

间充质干细胞治疗心血管疾病的研究进展

巫洪坤[△](综述) 梁贵友^{*}(审校)

(遵义医学院附属医院胸心血管外科, 贵州 遵义 563003)

中图分类号: R654. 1

文献标识码: A

文章编号: 1006-2084(2015) 14-2538-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2015. 14. 017

摘要: 间充质干细胞(MSCs)是一类具有向广泛组织自我更新和分化潜能的成体干细胞,在移植、组织修复和再生领域具有广泛前景。近年来干细胞替代疗法成为治疗心血管疾病的热点。大量的动物实验表明, MSCs 移植具有修复和改善心肌细胞及血管细胞的能力。在临床研究中, MSCs 能有效改善左室射血分数,诱导心肌重构,降低梗死面积,减轻缺血/再灌注损伤。该文对 MSCs 的生物学特性及治疗心血管疾病的研究进展予以综述。

关键词: 缺血/再灌注损伤; 间充质干细胞; 心肌; 治疗

Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Cardiovascular Diseases WU Hong-kun, LIANG Gui-you.
(Department of Cardio-Thoracic Surgery, Zunyi Medical College Affiliated Hospital, Zunyi 563003, China)

Abstract: Mesenchymal stem cells(MSCs) are a category of adult stem cells with wide self-renewal and differentiation potential and broad prospects in the field of transplantation and tissue repair and regeneration. In recent years, the stem cell replacement therapy has become a hot spot in the treatment of cardiovascular diseases. Numerous studies in animal models have demonstrated the ability of transplanted MSCs to renovate and differentiate into cardiomyocytes and vasculature cells. In clinical trials, MSCs therapy improved left ventricular function, induced reverse remodeling, decreased infarction size and relieved ischemic-reperfusion injury. Here reviews the current understanding of MSCs biological features and MSCs in the treatment of cardiovascular disease.

Key words: Ischemic-reperfusion injury; Mesenchymal stem cells; Myocardium; Therapy

据《中国心血管病报告 2012》报道,我国每年因心血管疾病死亡的人数约为 350 万人,占总病死率的 41%,位居各种疾病之首;我国心血管病患者约为 2.9 亿人,其中心肌梗死约 250 万人、风湿性心脏病约 250 万人、先天性心脏病约 200 万人、心力衰竭约 450 万人^[1]。随着国人生活水平的不断提高,心血管疾病的发病率将有不断增加的趋势。心肌细胞是永久性细胞,损伤或者死亡后很难再生,如何修复受损的心肌从而改善心功能成为治疗心血管疾病的主要措施。干细胞移植替代疗法为心肌修复提供了有治疗前景的选择方向,尤其是属于成体干细胞的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)被认为是当前心肌细胞移植替代疗法的首选细胞。现就 MSCs 的生物学特性及 MSCs 治疗心血管疾病的研究进展予以综述。

1 MSCs 的生物学特性

1.1 MSCs 的定义 干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞,可分为胚胎干细胞和成体干细胞。成体干细胞又可分为骨髓肌成肌细胞、心肌干细胞和骨髓干细胞等。最初用于临床前研究和动物研究的是造血干细胞,在血液系统的大量应用奠定了其良好的基础,但是造血干细胞的研究成果并未达到研究者的预期,于是人们开始寻找新的替代。MSCs 属于成体干细胞中的一种,起源于中胚层和小范围的脑神经脊,具有来源广泛、易体外分离扩增、组织修复能力强及向三胚层细胞强分化的多向分化潜能的特性^[2]。因为缺乏表面特异标志物, MSCs 目前尚无统一的定义标准。对人 MSCs,国际细胞治疗协会提出了以下几点定义标准:①在标准培养条件下

必须贴壁生长;②阳性表达 CD₁₀₅、CD₇₃、CD₉₀,同时缺乏造血干细胞表面标志物 CD₃₄、CD₄₅、CD_{11a}、CD₁₉ 和人类白细胞抗原-DR;③在特殊刺激下,在体外能分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞^[3]。

1.2 MSCs 的来源 目前应用于临床前和临床研究的 MSCs 主要来源于脐带血、骨髓、脂肪等组织。近年来,源于人胎盘羊膜组织的人羊膜 MSCs(human amniotic MSCs, hAMSCs)由于与骨髓

MSCs(bone marrow MSCs, BMSCs)具有相似的生物学特征^[4],且取材更加方便,来源广泛,具备极强的增殖能力和不受伦理学的限制等优势,成为新的组织工程学和替代细胞疗法的研究热点。研究发现, hAMSCs 能有效增加缺血下肢部位的血流量和毛细血管密度^[5]。还有报道指出,来源于人羊膜的 hAMSCs 在对肝脏疾病的分化潜能和治疗中都产生了较好的作用^[6]。

