

◆ 实验研究

Targeted microbubbles in promoting angiogenesis and changes of myocardial mechanics after stem cell transplantation in rabbit models of acute myocardial infarction

ZENG Qian-qian¹, CAO Gui-qiu², MU Yu-ming^{1*}, TANG Qi¹, WANG Chun-mei¹

(1. Medical Center of Echocardiography, the First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Department of Geratology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective** To assess the efficacy of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) being transplanted into rabbit models of acute myocardial infarction (AMI) after injected targeted microbubbles by two-dimensional ultrasound speckle-tracking imaging (STI). **Methods** CD34-targeted microbubbles were prepared. Thirty-six healthy rabbits were randomly and equally divided into three groups, i. e. control group (simply transplant group), common microbubbles group (Transplant +C) and CD34-targeted microbubbles group (Transplant +T). Then myocardial perfusion parameters of pre- and 3 days post-ligation and 4 weeks after stem cell transplantation were compared. Two-dimensional strain images were acquired from left ventricular (LV) short-axis view (at the levels of mitral annulus, muscle papillary and apex), and radial strain rate (SrR), circumference strain rate (SrC), rotation rate (RotR) and rotation (Rot) of three levels in short-axis views were measured by STI. Microvessel density was assessed at last. **Results** Compared to before stem cell transplantation, A, β and $A \times \beta$ values of Transplant+C and Transplant+T group increased, especially in transplant+T group (all $P < 0.05$). SrR, SrC, RotR and Rot of left ventricular anterior regional myocardial function of three levels in short-axis views increased (all $P < 0.01$) than before transplantation, and showed correlation with left ventricular ejection fraction. **Conclusion** Targeted microbubbles probably have certain value for angiogenesis after stem cell transplantation.

[Key words] Microbubbles; Myocardial infarction; Bone marrow mesenchymal stem cells; Speckle tracking imaging

靶向微泡造影剂促进兔心肌梗死骨髓干细胞移植后血管新生及心肌力学改变

曾倩倩¹, 曹桂秋², 穆玉明^{1*}, 唐琪¹, 王春梅¹

(1. 新疆医科大学第一附属医院超声医学中心, 新疆 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆医科大学第五附属医院老年病科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的** 应用斑点追踪技术评价靶向微泡造影剂注射后兔心肌梗死区域骨髓干细胞移植疗效。**方法** 制备靶向微泡超声造影剂(携 CD34 单克隆抗体)。将 36 只新西兰大白兔随机分为对照组(单纯移植组)、普通造影剂组(移植+C 组)及靶向造影剂组(移植+T 组), 分别于急性心肌梗死(AMI)前、AMI 后 3 天、干细胞移植术后 4 周行心肌超声造影(MCE), 采用彩色编码参数量化(PQ)技术对比各组干细胞移植前后梗死区域心肌灌注参数, 同时对 3 组动物心肌梗死干细胞移植区域心肌的径向应变率(SrR)、圆周应变率(SrC)、旋转率(RotR)、收缩期 S 峰值及心肌扭转角度(Rot)进行斑点追踪分析, 并于移植 4 周后检测微血管密度。**结果** 干细胞移植后各心肌节段的 A、 β 和 $A \times \beta$ 值均较本组内移植前改善,

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(200821145)、新疆医科大学干细胞专项基金资助项目(2009-GXB-8)。

[作者简介] 曾倩倩(1984—), 女, 新疆乌鲁木齐人, 硕士, 医师。研究方向: 心血管超声。E-mail: 54606635@qq.com

[通讯作者] 穆玉明, 新疆医科大学第一附属医院超声医学中心, 830011。E-mail: mym1234@126.com

[收稿日期] 2012-12-20 **[修回日期]** 2013-02-17

移植+T组改善最为明显(P 均 <0.05)。各组左心室前壁的 SrR、SrC、RotR 及 Rot 均较本组内移植前增高(P 均 <0.01),并与左心室射血分数相关。**结论** 靶向微泡造影剂对兔骨髓干细胞移植后微血管新生具有一定作用。

[关键词] 微泡;心肌梗死;骨髓间充质干细胞;斑点追踪成像

[中图分类号] R364.17; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2013)07-1062-05

骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)移植后主要通过诱导局部血管形成及分化来改善心功能。心肌声学造影(myocardial contrast echocardiography, MCE)已开始用于评价移植区域新生血管效应^[1]。研究^[2]表明,超声联合微泡经静脉移植 BMSCs 能增加 BMSCs 在缺血及周围区心肌的聚集与归巢,增强其靶向性。超声破坏微泡可刺激心肌内源性 VEGF 分泌,促进缺血心肌血管新生^[3]。本研究将超声造影剂与微血管标记物 CD34 特异性结合,制备成靶向造影剂,采用彩色编码参数量化(parametric quantification, PQ)分析技术对干细胞移植前后梗死区域的心肌微循环灌注指标进行分析,同时应用斑点追踪显像(speckle tracking imaging, STI)评价心肌梗死干细胞移植区域心肌的各项应变参数,探讨靶向造影剂对干细胞移植后微血管新生及心功能恢复的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 新西兰大白兔 42 只,体质量 1.7~2.5 kg,雌雄不限。

1.2 仪器与方法

1.2.1 BMSCs 的提取及培养 造模前用 20 ml 注射器(含肝素 3000 U,约 0.2 ml)在无菌条件下抽取兔胫骨骨髓约 10 ml,进行 BMSCs 的分离纯化及培养。采用贴壁筛选纯化扩增 BMSCs 法,进行 1:2 消化传代,之后通过贴壁培养来扩增 BMSCs。

1.2.2 携 CD34 单抗的靶向微泡超声造影剂的制备 将鼠抗兔 CD34 单克隆抗体与超声微泡造影剂 SonoVue 等比例混合,恒温孵育 2 h,洗涤、离心,分层后取上浮液,制备成靶向微泡超声造影剂(携 CD34 单抗)。

1.2.3 实验分组、急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)模型建立及 BMSCs 移植 结扎兔冠状动脉左前降支,建立 AMI 模型。造模成功 36 只,并随机分为对照组(单纯移植组)、普通造影剂组(移植+C 组)及靶向造影剂组(移植+T 组),每组 12 只。单纯移植组在造模 2 周后只进行 BMSCs 移植。对 3 组实验兔用微量注射器在心肌梗死区域多点注入制备好的 BMSCs 悬液(共约 1.0×10^6 个细胞)。

1.2.4 MCE 检查 于 AMI 造模前、AMI 后 3 天、BMSCs 移植后 4 周行超声检查。采用 Philips iE33 超声诊断仪,S5-1 探头,探头频率 1~5 MHz。兔保定后经耳缘静脉注射 SonoVue 造影剂(0.3 ml/kg 体质量)。图像稳定在胸骨旁乳头肌短轴水平,待心肌显像稳定后发射高机械指数(1.7)脉冲破坏心肌内微泡,再自动转换为低机械指数(0.08)状态观察造影剂的再充盈过程。之后在 QLab 工作站进行脱机分析。采用 ASE 推荐的 16 节段室壁划分法,手动描绘心内及心外膜边界,软件将用色彩编码像素信号的灌注程度,将 ROI 置于灌注缺损区任一位置,软件得出平台期强度(A)和再充盈速度(β),自动绘制出该区造影剂再充盈的时间-强度曲线。

1.2.5 STI 技术 应用 GE Vivid 7 彩色超声诊断仪于同上时间段对 3 组实验兔分别进行 STI 参数检测,M3S 探头,频率 1.7~3.4 MHz,帧频 70~90 帧/秒,留取连续 5 个心动周期二维图像,于收缩末期手动勾画心内膜(16 节段)。STI 于前壁测量各节段圆周应变率(circumference strain rate, SrC)、径向应变率(radial strain rate, SrR)、旋转率(rotation rate, RotR)的收缩期 S 峰值及心肌扭转角度(rotation, Rot)(包括心尖部 Rot、瓣环部 Rot 及整体 Rot)。测量左心室短轴观前壁三水平 SrR、SrC 和 RotR 收缩期 S 峰值及 Rot 的平均值,并与左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)行相关性分析;以 LVEF $<50\%$ 为阴性对照行 Logistic 回归分析。

