological engineering, the discovery of CSCs and the successful separation causes the CSCs research to become a new hotspot. CSCs are considered to be one of the best seed cells for the treatment of heart disease. Experiments also show that after the CSCs transplantation, the heart function of the myocardial infarction model has greatly improved, but the effects in the electrophysiology have seldom been reported in the literature. Therefore, this part is to evaluate cardiac electrophysiological effects in rats with myocardial infarction treated with CSCs.

3.1 Objective

To observe cardiac electrophysiological effects in rats with myocardial infarction treated with CSCs.

3.2 Materials and methods

26 male SD rats are taken as the myocardial infarction model, of which 20 are done. After 2 weeks, 20 rats with myocardial infarction are randomly divided into 2 groups --- CSCs transplantation group and control group (PBS group), each of which has 10 rats. Rats in the CSCs transplantation group are myocardial injected CSCs ($5 \times 10^6/0.1$ ml) 0.1ml in the infarct area, while rats in the PBS group were injected PBS 0.1ml in the infarct area. 6 weeks after the injection, the following data are detected: ventricular effective refractory period, epicardial unipolar electrogram activation recovery time and activation recovery time dispersion, the inducibility of malignant ventricular arrhythmias, ventricular fibrillation threshold (VFT) and the expression of Connexin-43(Cx43) of CSCs in the infarct area and infarct marginal zone.

3.3 Results

3.3.1 There are no differences in ventricular effective refractory period between CSCs group and PBS group in the infarct marginal zone and the non-infarct zone.

3.3.2 After the CSCs transplantation, there are significantly shorter activation recovery time in the infarct marginal zone and non-infarct zone, and the activation recovery time dispersion decreases significantly.

3.3.3 After the CSCs transplantation, it is more difficult to induce malignant ventricular arrhythmias.

3.3.4 After the CSCs transplantation, the ventricular fibrillation threshold is significantly increased.

3.3.5 The Cx43 expression can be detected in infarct area and the infarct marginal zone and it is overlapped by the CSCs in the CSCs transplantation group. There was few Cx43 expression in PBS group.

3.4 Summary

3.4.1 CSCs can modulate the electrophysiological abnormalities and increase ventricular fibrillation threshold in rats with myocardial infarction treated with allogenic CSCs.

3.4.2 After the CSCs transplantation, The Cx43 expression can be detected in infarct area and the infarct marginal zone.

The main Conclusion of the study

1 CSCs can be isolated from the myocardium and cultured in vitro, proliferating efficiently. It also can be induced to differentiate into cardiomyocytes.

2 The mRNA of ion channels express in CSCs, but the ion currents could not be detected by the patch clamp whole cell recording.

3 CSCs can modulate the electrophysiological abnormalities and increase ventricular fibrillation threshold in rats with myocardial infarction treated with allogenic CSCs.

Key words: cardiac stem cell; transplantation; myocardial infarction; ion channel; Electrophysiology

目 录

中文摘要	I
ABSTRACT	VI
目 录	XII
前 言	1
第 1 章 心肌干细胞的分离, 培养, 鉴定与诱导分化	7
1.1 材料与方法	7
1.2 结果	9
1.3 讨论	10
1.4 小结	10
第 2 章 大鼠心肌干细胞离子通道 mRNA 的表达与电流测定	15
2.1 实验材料, 溶液和仪器	15
2.2 实验方法	16
2.3 结果	19
2.4 讨论	19
2.5 小结	20
第 3 章 心肌干细胞移植对大鼠心肌梗死心电生理的影响	24
3.1 实验材料	24
3.2 实验方法	24
3.3 数据检测	25
3.4 结果	27
3.5 讨论	29
3.6 小结	31
第 4 章 实验局限性、创新点与全文总结	37
4.1 局限性	37
4.2 创新点	37
4.3 全文结论	37
干细胞膜电流特性及其致心律失常作用	38
英文缩略语	45
在读期间发表论文	46
致 谢	47



心肌干细胞移植对大鼠心肌梗死心电生理影响的研究

博士研究生：郑韶欣

导师：伍卫 教授

中山大学孙逸仙纪念医院心血管内科

前 言

心肌梗死是一种严重威胁人类健康的疾病。心肌梗死后心肌细胞坏死、凋亡，从而导致心肌细胞数量的减少，并为疤痕纤维所取代，进而心室肌重构，最后发展为心力衰竭和心律失常^[1,2]。其死亡原因主要是：心力衰竭和恶性室性心律失常。治疗心肌梗死的主流手段包括：介入治疗，药物治疗和器械治疗。循证医学证明，这些主流的治疗手段都能够提高患者的生存率和生活质量。然而现阶段心肌梗死死亡率仍然较高^[3]，有需要寻找新的治疗手段。

随着生物工程学的发展，干细胞（stem cell）替代治疗主要针对心肌细胞数量损失作为靶治疗方向，被认为是一种有前景的治疗手段。现阶段用于治疗心血管疾病的干细胞种类主要有：胚胎干细胞（embryonic stem cells, ESCs）、骨髓间质干细胞（mesenchymal stem cells, MSCs）、成肌细胞（myoblast）和心肌干细胞（cardiac stem cells, CSCs）等。

ESCs 是由早期胚胎的内细胞团或桑椹胚分离而建立的具有分化全能的细胞^[4]。ESCs 的显著特征是在体外不分化状态下保持无限增殖能力，并仍具备稳定的发育潜能^[5]。Doetschman 等^[6]在 1985 年，首先观察到 ESCs 在体外有多向分化能力，可以分化为三个胚层的多种细胞，其中就包括有在一定培养条件下能够分化出自发收缩的心肌样细胞。而 Fijnvandraat 等^[7,8]详细描述了 ESCs 向心肌细胞分化后的细胞生物学特性：这些细胞能够自发收缩，在电镜下能够看到心肌结构；电生理方面有表现为心室肌细胞或者窦房结细胞的电生理特征；能够表达心肌细胞特有的 GATA-4, Nkx2.5, 肌钙蛋白 I, 肌钙蛋白 T 和心钠素等。这些实验都为 ESCs 移植治疗心肌梗死、心力衰竭提供有力的生物学证明。在动物实验方面，Dinender 等^[9]用免疫抑制小鼠，制作心肌梗死动物模型，然后在心肌梗死区局部注射已经标记的未分化的 ESCs，结果发现移植后的 ESCs 能够和宿主心肌细胞整合，分化为心肌细胞，内皮细胞和血管平滑肌细胞；而损伤区域对移植的细胞有强的趋化作用，移植的细胞有一定的迁移能力，能够迁移到损伤区域。此实验显示了移植细胞在体内的生物学行为。Claudine 等^[10]则用小鼠的 ESCs 移

植入免疫抑制的羊的心肌梗死动物模型,结果显示移植组的瘢痕区域有 ESCs 的群集现象,移植组的左室射血分数有明显改善。这一系列实验表明: ESCs 能定向分化为心肌样细胞, ESCs 移植对心肌梗死动物模型心力衰竭有改善作用。然而 ESCs 由于其伦理学问题,仍然停留在动物实验的阶段,暂时没有临床实验。而且 ESCs 有可能引起排斥反应、致瘤性、致心律失常性,而限制其以后临床应用^[11]。

MSCs 来源于骨髓,是成体干细胞的一种,具有自我更新,横向分化潜能,其中包括分化成心肌细胞^[12]。MSCs 数量稳定,在生命过程长期存在;取材容易,可以自体移植,不存在排斥反应;易分离,体外长期培养,冷冻后不改变分化潜能;自体移植不存在伦理学问题^[13]。体内外研究表明, MSCs 可以分化为心肌样细胞,有自发收缩功能,电镜显示有心肌结构,能够表达心肌特有的蛋白和转录因子^[14,15,16]。在动物实验中, Shyu 等^[17]应用人类 MSCs 移植入心肌梗死的复合免疫缺陷小鼠,结果显示移植组的左室舒张末径,收缩末径,对比对照组明显减少;而射血分数明显升高;心脏重构减轻;血流动力学有明显的改善。由于 MSCs 相对于 ESCs 的临床可应用性高,所以开展的临床研究也较多。Chen 等^[18], 随机选取 34 名急性心梗患者在梗塞 18 天后移植 MSCs, 随机选 35 名患者作对照,结果显示移植组室壁运动,射血分数,收缩指数都优于对照组。所以 MSCs 用于治疗心肌梗死,慢性心力衰竭有着良好的临床应用前景。然而,也有一些动物实验对 MSCs 的长期治疗效果提出质疑, Wangde 等^[19]用标记的 MSCs 移植入小鼠的心肌梗死模型内,发现 4 个星期后移植组小鼠的左室射血分数和每搏输出量对比对照组有明显改善;但 6 个月后,心功能无明显改善。所以 MSCs 要应用于临床,还需要进一步研究其生物学特性、移植后细胞定植、以及改善心功能的机制。

成肌细胞为骨骼肌的前体细胞,来源于肌细胞纤维的基底膜,可以在损伤时迅速动员、增殖,使得损伤肌肉再生^[20]。成肌细胞容易从肌肉组织中分离、培养、增殖,并且在培养后可以产生收缩活动,所以被认为是心肌细胞移植的候选种子细胞之一^[21]。成肌细胞行移植后成活的横纹肌样细胞具有电活动和收缩功能,但兴奋性低且动作电位幅度低、时程短,为显著的骨骼肌特性,这就意味着成肌细胞移植后细胞是继续分化为骨骼肌细胞,而没有向心肌细胞分化^[22]。但是这样的情况没有影响其改善心肌梗死后心功能的能力。Guarita 等^[23]以 Wistar 大鼠作心肌梗死模型,然后移植入成肌细胞,并且设立对照组和 MSCs 组,结果显示,成肌细胞组对比对照组能够明显改善左室射血分数,而且效果比 MSCs 组更优;而免疫组化显示,成肌细胞组中有明显的肌细胞生长, MSCs 组则主要分化血管内皮细胞。显示了成肌细胞在某种程度上改善心功能的能力非常强大。由于成肌细胞改善心肌收缩效果显著,又容易分离培养,而且免疫源性低,所以应用于临床研究也是较早。Menasché 等^[24]是最早把成肌细胞应用于临床实验的,结果不但能够改善左室射血分数,而且能够观察到室壁运动的明显改善,最重要的是患者

症状能够得到改善。而 Herreros 等^[25]的临床实验也有类似的结果。

ESCs、MSCs 和成肌细胞移植对心肌梗死动物模型心力衰竭都有改善作用。然而,在成肌细胞的临床实验中,显示出其致心律失常性^[24,26];这促使了学者们开始关注干细胞电生理特性。

研究显示:1) Zhang 等^[11]实验显示:ESCs 能分化为不同种类心肌细胞群,分化后细胞的动作电位时程明显延长,最大上升速率(dV/dt)明显降低;在钙拮抗剂和氯化四乙铵作用下容易触发 2 相及 3 相早期后除极;这些特点均有可能参与心律失常的折返、触发、自律性机制。并且动物实验显示,ESCs 诱导为心肌细胞作为种子细胞移植到心肌组织中,发现移植细胞表现出的动作电位与成熟心室肌动作电位明显不一致^[27]。2) MSCs 胞膜上存在多种离子通道电流,包括延迟整流钾电流(I_{KDR})、瞬时外向钾电流(I_{to})、钙激活钾通道电流(I_{KCa})、少数 MSCs 记录到河豚毒素敏感性钠电流(I_{Na-TTX})及 L 型钙电流(I_{Ca-L})^[28]。MSCs 在体外诱导剂诱导分化为心肌样细胞后, I_{K1} 表达呈明显的不均一性, I_{K1} 电流密度总体上低于正常心室肌细胞,提示有致心律失常可能^[29]。Balana 等^[30]用 5-氮杂胞苷诱导人 MSCs 分化为心肌样细胞,引起明显的细胞电流改变:几乎所有分化后的细胞都具有快速和缓慢外向延迟整流钾电流(I_{Ks} , I_{Kr}),电流密度明显增加。并且由于缺乏正常心肌细胞所含有的快速内向钠电流, MSCs 移植到心肌组织后与宿主心肌细胞在电生理上存在显著的差异^[28,30]。3) 成肌细胞在体外与心肌细胞共培养,能够表达了 N-钙粘蛋白和间隙连接蛋白 43 (Cx43)^[31]。但成肌细胞植入动物体内后,则对这些蛋白表达下调甚至不表达^[32]。这些蛋白的低表达使移植的成肌细胞不能与宿主心室肌细胞进行电耦联,最终成肌细胞的收缩完全独立于宿主心室肌细胞^[22]。Sarah 等^[33]证实:移植入心肌的成肌细胞能保持兴奋性并对局部刺激产生动作电位,但不能与宿主心肌细胞形成协调一致的自律跳动,因此成肌细胞移植治疗心肌梗死,有致心律失常的潜在危险。由此可见,干细胞存在致心律失常可能,所以需要寻找一种新的更优越的移植用种子细胞。

既往观点认为,出生后心肌细胞即向终末分化,不能够增殖,因此心肌受损后,不能再生,为疤痕组织所代替,最终导致心脏功能受损^[2]。然而, Beltrami 等^[34]证实成年大鼠心肌中存在表达 c-kit⁺的细胞群, c-kit 是干细胞因子受体,显示此细胞群有干细胞特性可能。2004 年, Messina 等^[35]从人和小鼠心脏内成功地分离和培养出表达 c-kit⁺的细胞群,体外培养增殖。Oh 等^[36]用免疫磁珠分选法从成体心肌组织中分选出一类 c-kit⁺, Sca-1⁺祖细胞,该系细胞具有单能性,诱导后只分化为心肌细胞,并表达 Cx43、 α 肌动蛋白(α -actin)、心肌钙蛋白 I (cTn I) 以及 α 、 β 肌球蛋白重链。CSCs 的成功分离和体外培养增殖,以及能够诱导分化为心肌细胞,为以后科研实验和临床应用提供了必要的条件。而干细胞治疗其相应来源器官的疾病,被认为是最佳选择^[35]。Marcello 等^[37]动物实验的结果显

示, CSCs 移植大鼠心肌梗死模型后, 减少心肌梗死面积, 减轻心室重构, 降低心室舒张末径, 改善心功能。其他学者的动物实验也有相似结果^[38,39,40]。

综上所述, CSCs 是一种有前景的移植用种子细胞。CSCs 来源于心肌组织, 体内外都能够分化为心肌细胞, 表现出类似成熟心室肌细胞电生理特性^[41]。因而, CSCs 用于移植由于其自身特点是否可以降低潜在致心律失常的风险? 目前的研究报道甚少。所以, 我们设计了本实验研究。

本实验研究目的是: 了解大鼠 CSCs 电生理特性, 观察 CSCs 移植对大鼠心肌梗死心电生理的影响。

参考文献

- [1] Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *J Card Fail*, 2006, 12: 381-391
- [2] Anversa P, Nadal, Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature*, 2002, 415 (6868) :240-243
- [3] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, et al. Heart disease and stroke statistics 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2009, 119: e21-e181
- [4] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292 (5819) :154-156
- [5] Ueda O, Jishage K, Kamada N, et al. Production of mice entirely derived from embryonic stem cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos. *Exp Anim*, 1995, 44(3) : 205-210
- [6] Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, et al. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 1985, 87: 27-45
- [7] Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, de Boer PA, et al. Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube. *Cardiovasc Res*, 2003, 58: 399-409
- [8] Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, Schumacher CA, et al. Cardiomyocytes purified from differentiated embryonic stem cells exhibit characteristics of early chamber myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35: 1461-1472
- [9] Dinender KS, Timothy AH, Ma LL, et al. Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40: 195-200
- [10] Claudine M, Albert AH, Onnik A, et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet*, 2005, 366: 1005-1012
- [11] Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, et al. Stem cell-derived cardiomyocytes

- demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, 2002, 106: 1294-1299
- [12] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999, 103(5): 697-705
- [13] Bodo ES, Ran K. Stem Cell Therapy in Perspective. *Circulation*, 2003, 107: 929-934
- [14] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147
- [15] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 2002, 105: 93-98
- [16] Jones EA, Kinsey SE, English A, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*, 2002, 46: 3349-3360
- [17] Shyu KY, Wang BW, Hung HF, et al. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *Journal of Biomedical Science*, 2006, 13(1): 47-58
- [18] 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. *Am J Cardiol*, 2004, 94: 92-95
- [19] Dai WD, Sharon D. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Postinfarcted Rat Myocardium. *Circulation*, 2005, 112: 214-223
- [20] Philippe M. Skeletal myoblast for cell therapy. *Coronary Artery Disease*, 2005, 16: 105-110
- [21] van den Bos EJ, Davis BH, Taylor DA. Transplantation of skeletal myoblasts for cardiac repair. *J Heart Lung Transplant*, 2004, 23: 1217-1227
- [22] Leobon B, Garcin I, Menasche P, et al. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7808-7811
- [23] Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebelatto C, et al. Cell transplantation: Differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *International Journal of Cardiology*, 2005, 8: 64-70
- [24] Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*, 2001, 357: 279-280
- [25] Herreros J, Prosper F, Perez A, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2003, 24: 2012-2020
- [26] Smits PC. Myocardial repair with autologous skeletal myoblasts: a review of the clinical studies and problems. *Minerva Cardioangiologica*, 2004, 52(6): 525-535
- [27] Yi FF, Yang L, Li YH, et al. Electrophysiological Development of Transplanted

