

# 靶向磷酸二酯酶 5 的短发夹 RNA 导入后的间充质干细胞对心肌梗死后心室重构的影响

胡爽<sup>1</sup>, 李龙虎<sup>1</sup>, 孙洋<sup>1</sup>, 陈宏<sup>2</sup>, 魏冬梅<sup>3</sup>, 韩冬丽<sup>1</sup>

1. 齐齐哈尔市第一医院心内科, 黑龙江 齐齐哈尔 161005; 2. 齐齐哈尔市第一医院干部病房, 黑龙江 齐齐哈尔 161005;
3. 齐齐哈尔市第一医院科教部, 黑龙江 齐齐哈尔 161005

**摘要:** **目的** 探讨磷酸二酯酶 5 (PDE5) 短发夹 RNA (shRNA) 重组腺病毒载体 [PDE5shRNA] 导入后的间充质干细胞 (MSCs) 对心肌梗死 (MI) 后心室重构的影响。**方法** 构建 PDE5shRNA 转染的 MSCs, 结扎大鼠冠状动脉左前降支 (LAD) 建立 MI 模型, 随机分成假手术组 ( $n=4$ , 只穿线不结扎 LAD); 模型组 ( $n=4$ , 穿线并结扎 LAD 建立 MI 模型); MSCs-Ad-Null 组 ( $n=4$ , MI 模型基础上注射经空白腺病毒载体转染的 MSCs); MSCs-shRNA-PDE5 组 ( $n=4$ , MI 模型基础上注射经 PDE5shRNA 转染的 MSCs)。建模后, 每组各取 1 只大鼠取心脏进行病理检验, 用于判断造模成功, 余大鼠入组观察相关指标。4 周后心脏超声检测各组大鼠心功能指标 [左室收缩末期径 (LVESd)、左室舒张末期径 (LVEDd)、左室射血分数 (LVEF) 和左室短轴缩短率 (FS)]。HE 染色观察心肌病理改变, Masson 染色观察心肌纤维化情况, qRT-PCR 方法检测大鼠心肌中 PDE5、环磷酸鸟苷 (cGMP) 和蛋白激酶 (PKG) mRNA 的相对表达量。**结果** 实验 4 周后, (1) 心脏超声示: MI 各组大鼠心室腔明显扩张, 左心室心肌收缩功能明显降低。与假手术组相比, MI 各组大鼠的 LVESd、LVEDd 增大, LVEF、FS 降低 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 与模型组相比, MSCs-Ad-Null 组、MSCs-shRNA-PDE5 组的 LVESd、LVEDd 降低, MSCs-shRNA-PDE5 组的 LVEF、FS 升高 ( $P$  均  $< 0.05$ )。 (2) 心肌病理结果示: 与模型组比较, MSCs-Ad-Null 组、MSCs-shRNA-PDE5 组的心肌病理改变逐渐减轻。 (3) qRT-PCR 法结果示: 与假手术组相比, 模型组、MSCs-Ad-Null 组 PDE5 mRNA 表达升高、cGMP 和 PKG mRNA 表达降低 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 按模型组  $\rightarrow$  MSCs-Ad-Null 组  $\rightarrow$  MSCs-shRNA-PDE5 组之序, PDE5 mRNA 表达递降, cGMP、PKG mRNA 表达递升 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论** PDE5shRNA 导入后的 MSCs 可改善 MI 后心功能, 减轻心肌病理改变及心肌纤维化, 同时通过调节 PDE5、cGMP、PKG 的表达, 发挥抑制心室重构的作用。

**关键词:** 磷酸二酯酶 5; 短发夹核糖核酸; 间充质干细胞; 心肌梗死; 心室重构

**中图分类号:** R542.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)01-0001-06

## Effects of MSCs with shRNA targeting phosphodiesterase 5 on ventricular remodeling after myocardial infarction

HU Shuang\*, LI Long-hu, SUN Yang, CHEN Hong, WEI Dong-mei, HAN Dong-li

\* Department of Cardiology, the First Hospital of Qiqihar, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China