1.3 血管密度观察 BMSCs 移植后 4 周处死动物,进行抗 CD34 抗体组织化学染色,取左心室乳头肌水平梗死区域心肌组织,按照 Weidner 法计数心肌的毛细血管密度(microvessel density, MVD)。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 17.0 分析软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,配伍组设计采用方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。若样本不符合正态分布,则选用秩和检验。相关性分析采用 Pearson 分析,并采用二元 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组实验动物超声心动图各常规参数变化比较见表 1。

表 1 3 组兔的超声心动图参数比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

| 组别 | 左心室舒张末期 期内径(mm) | LVEF (%) | 左心室短轴 缩短率(%) |
|---------------|--------------------|---------------|-----------------|
| 单纯移植组 | | | |
| AMI 前 | 11.09±1.35 | 76.42±5.28 | 39.91±6.55 |
| AMI 后 3 天 | 14.12±1.93* | 49.19±7.56* | 25.76±5.41* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 12.43±1.16# | 55.53±9.78# | 27.81±5.48# |
| F 值 | 0.98 | 0.88 | 1.40 |
| P 值 | 0.003 | 0.009 | 0.0001 |
| 移植+C 组 | | | |
| AMI 前 | 10.97±1.25 | 73.42±5.28 | 35.81±6.55 |
| AMI 后 3 天 | 13.97±1.90* | 49.11±7.16* | 21.34±5.41* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 12.08±1.02#△ | 59.53±9.78#△ | 29.89±5.48#△ |
| F 值 | 1.02 | 0.93 | 1.38 |
| P 值 | 0.002 | 0.005 | 0.0001 |
| 移植+T 组 | | | |
| AMI 前 | 11.43±1.31 | 73.21±6.13 | 34.66±3.55 |
| AMI 后 3 天 | 14.32±0.96* | 52.42±5.37* | 26.24±4.40* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 11.53±0.95#▲△ | 62.32±6.71#▲△ | 30.82±2.08#▲△ |
| F 值 | 1.06 | 0.98 | 1.46 |
| P 值 | 0.002 | 0.003 | 0.0001 |

注: *, 与 AMI 前比较, $P < 0.01$; #, 与 AMI 后 3 天比较, $P < 0.05$; ▲, 与移植+C 组比较, $P < 0.05$; △, 与单纯移植组比较, $P < 0.05$

表 2 PQ 分析各组干细胞移植前后心肌灌注参数变化 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

| 组别 | 节段数 | A(dB) | $\beta(s^{-1})$ | $A \times \beta(dB/s)$ |
|---------------|-----|---------------|-----------------|------------------------|
| 单纯移植组 | | | | |
| AMI 前 | 66 | 8.22±1.95 | 2.37±0.94 | 21.53±3.98 |
| AMI 后 3 天 | 66 | 1.97±0.62* | 0.25±0.10* | 0.32±0.14* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 66 | 2.11±0.61* | 0.31±0.09* | 0.41±0.22*△ |
| 移植+C 组 | | | | |
| AMI 前 | 64 | 8.77±2.23 | 2.55±0.86 | 22.41±4.10 |
| AMI 后 3 天 | 64 | 2.03±0.97* | 0.22±0.16* | 0.28±0.15* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 64 | 2.79±0.75*△# | 0.92±0.23*△# | 2.55±0.21*△△# |
| 移植+T 组 | | | | |
| AMI 前 | 65 | 7.91±2.01 | 2.89±1.01 | 20.59±3.51 |
| AMI 后 3 天 | 65 | 2.11±0.64* | 0.22±0.16* | 0.35±0.11* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 65 | 2.92±0.51*△#▲ | 1.18±0.25*△#▲ | 5.67±0.43*△△#▲ |

注: *, 与 AMI 前比较, $P < 0.01$; 与 AMI 后 3 天比较, △, $P < 0.05$, △△, $P < 0.01$; 与单纯移植组比较, #: $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$; ▲, 与移植+C 组比较, $P < 0.05$

2.2 3 组移植区域 MCE 参数对比 与单纯移植组比较, 移植+C 组、移植+T 组 AMI 术前各观察指标差异无统计学意义; 与 AMI 前比较, 3 组 A、 β 和 $A \times \beta$ 值在 AMI 术后 3 天均降低 (P 均 < 0.05); 移植+C 组及移植+T 组在移植后 4 周 A、 β 和 $A \times \beta$ 值均较 AMI 后 3 天增加 (P 均 < 0.05), 移植+T 组较移植+C 组变化更为明显 (P 均 < 0.05), 且与单纯移植组相应时间比较差异亦有统计学意义 (P 均 < 0.05 , 表 2)。