- Embryonic Stem Cell-derived Cardiomyocytes in the Hearts of Syngeneic Mice. *Archives of Medical Research*, 2009, 40: 339-344
- [28] Li GR, Deng XL, Sun H, et al. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells*, 2006, 24 (6) : 1519-1528
- [29] 韦育林, 伍卫, 王景峰等. 骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌细胞及其内向整流钾电流特征. *中山大学学报(医学科学版)*, 2005, 26(4):396-399
- [30] Balana B, Nicolet ti G, Zahanich I, et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res*, 2006, 16 (12) : 949-960
- [31] Balogh S, Naus CG, Merrifield PA, et al. Expression of gap junctions in cultured rat L6 cells during myogenesis. *Dev Biol*, 1993, 155-351
- [32] Reinecke H, Poppa V, Murry CE, et al. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34: 241-249
- [33] Sarah F, Jean CA, Gilles L, et al. Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovascular Research*, 2006, 40:348-358
- [34] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003, 114(6):763-776
- [35] Messina E, Luciana DA, Giacomo F, et al. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine heart. *Circ Res*, 2004, 95: 911-921
- [36] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 12313-12318
- [37] Marcello R, Elena PI, Yu M, et al. Infarcted Myocardium Improving Cardiac Function Local Activation or Implantation of Cardiac Progenitor Cells Rescues Scarred. *Circ Res*, 2008, 103: 107-116
- [38] Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*, 2007, 115(7): 896-908
- [39] Wang X, Hu Q, Nakamura Y, et al. The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*, 2006, 24(7): 1779-1788
- [40] Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*, 2010, 121(2):293-305
- [41] Teun PB, Toon ABV, Malin KB, et al. Human cardiomyocyte progenitor cell-derived cardiomyocytes display a matured electrical phenotype. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 40: 254-260

第 1 章 心肌干细胞的分离, 培养, 鉴定与诱导分化

CSCs 存在于成熟心肌组织中, 其分离、体外培养和增殖是细胞实验和动物实验的基础; 也是以后临床应用的最基本要求。本实验目的是对 CSCs 进行分离培养增殖, 为后部分细胞实验和动物实验提供充足的细胞资源。

1.1 材料与方法

1.1.1 实验动物

健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由中山大学动物实验中心提供; 自行配种, 新生鼠用于本实验。

1.1.2 主要试剂和仪器

1.1.2.1 Ca-Mg-free phosphate-buffered solution (PBS, 美国 Cambrex 公司)。

1.1.2.2 胰蛋白酶 (含 0.25%胰蛋白酶, 0.02%EDTA; 美国 Mediatech 公司)。

1.1.2.3 II 型胶原酶 (Collagenase II, 美国 Worthington Biochemical 公司)。

1.1.2.4 IMDM 培养液 (美国 Sigma 公司)。

1.1.2.5 胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司)。

1.1.2.6 双抗 (含青霉素 10000 U/mL 和链霉素 10000 μ g/mL, 美国 Cambrex 公司)。

1.1.2.7 L-谷氨酰胺 (美国 MP Biomedicals 公司)。

1.1.2.8 2-巯基乙醇 (美国 Sigma 公司)。

1.1.2.9 抗大鼠 CD11b/c, CD34, CD45, CD90.1, c-kit 均购自美国 BD 公司。

1.1.2.10 DMEM - Ham F-12 (美国 Sigma 公司), B-27 (美国 Invitrogen 公司), 表皮生长因子 (美国 BD 公司), 碱性成纤维细胞生长因子 (美国 BD 公司), 心肌营养素-1 (美国 PeproTech 公司), 凝血酶 (美国 EMD 公司)。

1.1.2.11 抗心肌特异性肌钙蛋白 (cTnI) 抗体 (美国 Fitzgerald 公司), 鼠抗 Desmin (美国 NeoMarkers 公司), 鼠抗 α -Sarcomeric Actin (美国 Biomeda 公司),

1.1.2.12 山羊血清 (美国 Rockland 公司), 生物素亲和的山羊抗兔血清 (美国 Rockland 公司)。

1.1.2.13 完全移植培养液 (complete explant medium, CEM) 成分: IM DM 500mL, 10% 胎牛血清 50mL, 100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素, 200 mM/L L-谷氨酰胺 5mL, 2-巯基乙醇 3.5 μ L。

1.1.2.14 心肌球生长培养液 (cardiosphere-growing medium, CGM) 成分: 35% IMDM/65% DMEM-Ham's F-12, 2% B27, 10ng/ml 表皮生长因子, 20ng/ml

碱性成纤维细胞生长因子, 40nmol/L 心肌营养素-1, 40nmol/L 凝血酶, 100 U/ml 青霉素 G, 100 μ g/ml 链霉素, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.1 mmol/L 2-巯基乙醇。

1.1.2.15 Azide 液 (上海博生公司)。

1.1.2.16 流式细胞仪(美国 B-D 公司)。

1.1.3 CSCs 的分离与原代培养

取出生第三天的 SD 大鼠, 断颈处死后置于 75% 酒精内消毒 30 秒。在无菌条件下, 取出心脏置于直径为 3.5cm 培养皿中, 剪成大约 1 mm³ 的小块状心肌组织。用不含钙磷的 PBS 液冲洗心肌组织碎块至液体澄清。然后加入胰酶 2ml 消化, 5min 后吸出消化液, 加入 II 型胶原酶 2ml, 消化胶原, 5min 后弃去消化液, 上述消化过程重复 3 次。然后向心肌组织块加完全移植物培养液 (complete explant medium, CEM) 洗 2 次, 用吸管将心肌组织块转移入 25cm² 培养瓶中, 尽量在瓶底均匀铺开 (上述操作均在 25℃ 室温下完成), 然后加入 CEM 大约 1 mL, 放入 37℃ 5% CO₂ 恒温水浴培养箱中培养, 12h 后再加入大约 4 mL CEM 培养, 称之为原代培养 (P0)。每 3 天换液一次, 并逐日观察细胞生长情况。

1.1.4 CSCs 的传代

约 10 天, 细胞增殖铺满培养瓶底, 即可进行心肌细胞传代 (传代 1 次, 为 P1 代, 如此类推)。弃去培养瓶中培养液, 用 PBS 清洗 2 次, 加入胰酶消化 2-3min, 显微镜下可见细胞收缩变圆, 立即加入 10mL CEM 培养液终止反应。并反复用吸管吸取瓶底液体吹打培养瓶底壁, 使附壁细胞脱落, 成细胞悬液。将细胞悬液移至 15mL 离心管, 1000r/min 转速下离心 5 min, 使细胞下沉。弃去上清并重新加入 CEM 培养液 10mL, 按 1: 2 传代的比例, 分成两个培养瓶继续培养。

1.1.5 流式细胞仪鉴定

取 P3 代细胞制成细胞悬液 (方法如前), 取 100 μ L 细胞悬液加入 2 μ L CD 特异性检测用单克隆抗体冰上孵育 30 min, 用 PBS/Azide 液 1 mL 洗涤细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 共用 PBS 液洗 2 次。然后加入 100 μ L PBS/Azide 液及 100 μ L 2% 多聚甲醛, 摇匀后立即送流式细胞仪检测。

1.1.6 CSCs 诱导分化与细胞免疫组化检测

取 P3 代 CSCs 用心肌球生长培养液 (cardiosphere-growing medium, CGM) 诱导培养, 每 3 天须换液一次。取诱导 2 周后的细胞, 经胰酶消化后接种于多聚赖氨酸包被的 35mm 培养皿中, 重新放入 CO₂ 培养箱中继续培养 48 小时后取出, 继续下面的免疫组化步骤:

- ①去除培养液, PBS 清洗三次, 加入 4%的多聚甲醛予以固定 15-30min;
- ②PBS 洗涤三次, 加 3%的 H_2O_2 甲醛, 置于室温 30min;
- ③PBS 洗涤三次, 滴加 10%山羊血清及 5%BSA 封闭, 置于室温 20min, 吸除多余的液体;
- ④加入不同浓度的一抗 4℃孵育过夜: 鼠抗 α -Actin 1: 200, 鼠抗 Desmin 1: 400, 抗 cTnI 抗体 1: 200;
- ⑤第二天用 PBS 洗三次, 滴加生物素亲和的山羊抗兔 IgG, 37℃ 20min;
- ⑥PBS 清洗细胞四次, 用 DAB 显色, 至胞浆中出现棕黄色颗粒时, 蒸馏水清洗终止反应;
- ⑦苏木素复染 2min, 梯度酒精脱水 (50%、70%、80%、90%), 每个浓度 1min;
- ⑧二甲苯透明 1min, 中性树胶封片, 拍片记录。光镜下随机取 10 个非重叠视野, 计算阳性细胞百分比。

1.2 结果

1.2.1 细胞形态

心肌组织块种植入培养瓶后, 2-3 天后可见有细胞自心肌组织碎块的边缘爬出 (图 1-1), 并沿着组织碎块的周围呈同心圆向外围生长 (图 1-2)。平均 11 天可以长满 25 cm^2 的培养瓶底。原代及 P1 代细胞常有杂质细胞 (图 1-3), 但经过传代至 P2 及 P3 代时, 杂细胞明显减少, 得到较纯的 CSCs (图 1-4)。在用 CEM 不断传代的过程中, 未见有干细胞向搏动的心肌细胞的分化, 一直保持干细胞旺盛的分裂和增殖的特征。

1.2.2 流式细胞仪鉴定结果

结果显示 CSCs c-kit、CD29、CD90.1 表达为阳性 (图 1-5), CD11b/c、CD34、CD45 表达为阴性 (图 1-6)。

1.2.3 CSCs 诱导分化和细胞免疫组化结果

CSCs 经 CGM 诱导后, 分别于第 7 天可见多核细胞形成, 细胞形态变长变细, 第 14 天出现肌管样结构 (图 1-7)。诱导 2 周的细胞, 行细胞免疫组化检测可见 α -横纹肌肌动蛋白 (α -Sarcomeric Actin) (图 1-8)、结合蛋白 (Desmin) (图 1-9)、肌钙蛋白 I (Cardiac Troponin I, cTnI) (图 1-10) 的表达。阳性细胞表达率分别为 $(48.6 \pm 4.2)\%$ 、 $(39.3 \pm 3.5)\%$ 、 $(42.5 \pm 3.9)\%$ 。未诱导细胞的免疫组化结果均为阴性。

1.3 讨论

1.3.1 原代细胞的分离和培养

干细胞是一类有自我更新分化潜能的细胞。现阶段,研究用于治疗心脏疾病的干细胞主要有: CSCs、ESCs、MSCs 和成肌细胞等。其中 CSCs 被 Megency 等^[1]证实存在于心肌组织中。随后 Messina 等^[2]成功从小鼠和人心肌组织中分离出 CSCs, 并能够体外培养纯化。这使得 CSCs 的研究和日后临床应用成为可能。

现阶段,分离 CSCs 的方法主要有:磁珠分选法或流式细胞仪分选法^[3],基因表达筛选法^[4]和心肌组织体外培养贴壁分离法^[2]。本实验主要使用心肌组织体外培养贴壁分离法。在分离过程中,最重要的是酶的选择和消化时间的控制,以达到分离 CSCs 而减少 CSCs 损失的目的。本实验选择 0.2% 胰酶及 0.1% 胶原酶反复消化心肌组织的方法。0.2% 胰酶主要消化心肌组织块的间质,得到单个分离细胞。0.1% 胶原酶主要除组织块中的心肌细胞。在此过程,消化的时间要控制适当。如消化时间过长, CSCs 损失量大;消化时间不足,则分离单个细胞不充分。而本实验中,0.2% 胰酶及 0.1% 胶原酶反复消化的时间都是 5min,分离的细胞仍有较快的生长速度和强的增殖能力。

1.3.2 细胞的表面标记

使用流式细胞仪对细胞表面标志物进行检测,是鉴定 CSCs 的主要方法。CSCs 主要表达 c-kit, 而 c-kit 是干细胞因子受体,是干细胞重要的表面标志物^[2]。然而 CSCs 的鉴定还需要排除血源性干细胞在心肌组织中的定植。CD34 就是一个良好的鉴别标记物: CD34 选择性表达于造血干细胞、祖细胞和血管内皮细胞表面^[5,6], 而不表达于 CSCs 表面^[2]。而本实验分离的 CSCs 表达 c-kit、CD29、CD90.1, 不表达 CD11b/c、CD34、CD45, 与其他学者的研究结果基本符合^[7]。

1.3.3 CSCs 分化为心肌细胞后细胞免疫化学染色

CSCs 在采用 CGM 培养后,逐渐向心肌样细胞分化。诱导分化后,部分细胞 α -Sarcomeric Actin、Desmin、CTnI 呈阳性反应。 α -Sarcomeric Actin 是横纹肌肌动蛋白,仅存在于骨骼肌和心肌,不存在于平滑肌。Desmin 是横纹肌和平滑肌中的一种特殊的骨架蛋白。CTnI 是组成心肌细胞内肌钙蛋白的 3 个亚单位的其中之一。以上免疫组化结果提示诱导分化后的 CSCs 具有心肌细胞特征,与其他学者的研究结果基本符合^[8,9]。

1.4 小结

CSCs 可以从心肌中分离, 进行体外培养增殖。并且可以在体外诱导分化为心肌细胞。可以满足组织工程和细胞治疗的需要。

参考文献

- [1] Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, et al. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett*, 2002, 530 (1-3): 239-243
- [2] Messina E, Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, 2004, 95 (9): 911-921
- [3] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 12313-12318
- [4] Barile L, Messina E, Giacomello A, et al. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 50 (1): 31-48
- [5] Stellos K, Seizer P, Bigalke B, et al. Platelet aggregates-induced human CD34+ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro. *Semin Thromb Hemost*, 2010, 36(2): 139-145
- [6] Kessans MR, Gatesman ML, Kockler DR. Plerixafor: a peripheral blood stem cell mobilizer. *Pharmacotherapy*, 2010, 30(5): 485-492
- [7] 王彤, 万智, 符岳, 等. 大鼠心肌干细胞的体外分离培养和生物学特征鉴定. *岭南急诊医学杂志*, 2008, 13(1): 1-3
- [8] Nadal-Ginard B, Anversa P, Kajstura J, et al. Cardiac stem cells and myocardial regeneration. *Novartis Found Symp*, 2005, 265: 142-154
- [9] Barile L, Chimenti I, Gaetani R, et al. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, 4: S9-S14





图 1-1 CSCs 自心肌组织碎块的边缘爬出 (×40)。

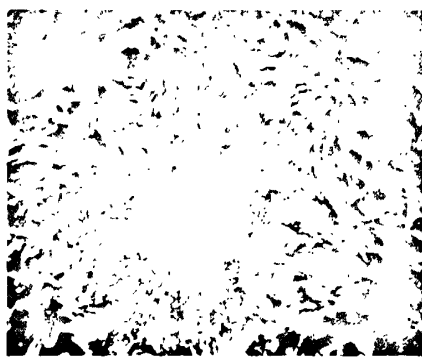


图 1-2 CSCs 沿着组织碎块的周围呈同心圆向外围生长 (×40)。



图 1-3 原代及 P₁ 代细胞的杂质细胞形状象成纤维母细胞(×40)



图 1-4 P₂ 及 P₃ 代时, 杂质细胞消失得到较纯心肌干细胞(×40)