Corresponding author: LI Long-hu, E-mail: lilonghu75@hotmail.com

**Abstract: Objective** To investigate the effects of mesenchymal stem cells (MSCs) with short hairpin RNA (shRNA) targeting phosphodiesterase 5 (PDE5) on ventricular remodeling after myocardial infarction (MI). **Methods** MI model rats were established by ligating left anterior descending coronary artery (LAD), and MSCs were constructed by transfecting with PDE5 shRNA. The rats were randomly divided into sham operation group ( $n=4$ , only threading without ligating LAD), the model group ( $n=4$ , threading and ligating LAD), MSCs-Ad-Null group ( $n=4$ , injected with MSCs transfected with blank adenovirus vector based on MI model) and MSCs-shRNA-PDE5 group ( $n=4$ , injected with MSCs transfected with PDE5shRNA based on MI model). After modeling, one rat heart from each group was taken for pathological examination to judge the success of modeling. The relevant indicators were observed in other rats. After 4 weeks, cardiac

function indexes were measured by echocardiography, including left ventricular end-systolic diameter (LVESd), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDd), left ventricular ejection fraction (LVEF) and percent fractional shortening (FS) of left ventricular short axis; myocardial pathological changes were observed by HE staining; myocardial fibrosis was observed by Masson staining; the relative expression level of PDE5, cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and protein kinase G (PKG) mRNA were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** After 4 weeks, echocardiography showed the obviously dilated ventricle cavity and decreased myocardial systolic function of left ventricle in MI rats. Compared with sham operation group, LVESd and LVEDd increased, and LVEF and FS decreased in other three groups (all  $P < 0.05$ ). Compared with model group, LVESd and LVEDd decreased in MSCs-Ad-Null group and MSCs-shRNA-PDE5 group, and LVEF and FS increased in MSCs-shRNA-PDE5 group (all  $P < 0.05$ ). Myocardial pathological results showed that the myocardial pathological changes were alleviated gradually in MSCs-Ad-Null group and MSCs-shRNA-PDE5 group. qRT-PCR results showed that compared with sham operation group, the expression of PDE5 mRNA increased, and the expressions of cGMP and PKG mRNA decreased in model group and MSCs-Ad-Null group (all  $P < 0.05$ ). According to the order of model group, MSCs-Ad-Null group and MSCs-shRNA-PDE5 group, the expression of PDE5 mRNA decreased gradually, and the expressions of cGMP and PKG mRNA increased gradually ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** MSCs with PDE5shRNA can improve cardiac function, alleviate myocardial pathological changes and myocardial fibrosis after MI and inhibit ventricular remodeling by regulating the expressions of PDE5, cGMP and PKG.

**Keywords:** Phosphodiesterase 5; Short hairpin RNA; Mesenchymal stem cells; Myocardial infarction; Ventricular remodeling

**Fund program:** Supported by Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (H2016096)

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 后心力衰竭 (heart failure, HF) 仍是临床的巨大挑战, 尽管难以明确随后 HF 的发病率, 但 HF 导致成功血管重建后晚期死亡率大幅增加, 因此对 HF 发生高风险患者进行治疗性干预、预防 HF 的发生具有重要价值<sup>[1]</sup>。如何降低 MI 后 HF 的发病率和死亡率, 成为心血管疾病防治领域中的关键问题。心室重构 (ventricular remodeling) 是 HF 的病理基础, 最终导致心室扩张, 心功能减弱, 是推动 HF 发生、发展的主要原因<sup>[2-3]</sup>。因此 MI 后早期干预与治疗心室重构有助于延缓 MI 后的进展, 对 MI 的远期预后有着不可估量的益处。传统观念认为心脏是一个终末分化器官, 再生能力极其有限, MI 后的大量细胞丢失是不可逆的, 然而自从发现心肌组织内固有的心脏干细胞, 又发现骨髓来源的干细胞也可以分化成心肌细胞, 人们开始试图利用干细胞的再生特性来修复损伤的心肌, 干细胞的出现为心肌损伤的治疗带来了新的希望。