1.3 MSCs 的分化功能 作为成体干细胞的一种, MSCs 不仅可以分化为骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等中胚层系细胞,还具有分化为内胚层和神经内胚层细胞系的潜能。移植后的 MSCs 可分化为 3 种类型的细胞,分别是组织特异型细胞、功能相关型细胞和调整型细胞,而心肌细胞就属于组织特异型细胞。1999 年, Makino 等^[7]首次报道 MSCs 在体外经 5-氮杂胞苷成功诱导分化为心肌细胞,该研究显示,培养出的细胞在透射电镜下明显观察到心肌终端样结构。在适合的生理刺激下, MSCs 能分化为心肌样细胞,但是 MSCs 移植后改善心功能的机制是否是因为分化为有功能的心肌样细胞产生作用,目前尚存在质疑。移植的 MSCs 大多数于 30 min 穿过内皮细胞进入血管周围组织,其对受损器官的保护作用多发生于 72 h,在此时间内能检测到的 MSCs 移植组织少之又少^[8]。另外, MSCs 转化的心肌样细胞^[9]是否能和宿主心肌同步收缩,该细胞是横向分化还是细胞融合的结果,目前都尚无定论。

1.4 MSCs 的旁分泌作用 实验研究证明, MSCs 移植后改善器官功能的效应主要来自干细胞的自分泌和旁分泌作用^[10]。旁分泌作用可以解释许多与修复相关的潜能,这些潜能包括促进新生血管形成、减少梗死面积和瘢痕形成、改善心肌的收缩功能等。MSCs 提供的微环境由其分泌的可溶性物质、细胞

表面分子以及细胞外基质组成,其中最具有功能意义的是分泌的可溶性因子。研究发现,MSCs 通过产生一些造血细胞因子来发挥其生物学效应,如血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子 1、干细胞因子、肿瘤坏死因子 α 等^[11]。这些细胞因子间接的抗凋亡、抗炎、抗纤维化等作用都促进了组织的内源性修复。

1.5 MSCs 的免疫调节功能 通过研究 MSCs 与各种不同免疫细胞的相互作用及 MSCs 与同种异体 T 细胞的相互影响,证明了 MSCs 的低免疫原性。MSCs 对 T 细胞应答具有较低的刺激阈,并且不能诱导同种异体 T 细胞的激活,要充分地激活 T 细胞需 2 个信号途径:①T 受体对主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子与抗原呈递细胞表面抗原相结合的识别;②T 细胞激活需要一个共刺激的信号,包括激活在 T 细胞内的 CD_{28} 和抗原呈递细胞内的 CD_{80} 或 CD_{86} ^[12]。MSCs 表面虽然能表达较低水平的 MHC I 类分子,但是其缺乏 MHC II 类分子和共刺激分子 CD_{80} 或 CD_{86} , CD_{40} 的表达有利于形成 MSCs 的低免疫原性。尽管干扰素 γ 可刺激 MHC I 类分子和 II 类分子的表达,但仍不能激起可引起免疫反应的 MSCs 的免疫原性。自然杀伤细胞是先天免疫系统中重要的效应细胞,这类细胞对缺乏 MHC I 类分子表达的细胞具有极强的溶解细胞的能力,同时,自然杀伤细胞也是重要的造血细胞移植过程的调节物;在体外, MSCs 对自然杀伤细胞具有抑制作用,并能下调其增殖能力、细胞毒活性和细胞因子表达;但由于 MSCs 表面低水平的 MHC I 类分子表达,自然杀伤细胞又对其有极强的杀伤作用^[13]。