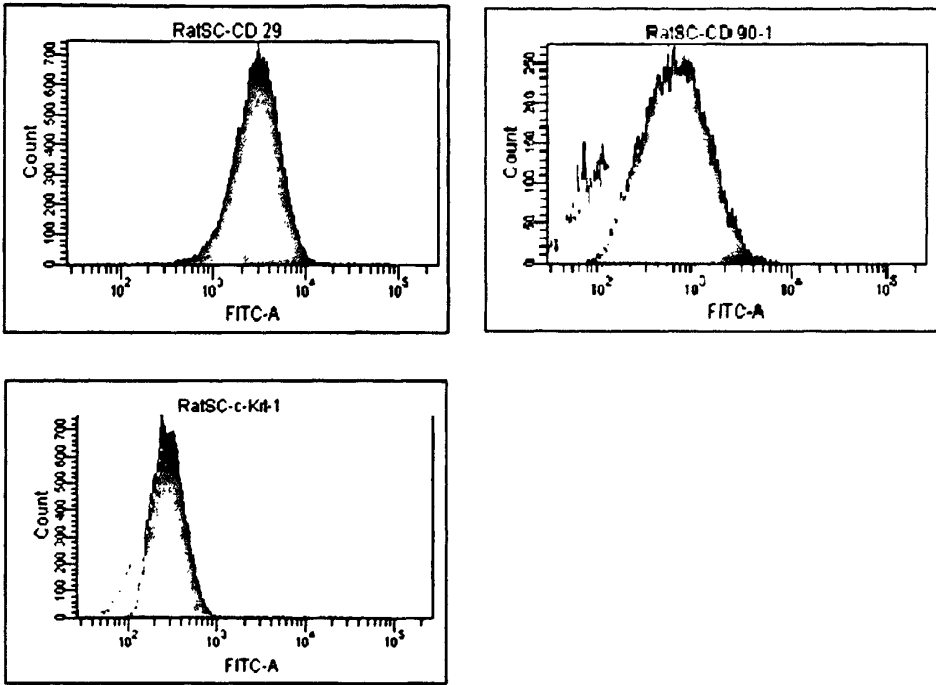


图 1-5 c-kit, CD29, CD90.1 表达为阳性

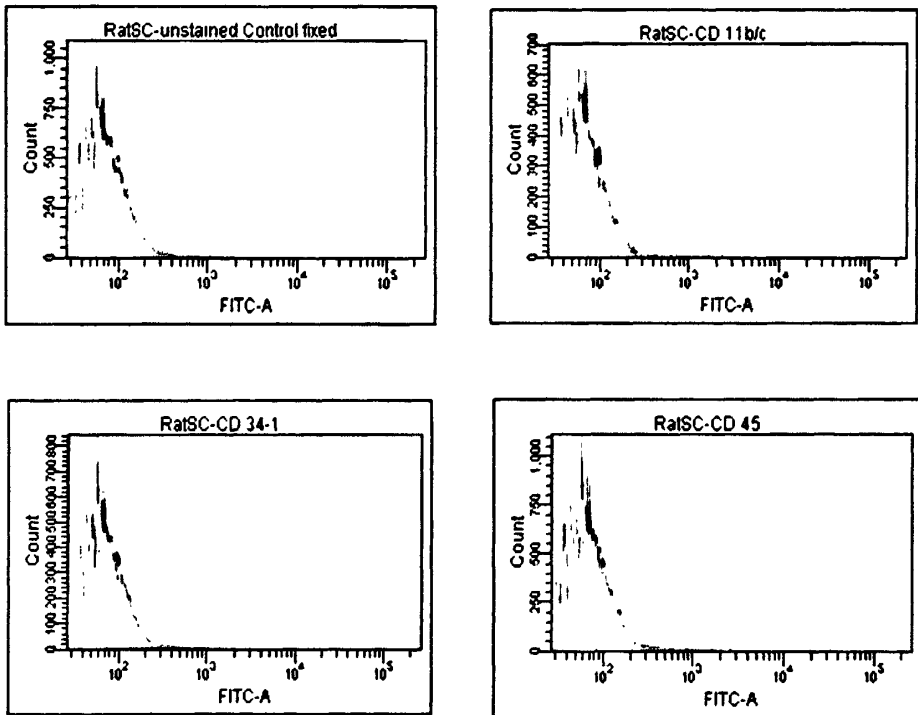


图 1-6 CD11b/c, CD34, CD45 为阴性



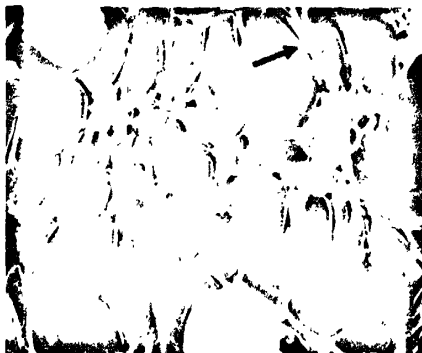


图 1-7 CGM 诱导 CSCs 两周后出现肌管样结构并相互连接(×200)

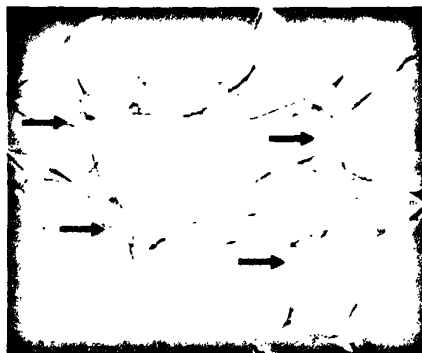


图 1-8 诱导细胞 α - Sarcomeric Actin 染色呈阳性 (×200)

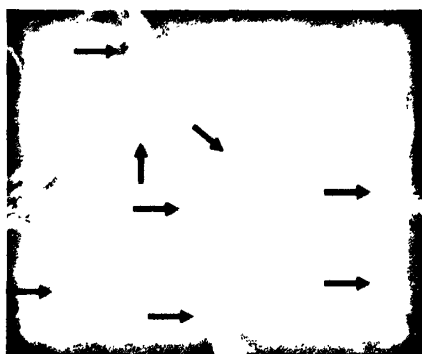


图 1-9 诱导细胞 Desmin 染色呈阳性 (×200)

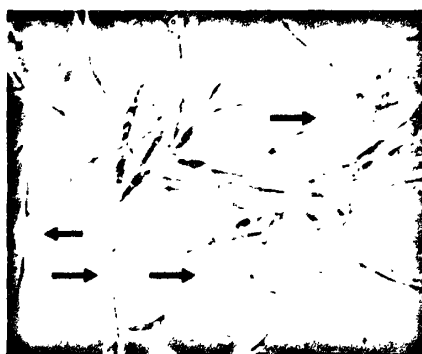


图 1-10 诱导细胞 CTnI 染色呈阳性 (×200)



第2章 大鼠心肌干细胞离子通道 mRNA 的表达与电流测定

CSCs 是来源于成熟心肌组织有分化增殖潜能的祖细胞^[1,2,3]。其可以在体内外分化为：心肌细胞，血管平滑肌细胞，血管内皮细胞和成纤维细胞^[4,5,6]。CSCs 在分化为心肌细胞后，可以表现出近似成熟心室肌细胞的动作电位^[7]。然而大鼠 CSCs 在未分化为心肌细胞状态下，其离子通道情况和电生理特性尚不明确。本实验旨在通过检测 CSCs 离子通道 mRNA 的表达与电流，了解 CSCs 的电生理特性，为 CSCs 移植提供电生理依据和日后 CSCs 的研究提供基础性的实验资料。

2.1 实验材料，溶液和仪器

2.1.1 实验材料：

心肌干细胞	本实验室培养
引物合成	上海生物工程技术服务有限公司
聚合酶链反应试剂盒	大连TAKARA公司
6孔板、96孔板	CORNING公司
15ml离心管	美国BD公司
滤膜滤器	Millipore公司

2.1.2 试剂以及容易配制

2.1.2.1 DEPC 水：吸出 1ml 放在 1000ml 双蒸水中配成 1%DEPC 水，放在 1000ml 容量瓶中静置 4 小时备用。

2.1.2.2 75%乙醇：用无水乙醇+DEPC 水配，然后放-20℃保存（其中 DEPC 水需先高压消毒）。

2.1.2.3 电泳缓冲液：Tris 54g、硼酸 27.5g、0.5M EDTA 20ml、pH8.0 蒸馏水 1000ml、5×TBE（贮存液）再将 5×TBE 稀释 10 倍成 0.5TBE 就可以在电泳时使用（即工作液浓度）。

2.1.2.4 上样缓冲液：0.25%溴酚蓝、0.25%二甲苯青 FF、30%甘油、6×缓冲液，4℃保存。

2.1.2.5 琼脂糖凝胶的配制：1.0g 琼脂糖+100ml 电泳缓冲液，微波炉中火 30 秒至沸腾，熔化的琼脂物冷却至 60℃时加入 10mg/ml 溴化乙锭 2.5 μl，充分混匀，将温热的凝胶倒入已置好梳子的胶膜中，在室温下放置 30-45min 后现进行电泳。

2.1.2.6 全细胞膜片钳电极外液成分(mmol/L)：

检测 $I_{NaI_{Ca}}$ 时: NMDG 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, glucose 6, NaHCO₃ 17.5, HEPES 15, 用 CsOH 将 pH 调整至 7.4;

检测 I_{K1} 时: NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, glucose 6, NaHCO₃ 17.5, HEPES 15, 用 NaOH 将 pH 调整至 7.4

2.1.2.7 全细胞膜片钳电极内液(mmol/L) :

检测 $I_{NaI_{Ca}}$ 时: CsCl 120, TEACl 10, MgCl₂ 3, CaCl₂ 1, Na₂ATP 2, EGTA 10, HEPES 5, 用 CsOH 将 pH 调整至 7.2;

检测 I_{K1} 时: potassium gluconate 125, KCl 10, HEPES 5, EGTA 5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 0.6, Na₂ATP 4, 用 KOH 将 pH 调整至 7.2

2.1.3 主要实验仪器

电泳仪	北京六一仪器厂
PCR 扩增仪	Applied Biosystems 公司
电转仪	Eppendorf 公司
梯度 PCR 仪	照生公司
垂直洁净工作台	北京昌平长城空气净化设备工程公司
冷冻离心机 5417R	eppendorf 公司
倒置生物显微镜	重庆光电仪器总公司
二氧化碳培养箱	美国 Thermo 公司
生物安全柜	美国 Labconco 公司
凝胶成像系统	美国 BIORAD 公司
微电极拉制仪	美国 Narishige 公司
三维微电极操纵仪	美国 Narishige 公司
防震电生理工作台	美国 Narishige 公司
倒置光学显微镜	Olympus 公司
膜片钳放大器	Axon 公司
AD/DA 转换器	Axon 公司
Pclamp8.0 记录软件	Axon 公司

2.2 实验方法

2.2.1 CSCs 离子通道 mRNA 表达的检测

检测 CSCs 离子通道 mRNA 表达: KCNN3 (钙相关性钾通道), CCHL2a(L 型钙通道), Kir2.1 (内向整流钾通道), Kv4.3 (瞬时外向钾电流通道), Kv3.1,

Kv2.1, Kv1.6(延迟整流钾电流通道), Kv1.3, rScn2a1(电压门控钠电流通道)的 mRNA 表达。

2.2.1.1 取 P3 代生长良好的大鼠 CSCs 按每孔 2×10^5 个细胞密度接种到 6 孔板,

加入 CEM 培养基 2ml 培养 48h;

2.2.1.2 48h 后按下述步骤提取 CSCs 总 RNA:

- ① 每孔加入 1ml Trizol 裂解液, 充分吹打, 将细胞悬液移入 1.5ml EP 管中;
- ② 室温孵育 5min, 让核蛋白复合物充分解离;
- ③ 加入氯仿 0.2ml, 用力振荡 15s, 使之充分摇混;
- ④ 室温孵育 15min;
- ⑤ 12000g, 4℃ 离心 15min, 溶液分为三层;
- ⑥ 吸取上层无色液体移入另一 1.5ml EP 管中, 加异丙醇 0.5ml, 用力混合几次, 室温放置 5-10min 使 RNA 沉淀;
- ⑦ 12000g, 4℃ 离心 10min, 弃上清, 白色沉淀为 RNA;
- ⑧ 加 75%乙醇 1ml, 在涡旋振荡器上振动 EP 管洗涤 RNA 沉淀;
- ⑨ 7500g, 4℃ 离心 5min, 弃上清;
- ⑩ 风干, 加入 20 μ l DEPC 水溶解, 55-60℃ 水浴 10min, -80℃ 冻存备用。

2.2.1.3 CSCs 总 RNA 定量及纯度鉴定

- ① 将 2ml DEPC 水加入 PE 比色杯;
- ② 加入 RNA 样品 2 μ l, 充分混匀;
- ③ 紫外分光光度计预热后, 用 DEPC 水调零;
- ④ 分别测定已提取的总 RNA 光密度值, 即 OD260 及 OD280, 每个样品测定 3 次, 取均值;
- ⑤ 按照 OD260/OD280 比值判定 RNA 纯度。要求 OD260/OD280 比值在 1.6-2.0;
- ⑥ 以下公式计算 RNA 浓度:

$RNA (\mu g/\mu l) = OD260 \times \text{稀释倍数} \times 40/1000$, 本实验中稀释倍数为 1000,
所以 $RNA (\mu g/\mu l) = OD260 \times \text{稀释倍数} \times 40$;

2.2.1.4 逆转录合成 cDNA 链

- ① 在新 PCR 管中建立反应体系, 依次加入以下试剂: 总 RNA 3 μ g、Oligo dT

- 1 μ l、RNAase inhibitor(40U/ μ l) 1 μ l、加 DEPC 水 13 μ l, 后离心, 使混悬液沉降到 PCR 管底部, 轻轻混匀, 再离心;
- ② PCR 仪中, 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 使 RNA 变性, 立即冰浴 5min;
- ③ 依次加入以下试剂: 5 \times RT 合成缓冲液 4 μ l、10mMdNTP 2 μ l、AMV 10U/ μ l 1 μ l 后摇匀, 离心;
- ④ 置 PCR 仪中, 分别 42 $^{\circ}$ C 反应 50min 95 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 灭活逆转录酶;
- ⑤ 冰浴 10min, 完成 cDNA 链合成, 置-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2.1.5 PCR 检测 mRNA 表达

① PCR 反应体系

模板 1 μ l、Primer F 1 μ l、Primer R 1 μ l、10 \times Taq Buffer 5 μ l、dNTP (10uM) 1 μ l、Taq 0.5 μ l、ddH₂O 40.5 μ l

② PCR 引物:

Kv1.3-PCR-F	ATTGTAGCCATCATCCCCTTAT
Kv1.3-PCR-R	AGCCTTCAGTGTCTGTCCC
Kv1.6-PCR-F	ACGAGGAGGAAGATGAAGAC
Kv1.6-PCR-R	ATGATATTGCGAAAGAAAGC
Kv2.1-PCR-F	GCTGCAGAGCCTAGACGAGT
Kv2.1-PCR-R	TGCTTTTGAACCTGGTGTCTG
Kv3.1-PCR-F	CTGCTTCCTCTTATCAACCG
Kv3.1-PCR-R	AAGGGCGAATCCTCTACG
Kv4.3-PCR-F	GCGTCCTGGTCATTGCTC
Kv4.3-PCR-R	GTCTTGCCCATGTGCTCC
Kir2.1-PCR-F	AGTCCATACCCGACAACA
Kir2.1-PCR-R	GGCAGAAGATTACCAGCA
CCHL2a-PCR-F	CTCTGAGATGTTAGAAACCCTT
CCHL2a-PCR-R	CTTCTCCTCCATCCGTGA
rScn2a1-PCR-F	GCCCAAATACGAAGACAA
rScn2a1-PCR-R	AAATAATAATGGCGGAGG
KCNN3-PCR-F	CCAACGCTACCCACAACC
KCNN3-PCR-R	CGTGCCGTCCAGAAGAAC

③ PCR 扩增条件

94°C 5min → 加 Taq 酶 1ul → 94°C 变性 30s → 55°C 退火 30s → 72°C 延伸 2min, 共 30-32 个循环 → 72°C 孵育 10min → 4°C 结束反应, 保存;

- ④ PCR 扩增产物检测: 用 1% 琼脂糖凝胶常规方法电泳鉴定结果;
- ⑤ 凝胶图像处理系统分析。

2.2.2 膜片钳全细胞记录 (whole cell recording) 模式测定 CSCs 离子电流

取 P3 代 CSCs, 以膜片钳全细胞记录模式检测钠电流 (I_{Na})、L 型钙电流 (I_{Ca-L}) 和瞬时外向钾电流 (I_{to})。记录电极由硬质玻璃毛细管经微电极控制仪双步控制而成, 充灌电极内液后阻抗为 8-12M Ω 。按膜片钳全细胞记录模式记录。刺激脉冲的产生和信号采集均由 pCLAMP8.0 软件完成, 离子电流通过膜片钳放大器放大, 经 AD/DA 转换板输入 IBM-PC 机硬盘中。测得的膜电流除以膜电容, 即为电流密度, 代表单位面积的电流密度, 单位为 pA/pF。电流-电压曲线 (I-V 曲线): 以膜电位为 X 轴, 各指令电压下的电流密度为 Y 轴作坐标图, 即得电流和电压关系曲线图。

2.3 结果

2.3.1 大鼠 CSCs 离子通道 mRNA 的检测

CSCs 离子通道 mRNA: CCHL2a 强表达, Kv4.3、Kv3.1 中度表达, Kv2.1、Kv1.6、Kv1.3、Kir2.1 低表达, KCNN3 和 rScn2a1 极低表达。(图 2-1)

2.3.2 膜片钳全细胞模式检测 CSCs 离子电流

在膜片钳全细胞记录模式测定下, 未检测出大鼠 CSCs 的 I_{Na} , I_{Ca-L} , I_{to} 存在。(图 2-2, 图 2-3, 图 2-4)