近年来有研究发现, 将需要的目的基因转染到腺病毒载体从而发挥相应的生物学效应来治疗相关疾病已经取得了不错的效果<sup>[4]</sup>。核糖核酸 (RNA) 干扰是近年发现的一种由双链 RNA 引发的转录后基因沉默机制, 能特异性地抑制靶基因的表达, 具有快速、高效、容易操作、序列特异性强等优点<sup>[5-6]</sup>。本课题组前期的研究构建了磷酸二酯酶 5 (PDE5) 短发夹 RNA (shRNA) 重组腺病毒载体 [PDE5shRNA], 将其导入体外培养的小鼠间充质干细胞 (mesenchymal stem

cells, MSCs) 后, 首次发现 PDE5shRNA 明显拮抗缺氧缺糖诱导的 MSCs 凋亡, 持续抑制 MSCs 的 PDE5 基因表达, 显著上调环磷酸鸟苷 (cGMP) 的活性, 多种生长因子分泌明显增加, 因此本研究假设移植导入 PDE5shRNA 的 MSCs 对治疗 MI 更有优势, 将转基因技术与干细胞移植相结合, 探索这种经基因修饰的 MSCs 是否能够更好的改善 MI 后的心室重构, 改善心功能, 为防治 MI 后 HF 提供新的思路。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性大鼠 16 只, 体重 280 ~ 300 g, 由齐齐哈尔医学院动物实验中心提供, 动物许可证号 [SCXK (黑) 2014-0002]。

1.2 仪器与试剂 彩色多普勒超声心动仪 (HP-1000 美国 HP); 显微镜 (BX53 日本 OLUMPUS)、显微照相机 (DP73 日本 OLUMPUS); 荧光定量 PCR 仪 (Exicycler 96 韩国 BIONEER); TRIpure (RP1001 北京 BioTeke)、Super M-MLV 反转录酶 (PR6502 北京 BioTeke)、RNase inhibitor (RP5602 北京 BioTeke)、2 × Power Taq PCR MasterMix (PR1702 北京 BioTeke)、SYBR Green (SY1020 北京 Solarbio); 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

1.3 筛选稳定表达 PDE5shRNA 的 MSCs 细胞株<sup>[7-8]</sup> 根据小鼠 PDE5 序列设计并合成 shRNA 寡核苷酸片段, 退火形成双链并克隆进入载体, 获得鼠 PDE5 的 shRNA 表达载体质粒。然后将供体注入到

骨架腺病毒获得 PDE5shRNA 重组腺病毒载体,未插入 shRNA 的空白腺病毒载体作为对照组,然后将携带有 PDE5shRNA 的重组腺病毒载体和空白腺病毒载体分别转染 HEK293 细胞,通过 HEK293 细胞扩增病毒,并经离心、提取、纯化制备高滴度携带小鼠 PDE5shRNA 片段的重组腺病毒载体。

分离小鼠双侧股骨和胫骨,取骨髓制成单细胞悬液后收集细胞,并进行原代培养、传代培养,取传至第 3 代的骨髓 MSCs。用高滴度重组腺病毒载体转染 MSCs 细胞,通过聚合酶链反应(PCR)、蛋白印迹技术(Western blotting)确定 PDE5 通过 shRNA 干扰、显著持续抑制 MSCs 的 PDE5 基因表达,并筛选稳定表达 PDE5shRNA 的 MSCs 细胞株。

**1.4 动物模型制备及实验分组** 动物模型的制备:选取体重 280 ~ 300 g 雄性 SD 大鼠 16 只,12 h 白 12 h 黑,温度(22 ± 1) °C,湿度 45% ~ 55%,自由进食饮水。适应性喂养 1 周后再建立模型。通过结扎冠状动脉左前降支(left anterior descending coronary artery, LAD)方法建立 MI 模型<sup>[9]</sup>:大鼠麻醉后,常规消毒,将大鼠的腹侧皮肤沿锁骨正中中线切开,做好关闭胸腔缝合的准备。在第 4 肋间隙水平用止血钳穿透胸膜和心包膜撑开胸腔,轻压右侧胸廓,挤出心脏。用不可吸收的丝线结扎 LAD,结扎成功后大鼠心脏心尖部位瞬间因缺血而变白,立即在 MI 区及周边区 4 个点各注射 5 × 10<sup>6</sup>/100 μl 经空白腺病毒载体转染的 MSCs 细胞或经 PDE5shRNA 转染的 MSCs 细胞[细胞预先用氯甲基苯甲酰胺(CM-Dil)标记,25 μl],假手术组大鼠 LAD 只穿线不结扎,注射等剂量的 PBS,最后沿切口用止血钳将大鼠的心脏送回,闭合胸腔,术后连续肌肉注射青霉素 3 d 防止感染。

