

· 综述 ·

间充质干细胞治疗炎症性心肌病的研究进展

瞿海龙¹, 边剑飞¹, 周英莲¹, 杨伟红¹, 麻晓静², 梁璐¹

(1. 河北大学附属医院急诊科, 河北 保定 071000; 2. 保定市南市区妇幼保健院, 河北 保定 071000)

摘要: 炎症性心肌病是一种慢性渐进性疾患, 传统的治疗方法不能改变其心衰的结局, 寻求有效治疗策略成为目前研究重点。众多证据表明干细胞移植可改善心功能, 其中间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 还具有免疫抑制特性, 使其在治疗炎症性心肌病时具有独特优势。现就炎症感染如何诱发MSCs的功能、如何促使其归巢到受损心肌、静脉应用MSCs的可行性作一综述。

关键词: 间充质干细胞; 炎症性心肌病; 归巢

中图分类号: R542.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-490X(2012)03-0044-05

Research progress of mesenchymal stem cells treating inflammatory cardiomyopathy

JU Hailong¹, BIAN Jianfei¹, ZHOU Yinglian¹, YANG Weihong¹, MA Xiaojing², LIANG Lu¹

(1. Emergency Department, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China; 2. Woman and Child Care Service Centre of Baoding Southern Downtown, Baoding 071000, China)

Abstract: Inflammatory cardiomyopathy usually has a progressive course, conventional therapy can not alert the pathological process for heart failure, merging for alternative interventional strategies is necessary. There is accumulating support for the application of cellular transplantation as a strategy to improve myocardial function, Mesenchymal stem cells (MSCs) have the advantage over other stem cells that they possess immunomodulatory features, making them attractive candidates for the treatment of inflammatory cardiomyopathy. This paper gives an overview about how inflammation triggers the functionality of MSCs and how it induces cardiac homing. Finally, the potential of intravenous application of MSCs by inflammatory cardiomyopathy is discussed.

Key words: mesenchymal stem cells; inflammatory cardiomyopathy; homing

心肌炎多由炎性细胞浸润心脏导致心肌细胞变性或坏死所致, 其病因包括各种病原微生物感染、免疫功能紊乱和理化因素等, 心肌炎迁延不愈, 可致炎症性扩张性心肌病 (inflammatory dilated cardiomyopathy, DCMi)。传统的治疗方法无法阻断DCMi的病情进展, 而其他治疗手段如免疫抑制剂治疗目前仍需大规模临床实验证实。对于病毒感染阴性的患者, 免疫抑制治疗具有较好疗效^[1-2], 然而对于心肌病毒持续存在的患者, 应用免疫球蛋白和干扰素等治疗却存在争议。

众多基础和临床实验表明, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有抗凋亡、抗纤维化、促血管形成特性, 与其他干细胞相比, MSCs还具有免疫抑制的作用。炎症性心肌病可能存在免疫功能

收稿日期: 2011-12-22

作者简介: 瞿海龙 (1976—), 男, 河北涿水人, 主治医师, 硕士。E-mail:hailongju1976@sohu.com

紊乱, 这使MSCs治疗该疾患时具有独特优势。有实验证实, MSCs通过心肌内注射或静脉输注的方法, 可减轻柯萨奇病毒B3(Coxsackievirus B3, CVB-3)感染性心肌炎和自身免疫性心肌炎的症状, 减少心肌损伤和功能紊乱^[3]。因此, 干细胞移植可能具有改善心功能的作用, 现就MSCs在治疗炎症性心肌病时如何实现跨血管转运及静脉应用MSCs的可行性进行综述。

1 间充质干细胞的生物学特点

MSCs 是一种非均质、具有多向分化潜能的干细胞, 在体外培养可贴壁生长, 呈纺锤状成纤维细胞样, 能够向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞等分化。其表面阳性表达CD₂₉、CD₄₄、CD₇₁、CD₉₀、CD₁₀₆、CD_{120a}、CD₁₂₄、SH₂、SH₃、SH₄分子, 缺乏造血干细胞表面标志物, 如CD₁₄、CD₃₄、CD₄₅^[4]。MSCs具有分化为心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞的潜能。Quevedo等^[5]应用活体猪制造心肌梗死模型, 在12周后将同种异体MSCs注射到梗死心肌内, 研究发现MSCs分化为心肌细胞, 阳性表达GATA-4、Nkx2.5和 α -横纹肌肌动蛋白。