2.4 讨论

2.4.1 大鼠 CSCs 离子通道 mRNA 的表达

心肌细胞动作电位主要由钾、钠、钙离子不同方向的跨膜流动而形成。rScn2a1 编码电压门控钠通道, 通过瞬时钠内流, 形成动作电位 0 相除极^[8]; Kv4.3 编码瞬时外向钾通道, 通过瞬时钾外流, 形成 1 相动作电位^[9]; CCHL2a 编码 L 型钙通道, 通过钙内流, 形成动作电位平台期^[10]; kv1.6 编码延迟整流钾通道,

通过钾外流形成动作电位 2,3 相复极^[11]；kir2.1 编码内向整流钾通道，决定心肌细胞膜静息电位^[12]。而离子通道除了与形成动作电位相关外，还与增殖细胞的细胞周期调控相关^[13,14]，其中 kv1.3 通道被证实在 T 淋巴细胞激活增殖中起调控作用^[15]。在本实验中，大鼠 CSCs 离子通道 mRNA：CCHL2a 强表达，Kv4.3 中度表达，Kv1.6、Kir2.1 低表达，rScn2a1 极低表达。而与增殖调控相关的 kv1.3 也有低表达。本实验显示 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下，已经表达了多种重要的与动作电位相关的离子通道 mRNA。而 kv1.3 可能对 CSCs 的增殖起调控作用。

2.4.2 大鼠、小鼠和人 CSCs 离子通道 mRNA 表达对比

大鼠 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下，已经有多种离子通道 mRNA 表达。但是小鼠 CSCs 则有 Kv1.6、Kir2.1 的强表达，并且膜片钳能够检测到外向性延迟整流钾电流和内向性整流钾电流^[11]；而 CCHL2a，Kv4.3，rScn2a1 则不表达；在细胞增殖调控方面，Clcn3 编码的电压门控性氯通道调控^[11,16,17]。而人 CSCs 则极少表达离子通道蛋白^[7]。对比显示，不同种属的 CSCs 在离子通道蛋白 mRNA 表达进程上可能不一致，并且其调控增殖相关离子通道也可能不一致。

(表 2-1)

表 2-1 大鼠、小鼠和人 CSCs 离子通道 mRNA 表达的对比

	CSCs 种属	CCHL2a	Kv4.3	Kir2.1	rScn2a1	Kv1.6	Kv1.3
本实验	大鼠	+++	++	+	-	+	+
Yi H ^[11]	小鼠	-	-	+++	-	+++	-
Teun P ^[7]	人	-	-	+	-	-	-

注：+++：强表达，++：中等表达，+：低表达，-：极低表达或不表达

2.4.3 膜片钳全细胞记录未检测出电流的原因

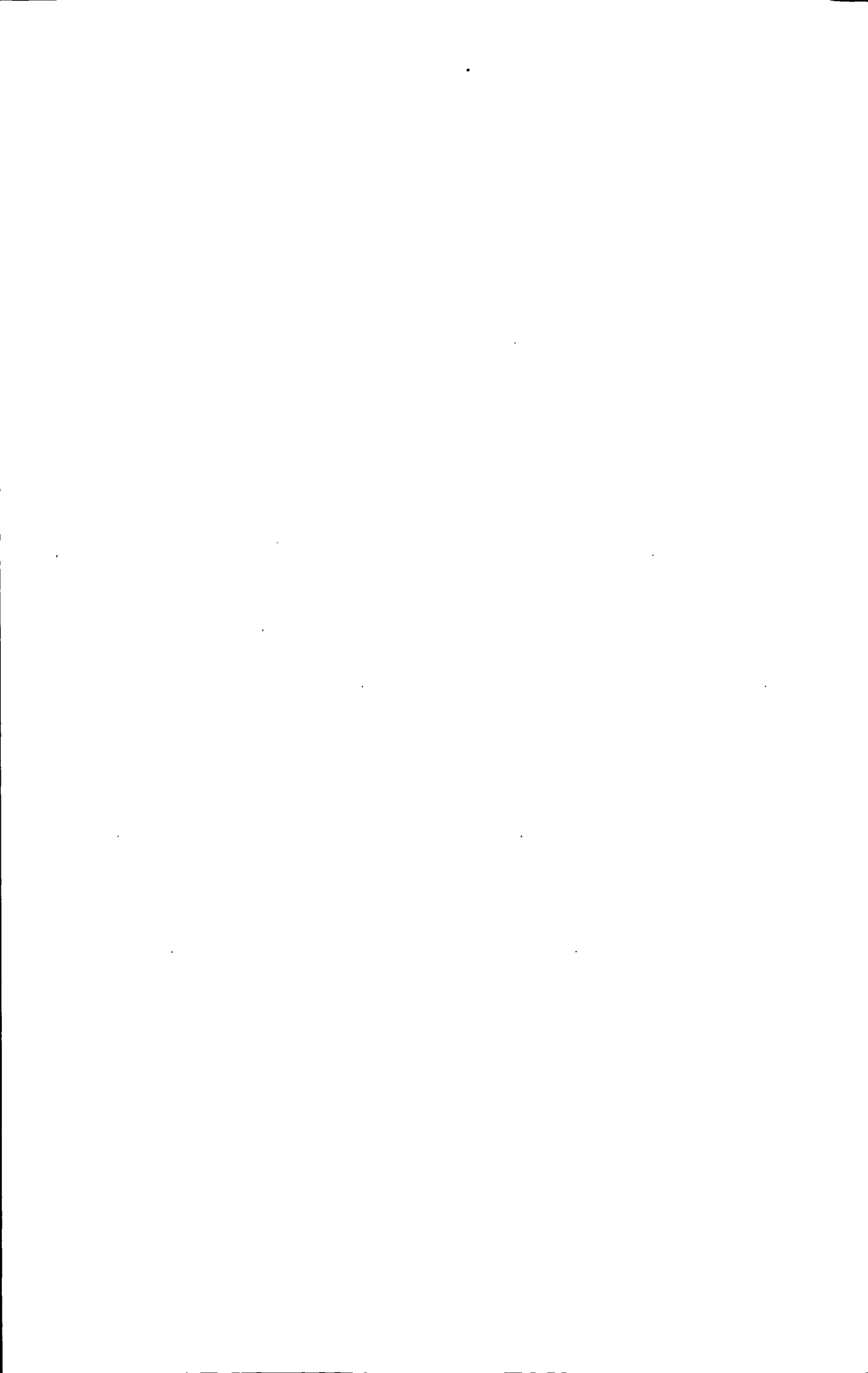
大鼠 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下，以膜片钳全细胞记录模式检测，未检测出 I_{Na} 、 I_{Ca-1} 和 I_{to} 的存在。对大鼠 CSCs 电生理状况尚待进一步研究。考虑主要原因如下：1) 大鼠 CSCs 在 P3 代未有通道蛋白的表达，或者有通道蛋白表达但未整合到细胞膜上。2) 整合到细胞膜上的通道蛋白数量极少，难以显示出电流。3) 电极内液和电极外液成分有可能与大鼠 CSCs 不匹配。

2.5 小结

大鼠 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下，已经有离子通道 mRNA 的表达，但是膜片钳全细胞记录模式未检测到离子电流存在。

参考文献:

- [1] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003, 114: 763-776
- [2] Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (35): 14068-14073
- [3] Barile L, Messina E, Giacomello A, et al. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 50 (1): 31-48
- [4] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*, 2005, 85(4):1373-1416
- [5] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 12313-12318
- [6] Dawn B, Stein AB, Urbanek K, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(10): 3766-3771
- [7] Teun PB, Toon ABV, Malin KB, et al. Human cardiomyocyte progenitor cell-derived cardiomyocytes display a matured electrical phenotype. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2010, 48: 254-260
- [8] Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF, et al. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol*, 1998, 508: 647-657
- [9] Li GR, Sun H, Deng X, et al. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells*, 2005, 23: 371-382
- [10] Trafford AW, Díaz ME, Eisner DA, et al. The control of Ca release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation. *Cardiovasc Res*. 1998, 38(3): 589-604
- [11] Yi H, Chen JD, Liu ZM, et al. Functional ion channels in mouse cardiac c-kit+ cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298: C1109-C1117
- [12] Rong T, Lau CP, Tse FH. Functional ion channels in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293:1561-1567
- [13] Pardo LA. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology*, 2004,19: 285-292
- [14] Wonderlin WF, Strobl JS. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol*, 1996,154: 91-107
- [15] Lewis RS, Cahalan MD. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 623-653
- [16] Nilius B. Chloride channels go cell cycling. *J Physiol*, 2001, 532: 581
- [17] Okada Y, Shimizu T, Maeno E, et al. Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol*, 2006, 209: 21-29



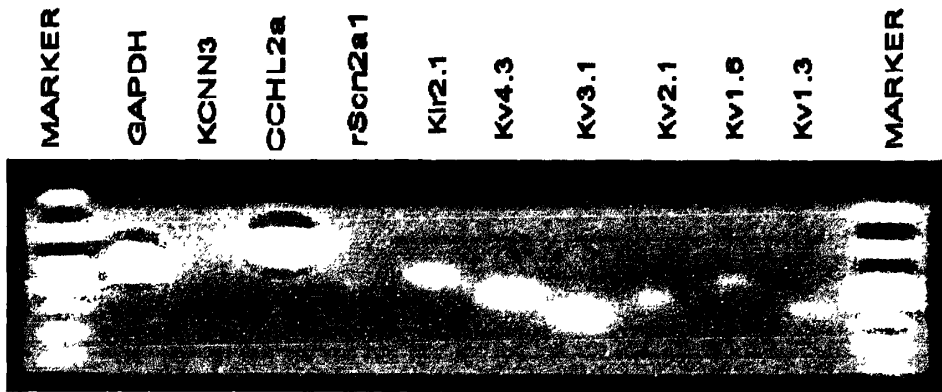


图 2-1 大鼠 CSCs 离子通道 mRNA 的检测

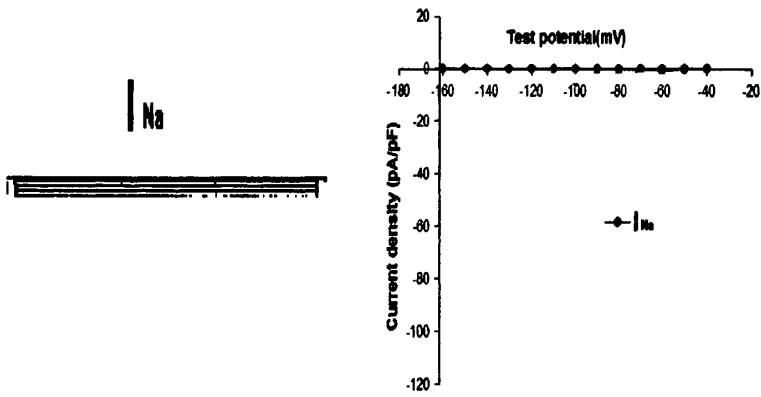
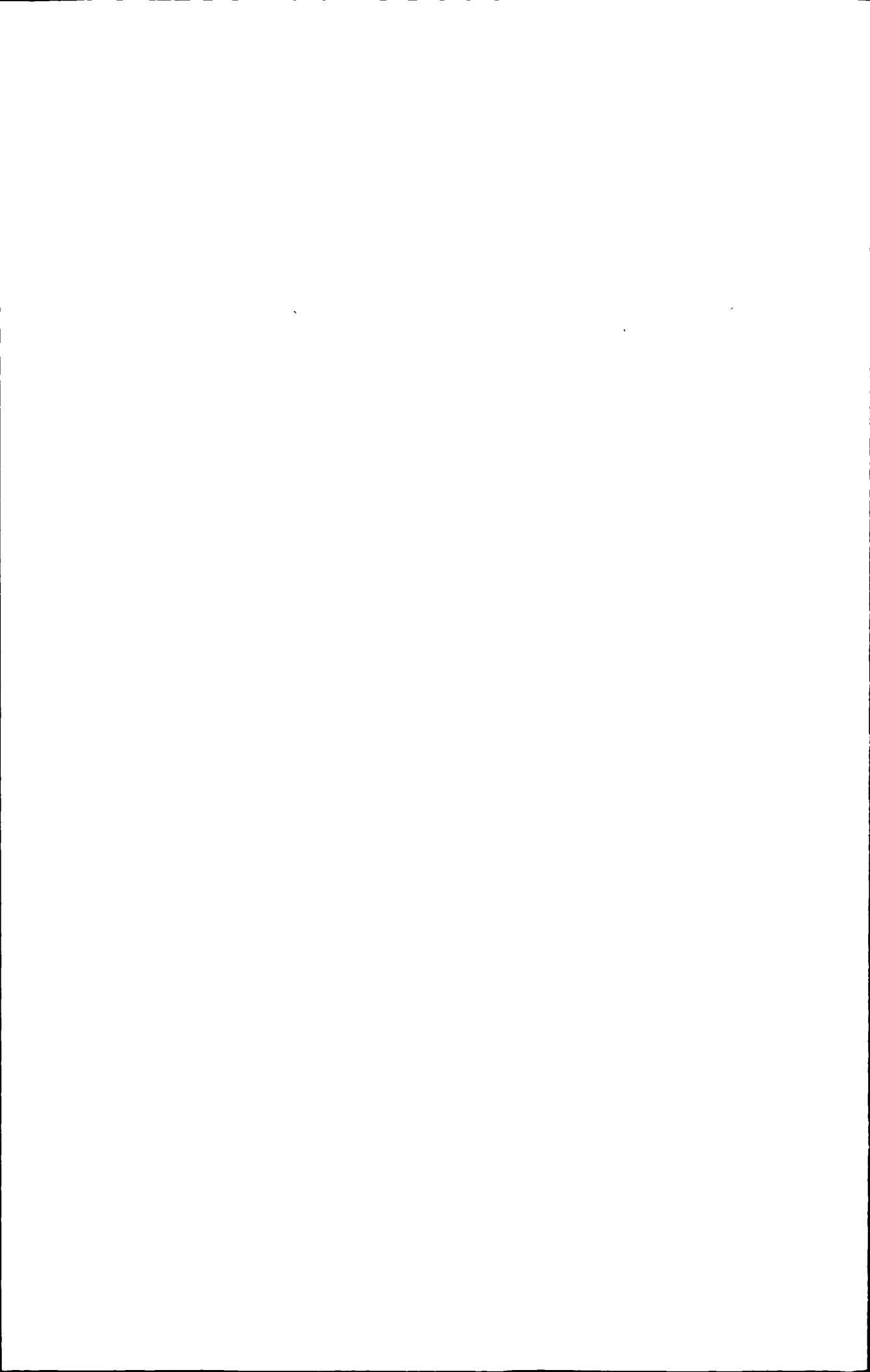


图 2-2 膜片钳全细胞记录模式未能检测到 CSCs 的 I_{Na}



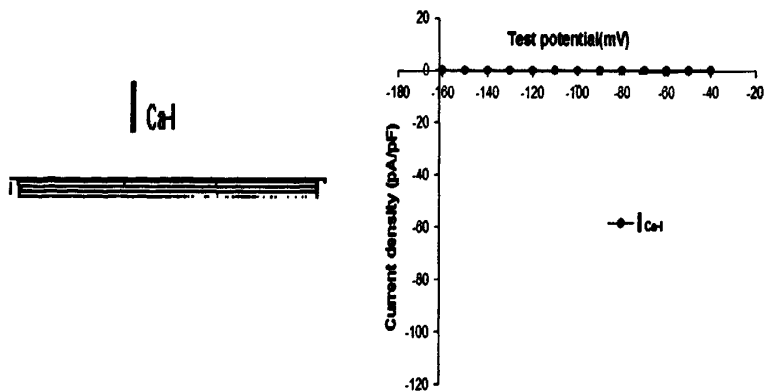


图 2-3 膜片钳全细胞记录模式未能检测到 CSCs 的 I_{Ca-1}

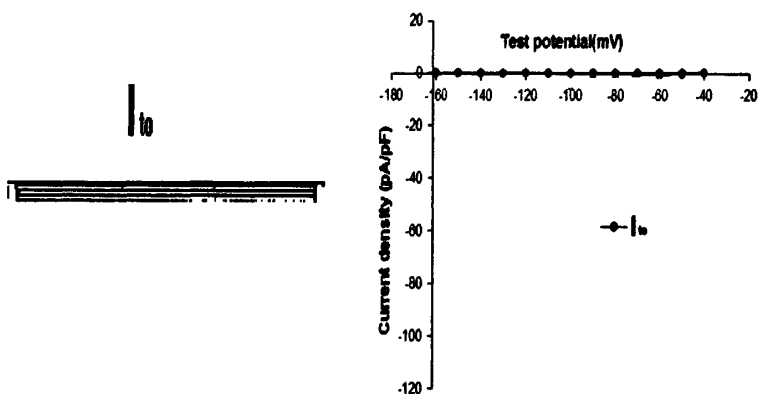


图 2-4 膜片钳全细胞记录模式未能检测到 CSCs 的 I_{to}



第3章 心肌干细胞移植对大鼠心肌梗死心电生理的影响

现阶段, 心肌梗死死亡率仍然较高^[1]。随着生物工程学发展, 干细胞替代治疗被认为是一种有前景的治疗方法。而 CSCs 的发现和体外成功分离^[2,3,4], 使 CSCs 成为了干细胞移植治疗心肌梗死中一个新研究热点。出于干细胞治疗与其来源相同器官疾病的考虑, CSCs 被认为可能是治疗心脏性疾病最好的种子细胞之一^[4]。然而, 干细胞的基础和动物实验研究显示, 干细胞移植治疗心肌梗死可能存在致心律失常性^[5,6,7]。实验证实 CSCs 移植对心肌梗死动物模型心功能有明显的提高作用, 但对心电生理影响却甚少报道。本实验目的是: 通过 CSCs 的移植, 观察其对大鼠心肌梗死心电生理的影响。

