

- [7] BALASUBRAMANIAM AS, THOMAS LJ, RAMAKRISHNAN-AN T, et al. Short-term effects of nonsurgical periodontal treatment with and without use of diode laser (980 nm) on serum levels of reactive oxygen metabolites and clinical periodontal parameters in patients with chronic periodontitis: a randomized controlled trial[J]. Quintessence Int, 2014, 45(3): 193-201.
- [8] 冀章章, 徐秀敏, 章润贞, 等. Er, Cr: YSGG激光治疗慢性牙周炎的临床疗效评价[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(5): 669-671, 672.
- [9] 葛琳华, 束蓉. Er, Cr: YSGG激光在慢性牙周炎基础治疗中的应用观察[J]. 口腔医学研究, 2014, 30(3): 235-237.

(收稿日期: 2019-05-21, 修回日期: 2019-07-08)

10.3969/j.issn.1009-6469.2020.02.036

◇ 临床医学 ◇

冠心病病人自身相关因素对体外扩增后骨髓间充质干细胞数量的影响

杨宇辉, 赵文强

作者单位: 安徽省第二人民医院心血管内科, 安徽 合肥 230000

通信作者: 赵文强, 男, 主任医师, 研究方向为心血管内科, E-mail: yyh35@126.com

摘要:目的 探索冠心病病人自身相关因素对体外扩增后骨髓间充质干细胞(MSCs)数量的影响, 为MSCs供体的筛选及临床应用提供证据。**方法** 选取2017年6月至2018年1月安徽省第二人民医院收治的冠心病病人60例, 经髂前上棘提取骨髓液, 并进行培养, 观察最终培养得到的细胞数目与病人相关因素的关联性。**结果** 从未吸烟病人骨髓MSCs体外扩增所达到的细胞数量多于吸烟病人($t=2.491, P=0.0156$), 年龄与骨髓MSCs体外扩增后所达到的细胞数目呈负相关($r=-0.502, P<0.0001$)。**结论** 吸烟、年龄可以影响骨髓MSCs体外扩增后所达到的细胞数目。

关键词: 冠心病; 间质干细胞移植; 细胞培养技术; 吸烟; 年龄因素

Influence of patient related factors on the amount of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in vitro

YANG Yuhui, ZHAO Wenqiang

Author Affiliation: Cardiovascular Medicine, Anhui NO.2 Provincial People's Hospital, Hefei, Anhui 230000, China

Abstract: Objective To investigate the impact of coronary heart disease related factors on the amount of mesenchymal stromal cells (MSCs) in vitro culture expansion, and to provide evidence for the screening of MSCs donors and MSCs' clinical application. **Methods** Sixty coronary heart disease patients selected from June 2014 to September 2017 in our hospital were enrolled in this study. The bone marrow fluid was extracted from the iliac crest and cultured in vitro to observe the correlation between the number of final cultured cells and the related factors of the patients. **Results** The amount of MSCs cultured from non-smokers in vitro was more than that of smokers ($t=2.491, P=0.0156$). There was a negative correlation between age and the number of MSCs in vitro ($r=-0.502, P<0.0001$). **Conclusion** Smoking and age are patient related factors which could affect the number of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in vitro in patients with coronary heart disease.

Key words: Coronary disease; Mesenchymal stem cell transplantation; Cell culture techniques; Smoking; Age factors

近年来, 细胞治疗作为新兴的治疗方式, 被广泛应用于包括缺血性心脏病(Ischaemic heart disease, IHD)在内的众多疾病。根据世界卫生组织的资料, IHD是当今世界上最主要的死亡原因^[1]。而患有IHD的老年人口不断增长以及IHD并发症如顽固性心绞痛、心衰等可使国家负担的健康预算进一步增加。使用成人间充质干细胞修复、治疗受损心肌的研究已有临床以及临床前研究。其中, 大多数

临床试验使用自体骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stromal cells, MSCs)^[2-4]。然而, 也有部分临床机构使用脂肪源性间充质干细胞(Adipose tissue-derived stromal cells, ASCs)进行临床试验^[5-6]。据信, 间充质基质细胞通过其旁分泌效应刺激血管(血管生成)和心脏组织(心肌发生)的生长^[4]。因此, 用于临床治疗的细胞数目与病人的治疗效果有关联性, 同时, 病人相关因素(病史、生活习惯等)在内的多