2 MSCs 的移植途径

临床研究显示, MSCs 的移植途径主要有①静脉移植:静脉移植方法简单,操作要求低,患者易于接受,但是该方法存在一些缺点,即在 MSCs 到达心肌发挥效应之前会经过肺循环,而肺循环会对 MSCs 产生诱捕,尽管 MSCs 具备极强的向损伤区归巢的倾向,但在循环过程中到达心肌的细胞数量及在心肌中的归巢定位还是受到不同程度的负性影响^[14];②经冠状动脉、静脉灌注:冠状动脉移植途径是目前最常用的路径,可根据支配损伤区域的动脉进行移植灌注,能较为准确地将 MSCs 定位到损伤区,但由静脉移植的 MSCs 要经过全身循环后到达靶区,移植效率低,现已很少使用;③心肌直接注射:该方法同外科手术相结合,定点移植 MSCs,最大程度地发挥 MSCs 的生物学效应^[15],是目前行冠状动脉旁路移植术治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的首选移植途径,但是因为该方法的有创性和侵入性,其临床应用受到局限。此外,还有其他移植途径如骨髓动员、超声微泡附注移植 MSCs 等,并且还在不断的更新。

3 MSCs 对心血管疾病的治疗

3.1 缺血性心脏病 在发展中国家,心脏病的发病率和病死率仍然很高,缺血性心脏病是导致临床心力衰竭的主要原因。目前的治疗虽能在一定程度上提高损伤后心功能的恢复,但不能代替已受损的心肌细胞。受目前治疗的限制, MSCs 移植替代疗法成为一个万众瞩目的热点。基于严格的临床前研究, MSCs 移植最主要的问题是细胞植入患者体内的有效性和安全性。Strauer 等^[16]于 2001 年首次报道了 1 例男性心肌梗死患者接受自体骨髓单个核细胞经皮下冠状动脉导管移植,10 周

后,梗死区面积占左心室面积的比例从 24.6% 降低至 15.7%,射血分数、心脏指数均增加 20%~30%。移植后 4 个月, MSCs 有效限制了梗死面积,并改善了心功能。Hare 等^[17]的研究发现,对 39 例急性心肌梗死的患者经静脉移植途径治疗,3 个月后患者心电图报告提示室性心律失常发生率有效降低且伴随肺功能的提高,左心室射血分数增加了 6%。Williams 等^[18]的研究发现,在对 8 例慢性心肌梗死患者直接心肌内注射 MSCs 至梗死和纤维化区域,结果显示,治疗区域的心肌重构且产生可收缩性;3 个月后心脏舒张末容积和收缩末容积有效降低,特别是在 1 年后对该 8 例患者行连续全身 CT,未发现有异位组织的生长, Holter 心电监视也未见连续的心律失常。近年来,国内研究也证实了 MSCs 移植治疗的可行性,有学者在对 MSCs 移植治疗缺血性心脏病的研究分析中指出,无论是动物实验研究,还是小样本的临床应用研究均显示 MSCs 移植的有效性及其应用的广阔前景^[19-20]。

3.2 心力衰竭 肾素-血管紧张素-醛固酮系统的失调、内分泌系统的紊乱及炎症系统的失调是心力衰竭的重要发病机制。合理的药物治疗可以缓解心功能的损害,虽然能使患者的心功能得到一定的恢复,但仍达不到人们的预期。MSCs 治疗通过干扰炎症的级联反应和强大的旁分泌作用,理论上能有效改善心力衰竭。2006 年, Wang 等^[21]的研究将 24 例心力衰竭患者随机分为两组,在经冠状动脉内 MSCs 移植治疗后,治疗组比对照组脑钠肽水平在 3 个月后降低,而患者 6 min 行走测试能力却升高;研究没有发现治疗组患者左心室功能恢复,但是治疗组在随访中也没有发生由 MSCs 治疗可能引发的并发症(包括心律失常和免疫反应),这同样证实了 MSCs 治疗心力衰竭的可行性和安全性。2010 年, Zeinaloo 等^[22]报道了 1 例冠状动脉内移植治疗由扩张型心肌病引起的心力衰竭病例,结果显示,治疗后患者的心功能得到改善,生活质量明显提高。

3.3 心律失常 关于 MSCs 对心脏血流动力学治疗的研究报道很多,对于 MSCs 治疗心律失常和影响心肌电生理效应的研究也有相关报道,这为 MSCs 治疗心血管疾病的安全性和有效性及治疗后并发症的处理提供了有力的证据。2003 年, Pak 等^[23]发现,在移植 MSCs 至猪的心脏时发生了交感神经紧张兴奋的现象,这有可能增加发生心律失常的风险。但是,这一理论并未得到其他研究者的认同。2005 年, Amado 等^[24]在对猪心肌移植 MSCs 的研究中,并没有发现由于心律失常而突然死亡的情况。现在的研究认为,如果移植入心肌内的细胞产生反常的电生理冲动,这极有可能产生一个自律性的电脉冲,导致许多心律失常疾病发生;但是,如果移植的细胞不能与存活的心肌产生电生理联系,则反而扩大了损伤的心肌面积,导致心功能负荷加重^[25]。还有一个兴起的研究热点是 MSCs 移植能产生特殊的离子通道,这有可能抑制心律失常的病灶点,以此代替外科手术和射频消融术治疗心律失常。