3.1 实验材料

3.1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 (350-450g), 由中山大学实验动物中心提供

3.1.2 主要试剂和仪器

3.1.2.1 PBS平衡液: 取KCL0.2g, KH₂PO₄0.2g, NaCL8.0g, Na₂HPO₄·12H₂O2.08g

酚红0.02g, 加入三蒸水950ml, 搅拌混匀, 充分溶解后调PH值为7.2, 补水至1000ml, 高压灭菌, 分装, 4℃保存

3.1.2.2 染色剂PKH26 (sigma 美国)

3.1.2.3 苯巴比妥钠 (merck 美国)

3.1.2.4 Cx43一抗 (santa cruz 美国) 荧光标记二抗 (anti-rabbit-488 中杉金桥)

3.1.2.5 脉冲刺激发生器 (Weil实验室 美国)

3.1.2.6 程序刺激仪 (DF-6A 中国)

3.1.2.7 生物信息采集系统 (Biopac 美国)

3.1.2.8 小动物呼吸机 (DW-3000 中国)

3.2 实验方法

3.2.1 大鼠心肌梗死模型的制备

26 只雄性 SD 大鼠 (350-450g) 建立心肌梗死动物模型^[8,9]。大鼠予以苯巴

比妥 45 mg/kg 腹腔注射麻醉, 气管插管, 连接呼吸机机械辅助呼吸, 设定潮气量 6.5 mL/kg, 呼吸频率 100 次/min。左侧胸部备皮, 消毒手术区域, 经左侧第 4 肋开胸, 暴露心脏, 分离心包, 用 5-0 无创丝线, 在左心房与肺动脉之间结扎冠状动脉左前降支, 术中, 心肌梗死区变成苍白色, 逐层缝合胸壁。自主呼吸恢复后, 拔出气管插管。大鼠清醒后送动物房饲养。

3.2.2 CSCs 准备

心肌梗死模型建立 2 周后, 消化 P3 代 CSCs, 予以 PKH26 进行细胞染色, 浓缩到 CSCs $5 \times 10^6/0.1$ ml 的浓度备用 (溶液为 PBS)。(图 3-1)

3.2.3 CSCs 移植

心肌梗死模型建立 2 周后, 20 只制作成功的心肌梗死模型大鼠, 随机分 2 组, 分别为心肌干细胞移植组 (CSCs 组) 和对照组 (PBS 组), 每组 10 只。心肌梗死大鼠第二次开胸, 开胸方法如前述。CSCs 组大鼠予以心肌梗死区心室内注射 CSCs ($5 \times 10^6/0.1$ ml) 0.1ml。PBS 组大鼠予以心肌梗死区心室内注射 PBS 0.1ml。术后, 逐层缝合胸壁。大鼠自主呼吸恢复后, 拔出气管插管, 清醒后送动物房饲养, 6 周后予以数据检查。

3.3 数据检测

CSCs 移植 6 周后, 心肌梗死大鼠第三次手术开胸 (方法如前述), 暴露心脏梗死区, 梗死边缘区与左室非梗死区。心肌梗死区 (Infarct area): 肉眼所见, 前降支支配范围内苍白色区域; 左室非梗死区 (Non-infarct zone): 左室游离壁正常心肌区域; 梗死边缘区 (Infarct marginal zone): 心肌梗死区与左室游离壁正常心肌连接区域。同时电极连接生物信息采集系统, 记录 II 道联心电图。

3.3.1 心室有效不应期 (ventricular effective refractory period, VERP) 的检测

刺激电极置于梗死边缘区和左室非梗死区, 参考电极置于皮下, 供程序刺激仪测定 VERP。测定 VERP 刺激程序: S1S2, S1S2S3 负向扫描法 (S1S2: S1 120ms, S2 100ms; S1S2S3: S1 120ms, S2 100ms, S3 100ms) S1: 8 个连续起搏周长 120ms, 步长为 10ms。VERP 为不能引起心室除极的最长 S1S2、S2S3 间期。心电数据通过生物信息采集系统记录于电脑。

3.3.2 心外膜单极电图记录

标测电极 (正极) 置于心外膜: 梗死区、梗死边缘区和左室非梗死区, 参考电极 (负极) 置于皮下, 电极连接生物信息采集系统, 分别记录各区单极电图。

心电数据通过生物信息记录系统记录于电脑。取窦性心律时段,测量单极心电图激动恢复时间(activation recovery time, ART)与计算激动恢复时间离散度(ART dispersion, ARTd)。并且通过 Bazett 方程校正($ARTc=ART/\text{square root from RR}$)得到:校正激动恢复时间(ARTc)和激动恢复时间离散度(ARTcd)。ART 是单极心电图 QRS 波斜率最少值与单极心电图 T 波斜率最大值之间的时间间期。ARTd 是同一只大鼠 ART 最大值与最少值之差^[10,11]。

3.3.3 恶性室性心律失常诱发

刺激电极置于梗死区、梗死边缘区和左室非梗死区,参考电极置于皮下,供程序刺激用。程序刺激方案:S1S2, S1S2S3(方案如前),burst 刺激(S1S1 周长分别为 100/90/80/70/60/50ms,持续时间 1s)。每个区域均接受 S1S2, S1S2S3 和 burst 刺激。心电数据通过生物信息记录系统记录于电脑。同一只大鼠,在任何部位、任何程序刺激下,诱发出室性心动过速和/或心室颤动视为诱发恶性室性心律失常成功。

3.3.4 室颤阈值(ventricular fibrillation threshold, VFT)的测定

刺激电极置于梗死区、梗死边缘区和左室非梗死区,参考电极置于皮下,脉冲刺激发生器电刺激用。VFT 的测定方法为串脉冲刺激法:刺激频率 30Hz,脉宽 10ms,持续时间 500ms,输出能量从 1mA 开始每次递增 1mA,直至诱发心室颤动,VFT 为能引起心室颤动的最小电流强度^[12]。心电信号通过生物信息记录系统记录于电脑。

3.3.5 免疫组织荧光

数据采集完成后,处死动物,取出心脏,对心脏梗死区和梗死边缘区行免疫组织荧光检测 Cx43。免疫荧光检测步骤:组织冰冻切片丙酮固定 10 分钟。PBS 洗 2 次,每次 5 分钟。10%正常山羊血清封闭 30 分钟。一抗 Cx43 (1: 50) 4℃ 孵育过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 分钟。荧光标记二抗(anti-rabbit-488, 1: 200)室温湿盒避光孵育 1 小时。PBS 洗 3 次,每次 5 分钟。DAPI 室温湿盒避光孵育 5 分钟。PBS 洗一次, 5 分钟。80%甘油封片。镜检,拍照。

3.3.6 统计学方法

计量资料以均数±标准差表示。两组间比较采用成组设计的样本均数的 t 检验。多组间比较采用完全随机设计的方差分析(one-way ANOVA)及多重比较采用最小有意义差异检验(LSD-t)。计数资料采用 fisher 精确检验。SPSS12.0 统计软件分析。显著性水准双侧 $\alpha=0.05$ 。

3.4 结果

3.4.1 大鼠手术后生存情况

26 只雄性 SD 大鼠, 在建立大鼠心肌梗死模型过程中, 20 只成功, 6 只死亡 (5 只死于心室颤动, 1 只死于大出血)。随后 CSCs 移植和数据检测过程中未再出现大鼠死亡。

3.4.2 对 VERP 的影响

在程序电刺激 S1S2 和 S1S2S3 条件下, CSCs 移植后对 VERP 影响无统计学差异。(表 3-1, 3-2)

Table 3-1 The influence of CSCs on measurement of VERP in program S1S2

Group	No.	Ventricular effective refractory period (ms)	
		Infarct marginal zone	Non-infarct zone
PBS group	10	64.0±7.0	63.0±6.7
CSCs group	10	62.0±6.3	65.0±5.3
P value		0.75	0.14

Values are means±SD. CSCs: cardiac stem cells; PBS: phosphate buffer solution; VERP: ventricular effective refractory period

Table 3-2 The influence of CSCs on measurement of VERP in program S1S2S3

Group	No.	Ventricular effective refractory period(ms)	
		Infarct marginal zone	Non-infarct zone
PBS group	10	63.0±6.7	66.0±8.4
CSCs group	10	66.0±5.2	64.0±8.4
P value		0.39	0.75

Values are means±SD. CSCs: cardiac stem cells; PBS: phosphate buffer solution; VERP: ventricular effective refractory period

3.4.3 对激动恢复时间以及激动恢复时间离散度的影响

经过心率校正, CSCs 移植后, 心肌梗死边缘区和左室非梗死区的校正激动恢复时间明显缩短, 校正激动恢复时间离散度明显下降; 梗死区校正激动恢复时间无明显差异。(表 3-3, 3-4)

Table 3-3 The influence of CSCs on measurement of ART and ARTd

Group	No.	activation recovery time (ART) (ms)			activation recovery dispersion(ARTd) (ms)
		Infarct area	Infarct marginal zone	Non-infarct zone	
PBS group	10	112.8±37.0	118.1±24.8	120.1±26.0	38.6±14.9
CSCs group	10	91.5±11.6	94.5±10.9	94.0±11.5	15.5±4.4
P Value		0.0991	0.0129	0.0094	0.000177

Values are means ± SD. CSCs: cardiac stem cell; PBS: phosphate buffer solution

Table 3-4 The influence of CSCs on measurement of ARTc and ARTcd

Group	No.	Correct activation recovery time (ARTc) (ms)			Correct activation recovery time dispersion (ARTcd) (ms)
		Infarct area	Infarct marginal zone	Non-infarct zone	
PBS group	10	250.1±67.4	257.2±40.8	265.8±50.0	72.1±23.2
CSCs group	10	217.1±27.5	223.2±17.8	220.7±19.3	33.3±11.7
P Value		0.1649	0.0261	0.0159	0.00017

Values are means ± SD. CSCs: cardiac stem cell; PBS: phosphate buffer solution

3.4.4 对恶性室性心律失常诱发率的影响

表 3-5 显示, CSCs 组更难诱发出恶性室性心律失常。

Table 3-5 The influence of CSCs on inducibility of malignant ventricular arrhythmias

Group	No.	Ventricular Arrhythmias	No ventricular Arrhythmias
PBS group	10	9	1
CSCs group	10	1	9

Fisher's exact test: P=0.00108 CSCs: cardiac stem cell; PBS: phosphate buffer solution

3.4.5 对 VFT 的影响

CSCs 移植后, 心肌梗死区、梗死边缘区和左室非梗死区 VFT 明显提高。在 PBS 组中, 梗死边缘区的 VFT 比梗死区低。(表 3-6)

Table 3-6 The influence of CSCs on measurement of VFT

Group	No.	ventricular fibrillation threshold (mA)		
		infarct area	infarct marginal zone	non-infarct zone
PBS group	10	4.0±1.6	2.5±0.8*	3.4±1.0
CSCs group	10	8.4±3.0	6.4±2.5	7.0±2.6
<i>P</i> value		0.00064	0.00016	0.00063

*: vs PBS group infarct area $p=0.002$

Values are means±SD. CSCs:cardiac stem cells; PBS: phosphate buffer solution;VFT: ventricular fibrillation threshold

3.4.6 免疫组织荧光结果

CSCs 组大鼠梗死区和梗死边缘区都可以检测到 Cx43 的表达, 并且与移植 CSCs 定位重叠。PBS 组大鼠梗死区和梗死边缘区 Cx43 表达量极少。(图 3-2, 图 3-3, 图 3-4, 图 3-5)

3.5 讨论

3.5.1 CSCs 移植后对激动恢复时间和激动恢复时间离散度的影响

心室外膜单极电图记录的激动恢复时间是评价心室传导、心室复极时间的重要指标。激动恢复时间离散度更加是评价心室复极均一性, 心室肌电稳定性的重要数据^[13,14]。Chauhan 等^[14]在临床实验中发现: 在患有心肌病的患者中, 伴有室性心律失常患者的激动恢复时间离散度比不伴有心律失常患者的要明显高。

心肌梗死后, 在梗死区和梗死边缘区往往出现以下变化: 1) 心肌细胞坏死或者凋亡, 心肌细胞数量明显减少^[15,16,17]; 2) 炎症细胞的浸润以及分泌大量的炎症因子^[18]; 3) 纤维疤痕形成^[19]。这些改变都导致梗死区, 梗死边缘区心肌电异质性增强, 电传导明显减慢^[14]。本实验显示: 经过心率校正后, CSCs 移植使得梗死边缘区和左室非梗死区的校正激动恢复时间明显缩短, 校正激动恢复时间离散度明显下降。提示: 当心肌梗死早期, CSCs 被注射到梗死区后, 能够在体内分化为心肌细胞, 增加了心肌细胞数量, 减少纤维沉积^[20], 降低梗死区和梗死边缘区电异质性, 从而加快了此区的电传导和复极, 最终提高了心室复极的均一性。所以移植 CSCs 可以改善心肌梗死后梗死区、梗死边缘区的电异质性, 提高心室复极均一性。

3.5.2 CSCs 移植后对恶性室性心律失常诱发率与 VFT 的影响

恶性室性心律失常诱发率和 VFT 是评价心脏电稳定性及心室易颤性的一项重要指标^[21]。CSCs 移植后对恶性室性心律失常诱发率和 VFT 影响的文献尚未见报导。

干细胞移植治疗心肌梗死,可以改善血流动力学,提高心功能^[20,22,23,24]。但是移植后的干细胞是否有致心律失常性,是一个令人关注的问题。其中尤以成肌细胞最突出。Sarah 等^[25]用成肌细胞移植入心肌梗死大鼠后,行电生理检查,诱发室速;结果显示:对照组 5/17 大鼠诱发出室速,而成肌细胞组 13/20 大鼠诱发出室速 ($p < 0.05$),显示出成肌细胞有明显的致心律失常性。而 Boyoung 等^[26]的实验显示:骨髓间质干细胞移植后对心肌梗死大鼠恶性室性心律失常诱发率无明显改变(对照组 25/53,骨髓间质干细胞组 18/52, $p=0.13$)。提示移植骨髓间质干细胞是安全的,但是对恶性室性心律失常诱发率无明显改善。然而本实验显示:恶性室性心律失常诱发率明显下降 ($p=0.00108$),而且 VFT 在梗死区、梗死边缘区和左室非梗死区明显提高。

目前认为,移植干细胞所致心律失常,往往由以下原因所导致:移植细胞内源性致心律失常作用;移植细胞与宿主心肌细胞之间的动作电位异质性;心肌注射所导致的局部损伤水肿^[27]。成肌细胞移植后,不能表达 Cx43 难以与宿主心肌细胞形成连接,并且有强烈的自发电活动,从而形成致心律失常起源^[25]。而骨髓间质干细胞和胚胎干细胞的体外实验显示:经过诱导分化为心肌样细胞后,其细胞电生理显示出动作电位的延迟,最终导致与宿主心肌细胞形成异质性^[7]。CSCs 在体内体外都可以经诱导分化为心肌细胞而非心肌样细胞,因而有更加良好的组织相容性。另外有实验显示,人 CSCs 经过诱导,分化为成熟的心肌细胞后,其电生理特性显出成熟心肌细胞特性:有稳定的膜电位,近似成熟心肌细胞的 I_{Na} , I_{Ca-L} and I_{Kl} 电流,形成与成熟心室肌相近的动作电位^[28]。提示 CSCs 移植后,能够和宿主心室肌细胞一起形成相近的动作电位,对比起其他干细胞移植所带来的区域电异质性增加,有明显优势。

CSCs 移植后,在梗死区与梗死边缘区定植分化,增加心肌细胞数量。本实验免疫组织荧光显示,分化后的 CSCs 表达缝隙连接蛋白 43 (Cx43)。Teun 等^[28]发现,CSCs 在体外诱导分化后,Cx43 转移到细胞膜上。提示:CSCs 在体内分化后,有可能表达 Cx43 蛋白与宿主心肌细胞形成连接。Cx43 蛋白是心室肌间数量最多、最重要的连接蛋白^[29,30]。有实验显示,在 Cx43 低表达的大鼠模型中,其室性心律失常和室颤明显增加^[31]。已有体外实验观察到:成肌细胞高表达 Cx43,可以减少成肌细胞与心肌细胞间的折返性心律失常^[25]。骨髓间质干细胞高表达 Cx43,可以增加存活和提高治疗效果^[32]。这些实验显示:Cx43 对心室肌电整合和移植细胞的定植有重要的作用。由此推断:CSCs 移植后,使梗死区和梗死边缘区电稳定性得到提高。