2.3 3 组间左心室 STI 指标比较结果 与移植+T 组比较, 移植+C 组、单纯移植组 AMI 术前各指标间

差异无统计学意义; 3 组 AMI 术后 3 天左心室前壁 SrR、SrC、RotR 收缩期 S 峰值及 Rot 均较 AMI 前下降; BMSCs 移植后 4 周, 3 组前壁移植区域 SrR、SrC、RotR 收缩期 S 峰值及 Rot 均较 AMI 后 3 天升高, 移植+T 组较移植+C 组变化更为明显, 且与单纯移植组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 3, 图 1)。

2.4 BMSCs 移植后各组 MVD 比较 BMSCs 移植后免疫组化检测 MVD, 移植+C 组、移植+T 组分别为 39.98 ± 12.36 、 59.98 ± 14.79 , 均高于单纯移植组 (26.79 ± 10.30 , $P < 0.05$), 移植+T 组较移植+C 组增加更为明显 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.5 相关性分析 左心室前壁 SrR、SrC、RotR、左心室前壁心尖水平 Rot, 左心室前壁整体扭转 Rot 均与 LVEF 呈正相关 ($P < 0.05$)。左心室前瓣环水平 Rot 与 LVEF 无相关性 (表 4)。

2.6 回归分析 以 $LVEF < 50\%$ 为阴性对照^[4], 将 BMSCs 移植后移植+T 组的参数指标入选 Logistic 回归方程, 见表 5。

3 讨论

骨髓干细胞移植能够增加心肌梗死区域的新生血管数量, 促

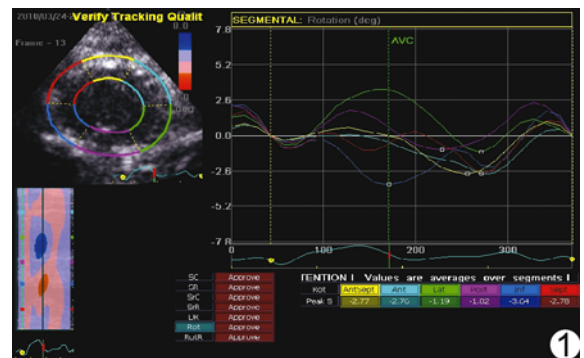


图 1 移植+T 组干细胞移植后 4 周 STI 分析显示心尖水平扭转角度曲线

表 3 STI 评价 3 组实验动物左心室前壁各时间段应变率($\bar{x} \pm s, n=12$)

| 组别 | SrR 收缩期 S 峰值 | SrC 收缩期 S 峰值 | RotR 收缩期 S 峰值 | Rot 整体均值 |
|---------------|--|--|--|--|
| 单纯移植组 | | | | |
| AMI 前 | 5.49±0.99 | 3.59±1.10 | 104.41±28.14 | 4.49±1.01 |
| AMI 后 3 天 | 1.81±0.96* | 1.68±0.38* | 34.99±26.02* | 0.99±0.59* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 4.10±1.82 Δ | 2.61±0.53 Δ | 72.02±26.12 Δ | 2.72±0.90 Δ |
| F 值 | 0.98 | 1.30 | 1.43 | 1.19 |
| P 值 | 0.003 | 0.009 | 0.0001 | 0.004 |
| 移植+C 组 | | | | |
| AMI 前 | 5.39±1.31 | 3.61±0.98 | 102.41±24.11 | 4.51±0.09 |
| AMI 后 3 天 | 1.79±0.92* | 1.59±0.48* | 31.41±21.03* | 0.93±0.18* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 4.40±1.12* Δ # | 2.81±0.24* Δ # | 80.02±24.11* Δ # | 2.82±0.90* Δ # |
| F 值 | 1.21 | 1.11 | 1.28 | 1.43 |
| P 值 | 0.001 | 0.003 | 0.009 | 0.0001 |
| 移植+T 组 | | | | |
| AMI 前 | 5.28±1.03 | 3.48±1.09 | 103.11±22.15 | 4.39±1.10 |
| AMI 后 3 天 | 1.71±0.48* | 1.61±0.32* | 33.53±24.11* | 0.90±0.12* |
| BMSCs 移植后 4 周 | 4.80±1.12* Δ # \blacktriangle | 3.00±0.51* Δ # \blacktriangle | 82.02±19.45* Δ # \blacktriangle | 3.01±0.90* Δ # \blacktriangle |
| F 值 | 1.19 | 0.98 | 1.41 | 1.29 |
| P 值 | 0.001 | 0.004 | 0.0008 | <0.001 |