种因素可影响体外培养最终获得的干细胞数量。有研究报道, IHD引起的病人相关因素对间充质干细胞数量的影响以及自体细胞的分离及扩增潜力^[4,7-8]。Mozid等^[7]发现, IHD病人年龄增加与外周血 CD34⁺细胞收获率降低和骨髓 CD34⁺细胞浓度降低有关。然而, Friis等发现, 来自年轻健康供体的骨髓 MSCs 与患有严重慢性 IHD 老年病人的骨髓 MSCs 增殖能力没有差异^[3]。

本研究旨在探讨病人自身相关因素尤其是可能导致 IHD 的危险因素对体外培养、扩增的间充质干细胞数目的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入自 2017 年 6 月至 2018 年 1 月安徽省第二人民医院收治的冠心病病人 60 例, 男 36 例, 女 24 例, 年龄(66.5±6.3)岁, 体质量(27.4±2.1) kg/m²; 60 例病人中, 糖尿病 18 例, 高血压病 60 例, 心肌梗死史 15 例, 经皮冠状动脉介入治疗史 39 例, 曾吸烟或仍吸烟 32 例, 不吸烟 28 例, 射血分数(56.1±10.8)%, 收缩压(143.74±10.97)mmHg, 舒张压(95.99±11.82)mmHg, 总胆固醇(3.93±0.82)mmol/L, 体外扩增细胞数(61.3±67.1)×10⁶。所有病人均没有严重的肝肾疾病、风湿性疾病、恶性肿瘤等。病人或近亲属同意并签署知情同意书。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 诊断标准 冠心病诊断依据和诊断原则参考 CN-WS 2010 年 1 月 1 日发布的冠状动脉硬化性心脏病诊断标准。即至少满足以下其中一条即可诊断冠心病: (1) 依 1997 年 WHO 发布的冠心病诊断标准, 即有典型的心绞痛及心肌梗死症状发作, 却无重度主动脉瓣关闭不全、狭窄重度主动脉炎, 也无证据支持冠状动脉栓塞或心肌梗; (2) 男性 40 岁、女性 45 岁以上病人, 在休息时心电图有明显心肌缺血表现, 或无其他诱因的心电图运动试验阳性, 并有以下两项中的两项者: 高胆固醇血症、糖尿病、高血压; (3) 做冠状动脉造影检查时显示有多支或一支主要冠状动脉狭窄且狭窄程度超过 50% 的病人; (4) 做过冠状动脉旁路移植手术或经皮冠状动脉介入治疗手术的病人。

1.3 骨髓穿刺与培养 采用密度梯度离心法培养骨髓间充质干细胞^[9]。使用局部麻醉的方法从病人髂前上棘抽取 3~6 mL 骨髓液, 其中, 骨髓穿刺液的稀释使用等量盐酸盐缓冲盐水(PBS)加入含有 Percoll 分离液的离心管中以 2 000 r/min 离心 2 min, 收集单个核细胞层。这些细胞在 PBS 中洗涤 2 次, 离心后重新收集。完全培养基(使用 Dulbecco 的改良 Eagle 培养基(DMEM))、10% 医药级低糖胎牛血清

(FBS) 和 1% 青霉素/链霉素用于 MSC 的培养^[3,10]。在 37 ℃、5% 二氧化碳饱和湿度培养箱中对细胞进行培养, 2 d 后进行换液(半量), 之后每 3 天换液 1 次, 观察细胞生长情况, 这些细胞的培养、扩增过程约 4~6 周, 由于供体机体条件的不同, 骨髓 MSCs 的扩增潜力也不同, 因此扩增的持续时间也不同。待达到 80%~90% 细胞融合率以上时用 0.25% 胰蛋白酶消化, 并传代 2 次。流式细胞仪检测 CD45、CD34、CD105、CD73、CD13 和 CD90 的表达^[11-12], 最终, 所得细胞在 NucleoCounter 上对细胞进行计数。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件包内进行统计分析, 连续型变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两独立样本 *t* 检验。分类变量以例(%)表示, 采用 χ^2 检验。采用 Pearson 线性回归分析细胞总计数与各因素的关联性。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 性别、病史、吸烟对骨髓 MSCs 体外扩增后所达到的细胞数量的影响 如图 1 所示, 本研究发现, 从未吸烟病人骨髓 MSCs 体外扩增所达到的细胞数量多于吸烟病人, 差异有统计学意义($t = 2.491, P = 0.0156$); 男性、无糖尿病史、无梗死病史、无 PCI 治疗史、病人的骨髓 MSCs 体外扩增所达到的细胞数量多于女性、有糖尿病史、有梗死病史、有 PCI 治疗