具体分组及处理方式如下:将大鼠随机分成 4 组,即(1)假手术组( $n = 4$ ),只穿线不结扎 LAD;(2)模型组( $n = 4$ ),穿线并结扎 LAD 建立 MI 模型;(3)MSCs-Ad-Null 组( $n = 4$ ),MI 模型基础上注射经空白腺病毒载体转染的 MSCs;(4)MSCs-shRNA-PDE5 组( $n = 4$ ),MI 模型基础上注射经 PDE5shRNA 转染的 MSCs。建模后,每组各取 1 只大鼠取心脏组织进行病理检验,用于判断造模成功,余大鼠入组观察相关指标,于 4 周后处死,即每组 3 只大鼠进行超声心动图检测,以及 HE 染色、Masson 染色、PDE5、PKG、cGMP 检测。

**1.5 心功能的超声心动图检测** 4 周后大鼠称重,对存活的大鼠用 1% 戊巴比妥钠麻醉,将大鼠仰卧位固定,充分暴露前胸,在二维超声心动图影像指导下

检测左室收缩末期内径(LVESd)、左室舒张末期内径(LVEDd),并计算左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(FS); $FS(\%) = [(LVEDd - LVESd) / LVEDd] \times 100\%$ 。所有检测指标取三个连续心动周期的平均值。

**1.6 组织标本处理** 心脏超声心动图检测和记录完成后,迅速开胸,取心脏,剪去残余的大血管及心耳,以冰生理盐水冲洗干净,吸干水分,称心室重量。垂直心脏长轴将其分为两等份:一部分于 10% 甲醛固定,室温下保存,用于心肌组织病理学检测;另一部分置于普通 EP 管中, -80 °C 保存,用于 PCR 检测。

**1.7 心肌病理改变的观察**

**1.7.1 苏木精-伊红(HE)染色** 以 10% 的多聚甲醛固定心脏,经过固定、脱水、透明、浸蜡、包埋后做成 5 μm 切片,并进行 HE 染色。

**1.7.2 Masson 染色** 石蜡切片脱蜡后用去汞盐沉淀,用 Weigert 苏木精液染核 5 ~ 10 min,Masson 染液染色 5 ~ 10 min,浓度为 2% 的冰醋酸水溶液浸洗片刻,分别用 1% 磷钨酸水溶液、苯胺蓝染,分化、染色 5 min;再次用冰醋酸水溶液浸洗;95% 乙醇、无水乙醇、二甲苯透明,中性树脂胶封固。光镜下每个切片随机选取 20 个高倍视野,观察各组大鼠的心肌组织形态学变化及纤维化情况。

**1.8 PDE5、cGMP 和蛋白激酶(PKG)mRNA 的检测** 应用 qRT-PCR 方法检测各组大鼠心肌组织中 PDE5、cGMP、PKG mRNA 水平。提取各组大鼠心肌组织,按照试剂盒操作步骤进行 RNA 提取,然后反转录合成 cDNA,将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,用荧光定量仪进行荧光定量分析。用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算 qRT-PCR 方法检测的各目标 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 用于 qRT-PCR 的引物序列

mRNA (Rat)		引物序列(5'-3')
PDE5	正向	ATT GCT GAT TGC CGC TTT A
PDE5	反向	GTT GCC TGG GCT GTT TAG
cGMP	正向	TTG CTA TCC TCA ACA CCC AT
cGMP	反向	CCC ACT TCA GCC ATC TTC T
PKG	正向	AGT GGT TTG AGG GCT TTA
PKG	反向	ATG TCC CAG CCT GAG TTG
β-actin	正向	GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TAG C
β-actin	反向	GGC CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T

**1.9 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间均数比较采用单因素方差分析及两两比较的 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 心脏超声心动图检查结果 实验4周后,MI 各组大鼠心室腔明显扩张,左心室心肌收缩功能明显降低。与假手术组相比,MI 各组大鼠的LVESd、LVEDd增大,LVEF、FS降低,差异有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ );与模型组相比,MSCs-Ad-Null组、MSCs-shRNA-PDE5组的LVESd、LVEDd降低、MSCs-shRNA-PDE5组的LVEF、FS升高,差异有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ );与MSCs-Ad-Null组相比,MSCs-shRNA-PDE5组的LVEDd降低、LVEF、FS升高,差异有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。见图1、表2。