注: * :与 AMI 前比较, P<0.01;与 AMI 后 3 天比较, Δ : P<0.05, $\Delta\Delta$: P<0.01;与单纯移植组比较, #: P<0.05, ##: P<0.01; \blacktriangle :与移植+C 组比较, P<0.05

表 4 左心室前壁 STI 各参数与 LVEF 间的相关关系

| 组别 | SrR | | SrC | | RotR | | 心尖水平 Rot | | 瓣环水平 Rot | | 左心室前壁整体 Rot | |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|----------|-------|-------------|-------|
| | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 |
| 单纯移植组 | 0.713 | 0.045 | 0.798 | 0.044 | 0.815 | 0.041 | 0.831 | 0.039 | -0.734 | 0.079 | 0.811 | 0.048 |
| 移植+C 组 | 0.809 | 0.039 | 0.757 | 0.039 | 0.634 | 0.042 | 0.789 | 0.032 | -0.644 | 0.121 | 0.756 | 0.047 |
| 移植+T 组 | 0.817 | 0.039 | 0.674 | 0.038 | 0.793 | 0.036 | 0.729 | 0.019 | -0.381 | 0.281 | 0.689 | 0.023 |

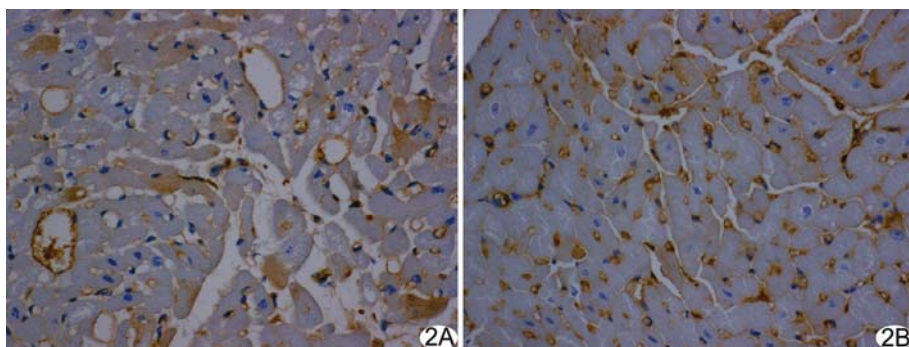


图 2 移植+C 组干细胞移植 4 周后,免疫组化结果示新生血管管壁呈棕黄色(DAB 染色, $\times 400$, A);移植+T 组干细胞移植 4 周后,免疫组化结果示新生血管密度明显增加(DAB 染色, $\times 400$, B)

进心肌梗死区域新微循环再生。心肌功能恢复与心肌灌注量密切相关,建立心肌微循环是改善心肌灌注的关键^[5]。研究^[6]表明,微循环受损时,即使心外膜大血管成功开通,心肌组织血流仍不能完全恢复正常。检测心肌组织水平微循环灌注有重要临床意义。

超声联合 SonoVue 可促进干细胞靶向迁移,提高

局部血管通透性,利于干细胞向心肌梗死区域迁移^[7]。为增强造影剂的靶向性,本实验将造影剂与造血干细胞的细胞膜表面特异性抗原 CD34 耦联,发现 BMSCs 移植后 A、 β 和 A \times β 等反映心肌微循环灌注的造影剂定量指标均较移植前明显改善,且移植+T 组较移植+C 组改善更为明显,可能与干细胞移植后局部梗死区域心肌微循环灌注提高有关。

MVD 计数显示,使用造影剂的移植+C 组与移植+T 组均高于未使用造影剂的单纯移植组,且移植+T 组数量增加更为显著,可能与超声造影剂促进毛细血管新生效应有关^[1]。

