

成体干细胞治疗肺动脉高压的研究现状

谢镇国(综述), 谢良地(审校)

福建医科大学附属第一医院, 福建省高血压研究所, 福州 350005

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是指原因未明的肺血管阻力的进行性增高伴有肺血管重构为特征的心肺综合征。目前对于 PAH 的内科治疗主要的策略是应用血管扩张剂,包括钙拮抗剂,前列环素及其衍生物,一氧化氮,磷酸二酯酶 III 抑制剂,内皮素受体拮抗剂,血管紧张素转换酶抑制剂及血管紧张素受体拮抗剂也有一定作用,近年来还有人试图使用他汀改善肺动脉的血管重建。这些治疗方法在一定程度上改善了 PAH 患者的生活质量,然而这些药物虽然能够扩张肺动脉,降低肺血管阻力,改善患者的肺功能及临床症状,但抑制和逆转肺血管重构的作用有限。近年来,国外的一些研究表明干细胞的移植有助于改善肺血管的内皮功能,降低肺动脉压力并且改善肺小动脉的重构^[1-3]。而且,由于成体干细胞(adult stem cells, ASC)不存在着伦理、法律、免疫排斥反应等问题,同时具有取材方便、来源广等优点,使得 ASC 在组织工程、基因治疗及个体化治疗的研究中具有较好的临床应用前景^[4]。因此,利用各种干细胞移植治疗有望成为 PAH 治疗的有效方法。

1 干细胞的概述

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞,在条件适宜或特定诱导下,能够自我复制、分化成特定的细胞,可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)和 ASC。

1.1 ESC ESC 是原始干细胞,具有全能分化性,几乎能够分化为各种成年组织细胞,包括心肌、血管内皮等细胞。但 ESC 移植在应用上存在诸多需要克服的障碍,包括来源、免疫反应、伦理学及法律等方面的问题。

1.2 ASC ASC 是存在于成体组织、具有不断增殖、自我更新和分化潜能的一类特殊的细胞群体,其基本功能是参与组织的更新、创伤修复并维持机体内环境稳定。目前在众多用于移植的 ASC 中,主要有骨髓源干细胞及脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal

stem cells, ADMSC)等。骨髓源干细胞包括多种细胞成分,如造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)、骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)以及内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)等。ASC 可在体外培养扩增,遗传背景稳定,具有多向分化潜能,可在体外被不同的诱导因子诱导分化为骨、软骨、心肌、脂肪以及内皮细胞等^[5-7]。与 ESC 移植相比,ASC 移植不涉及伦理、法律等社会问题,而且易于获得,低免疫原性,因此成为移植治疗的主要细胞来源。ASC 的这些特性使其成为再生医学研究中一种非常重要的细胞来源。

1.3 诱导多能干细胞 2006 年 Yamanaka^[8]报道了诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)方法。iPS 细胞在形态、基因和蛋白表达、表观遗传修饰状态、分化能力等方面都与 ESC 相似。与 ESC 相比,不存在伦理和免疫问题,但是,现在的 iPS 技术主要采用病毒载体引入细胞因子,这些病毒随机插进基因组后存在着激活致癌基因或抑制抑癌基因的可能性,因此仍需要大量深入细致的研究。

2 ASC 治疗 PAH 的现状

PAH 的病理生理学改变包括内皮功能失调/血管收缩增强和血管壁细胞增殖引起的血管重构,是造成 PAH 肺血管阻力增加的主要原因。目前,利用 ASC 治疗 PAH 疾病,多采用直接干细胞移植,或以干细胞为载体,携带编码某一具有血管活性物质的基因如脂联素,移植进入体内,发挥生物学作用,改善肺组织的血流动力学。

2.1 干细胞与动物实验性 PAH 的相关研究

2.1.1 MSC 治疗 PAH Baber 等^[9]采用 MSC 治疗野百合碱诱导的大鼠 PAH,在 MSC 移植后 3 周观察到与 PAH 组比较,MSC 治疗组肺血管阻力下降,血管内皮依赖的血管舒张功能改善,肺血流动力学改善。Umar 等^[10]研究野百合碱诱导的 PAH,在移植 MSC 后,肺小动脉重构改善,右心室肥厚减轻,右心室收缩末压降低。Liang 等^[11]利用 MSC 治疗慢性缺氧诱导的大鼠 PAH 模型,可以有效降低肺动脉压,改善肺小动脉重构,并改善右心室功能,逆转右心室肥厚。