3.4 心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) MIRI 是体外循环心脏直视手术术后心功能障碍和导致死亡的最主要原因。造成 MIRI 的原因主要有:①自由基损伤:活性氧类大量产生,超过自身清除能力,导致能量合成受阻^[26];②钙离子超载:大量钙离子沉积于线粒体,干扰氧化磷酸化过程,使线粒体功能障碍导致细胞能量供应不足,

最终导致细胞死亡^[27]; ③能量代谢障碍: 心肌缺血时线粒体片段化, 线粒体膜的分裂/融合平衡被打破, 导致线粒体功能障碍, 这一过程主要依赖线粒体融合蛋白 1 和线粒体融合蛋白 2 的调控^[28]; ④炎症因子的影响^[29]; ⑤心肌胰岛素抵抗^[30-32]。目前对于 MIRI 的治疗采取多环节、多阶段和多学科的联合治疗方案。主要有药物治疗(如降糖药、他汀类药物、麻醉类药物等)、缺血预处理治疗、缺血后治疗、基因治疗等治疗方式, 但总体治疗效果不满意, 病死率仍然较高。而干细胞替代疗法引发国内外学者广泛的关注。MSCs 在 MIRI 发生、发展的各个阶段都表现出一定的修复作用, 分泌释放的一些生长因子(如血管内皮细胞生长因子、肝细胞生长因子、重组人角质细胞生长因子、人单核细胞趋化蛋白 1、基质细胞衍生因子 1、成纤维细胞生长因子等)刺激对内源性细胞的修复; 同时, 在 MIRI 的炎症环境中, MSCs 可释放白细胞介素 6、白细胞介素 10、转化生长因子 β 、前列腺素 E_2 、一氧化氮等因子, 在局部形成了一个抗炎的区域, 同时这些抗炎因子也促进了 MSCs 向损伤区域归巢^[33]。徐风等^[34]在大鼠开胸阻断前降支 30 min, 开放再灌注 2 h 构建的 MIRI 模型中, 经 MSCs 干预后该组对心肌的修复明显好于胰岛素抵抗组, 这进一步证明了 MSCs 移植对 MIRI 的修复作用。但是, 对于心内直视手术必须的技术手段-体外循环, MSCs 移植治疗后 MIRI 目前未见相关报道, 值得进行更深入的探索。另外, 有研究表明, 在大鼠脑缺血损伤再灌注模型中, 缺血/再灌注损伤 24 h 后, 经尾静脉移植 hAMSCs 1 周后, 缺血损伤区大鼠神经功能明显改善, hAMSCs 在损伤区存活^[35]。hAMSCs 对体外循环后 MIRI 也具有修复作用, 相关报道较少见, 值得进一步研究。

4 小 结

现阶段研究证明, MSCs 移植凭借其强大的修复和分泌功能, 对心肌细胞的修复和心功能的恢复具有极大的促进作用, 同时也表明了 MSCs 移植替代疗法的安全性和有效性。但是, MSCs 治疗能否改善体外循环心内直视手术后 MIRI, 值得进一步研究。而对于 hAMSCs 能否成为细胞替代疗法新的细胞来源及其在对心血管疾病的治疗上, 能否为治疗带来令人满意的高效性和稳定性等问题都有必要进行更深入的探索。