应用 STI 技术测量的移植后 4 周,3 组左心室前壁移植区域的 SrC、SrR、RotR 及 Rot 收缩期 S 峰值均较 AMI 后 3 天升高,移植+T 组较移植+C 组变化更

表 5 Logistic 回归方程模型中的自变量分析结果

| 参数 | B | S. E | Wals | P | OR |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| SrR | 1. 134 | 0. 044 | 5. 294 | 0. 010 | 1. 443 |
| SrC | 0. 087 | 0. 039 | 4. 996 | 0. 025 | 1. 091 |
| RotR | 1. 018 | 0. 470 | 5. 038 | 0. 020 | 1. 129 |
| 左心室前壁心尖水平 Rot | 1. 926 | 0. 350 | 8. 142 | 0. 001 | 5. 323 |
| 左心室前壁瓣环水平 Rot | 1. 417 | 0. 413 | 6. 023 | 0. 009 | 1. 629 |
| 左心室前壁整体 Rot | 1. 531 | 0. 649 | 8. 009 | 0. 002 | 4. 317 |

为明显,与单纯移植组比较差异有统计学意义。STI 技术局部评价功能显示移植+T 组 BMSCs 移植区域的局部心肌收缩功能增强较显著,表明心肌灌注改善有助于提高心肌收缩功能^[8],移植+T 组移植后的心肌功能改善更为明显。

3 组左心室前壁 SrR、SrC、RotR 及心尖水平 Rot、左心室前壁整体 Rot 的峰值变化均与 LVEF 有良好相关性,尤其是心尖水平的 Rot。研究^[9]证实,左心室心尖部扭转能力降低对左心室整体收缩功能具有显著影响。本研究显示瓣环水平 Rot 与 LVEF 无相关性, BMSCs 移植后左心室前壁心尖水平 Rot 峰值的增高,即左心室前壁心尖扭转功能的恢复对整体心功能提高最具影响。

综上,移植+T 组灌注改善可能与超声造影剂促毛细血管新生效应有关^[10],靶向造影剂滞留时间延长,进一步发挥其识别并促进毛细血管新生的作用。

[参考文献]

[1] 曹桂秋,穆玉明,李艳红,等.彩色编码参数量化技术结合靶向微泡造影剂评价干细胞移植后微血管新生.中华超声影像学杂志, 2011,20(11):67-71.

[2] 李雪霖,王志刚,凌智瑜,等.超声破坏微泡造影剂促进大鼠心肌血管新生的实验研究.中国超声医学杂志, 2007,23(1):6-8.

[3] 徐亚丽,高云华,方针强,等.诊断超声联合微泡增强骨髓间充质干细胞归巢兔缺血心肌的研究.中华超声影像学杂志,2008,17(10):899-902.

[4] 闫雪,关丽娜,穆玉明,等.二维超声斑点追踪技术对兔室壁瘤形成后左心室扭转角度的研究.中华超声影像学杂志,2012,21(5):435-438.

[5] 马春燕,李楠,刘爽,等.二维斑点追踪检测心肌跨壁应变梯度在非 ST 段抬高型心肌梗死中的应用.中国医学影像技术,2013,29(2):217-220.

[6] Kenner MD, Zajac EJ, Kondos GT, et al. Ability of the no-reflow phenomenon during an acute myocardial infarction to predict left ventricular dysfunction at one-month follow-up. Am J Cardiol, 1995,76(12):861-868.

[7] Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, et al. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. Circulation, 1998,98(4):290-293.

[8] Palmer BR, Pilbrow AP, Yandle TG, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism interacts with left ventricular ejection fraction and brain natriuretic peptide levels to predict mortality after myocardial infarction. J Am Coll Cardiol, 2003,41(5):729-736.

[9] Kim HK, Sohn DW, Lee SE, et al. Assessment of left ventricular rotation and torsion with two-dimensional speckle tracking echocardiography. J Am Soc Echocardiogr, 2007,20(1):45-53.

[10] Xu YL, Gao YH, Liu Z, et al. Myocardium-targeted transplantation of mesenchymal stem cells by diagnostic ultrasound-mediated microbubble destruction improves cardiac function in myocardial infarction of New Zealand rabbits. Int J Cardiol, 2010,138(2):182-195.