本实验结果显示,CSCs 移植后,心肌激动恢复时间、激动恢复时间离散度

得到改善,恶性室性心律失常诱发率下降,VFT提高,提示CSCs移植后对心肌梗死大鼠异常心电生理状态有改善作用。

然而本实验结果显示,CSCs移植后,左室非梗死区的VFT提高与校正激动恢复时间降低。这一现象不能用局部CSCs移植解释,但局部的CSCs移植,可能对非移植区域的心肌起间接影响作用。心肌梗死后,心肌细胞数量减少,导致心力衰竭。心力衰竭从而导致一连串复杂的反应:1)交感神经激活,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RASS)过度激活;2)心室肌重构;3)心室肌离子通道的改变(获得性离子通道病)等。 β 受体阻滞剂、血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体阻滞剂在循证医学研究中表现出降低心力衰竭患者心脏性猝死的效应,证明了抑制交感神经和RASS过度激活,可以减少恶性室性心律失常发生。心室肌重构,往往表现为肌成纤维细胞的增生,和细胞外基质沉着,导致心肌细胞间三维电网络的破坏,而出现致心律失常性电传导延缓和阻滞^[33,34,35]。而心力衰竭往往导致心室肌离子通道发生改变:瞬时外向钾电流(I_{to})、延迟整流钾电流(I_{KD})电流密度降低,导致动作电位时程增长,引起复极延迟和心电生理不稳定^[36]。这些实验都证明由于心力衰竭所导致的一连串反应都有可能增加恶性室性心律失常风险。已经有实验显示,CSCs用于治疗心肌梗死后心力衰竭的大鼠模型,能够显著提高大鼠的心功能和改善血流动力学状况,减轻心肌的重构、抑制交感神经和RASS的过度激活^[20,22,23,24]。本实验团队的另一组实验也观察到CSCs移植能改善心肌梗死大鼠心功能(论文待发表)。在本实验中心肌梗死大鼠移植CSCs6周后,显示出在左室非梗死区VFT提高与激动恢复时间的缩短,可能与大鼠心功能改善有关。

3.6 小结

3.6.1 CSCs移植后,可以改善大鼠心肌梗死电生理异常状态,提高VFT。

3.6.2 CSCs移植后,能够在定植区定植并且表达Cx43。

参考文献

- [1] Lloyd JD, Adams R, Carnethon M, et al. Heart disease and stroke statistics 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2009, 119: e21-e181
- [2] Nadal GB, Kajstura J, Leri A, et al. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*, 2003, 92: 139-150
- [3] Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, et al. Evidence for cardiomyocyte

- repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res*, 2002, 90: 634-640
- [4] Messina E, Luciana DA, Giacomo F, et al. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine heart. *Circ Res*, 2004, 95: 911-921
- [5] Menasché P. Stem cell therapy for heart failure: are arrhythmias a real safety concern? *Circulation*, 2009, 119(20): 2735-2740
- [6] Ly HQ, Nattel S. Stem cells are not proarrhythmic: letting the genie out of the bottle. *Circulation*, 2009, 119(13): 1824-1831
- [7] Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, et al. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, 2002, 106(10): 1294-1299
- [8] Wang T, Tang W, Sun S, et al. Mesenchymal stem cells improve outcomes of cardiopulmonary resuscitation in myocardial infarcted rats. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(3): 378-384
- [9] Wang T, Tang W, Sun S, et al. Intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells improves brain function after resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med*, 2008, 36(11): 486-491
- [10] Azarov JE, Shmakov DN, Vityazev VA, et al. Activation and repolarization patterns in the ventricular epicardium under sinus rhythm in frog and rabbit hearts. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007, 146: 310-316
- [11] Xia Y, Kongstad O, Hertvig E, et al. Activation recovery time measurements in evaluation of global sequence and dispersion of ventricular repolarization. *J Electrocardiol*, 2005, 38(1): 28-35
- [12] Wang H, Tang W, Ristagno G, et al. The potential mechanisms of reduced incidence of ventricular fibrillation as the presenting rhythm in sudden cardiac arrest. *Crit Care Med*, 2009, 37(1): 26-31
- [13] Conrath CE, Opthof T. Ventricular repolarization: An overview of pathophysiology, sympathetic effects and genetic aspects. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006, 92(3): 269-307
- [14] Chauhan VS, Downar E, Nanthakumar K, et al. Increased ventricular repolarization heterogeneity in patients with ventricular arrhythmia vulnerability and cardiomyopathy: a human in vivo study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290: H79-H86
- [15] Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther*, 2004, 104: 1-16
- [16] Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *J Card Fail*, 2006, 12: 381-391
- [17] Nepomnyashchikh LM, Semenov DE. Apoptosis of cardiomyocytes as extreme manifestation of regeneration and plastic insufficiency of myocardium. *Bull Exp Biol Med*, 2000, 130: 903-907

- [18] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML, et al. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2002, 53(1): 31-47
- [19] Mollmann H, Nef HM, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodeling. *Cardiovasc Res*, 2006, 71: 661-671
- [20] Marcello R, Elena PL, Yu M, et al. Infarcted myocardium improving cardiac function local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred. *Circ Res*, 2008, 103: 107-116
- [21] Cittadini A, Monti MG, Isgaard J, et al. Aldosterone receptor blockade improves left ventricular remodeling and increases ventricular fibrillation threshold in experimental heart failure. *Cardiovasc Res*, 2003, 58(3): 555-564
- [22] Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*, 2007, 115(7): 896-908
- [23] Wang X, Hu Q, Nakamura Y, et al. The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*, 2006, 24(7): 1779-1788
- [24] Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*, 2010, 121(2): 293-305
- [25] Sarah F, Jean CA, Gilles L, et al. Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovascular Research*, 2006, 69: 348-358
- [26] Boyoung J, Il KK, Lee MH, et al. Bone Marrow Mononuclear Stem Cells Transplanted in Rat Infarct Myocardium Improved the Electrical Conduction without Evidence of Proarrhythmic Effects. *Yonsei Med J*, 2007, 48(5): 754-764
- [27] Makkar RR, Lill M, Chen PS. Stem cell therapy for myocardial repair: is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42: 2070-2072
- [28] Teun PB, Toon ABV, Malin KB, et al. Human cardiomyocyte progenitor cell-derived cardiomyocytes display a matured electrical phenotype. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 40: 254-260
- [29] Karen M, Sharon EC, Lin XM, et al. Cx43 CT domain influences infarct size and susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 2009, 84: 361-367
- [30] Stefan D, Anja H, Joanna J, et al. Improving cardiac gap junction communication as a new antiarrhythmic mechanism: the action of antiarrhythmic peptides. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol*, 2010, 381(3): 221-234
- [31] van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, et al. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation*, 2004, 109: 1048-1055

- [32] Wang D, Shen W, Zhang F, et al. Connexin43 promotes survival of mesenchymal stem cells in ischemic heart. *Cell Biol Int*, 2010, 34(4): 415-423
- [33] Rohr S. Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias? *Heart Rhythm*, 2009, 6(6):848-856
- [34] Miragoli M, Salvarani N, Rohr S, et al. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res*, 2007, 101(10):e114
- [35] Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S, et al. Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circ Res*, 2006, 98(6): 801-810
- [36] Lankipalli RS, Zhu T, Guo D, et al. Mechanisms underlying arrhythmogenesis in long QT syndrome. *J Electrocardiol*, 2005, 38: 69-73

CSCs stained by PKH26

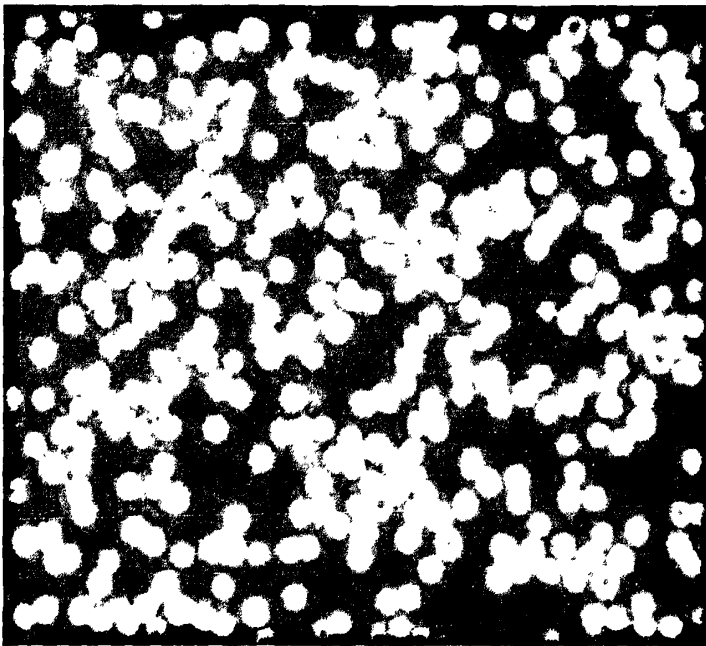


图 3-1 CSCs 移植前, PKH26 对 CSCs 染色

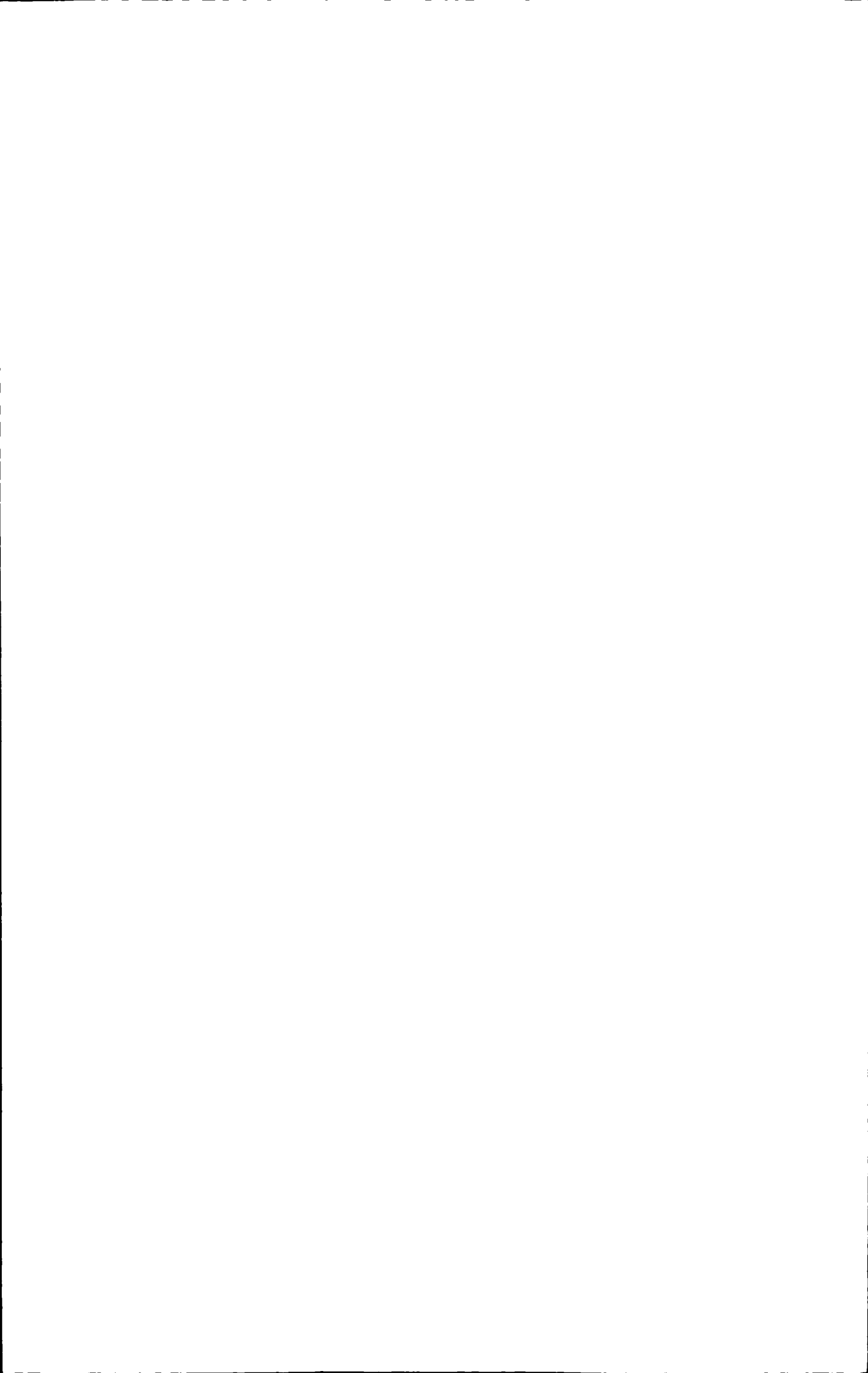
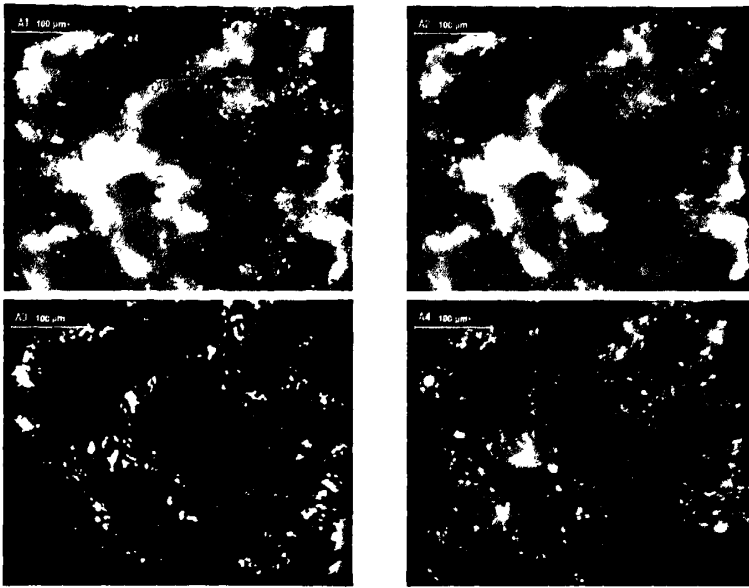
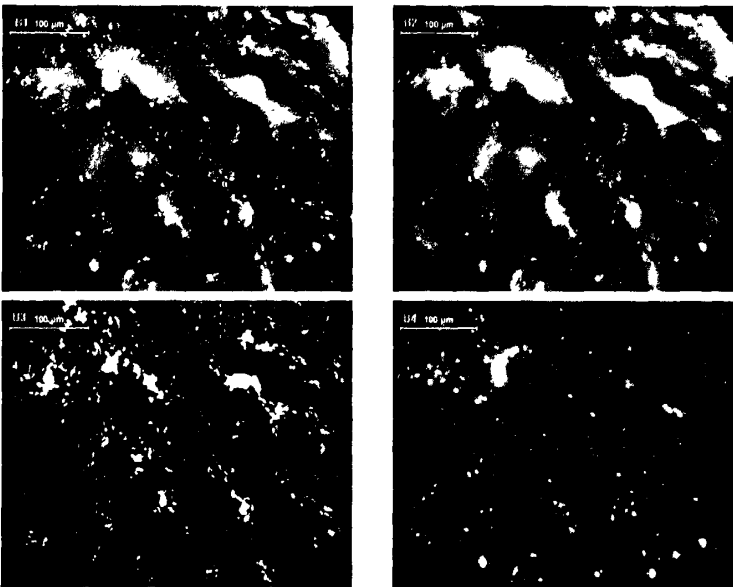