2.2 光镜下心脏病理学检查结果 (1)HE染色结果显示,假手术组的心肌细胞排列规则,未见充血及炎性细胞浸润;MI各组心肌细胞排列紊乱,心肌细胞肿胀、断裂,细胞核溶解,炎性细胞浸润;与模型组比较,MSCs-Ad-Null组、MSCs-shRNA-PDE5组的心肌病理改变逐渐减轻。见图2。(2)Masson染色结果显示,正常心肌纤维呈红色,胶原纤维呈蓝色;假手术组未见明显蓝色沉积,模型组有大量蓝色胶原纤维沉积,梗死边缘区纤维化面积较大。与模型组比较,MSCs-Ad-Null组、MSCs-shRNA-PDE5组的蓝色胶原沉积情况逐渐减少。见图3。

2.3 PDE5、cGMP、PKG mRNA的表达 各组大鼠心

表2 各组大鼠超声心动图所测心功能变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	只数	LVESd(mm)	LVEDd(mm)	LVEF(%)	FS(%)
假手术组	3	4.35 ± 1.32	1.87 ± 0.62	91.17 ± 1.61	57.83 ± 3.62
模型组	3	7.17 ± 0.42 <sup>a</sup>	5.90 ± 0.39 <sup>a</sup>	44.67 ± 4.31 <sup>a</sup>	19.17 ± 2.52 <sup>a</sup>
MSCs-Ad-Null组	3	5.84 ± 0.36 <sup>ab</sup>	4.80 ± 0.18 <sup>ab</sup>	45.67 ± 4.25 <sup>a</sup>	19.67 ± 2.25 <sup>a</sup>
MSCs-shRNA-PDE5组	3	5.98 ± 0.48 <sup>ab</sup>	3.77 ± 0.23 <sup>abc</sup>	73.00 ± 2.18 <sup>abc</sup>	37.00 ± 1.73 <sup>abc</sup>
$F$ 值		7.031	56.204	139.163	155.684
$P$ 值		$< 0.05$	$< 0.01$	$< 0.01$	$< 0.01$

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与MSCs-Ad-Null组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