Kanki-Horimoto 等^[12]研究了移植 MSC 治疗野百合碱诱导的大鼠 PAH, 可以生产新的内皮细胞, 提高肺血管床的数量, 使升高的肺动脉压下降, 肺血管阻力降低, 而且可以加强内皮细胞分泌一氧化氮, 携带内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 的 MSC 更有统计学意义。Takemiya 等^[13]的研究也证实了移植 MSC 后, 肺组织中的 6-keto PGF1 α 较 PAH 组多, 肺血管的舒缩功能改善; 携带前列腺素合酶的 MSC 比起单纯的 MSC 来, 更能修复受损的前列腺素酶系统, 可以更好地治疗野百合碱诱导的大鼠 PAH。

2.1.2 EPC 治疗 PAH 国外的一些研究利用 EPC 治疗野百合碱诱导的大鼠 PAH 模型, 观察到在移植 EPC 后, 肺动脉压下降, 肺小动脉重构逆转, 肺血流动力学改善^[14-16]。Takahashi 等^[17]采用直接肺组织注射 EPC 治疗犬 PAH, 发现犬肺组织中有新的血管形成, 并且观察到了肺组织结构的改变 (肺动脉中膜厚度变薄和肺泡壁结构改变)。Zhao 等^[18]使用 EPC 移植治疗野百合碱诱导的大鼠 PAH, 观察到与模型组比较, EPC 的移植治疗可以显著改善野百合碱处理后的肺微血管重构和肺泡毛细血管灌注, 而携带 eNOS 的 EPC 则可加强这种作用。

2.1.3 ADMSC 治疗 PAH Liu 等^[19]报道了 ADMSC 治疗肺高血流量诱导的大鼠 PAH, 观察到肺血流动力学改善, 肺小动脉中膜厚度变薄, 且血清肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、eNOS 较模型组明显升高, HGF 可增加肺血管床的数量, 改善肺血管阻力。本研究小组用野百合碱诱导 PAH 模型, 在造模 2 周后静脉移植 ADMSC, 2 周后仍观察到 ADMSC 可以在肺内定植, 并且在一定程度上改善 PAH 的血管重建^[20]。

2.2 临床研究 目前, 干细胞移植为 PAH 疾病的治疗开辟了一条新的途径, 近几年已由动物实验逐步应用于小样本临床治疗。Wang 等^[21]进行的一项前瞻性、随机临床试验共入选特发性 PAH 患者 31 例, 发现接受自身 EPC 移植加传统治疗患者 15 例较单纯接受传统治疗 (口服钙拮抗剂, 利尿剂, 硝酸盐类药物, 地高辛, 吸氧, 前列腺素 E1, 华法林和西地那非), 其 6 min 步行距离增加, 平均肺动脉压下降, 肺血管阻力下降, 未见明显的与 EPC 移植相关的副作用。国内马彩艳等^[22]用 EPC 移植治疗 13 例儿童原发性 PAH, 也证实了 EPC 治疗可以改善 PAH 的血流动力学。EPC 移植治疗 PAH 显示出良好的有效性。

3 干细胞移植治疗 PAH 的可能机制

干细胞移植降低肺动脉压力并改善肺小动脉重构

的机制目前还不十分清楚, 其可能的机制有: ①移植的干细胞分化为血管内皮细胞, 修复和恢复受损的内皮细胞, 进而恢复血管内皮的效应器功能, Kanki-Horimoto 等^[12]的研究发现移植 MSC 后, 肺动脉压下降、肺小动脉重构改善及内皮依赖的血管舒张功能改善。本研究小组的研究亦观察到, 移植 ADMSC 后, 可在 PAH 大鼠体内分化为内皮细胞^[23]。②生成新的血管, 增加肺循环的血管床面积, 减少肺循环的阻力; 在 Takahashi 等^[17]研究犬 PAH 的实验中, 亦观察到了在 EPC 移植后, 犬肺组织有新生血管形成, 肺循环血流动力学改善, 这与 EPC 移植治疗下肢缺血疾病模型和缺血性心血管疾病模型观察到的结果是一致的^[24-25]。③合成分泌生物活性物质, 促进血管新生, MSC 本身已经被证实了可以分泌多种生物活性物质^[26-28], 如血管内皮生长因子、HGF 等, 参与血管的再生和重构, 形成新的血管。

4 干细胞移植治疗 PAH 的途径

动物实验中移植途径的选择也是实现组织修复的关键一步, 目前常见的干细胞移植治疗 PAH 的途径主要包括以下几种。

4.1 静脉注射移植 经静脉途径移植细胞, 方法简单, 适用于小型动物实验研究。目前采用的有经舌下静脉、颈外静脉、尾静脉、股静脉、中心静脉等静脉移植。细胞经该途径进入体内后, 通过血液循环达到肺组织, 由于肺的微循环特点、细胞间的黏附及 PAH 时炎症的存在, 在流经肺循环的时候, 干细胞可在肺组织中定植, 移植效率较高。Takemiya 等^[13]的研究也证实了经静脉移植可以在肺组织中观察到存活的干细胞。