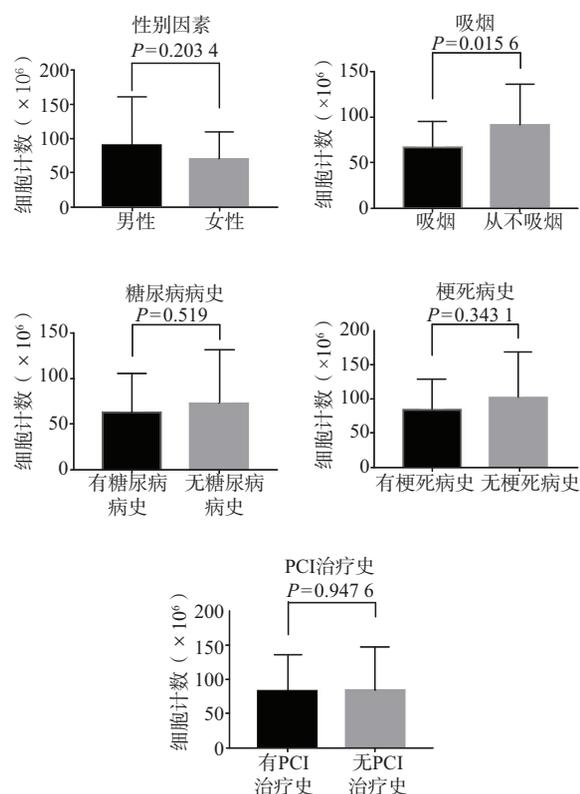


图1 性别、病史、吸烟对骨髓 MSCs 体外扩增后所达到的细胞数量的影响

史的病人,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 年龄、BMI、射血分数、胆固醇、血压对骨髓MSCs体外扩增后所达到的细胞数量的影响 本研究发现,年龄与骨髓MSCs体外扩增后所达到的细胞数目呈负相关($r = -0.502, P < 0.0001$);BMI、射血分数、胆固醇、收缩压、舒张压与骨髓MSCs体外扩增后所达到的细胞数目无明显相关关系($P > 0.05$)。见图2。

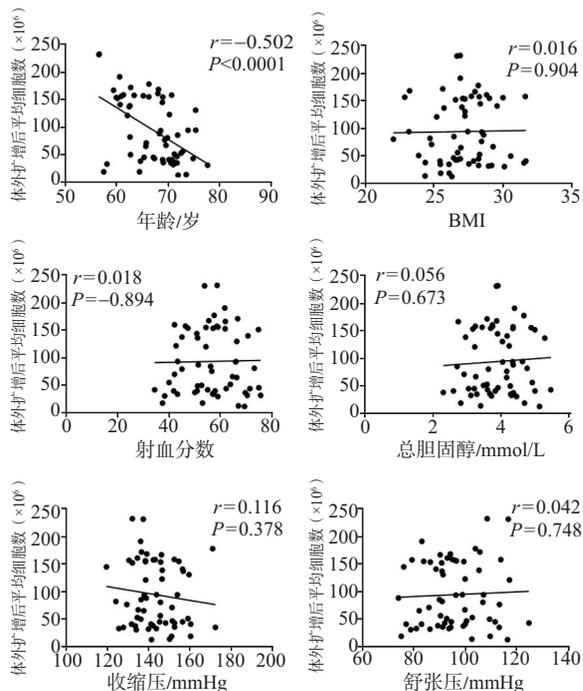


图2 年龄、BMI、射血分数、胆固醇、血压对骨髓MSCs体外扩增后所达到的细胞数量的影响

3 讨论

本研究纳入了60例冠心病病人,探索病人相关因素对骨髓MSCs体外扩增后所达到的细胞数量是否有影响。

我们发现年龄和骨髓MSCs体外扩增后所达到的数量之间存在关联。这与Mozid等^[7]的研究结果相同,他们在201例IHD、扩张型心肌病或AMI病人中发现年龄与外周血和骨髓中的CD34+细胞之间存在显著的相反关系。其原因可能是由于研究的细胞类型与目前的干细胞不相同。然而,Friis等^[3]以前的研究表明,在16例年轻健康供体的骨髓来源的MSCs的增值能力和已知患有严重慢性IHD的15例老年病人的增值能力的比较,差异无统计学意义。