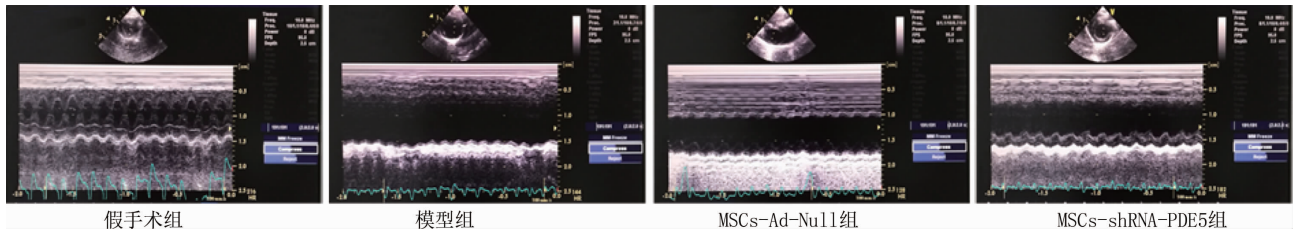


图1 各组大鼠超声心动图

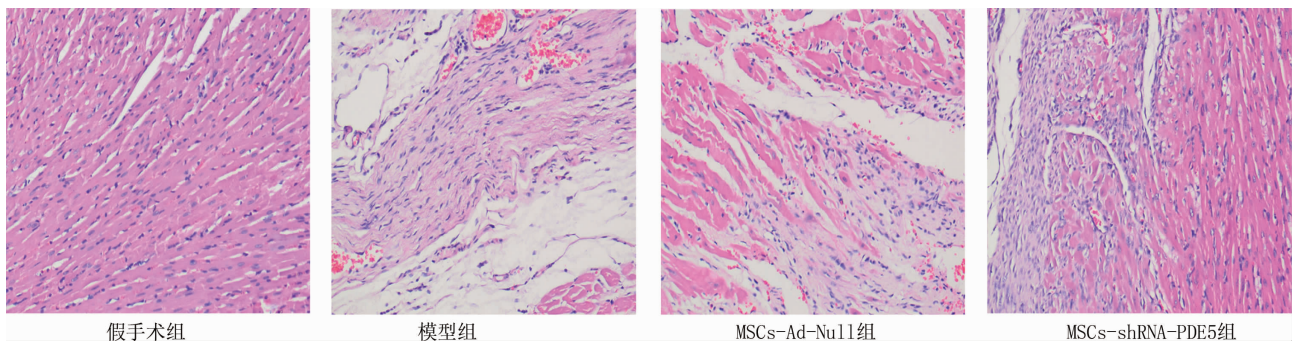


图2 各组大鼠心肌组织病理图 (HE染色,  $\times 200$ )

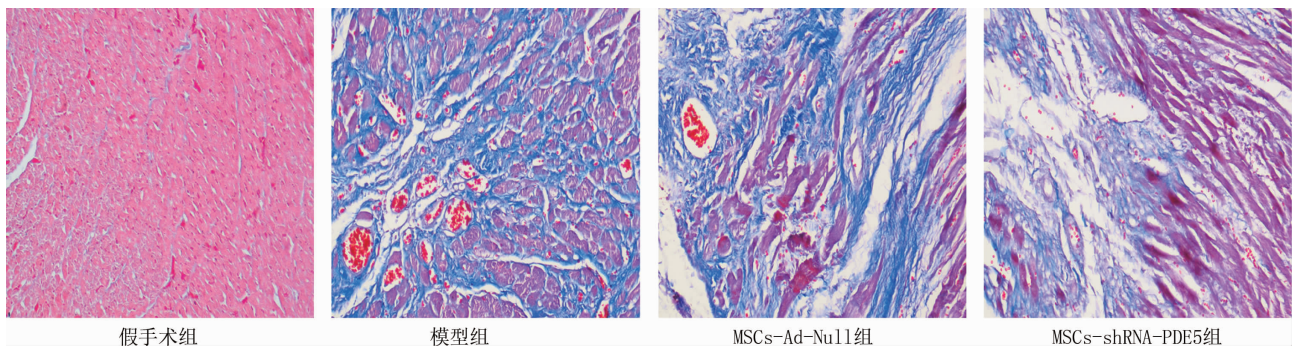


图3 各组大鼠心肌组织病理图 (Masson染色,  $\times 200$ )

表3 各组大鼠 PDE5、cGMP、PKG mRNA 的相对表达量比较

 $(\bar{x} \pm s)$ 

组别	只数	PDE5 mRNA	cGMP mRNA	PKG mRNA
假手术组	3	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.02
模型组	3	2.66 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>
MSCs-Ad-Null 组	3	1.82 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>ab</sup>
MSCs-shRNA-PDE5 组	3	0.51 ± 0.04 <sup>abcd</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>abcd</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>abcd</sup>
F 值		286.645	445.220	209.950
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与 MSCs-Ad-Null 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

肌中均可检测出 PDE5、cGMP、PKG mRNA 的表达,且四组间相对表达量差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。与假手术组 PDE5 mRNA 表达相比,模型组、MSCs-Ad-Null 组表达升高( $P$  均  $< 0.05$ ),而 MSCs-shRNA-PDE5 组表达降低( $P < 0.05$ );按模型组 → MSCs-Ad-Null 组 → MSCs-shRNA-PDE5 组之序,PDE5 mRNA 表达呈依次递降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。

与假手术组 cGMP、PKG mRNA 表达相比,MI 各组大鼠表达均降低( $P$  均  $< 0.05$ );依模型组 → MSCs-Ad-Null 组 → MSCs-shRNA-PDE5 组之序,cGMP、PKG mRNA 表达呈依次递升( $P$  均  $< 0.05$ ),差异有统计学意义。见表 3。

### 3 讨论

MI 后会代偿性激活心肌成纤维细胞、心肌细胞和细胞外基,使其分泌大量胶原蛋白,从而损伤心肌组织功能,造成心肌纤维化,进而发生心室重构等病理过程,最终导致 HF 的发生<sup>[10-11]</sup>。其主要表现为心室收缩和舒张功能障碍,即心室的增大和左室收缩功能的下降,减轻 MI 后心室重构有利于心功能的改善,减少 HF 的发生。