4.2 经气道吸入移植 颈部切开, 暴露气管, 直视下将所需干细胞在大鼠深吸气的时候注射, 使干细胞尽可能到达终末细支气管。Baber 等^[9]即采用这种方法, 并在气道周围肺实质中广泛分布着带标记的干细胞。这种方法比较简单且容易被接受, 具有较好的临床应用前景, 但是可能因为呼吸的关系, 不能保证移植的干细胞的量。

4.3 经气道直接肺组织移植 气管插管后, 在纤维支气管镜的介导下, 将所需的干细胞在直视下或 X 线透视下注射到气管周围的肺实质。本法适用于体型较大的动物, 如兔、犬等, 这种方法可以保证干细胞的移植量, 而避免在移植过程中干细胞的丢失, 但是技术水平要求高, 操作不方便。Takahashi 等^[17]第一次采用这种方法。

5 存在问题

虽然目前进行的动物研究及临床试验向我们提示

ASC 治疗 PAH 疾病的广阔前景,但仍有一些问题需要解决。

干细胞移植治疗 PAH 的相关问题:①现有研究所用干细胞均为多种细胞成分的混合物,如何能够鉴定、纯化出单一类型的细胞,及用哪一类型的干细胞进行移植治疗是安全有效的,目前仍未有这方面的研究报道;②干细胞移植的最佳剂量仍未界定,剂量少,则会影响疗效;剂量过多,则可能引起栓塞等;③何种移植途径最优,是否可以保证移植的细胞归巢于受损组织的数量,目前尚无统计学上的严格对比结果可以参照;④移植时机的选择直接影响到移植干细胞的存活。移植过早可能由于局部微环境恶劣致使大量移植的细胞死亡,移植过晚则可能局部损伤已不可逆,影响移植效果。具体的最佳移植时间仍不明确,国外的一些报道有采用野百合碱注射后 3、7、14 d^[12-13,18],均有观察到野百合碱诱导的大鼠 PAH 的肺血流动力学的改善;⑤干细胞移植的具体适应证尚无界定,目前用于实验性 PAH 模型的建立主要有:腹主动脉—腔静脉分流、左肺切除、野百合碱注射及左肺切除+野百合碱等,与人类不同类型的 PAH 之间的关联性仍不清楚;⑥移植进入体内的干细胞最终去向仍未清楚,是否分化成肺血管和基质细胞,分化出来的细胞是否有同样的生物学功能,是否可以实现结构和功能的整合;是否与局部的细胞融合;是否仅有定植而没有分化,仍需要进一步的研究。

因此在应用于临床之前,还需要更多的大规模临床双盲随机对照实验来证实其有效性和安全性,同时还需制订标准的操作规范来指导临床研究。

6 展 望

当前,利用 ASC 治疗 PAH 尚处于初级阶段,许多研究有待进一步开展。随着相关问题的解决及干细胞技术、生物技术的发展,通过阐明干细胞或经基因改造的干细胞的定向分化调控机制,建立完整的动物模型技术平台,探索各项技术在临床应用的可能性,干细胞移植治疗作为一种新的治疗手段,有望用于治疗 PAH 病人。

参考文献

- [1] Zhao Q, Liu Z, Wang Z, *et al.* Effect of prepro-calcitonin gene-related peptide-expressing endothelial progenitor cells on pulmonary hypertension[J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 84(2): 544-552.
- [2] Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, *et al.* Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice[J]. *Respir Res*, 2007, 8(8): 1-13.
- [3] Zeng C, Wang X, Hu X, *et al.* Autologous endothelial progenitor cells transplantation for the therapy of primary pulmonary hypertension[J]. *Med Hypotheses*, 2007, 68(6): 1292-1295.
- [4] Alvarez A, Unda F, Cañavate ML, *et al.* Stem cell and regenerative medicine[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009, 4(4): 287-297.
- [5] Rastegar F, Shenaq D, Huang J, *et al.* Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications[J]. *World J Stem Cells*, 2010, 2(4): 67-80.
- [6] Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, *et al.* Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 16(1): 91-104.
- [7] Lee RH, Kim B, Choi I, *et al.* Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14 (4/5/6): 311-324.
- [8] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [9] Baber SR, Deng W, Master RG, *et al.* Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2): H1120-1128.
- [10] Umar S, de Visser YP, Steendijk P, *et al.* Allogenic stem cell therapy improves right ventricular function by improving lung pathology in rats with pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(5): H1606-1616.
- [11] Liang OD, Mitsialis SA, Chang MS, *et al.* Mesenchymal stromal cells expressing heme oxygenase-1 reverse pulmonary hypertension[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(1): 99-107.
- [12] Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, *et al.* Implantation of mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase improves right ventricular impairments caused by pulmonary hypertension[J]. *Circulation*, 2006, 114(suppl 1): 181-185.
- [13] Takemiya K, Kai H, Yasukawa H, *et al.* Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for pulmonary hypertension rats[J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(3): 409-417.
- [14] Yip HK, Chang LT, Sun CK, *et al.* Autologous transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. *Crit Care*, 2008, 36(3): 873-880.
- [15] Xia L, Fu GS, Yang JX, *et al.* Endothelial progenitor cells may inhibit apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells: new insights into cell therapy for pulmonary arterial hypertension[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(4): 492-502.
- [16] Sun CK, Lee FY, Sheu JJ, *et al.* Early combined treatment with cilostazol and bone marrow-derived endothelial progenitor cells markedly attenuates pulmonary arterial hypertension in rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(3): 718-726.
- [17] Takahashi M, Nakamura T, Kajiwara N, *et al.* Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs[J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(5/6): 771-779.
- [18] Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, *et al.* Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease[J]. *Circ Res*, 2005, 96(4): 442-450.
- [19] Liu K, Liu RF, Cao GQ, *et al.* Adipose-Derived stromal cell au-