Neef等^[8]研究表明,糖尿病病人骨髓MSCs体外扩增后的集落形成单位数量高于无糖尿病病人。但本研究无法证实糖尿病病人和无糖尿病病人之间存在相同的差异。

近年来,干细胞治疗正作为一种治疗选择被广泛研究应用^[13-15]。有报道指出,干细胞心肌内注射治疗心脏病的效果取决于注射的细胞量,因为冠心病与其他非冠心病病人骨髓MSCs的生长曲线、细胞形态、细胞表型并无差别,因此体外扩增所得到的细胞数目是此治疗方式的基础。大多数正在进行的临床试验使用烧瓶进行培养扩增,但趋势已趋向于使用同种异体细胞和使用生物反应器进行培养扩增。在过去的几年中,已经开发了更多的技能和更好的工具来培养、收集细胞,同时,细胞的生长条件和传代方法也已经得到改善^[16-18]。因此,合适的干细胞供体成为研究的重点。冠心病是由于全身系统疾病导致的以心脏为突出表现的心脏病^[19],因此冠心病病人的相关因素可能影响骨髓MSCs体外扩增所达到数量,并以此预测未患冠心病的供体的骨髓MSCs体外扩增的能力。

关于年龄对骨髓MSCs体外扩增的影响,我们的结果与有关祖细胞体外扩增数目的报道一致^[20],均显示较大的年龄与较少的体外培养数目相关。这可能是由于随着年龄增加,参与细胞生存、衰老、增殖调控的microRNAs的表达也发生改变。Liu等^[21]发现,miR-17-92簇可以调控神经祖细胞的增殖及存活,同时,随年龄增加其表达下调最为明显。此外,有学者^[22]发现,18岁年轻人骨髓间充质干细胞体外传代至第12代时出现衰老征象,同时,这种传代衰老一方面可能与体内微环境和体外培养条件的差异有关,另一方面与端粒缩短所致体细胞的有限增殖有关。他还指出,与取自老年人的骨髓间充质干细胞相比,年轻人的骨髓间充质干细胞在体外培养过程中具有更高的群体倍增水平。

吸烟可从形态学、增殖凋亡、Ca⁺、尼古丁型乙酰胆碱受体表达变化等方面影响骨髓间充质干细胞的活性及功能。例如,被吸入人体的尼古丁可通过影响NO调控细胞增殖或凋亡,后者已被证实高浓度的情况下可以促进细胞凋亡,低浓度延缓细胞凋亡^[23]。不仅如此,尼古丁还可以造成骨髓间充质干细胞MSCs线粒体DNA损伤,促进ROS产生。高浓度的ROS攻击线粒体膜,线粒体膜发生脂质过氧化,造成后者通透性改变,释放凋亡诱导因子,形成ROS-线粒体DNA损伤的恶性循环,使细胞进入不可逆的凋亡过程^[24]。

我们的研究暂时限于骨髓MSCs,而外国学者发表的研究同时纳入了脂肪源性干细胞,因此,仅分析了一种特定类型细胞的扩增或分化潜能可能存在一定的偏倚,同时本研究的样本量较少,如已戒

烟和现在吸烟分别为 11 和 21 例,这两组间虽然 MSCs 培养所达到的细胞数目差异无统计学意义(分别为 59.7×10^6 和 60.4×10^6 ; $t = 1.342$, $P = 0.118$),但由于较小的样本量限制了进一步探究戒烟时长可能对病人体外 MSCs 培养扩增结果的影响。

综上所述,本研究表明病人相关因素可能影响 MSCs 培养扩增后的结果。BMI 与培养扩增后的自体 ASC 的数量以及所有病人的 MSCs 和 ASCs 联合使用存在着显著的相关性。此外,高血压病人的 ASCs 数量和所有病人的 MSCs 和 ASCs 的数量均达到了较高的水平。此外,性别,高血压和左心室射血分数可能影响体外培养扩增后获得的骨髓 MSCs 的数量。