参考文献

- [1] 王文, 朱曼璐, 王拥军, 等. 《中国心血管病报告 2012》概要[J]. 中国循环杂志, 2013, 28(6): 408-412.
- [2] Ren G, Chen X, Dong F, et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues[J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(1): 51-58.
- [3] Xiao W, Mohseny AB, Hogendoorn PC, et al. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis[J]. Clin Sarcoma Res, 2013, 3(1): 10.
- [4] Parolini O, Caruso M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update[J]. Placenta, 2011, 32 Suppl 2: S186-195.
- [5] Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, et al. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(3): 525-534.
- [6] 宫黎明, 方宁, 陈代雄, 等. 人羊膜间充质干细胞在大鼠受损肝组织中分化为肝细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36): 6709-6713.
- [7] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro[J]. J Clin Invest, 1999, 103(5): 697-705.
- [8] Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury[J]. Annu Rev Med, 2008, 59: 311-325.
- [9] 姜辉, 王辉山, 汪曾炜, 等. 体外诱导人骨髓间充质干细胞转化为心肌样细胞的基因表达[J]. 心肺血管病杂志, 2010, 29(1): 43-48.
- [10] Wen Z, Zheng S, Zhou C, et al. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(5): 1032-1043.
- [11] Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status[J]. Stem Cells, 2010, 28(3): 585-596.
- [12] Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, et al. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells[J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91(1): 32-39.
- [13] Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, et al. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 40(1): 84-90.
- [14] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(1): 54-63.
- [15] Ince H, Stamm C, Nienaber CA. Cell-based therapies after myocardial injury[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2006, 8(6): 484-495.
- [16] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Intracoronary human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2001, 126(34/35): 932-938.
- [17] Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(24): 2277-2286.
- [18] Williams AR, Trachtenberg B, Velazquez DL, et al. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling[J]. Circ Res, 2011, 108(7): 792-796.
- [19] 瞿海龙, 边剑飞, 张冰, 等. 间充质干细胞临床应用的前景与困惑[J]. 医学研究与教育, 2011, 28(5): 72-75.
- [20] 陈婷, 陈光辉. 间充质干细胞移植治疗心血管疾病的应用与进展[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1): 142-149.
- [21] 王建安, 谢小洁, 何红, 等. 骨髓间质干细胞移植治疗原发性扩张型心肌病的疗效与安全性[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(2): 107-110.
- [22] Zeinaloo A, Zanjani KS, Bagheri MM, et al. Intracoronary administration of autologous mesenchymal stem cells in a critically ill patient with dilated cardiomyopathy[J]. Pediatr Transplant, 2011, 15(8): 183-186.
- [23] Pak HN, Qayyum M, Kim DT, et al. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a swine model of myocardial infarction[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2003, 14(8): 841-848.
- [24] Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(32): 11474-11479.
- [25] Turan RG, Bozdogan-Turan I, Ortak J, et al. Improvement of cardiac function by intracoronary freshly isolated bone marrow cells transplantation in patients with acute myocardial infarction[J]. Circ J, 2011, 75(3): 683-691.
- [26] Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species[J]. World J Cardiol, 2011, 3(6): 186-200.
- [27] Omar MA, Wang L, Clanachan AS. Cardioprotection by GSK-3 inhibition: role of enhanced glycogen synthesis and attenuation of calcium overload[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(3): 478-486.
- [28] Chen Y, Liu Y, Dorn GW. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis[J]. Circ Res, 2011, 109(12): 1327-1331.
- [29] Kim YS, Kim JS, Kwon JS, et al. BAY 11-7082, a nuclear factor- κ B inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model[J]. Int Heart J, 2010, 51(5): 348-353.
- [30] 梁贵友, 蔡庆勇, 牛义民, 等. 葡萄糖转运蛋白 4 在犬体外循环

- 心肌胰岛素抵抗发生中的作用[J]. 中华实验外科杂志 2008 , 25(9): 1105-1107.
- [31] Liang GY ,Wu HS ,Li J *et al.* Role of insulin receptors in myocardial ischaemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass [J]. Acta Cardiol 2011 ,66(3) : 323-331.
- [32] Liu B ,Liang G ,Xu G *et al.* Intervention of rosiglitazone on myocardium Glut-4 mRNA expression during ischemia-reperfusion injury in cardio-pulmonary bypass in dogs[J]. Mol Cell Biochem , 2013 ,373(1/2) : 279-284.
- [33] Souidi N ,Stolk M ,Seifert M. Ischemia-reperfusion injury: beneficial effects of mesenchymal stromal cells [J]. Curr Opin Organ Transplant 2013 ,18(1) : 34-43.
- [34] 徐凤 ,王爱玲 ,陈峰 ,等. 骨髓间充质干细胞预移植 1 周后构建心肌缺血再灌注损伤大鼠模型[J]. 中国组织工程研究与临床康复 2011 ,15(1) : 46-50.
- [35] 徐颖 ,凌伟华 ,陆士奇 ,等. 尾静脉移植羊膜间充质干细胞治疗大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复 , 2011 ,15(49) : 9198-9201.

收稿日期: 2014-10-10 修回日期: 2014-12-15 编辑: 郑雪