- tologous transplantation ameliorates pulmonary arterial hypertension induced by shunt flow in rat models[J]. *Stem Cells Dev*, 2011,20(6):1001-1010.
- [20] 谢镇国, 谢良地, 陈明, 等. 脂肪间充质干细胞对野百合碱诱发的大鼠肺动脉重构的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39(增刊 5): 345.
- [21] Wang XX, Zhang FR, Shang YP, *et al*. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(14): 1566-1571.
- [22] 马彩艳, 陈君柱. 内皮祖细胞移植治疗儿童原发性肺动脉高压的初步探讨[J]. *浙江医学*, 2006, 28(7): 526-531.
- [23] 陈明, 谢良地, 谢镇国, 等. 脂肪间充质干细胞的归巢研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39(增刊 5): 455.
- [24] Koiwaya H, Sasaki K, Ueno T, *et al*. Augmented neovascularization with magnetized endothelial progenitor cells in rats with hind-limb ischemia[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(1): 33-40.
- [25] Capobianco S, Chennamaneni V, Mittal M, *et al*. Endothelial progenitor cells as factors in neovascularization and endothelial repair[J]. *World J Cardiol*, 2010, 2(12): 411-420.
- [26] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, *et al*. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms[J]. *Circ Res*, 2004, 94(5): 678-685.
- [27] Heng BC, Liu H, Cao T, *et al*. Transplanted human embryonic stem cells as biological "catalysts" for tissue repair and regeneration[J]. *Med Hypotheses*, 2005, 64(6): 1085-1088.
- [28] Wang Y, Crisostomo PR, Wang M, *et al*. Nitric oxide suppresses the secretion of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor from human mesenchymal stem cells [J]. *Shock*, 2008, 30(5): 527-531.
- 收稿日期: 2011-05-30 责任编辑: 张刘锋

• 简 讯 •

雄性和雌性自发性高血压大鼠在成熟和衰老期间的心血管系统变化

张玲玉(译), 叶鹏(摘、审校)

心血管重构导致的心力衰竭通常发生于老年。检查心力衰竭治疗药物的有效性需要一个适当的动物模型, 以能够适当地模拟人体的疾病状态。方法: 自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)是一种由遗传基因调控的、研究慢性高血压诱发的心血管重构的动物模型。该研究以 SHR 为实验组, 以年龄和性别相匹配的正常血压大鼠作为对照组, 研究雄性和雌性 SHR 整个生命期的心血管系统结构、功能和电特性的变化情况, 以确定衰老的 SHR 是否能够模拟人类年龄增长所发生的相应变化。结果: 衰老的雄性和雌性 SHR 均发生进展性高血压、心室肥厚、左

心室纤维化和动作电位延长, 但葡萄糖耐量没有受损。雄性 SHR 从 15 月龄起开始出现左心室壁变薄和心腔扩张, 同时还出现收缩和舒张功能障碍、心脏僵硬度增加以及红细胞超氧化物生成增多, 但雌性 SHR 没有发生上述改变。结论: 与雌性 SHR 相反, 衰老的雄性 SHR 能更好地模拟人类高血压诱发的慢性心力衰竭。因此, 衰老的雄性 SHR 可用于研究人类慢性充血性心力衰竭的新型治疗措施。[Chan V, Fenning A, Levick SP, Loch D, Chunduri P, Iyer A, Teo YL, Hoey A, Wilson K, Burstow D, Brown L. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 57(4): 469-478.]