目前,干细胞移植成为治疗 MI 后 HF 领域的新靶点<sup>[12-13]</sup>,移植具有心肌再生能力的干细胞来代替梗死心肌显示出了巨大的治疗潜能。骨髓 MSCs 由于拥有多向分化潜能(multidirectional differentiation potential)、可从自体获得、体外易于培养扩增的优势,成为最具移植潜力的干细胞来源<sup>[14]</sup>。研究表明,MSCs 可分化为多种细胞,这其中便包括心肌细胞,并可通过旁分泌作用抗细胞凋亡、抗纤维化、促进血管新生,起到改善心室重构、提高心功能的作用<sup>[15-16]</sup>。Garcia 等<sup>[17]</sup>的体外研究显示,PDE-5 在心脏衰竭的心肌中升高,并影响心肌细胞的重构。心肌损伤患者左室 PDE5 表达活性升高,MI 后左室重构不良,而抑制 PDE5 的表达则可减少 MI 面积,提高存活

率<sup>[18-19]</sup>。cGMP 是细胞内重要的第二信使,是 PDE5 上的高亲和位点,它可以起到改善左心室收缩功能及心室重构的作用,减少缺血再灌注所带来的损伤,而 PKG 是 cGMP 信号级联反应的主要下游通道之一,cGMP/PKG 信号通路的失调与心血管疾病的发生紧密相关<sup>[20-21]</sup>,PDE5 则是该信号通路的重要参与者,抑制 PDE5 的表达可增加 cGMP 的表达从而激活 PKG,对延缓心室重构具有重要作用。前期研究中<sup>[22]</sup>,本课题组构建了一个以 PDE5 为靶点的 shRNA,并构建、筛选稳定表达它的腺病毒载体,利用其抑制 PDE5 具有延长保护作用时间的优点,观察到 PDE5shRNA 可对阿奇霉素致心肌病的小鼠心肌起到保护作用,改善其心肌纤维化,抑制心室重构。

因此,本课题将 PDE5shRNA 与 MCS 相结合,观察这种经基因修饰后的 MCSs 对 MI 后相关指标及因子的影响,本实验主要以大鼠心功能指标、心肌细胞病理改变及心肌纤维化情况、心肌中 PDE5、cGMP、PKG mRNA 的表达来评估 MI 后心室重构的程度。通过比较各组以上数据发现,无论是经空白腺病毒载体还是经 PDE5shRNA 转染的 MSCs 对 MI 后心室重构均有不同程度的改善,但 PDE5shRNA 转染的 MSCs 对心室重构的改善更为显著,且这种改善在 MI 发生后早期(4 周内)即发挥作用,尤其体现在增加大鼠 LVEF 及降低心肌中 PDE5 表达方面,在抑制 PDE5 表达的同时可能存在激活 cGMP/PKG 因子通路途径,进而调节 cGMP、PKG 的表达。在减少 LVESd、LVEDd 增大方面未见比空白腺病毒载体转染的 MCSs 更明显,可能与本实验观察周期较短、实验样本量较少有关,其对 MI 后心室重构的远期影响及优势仍待进一步研究。

综上所述,导入 PDE5shRNA 后的 MSCs 可以增强干细胞治疗 MI 的作用,更好地改善心功能,减少 MI 后心室扩大,增强心室收缩功能,抑制心肌细胞纤维化,同时显著降低 MI 后心肌中 PDE5 的表达、提高 cGMP、PKG 的表达,从而减轻 MI 后心室重构及心脏