图 3-2 心肌梗死区 PKH26 标记的 CSCs 表达 Cx43



A1: A2 与 A4 叠加图; A2:CSCs 表达 Cx43; A3:细胞核定位; A4: PKH26 标记 CSCs

图 3-3 心肌梗死边缘区 PKH26 标记的 CSCs 表达 Cx43



A1: A2 与 A4 叠加图; A2:CSCs 表达 Cx43; A3:细胞核定位; A4: PKH26 标记 CSCs

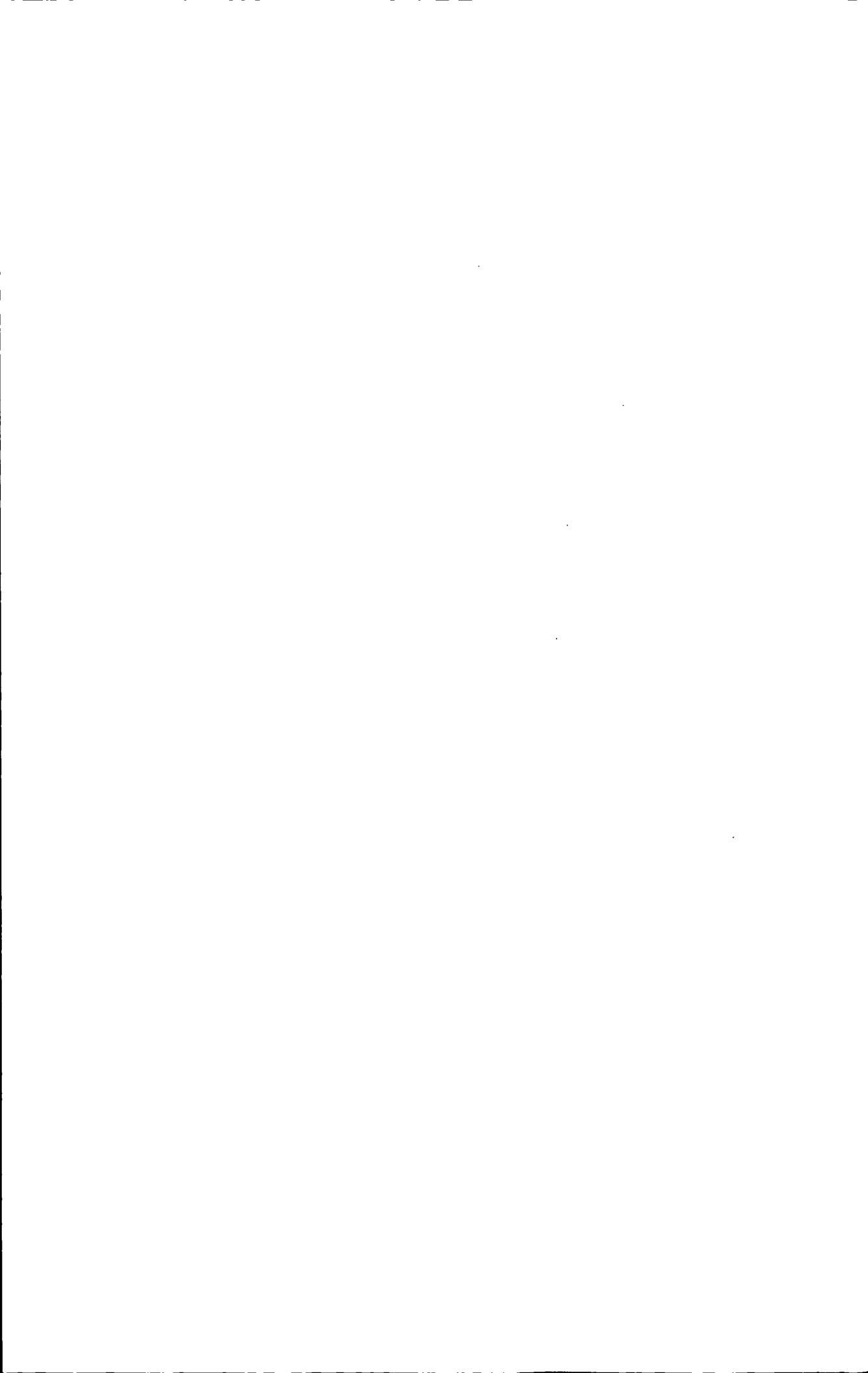
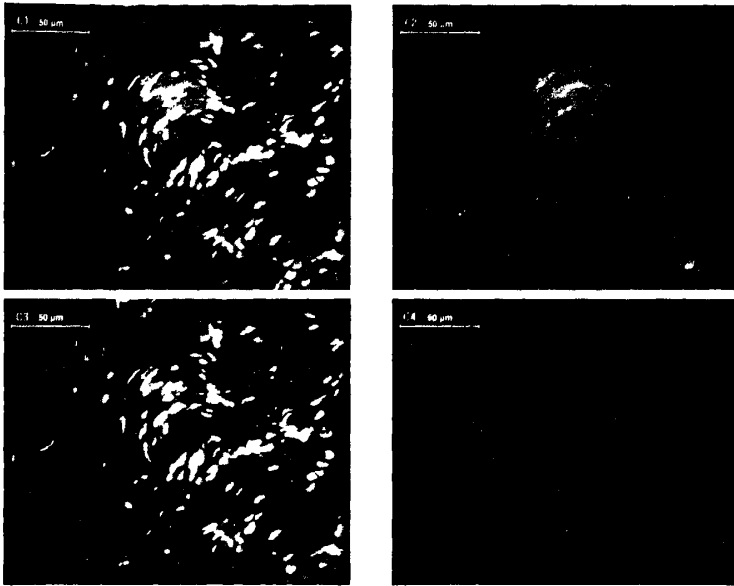
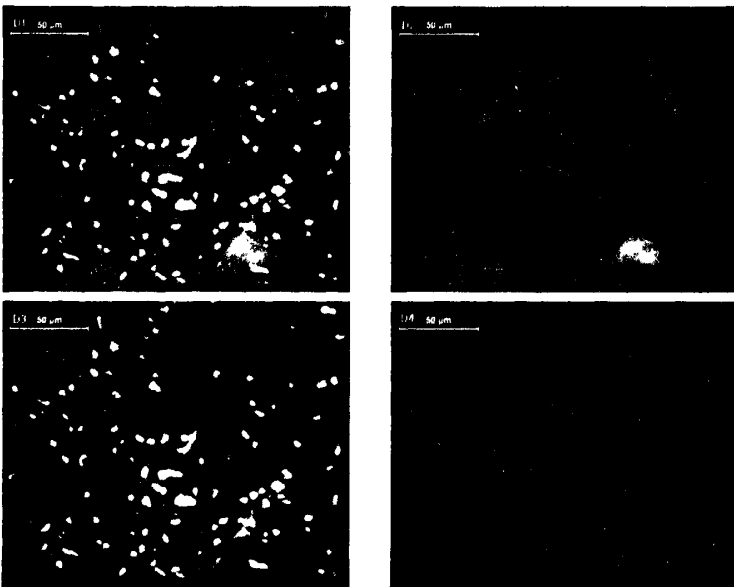


图 3-4 对照组心肌梗死区未见 Cx43



A1: A2 与 A4 叠加图; A2: 未见 Cx43 表达; A3: 细胞核定位; A4: 未见 CSCs

图 3-5 对照组心肌梗死边缘区未见 Cx43 表达



A1: A2 与 A4 叠加图; A2: 未见 Cx43 表达; A3: 细胞核定位; A4: 未见 CSCs



第 4 章 实验局限性、创新点与全文总结

4.1 局限性

4.1.1 未能观察大鼠心肌梗死经 CSCs 移植治疗后更长时间的心电生理及其心律失常情况。

4.1.2 未能对 CSCs 移植后，心肌梗死大鼠 VFT 提高的机制作进一步探讨。

4.2 创新点

4.2.1 本实验观察到：大鼠 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下，已经有离子通道 mRNA 的表达，但是膜片钳全细胞记录模式未能检测到离子电流。

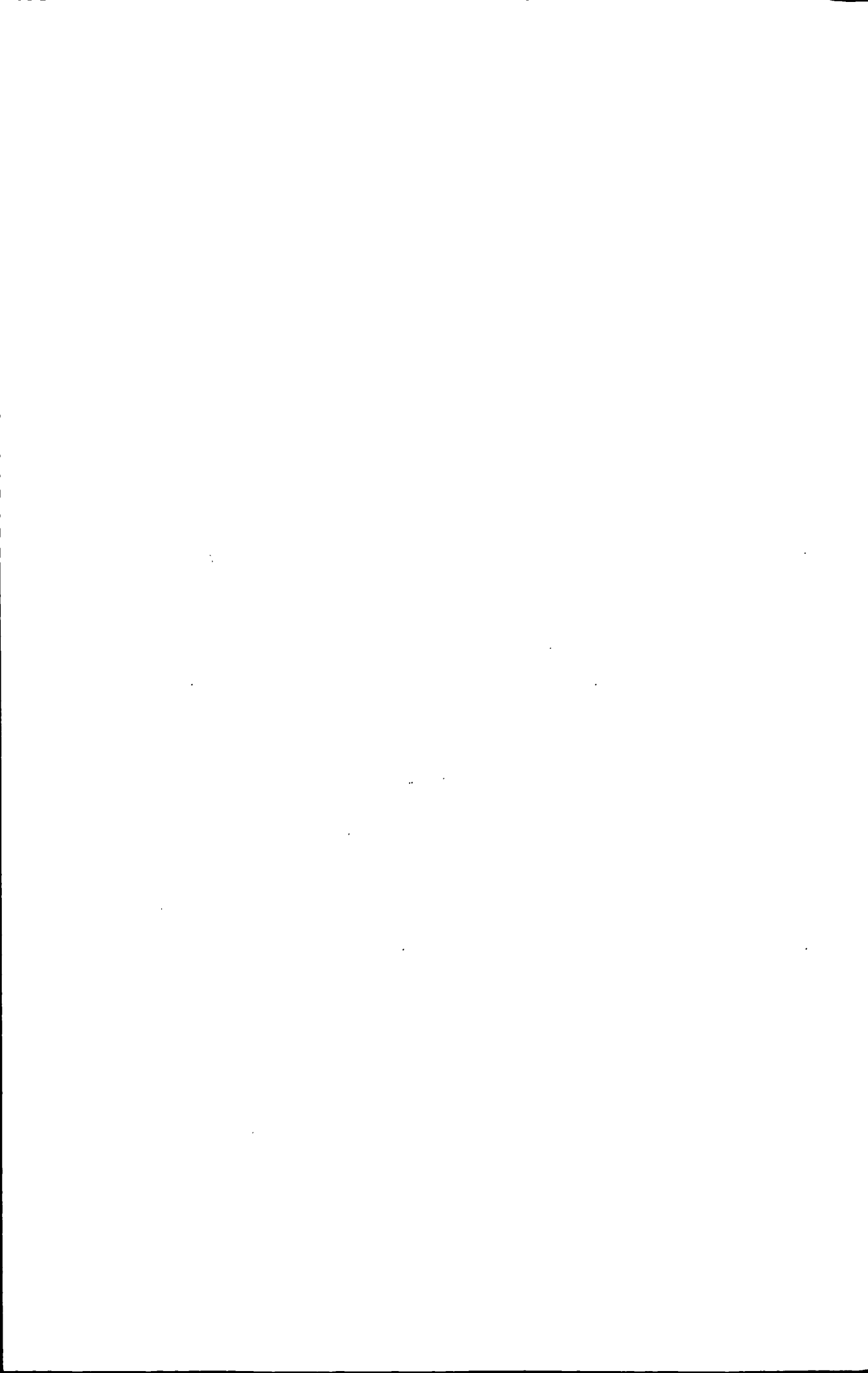
4.2.2 本实验观察到：CSCs 移植后，可以改善心肌梗死大鼠电生理异常状态，缩短激动恢复时间离散度，提高 VFT。

4.3 全文结论

4.3.1 CSCs 可以从心肌中分离，进行体外培养增殖。并且可以在体外诱导分化为心肌细胞。

4.3.2 大鼠 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下，已经有离子通道 mRNA 的表达，但是膜片钳全细胞记录模式未检测到离子电流存在。

4.3.3 CSCs 移植后，可以改善大鼠心肌梗死心电生理异常状态，提高 VFT。



综述

干细胞膜电流特性及其致心律失常作用

郑韶欣

中山大学孙逸仙纪念医院心血管内科

摘要: 干细胞移植治疗心肌梗死后心力衰竭成为新的研究热点。然而仍有很多问题待解决,其中潜在致心律失常性尤其被关注。现对干细胞膜电流特性及其致心律失常作用作一综述。

关键词: 电生理学; 干细胞; 膜电流; 心律失常

The Characteristics of Membrane Currents and The Arrhythmogenic in Stem Cell

Zheng Shaoxin

Department of Cardiology, The Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University

Abstract: Stem cell transplantation for heart failure after myocardial infarction has become a hotspot. However, A lot of problems remain to be solved. The arrhythmogenic of the stem cell is now strongly concerned. The characteristics of membrane currents of stem cells and the arrhythmogenic are reviewed in this article.

Key words: electrophysiology; stem cell; membrane currents; arrhythmia

干细胞(stem cell)移植术是利用成体或胚胎干细胞,移植入梗死区或梗死边缘区,在心肌局部微环境作用,诱导干细胞分化为新的心肌和血管组织的技术。现阶段研究用于治疗心血管疾病的干细胞种类主要有:骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、成肌细胞(myoblast)、胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)和心肌干细胞(cardiac stem cells, CSCs)。干细胞移植治疗心肌梗死后心力衰竭,主要针对心肌细胞数量损失作为靶治疗方向,被认为是一种有前景的治疗手段。实验显示,干细胞移植对心肌梗死后心力衰竭有明显的改善作用^[1-4]。

干细胞移植然仍有很多问题需要解决,其中潜在致心律失常性尤其被关注。有学者推测干细胞致心律失常机制可能如下^[5,6]: (1)用于移植的干细胞存在自发

性电活动,形成局灶性异位起搏点,而存在致心律失常可能性;(2)成活细胞与宿主心肌细胞之间存在电生理异质性和成活细胞不能与宿主心肌细胞形成电耦联,容易形成折返和触发活动;(3)移植途径:心肌内注射所导致的机械、炎症刺激;(4)干细胞移植后,旁分泌改变了交感神经的活性。其中,干细胞膜电流特性对前两点影响尤为重要,所以本文将对干细胞膜电流特性及其致心律失常作用作一综述。

1 骨髓间质干细胞

MSCs 来源于骨髓,是成体干细胞的一种,具有自我更新,横向分化潜能,其中包括分化成心肌细胞^[7]。MSCs 数量稳定,在生命过程长期存在;取材容易,可以自体移植,不存在排斥反应;易分离,体外长期培养,冷冻后不改变分化潜能;自体移植不存在伦理学问题^[8]。

动物和临床实验显示:MSCs 用于治疗心肌梗死,慢性心力衰竭有着良好的临床应用前景^[2,9]。而在细胞层次的电生理研究中显示:MSCs 与成熟心肌细胞间存在显著的电生理差异。目前在 MSCs 上共记录到钠通道电流、L 型钙通道电流、钙相关性钾通道电流、瞬时外向钾通道电流、延迟整流钾通道电流等^[10-12]。这些离子通道的电流密度远远低于成熟的心室肌细胞,并且其检查比例只能达到 10%-40%^[10]。而每个研究小组的结果之间不尽相同,考虑是:研究小组所用 MSCs 的传代次数不同,细胞培养条件不一,使细胞周期循环存在差异,最终导致结果的不一性^[13-16]。

在 MSCs 诱导分化为心肌样细胞后,其电生理特性也发生改变。在 MSCs 与乳鼠心室肌细胞共培养,诱导 MSCs 分化为心肌细胞后,其显示出内向整流钾通道电流、瞬时外向钾通道电流和持续性外向钾通道电流都明显增加,和心室肌电生理特性相似;但难以记录到钠电流和钙电流^[17]。而在 5-氮杂胞苷诱导下,MSCs 分化为心肌样细胞后,其内向整流钾电流呈明显的不均一性,少部分细胞与正常心室肌细胞相似,但总体上其电流密度低于正常心室肌细胞^[18]。

可见 MSCs 在分化为心肌样细胞前后,都能够表现出一定的电流特征,但是都与成熟心室肌细胞存在明显的不一致性。而细胞电生理不一致性,往往导致移植细胞后,出现移植区域的传导缓慢或阻滞,形成折返机制,增加心律失常发生率。这观点在 Chang 等^[19]通过 MSCs 与乳鼠心室肌细胞体外共培养,检测其传导速度得到证实。由此可见,移植 MSCs 存在致心律失常性可能。

2 成肌细胞

成肌细胞为骨骼肌的前体细胞,来源于肌细胞纤维的基底膜,可以在损伤时迅速动员、增殖,使得损伤肌肉再生^[20]。成肌细胞容易从肌肉组织中分离、培养、增殖,并且在培养后可以产生收缩活动,所以被认为是心肌细胞移植的候选种子细胞之一^[21]。

成肌细胞诱导分化为横纹肌样细胞后,具有电活动和收缩功能,能够表达钠

通道, 氯通道, 瞬时外向钾通道^[22], 但是内向整流钾通道, L 型钙通道则不表达。成肌细胞移植后, 去极化引起其钠通道短暂快速的开放, 钠离子内流, 同时氯通道开放, 氯离子进入细胞内使膜电位回到静息状态。但是钠离子电流密度明显低于心室肌细胞, 而且缺乏内向整流钾电流和 L 型钙通道电流, 所以表现为能自兴奋性, 动作电位幅度低, 缺乏平台期, 动作电位时程短, 呈显著的骨骼肌特性^[23]。尽管成肌细胞在心肌环境中, 可发生环境依赖性分化, 其细胞表型和电生理特性可向心肌细胞过渡, 但是其动作电位幅度仍然较心室肌细胞低^[24,25]。Abraham 等^[26]在成肌细胞和心肌细胞共同培养单层细胞研究中, 发现成肌细胞出现自发性电活动, 并且发生电传导延缓, 形成持续折返性螺旋波, 这与室性心动过速的电生理机制相同。