参考文献

- [1] DOLLERUP J, VESTBO J, MURRAY-THOMAS T, et al. Cardiovascular risks in smokers treated with nicotine replacement therapy: a historical cohort study [J]. *Clin Epidemiol*, 2017, 9: 231-243.
- [2] CHOI YH, KURTZ A, STAMM C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(1): 3-17.
- [3] FRIIS T, HAACK-SORENSEN M, HANSEN SK, et al. Comparison of mesenchymal stromal cells from young healthy donors and patients with severe chronic coronary artery disease [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011, 71(3): 193-202.
- [4] KASTRUP J. Stem cells therapy for cardiovascular repair in ischemic heart disease: how to predict and secure optimal outcome? [J]. *EPMA J*, 2011, 2(1): 107-117.
- [5] QAYYUM AA, MATHIASSEN AB, MYGIND ND, et al. Adipose-derived stromal cells for treatment of patients with chronic ischemic heart disease (My Stromal Cell Trial): a randomized placebo-controlled study [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 5237063.
- [6] SUZUKI E, FUJITA D, TAKAHASHI M, et al. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease [J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(8): 454-465.
- [7] MOZID AM, JONES D, ARNOUS S, et al. The effects of age, disease state, and granulocyte colony-stimulating factor on progenitor cell count and function in patients undergoing cell therapy for cardiac disease [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(2): 216-223.
- [8] NEEF K, CHOI YH, WEICHEL A, et al. The influence of cardiovascular risk factors on bone marrow mesenchymal stromal cell fitness [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(6): 670-678.
- [9] FRIIS T, HAACK-SORENSEN M, MATHIASSEN AB, et al. Mesenchymal stromal cell derived endothelial progenitor treatment in patients with refractory angina [J]. *Scand Cardiovasc J*, 2011, 45(3): 161-168.
- [10] HAACK-SORENSEN M, BINDSLEV L, MORTENSEN S, et al. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use [J]. *Cytotherapy*, 2007, 9(4): 328-337.
- [11] BOURIN P, BUNNELL BA, CASTEILLA L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(6): 641-648.
- [12] DOMINICI M, LE BK, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [13] KASTRUP J, MYGIND ND, QAYYUM AA, et al. Experimental myocardial stem cell therapy for ST-elevation myocardial infarction: rationale and level of evidence [J]. *Minerva Cardioangi*, 2016, 64(3): 322-329.
- [14] 李浩,周翔天,殷俊,等.人脐血干细胞移植术治疗肝炎后肝硬化的临床应用与观察 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(7): 1246-1249.
- [15] SINGH A, SINGH A, SEN D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015) [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 82.
- [16] HAACK-SORENSEN M, EKBLOND A, KASTRUP J. Cryopreservation and Revival of human mesenchymal stromal cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1416: 357-374.
- [17] HAACK-SORENSEN M, FOLLIN B, JUHL M, et al. Culture expansion of adipose derived stromal cells. A closed automated quantum cell expansion system compared with manual flask-based culture [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 319.
- [18] SONDERGAARD RH, FOLLIN B, LUND LD, et al. Senescence and quiescence in adipose-derived stromal cells: effects of human platelet lysate, fetal bovine serum and hypoxia [J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(1): 95-106.
- [19] SOUFI A, COLMAN JM, LI Q, et al. Revision: review of non-elective hospitalisations of adults with CHD [J]. *Cardiol Young*, 2017, 27(9): 1764-1770.
- [20] PARK J S, KIM H Y, KIM H W, et al. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells [J]. *Mechanisms of Ageing & Development*, 2005, 126(5): 551-559.
- [21] LIU XS, CHOPP M, WANG XL, et al. MicroRNA-17-92 cluster mediates the proliferation and survival of neural progenitor cells after stroke [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(18): 12478-12488.
- [22] STOLZING A, JONES E, MCGONAGLE D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. [J]. *Mechanisms of Ageing & Development*, 2008, 129(3): 163-173.
- [23] 覃永亮,曾慧兰,卜欠欠,等.尼古丁诱导人脐带间充质干细胞凋亡的机制 [J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 2011, 32(6): 598-601.
- [24] CIRCU ML, AW TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, 48(6): 749-762.

(收稿日期:2018-03-25,修回日期:2018-05-11)