功能障碍,基因修饰干细胞技术比单独基因治疗或干细胞治疗更具明显优势,对治疗 MI 后的 HF 或有重大意义。

## 参考文献

- [1] 梁峰,胡大一,沈珠军. 急性 ST 抬高型心肌梗死后心力衰竭的现代诊治[J]. 中国循证心血管医学杂志,2019,11(9):1029-1039.
- [2] Shah R, Ziegler O, Yeri A, et al. MicroRNAs associated with reverse left ventricular remodeling in humans identify pathways of heart failure progression[J]. *Circ Heart Fail*,2018,11(2):e004278.
- [3] Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, et al. Inflammation as a driver of adverse left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*,2016,67(17):2050-2060.
- [4] Wang CJ, Weng LH, Hsu SL, et al. pCMV-BMP-2-transfected cell-mediated gene therapy in anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits[J]. *Arthroscopy*,2010,26(7):968-976.
- [5] Guo Z, Li Y, Ding SW. Small RNA-based antimicrobial immunity[J]. *Nat Rev Immunol*,2019,19(1):31-44.
- [6] 袁喜先,张蒙蒙,曲若梅,等. Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株对人 HT-29 结肠癌细胞中 PCNA, Ki-67 表达的影响[J]. 中国临床研究,2019,32(5):597-599,603.
- [7] Li L, Haider HKh, Wang L, et al. Adenoviral short hairpin RNA therapy targeting phosphodiesterase 5a relieves cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2012,302(10):H2112-H2121.
- [8] He JG, Li HR, Han JX, et al. GATA-4-expressing mouse bone marrow mesenchymal stem cells improve cardiac function after myocardial infarction via secreted exosomes[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):9047.
- [9] Wang QL, Wang HJ, Li ZH, et al. Mesenchymal stem cell-loaded cardiac patch promotes epicardial activation and repair of the infarcted myocardium[J]. *J Cell Mol Med*,2017,21(9):1751-1766.
- [10] Zhang L, Mandry D, Chen B, et al. Impact of microvascular obstruction on left ventricular local remodeling after reperfused myocardial infarction[J]. *J Magn Reson Imaging*,2018,47(2):499-510.
- [11] Castelvechio S, Moroni F, Menicanti L. The matter of reverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction between fiction and reality[J]. *J Cardiovasc Med*,2018,19(8):397-398.
- [12] Narita T, Suzuki K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure[J]. *Heart Fail Rev*,2015,20(1):53-68.
- [13] Bartolucci J, Verdugo FJ, González PL, et al. Safety and Efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure; a Phase 1/2 Randomized Controlled Trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy][J]. *Circ Res*,2017,121(10):1192-1204.
- [14] 常影,李树岩,董明慧. 骨髓间充质干细胞联合 VEGF 基因移植对 AMI 心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国临床研究,2012,25(5):420-423.
- [15] Jung JH, Fu X, Yang PC. Exosomes generated from iPSC-derivatives: new direction for stem cell therapy in human heart diseases[J]. *Circ Res*,2017,120(2):407-417.
- [16] Blondiaux E, Pidiol L, Autret G, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-loaded fibrin patches act as a reservoir of paracrine factors in chronic myocardial infarction[J]. *J Tissue Eng Regen Med*,2017,11(12):3417-3427.
- [17] Garcia AM, Nakano SJ, Karimpour-Fard A, et al. Phosphodiesterase-5 is elevated in failing single ventricle myocardium and affects cardiomyocyte remodeling in vitro[J]. *Circ Heart Fail*,2018,11(9):e004571.
- [18] De Vecchis R, Cesaro A, Ariano C, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors improve clinical outcomes, exercise capacity and pulmonary hemodynamics in patients with heart failure with reduced left ventricular ejection fraction; a meta-analysis[J]. *J Clin Med Res*,2017,9(6):488-498.
- [19] Wang R, Xi L, Kukreja RC. PDE5 Inhibitor tadalafil and hydroxychloroquine cotreatment provides synergistic protection against type 2 diabetes and myocardial infarction in mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2017,361(1):29-38.
- [20] Wan X, Belanger K, Widen SG, et al. Genes of the cGMP-PKG-Ca<sup>2+</sup> signaling pathway are alternatively spliced in cardiomyopathy: role of RBFOX2[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*,2020,1866(3):165620.
- [21] Persoon S, Paulus M, Hirt S, et al. Cardiac unloading by LVAD support differentially influences components of the cGMP-PKG signaling pathway in ischemic and dilated cardiomyopathy[J]. *Heart Vessels*,2018,33(8):948-957.
- [22] 肖锦雯,李龙虎,洪炳哲. 抑制磷酸二酯酶 5 的短发夹 RNA 重组腺病毒载体对阿霉素所致心肌病小鼠的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(14):1344-1347.

收稿日期:2020-03-19 修回日期:2020-05-08 编辑:石嘉莹