另外, 缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 是心室肌间数量最多、最重要的连接蛋白^[27,28]。而成肌细胞移植后, 在心肌组织内则不能表达 Cx43, 导致成肌细胞不能与宿主心肌细胞进行电耦联, 最终成肌细胞的收缩完全独立于宿主心肌细胞^[23]。通过转基因的方法, 使成肌细胞高表达 Cx43, 则可以减少成肌细胞与心肌细胞间的折返性心律失常^[29]。

由此可见, 成肌细胞在体外诱导分化和心肌环境中所表现出的电生理特性与心肌细胞有巨大差异, 并且有自发电活动, 导致移植局部心肌电不均一性增加。而且移植后成肌细胞与宿主心肌间不能形成有效电耦联, 导致局部电传导障碍, 形成折返的产生, 最终产生严重室性心律失常。

3 胚胎干细胞

ESCs 是由早期胚胎的内细胞团或桑椹胚分离而建立的具有分化全能的细胞^[30]。ESCs 的显著特征是在体外不分化状态下保持无限增殖能力, 并仍具备稳定的发育潜能^[32]。Doetschman 等^[32]在 1985 年, 首先观察到 ESCs 在体外有多向分化能力, 可以分化为三个胚层的多种细胞, 其中就包括有在一定培养条件下能够分化出自发收缩的心肌样细胞。

Doevendans 等^[33]报道, 通过对 ESCs 诱导, 分化为心肌样细胞。在分化第 11-12 天和第 15-16 天, 细胞膜上均可记录到钠通道、L 型钙通道和钾通道电流, 这些电流与胚胎期小鼠心肌细胞膜上同种电流特性基本相似。然而 Zhang 等^[34]实验显示: ESCs 能分化为不同种类心肌细胞群, 分化后细胞的动作电位时程明显延长, 最大上升速率 (dV/dt) 明显降低; 在钙拮抗剂和氯化四乙铵作用下容易触发 2 相及 3 相早期后除极; 这些特点均与成熟心室肌细胞电生理特性明显不一致, 有可能参与心律失常的折返、触发、自律性机制。此外, 有学者对 ESCs 诱导分化为心肌样细胞后, 检测其分化的种类。结果显示: 73.5%(n=34)的细胞记录到典型心房肌细胞动作电位; 20.5%(n=9)细胞表现为起搏细胞动作电位; 只有 1 个细胞显示了典型的心室肌细胞动作电位的特征^[35]。

由此可见, ESCs 经诱导分化为心肌样细胞后, 表现出多种电生理特性, 并

且与心室肌细胞电生理特性不完全一致,存在致心律失常可能性。而且 ESCs 由于其伦理学问题,仍然停留在动物实验的阶段,暂时没有临床实验。并且 ESCs 有可能引起排斥反应和潜在致瘤性而限制其以后临床应用^[34]。

4 心肌干细胞

既往观点认为,出生后心肌细胞即向终末分化,不能够增殖。然而, Megency 等^[36]首次证实出生后的老鼠心脏中存在有 CSCs,推翻了这一观点。之后 Messina 等^[37]从人和老鼠心脏内成功地分离和培养出 CSCs,使之成为了新的研究热点。近期,有研究组成功在成人心肌活检组织中,分离 CSCs,并且在体外培养增殖^[38,39]。这技术的成功建立,为 CSCs 的临床应用打下坚实的基础。

在 CSCs 移植用于治疗心肌梗死后心力衰竭的动物实验中,结果显示: CSCs 移植到心肌梗死动物模型后,减少心肌梗死面积,减轻心室重构,降低心室舒张末径,改善心功能^[40,41,42,43]。然而,在动物实验层次, CSCs 移植对心电生理影响的研究,却未见报道。在细胞电生理研究方面, Yi 等^[44]对老鼠 CSCs 在未分化为心肌细胞的状态下,进行膜片钳检测。结果显示,发现三种膜电流的存在,包括延迟整流钾电流、内向整流钾电流和电压门控氯电流。其中电压门控氯电流是对 CSCs 增殖起调控作用的。但是此实验未检测出钠电流和钙电流的存在。Teun 等^[45]则对 CSCs 诱导分化为心肌细胞后,对之进行膜片钳检测,结果令人鼓舞。实验显示, CSCs 可以表达 Cx43,但是主要在胞浆中;经过诱导分化后, Cx43 则整合到细胞膜上,预示着 CSCs 移植后,有可能与宿主细胞形成电耦联。CSCs 诱导分化为心肌细胞后,膜片钳检测出其存在钠电流, L 型钙电流,外向整流钾电流,并且电流密度与成熟心室肌细胞极度相似,预示着 CSCs 移植后,与宿主心室肌细胞的电相容性较好。

尽管现阶段实验显示, CSCs 诱导分化为心肌细胞后,其电生理特性与成熟心室肌细胞相近,预示着 CSCs 移植可能可以减少心律失常的发生,但是这推测仍缺乏动物实验的支持。

5 小结

综上所述, MSCs、成肌细胞和 ESCs 在诱导分化为心肌样细胞后,其膜电流和电生理特性与成熟心室肌细胞存在明显差异,导致异位性起搏点、传导延迟和触发活动形成,从而表现出致心律失常性。所以,寻找一种电生理特性与心室肌细胞相似,并且能够与宿主细胞形成电耦联的新的种子细胞,成为减少干细胞移植所致心律失常的关键。CSCs 是来源于心肌组织,能够在体外分化为心肌细胞、血管平滑肌细胞和血管内皮细胞等^[46],与心肌组织相容性良好;并且诱导分化为心肌细胞后,其电生理特性与成熟心室肌细胞相近,有希望成为一种更为优越的种子细胞,用于干细胞移植治疗。

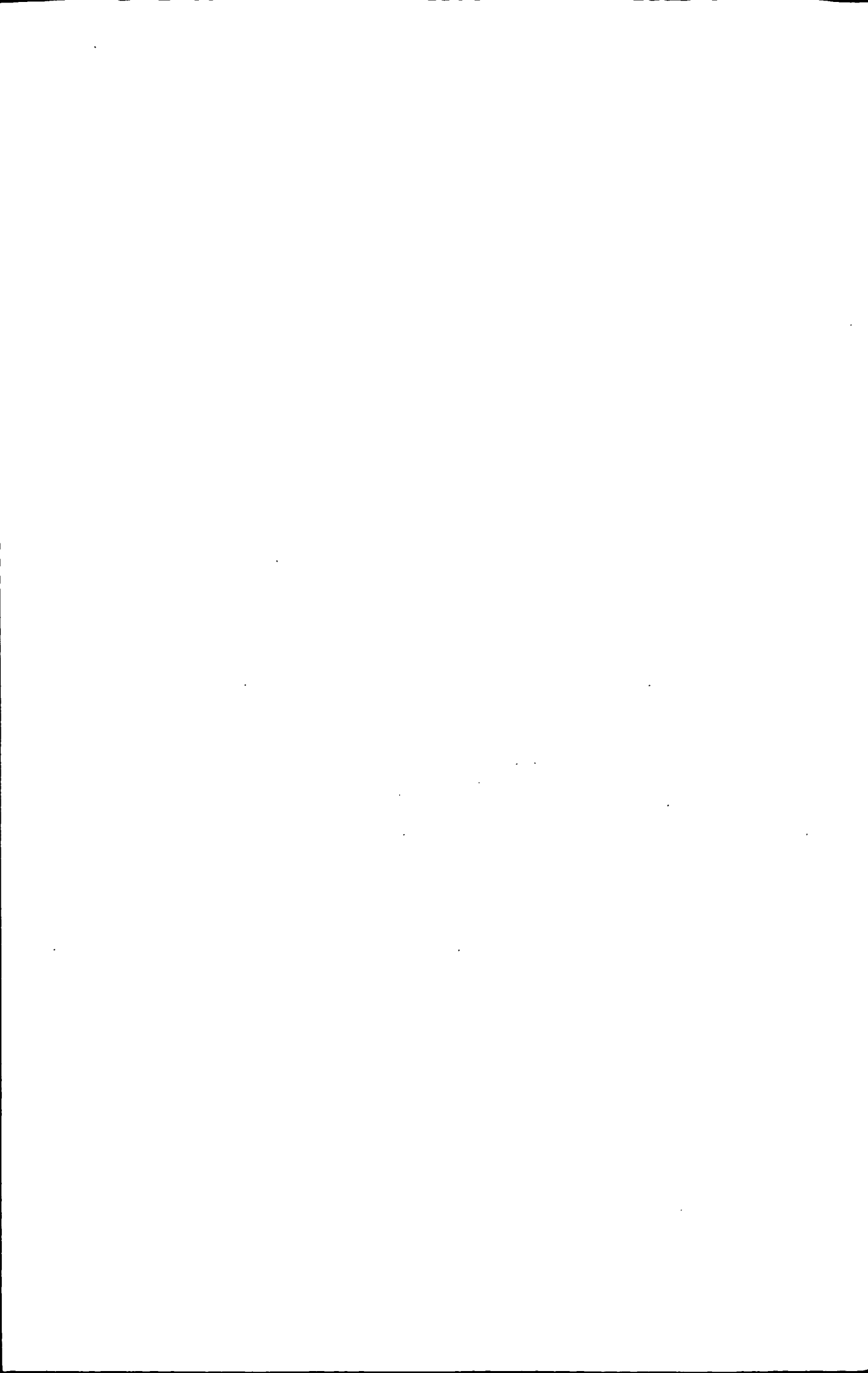
参考文献

- [1] Claudine M, Albert AH, Onnik A, et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet*, 2005, 366: 1005-1012
- [2] 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. *Am J Cardiol*, 2004, 94: 92-95
- [3] Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*, 2001, 357: 279-280
- [4] Herreros J, Prosper F, Perez A, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal musclederived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2003, 24:2012-2020
- [5] Makkar RR, Lill M, Chen PS. Stem cell therapy for myocardial repair: is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardio*, 2003, 42: 2070-2072
- [6] Menasche P. Myoblast transplantation: feasibility, safety and efficacy. *Ann Med*, 2002, 34: 314-315
- [7] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999, 103: 697-705
- [8] Bodo ES, Ran K. Stem Cell Therapy in Perspective. *Circulation*, 2003, 107: 929-934
- [9] Shyu KY, Wang BW, Hung HF, et al. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *Journal of Biomedical Science*, 2006, 13: 47-58
- [10] Gui R, Li HY, Sun XL, et al. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells*, 2005, 23: 371-382
- [11] Seiko K, Keishi O, satoshi S, et al. Ca^{2+} oscillations regylated by Na^+Ca^{2+} exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump induce fluctuations of membrane currents and potential sin human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium*, 2003, 34: 145-156
- [12] Heubach JF, Graf EM, Leut HJ, et al. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol*, 2004, 554: 659-672
- [13] Li GR, Deng XL, Sun HY, et al. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells*, 2006, 24: 1519-1528
- [14] Macfarlane SN, Sont HH. Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord ast rocytes. *Glia*, 2002, 30: 39-48
- [15] Park KS, Jung KH, Kim SH, et al. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells*, 2007, 25:

2044-2052

- [16] Rong T, Chu PL, Hung FT, et al. Functional ion channels in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293: C1561- C1567
- [17] 朱松龄, 蔡本志, 刘嘉祺等. 心肌微环境诱导骨髓间充质干细胞心肌化时电生理特性研究. *哈尔滨医科大学学报*, 2010, 44: 26-28
- [18] 韦育林, 伍卫, 王景峰等. 骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌细胞及其内向整流钾电流特征. *中山大学学报(医学科学版)*, 2005, 26: 396-399
- [19] Chang MG, Tung L, Sekar RB, et al. Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model. *Circulation*, 2006, 113: 1832 – 1841
- [20] Philippe M. Skeletal myoblast for cell therapy. *Coronary Artery Disease*, 2005, 16: 105-110
- [21] van den Bos EJ, Davis BH, Taylor DA. Transplantation of skeletal myoblasts for cardiac repair. *J Heart Lung Transplant*, 2004, 23: 1217-1227
- [22] Ott HC, Berjukow S, Marksteiner R, et al. On the fate of skeletal myoblasts in a cardiac environment down regulation of voltagegated ion channels. *J Physiol*, 2004, 558: 793-805
- [23] Leobon B, Garcin I, Menasche P, et al. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7808-7811
- [24] Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP, et al. Postnatal myocardial augmentation with skeletal myoblastbased fetal tissue engineering. *Surgery*, 2006, 140: 100-107
- [25] Zebedin E, Mille M, Speiser M, et al. C2C12 skeletal muscle cells adopt cardiac-like sodium current properties in a cardiac cell environment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: H439-H450
- [26] Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, et al. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res*, 2005, 97:159-167
- [27] Karen M, Sharon EC, Lin XM, et al. Cx43 CT domain influences infarct size and susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 2009, 84: 361-367
- [28] Stefan D, Anja H, Joanna J, et al. Improving cardiac gap junction communication as a new antiarrhythmic mechanism: the action of antiarrhythmic peptides. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol*, 2010,38: 221-234
- [29] Sarah F, Jean CA, Gilles L, et al. Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovascular Research*, 2006, 69: 348-358
- [30] Evans MJ , Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154-156
- [31] Ueda O, Jishage K, Kamada N, et al. Production of mice entirely derived from embryonic stem cell with many passages by coculture of ES cells with

- cytochalasin B induced tetraploid embryos. *Exp Anim*, 1995, 44: 205-210
- [32] Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, et al. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 1985, 87: 27-45
- [33] Doevendans PA, Kubalak SW, An RH, et al. Differentiation of cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32: 839-851
- [34] Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, et al. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, 2002, 106: 1294-1299
- [35] 于艳秋, 段亚琦, 张义侠等. 小鼠胚胎干细胞分化心肌细胞过程中基因表达情况和电生理特性研究. *中国病理生理杂志*, 2006, 22: 666-669
- [36] Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, et al. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett*. 2002; 530 (1-3):239-243.
- [37] Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004; 95 (9):911-921
- [38] Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. 2007, *Circulation*, 115: 896-908
- [39] Davis DR, Zhang Y, Smith RR, et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One*, 2009, 4:e7195.
- [40] Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*, 2010, 106: 971-980
- [41] Matsuura K, Honda A, Nagai T, et al. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119: 2204-2217
- [42] Marcello R, Elena PI, Yu M, et al. Infarcted myocardium improving cardiac function local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred. *Circ Res*, 2008, 103: 107-116
- [43] Johnston PV, Sasano T, Mills K, Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 2009, 120: 1075-1083
- [44] Yi H, Chen JD, Liu ZM, et al. Functional ion channels in mouse cardiac c-kit+ cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298: C1109-C1117
- [45] Teun PB, Toon ABV, Malin KB, et al. Human cardiomyocyte progenitor cell-derived cardiomyocytes display a matured electrical phenotype. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 40: 254-260
- [46] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003, 114(6):763-776



英文缩略语

英文缩写	中文全称
ESC _s	胚胎干细胞
MSC _s	骨髓间质干细胞
CSC _s	心肌干细胞
Cx43	缝隙连接蛋白 43
cTn I	心肌钙蛋白 I
SD rat	SD 大鼠
CEM	完全移植物培养液
CGM	心肌球培养液
I_{Na}	钠电流
I_{Ca-L}	L 型钙通道电流
I_{to}	瞬时外向钾电流
VERP	心室有效不应期
ART	激动恢复时间
ARTd	激动恢复时间离散度
ARTc	校正激动恢复时间
ARTcd	校正激动恢复时间离散度
VFT	室颤阈值
RASS	肾素血管紧张素醛固酮系统



在读期间发表论文

Zheng SX, et al. Improvements of cardiac electrophysiological stability and ventricular fibrillation threshold in rats with myocardial infarction treated with cardiac stem cells. (已投出, 待发表)



致 谢

本课题是在导师伍卫教授的悉心指导下完成的,衷心感谢导师伍卫教授五年来在学业上对我的悉心指导和谆谆教诲,在生活中无微不至的关怀。导师严谨的科学思维、极大的工作热忱、良好的医德医风和对专业知识孜孜不倦的追求是我一生学习的楷模!

特别感谢王彤教授在本课题中对本人的指点和帮助,以及对本人的鞭策。

衷心感谢王景峰教授、刘品明教授、周淑娴教授、聂如琼教授、杨莉教授、谭桂明副教授、韦育林副教授、张玉玲副教授、耿登峰副教授、刘英梅副教授、黄至斌副教授、罗年桑老师、方昶老师、袁沃亮老师、谢双伦老师、陈样新老师、袁桂仪老师、雷娟老师、林永青老师五年来对我的关心、支持和帮助!

感谢陈柏深博士、赵永博士、王莹师妹、周长青师弟在实验中给予我热心帮助!

感谢心内科以及内科的全体老师和同学对我工作和学习的关心和支持!

感谢我的家人和所有关心、帮助过我的朋友们!