MSCs的心肌保护效应主要源于其心肌细胞分化特性、抗纤维化、免疫调节、抗凋亡及促血管形成作用。MSCs可减少心肌纤维增殖和I型及III型胶原的表达, 促进金属蛋白酶的分泌, 抑制心室肌的纤维化。MSCs的这些效应受抗纤维因子如肝细胞生长因子等的调节。众多研究显示, MSCs具有免疫调节的作用, 可影响T细胞、B细胞、树突细胞、自然杀伤细胞的功能^[6]。MSCs与同种异体组织接触后释放可溶性因子, 如白介素10(IL-10)、转化生长因子 β (TGF- β)、吲哚胺2,3-双加氧酶、前列腺素E₂, 这些因子具有免疫抑制效应。通过对糖尿病心肌病、心肌梗死和心肌炎的研究显示, MSCs治疗此类疾患时, 可减少心肌细胞凋亡、促进局部血管形成。将MSCs与CVB-3感染的HL-1心肌细胞共培养时, MSCs显示出内在的抗凋亡特性, 该特性具有一氧化氮依赖性。Nagaya等^[7]研究显示, MSCs可分泌大量的促血管形成因子、抗凋亡因子、促有丝分裂因子、血管内皮细胞生长因子、肝细胞生长因子、肾上腺髓质激素、胰岛素样生长因子-1, 这些因子参与了MSCs向内皮细胞转化, 促进心肌血管形成的过程。

2 炎症细胞因子促进MSCs活化

干扰素 γ (IFN- γ)对MSCs的活化具有重要的作用。IFN- γ 是由活化的T细胞产生的一种促炎因子, 对MSCs启动免疫抑制功能至关重要。IFN- γ 可直接作用于MSCs, 促进表面B7-H1分子的上调表达, 并通过B7-H1/PD-1通路抑制T细胞活化增殖。Ren等^[8]研究显示, MSCs的免疫抑制功能除由IFN- γ 参与外, 还需下列三种因子的任何一项因子的共同调节: 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 α 、IL-1 β 。因子间的协同作用可使MSCs表达趋化因子、诱导一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 趋化因子促使T细胞向MSCs部位发生移动, NO则可抑制该部位的T细胞反应。由iNOS^{-/-}或IFN- γ R1^{-/-}小鼠中提取的MSCs, 其免疫抑制功能消失, 采用野生型MSCs治疗小鼠移植抗宿主疾患时, 其疗效可被抗IFN- γ 或iNOS抑制剂所逆转。因此, 促炎因子对MSCs的活化、免疫抑制功能的发挥是必不可少的。Ren等进一步研究显示, 细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)对MSCs的免疫抑制具有重要的作用^[9]。将MSCs与T细胞共培养时, MSCs上调表达ICAM-1和VCAM-1, 提高T细胞的黏附能力, 且ICAM-1和VCAM-1表达越高, MSCs的免疫抑制功能越明显。炎症因子IFN- γ 、TNF- α 、IL-1的协同作用, 可诱导ICAM-1和VCAM-1的表达。采取基因敲除或功能阻断的办

法,抑制MSCs黏附分子的表达,其免疫抑制功效消失,这不仅说明黏附分子对MSCs免疫调解的作用,而且对临床采取抗黏附方法治疗各种免疫功能紊乱提供了新思路。

IFN- γ 不仅对MSCs的免疫抑制功能起着重要作用,而且对其发挥抗凋亡、抗氧化、抗病毒的功效亦至关重要。将MSCs与CVB-3感染的HL-1心肌细胞共培养,可减少心肌细胞凋亡、氧化应激和病毒释放,然而这种疗效可被抗IFN- γ 抗体所阻断。Oh等^[10]研究表明, MSCs需IFN- γ 才能产生NO,后者具有抗病毒、抗凋亡的疗效。

3 MSCs的心肌归巢机制

MSCs向心肌细胞归巢是一复杂的过程,其中包括了趋化因子间的相互作用、与内皮细胞的黏附、跨内皮、细胞骨架重组、与细胞外基质黏附作用等。众多体内实验证明, MSCs可从血液中移出,跨过内皮进入到受损组织,在受损组织局部发挥疗效。

MSCs可表达一系列趋化因子,如CXCR4和CCR2,这两种因子分别为基质细胞衍生因子-1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)与单核细胞趋化蛋白1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的受体。SDF-1 α 能够在缺氧条件下表达,促进干细胞进入受损组织。在动物的心肌梗死模型中、心肌缺血患者的心肌中, SDF-1 α 的表达明显增加^[11]。Abbott等^[12]研究显示,应用特异性阻断SDF-1 α 与其受体CXCR4结合的试剂——AMD3100, MSCs的归巢效应消失,表明SDF-1 α 可调控MSCs到达病灶部位。在心肌梗死和CVB-3诱导的心肌炎中, MCP-1的表达是上调的,且其表达量与侵入心肌的单核细胞数量存在相关性。Belema-Bedada等^[13]研究显示,由心肌细胞表达的MCP-1可通过CCR2/FROUNT途径,直接诱导MSCs归巢到受损心肌,衔接分子FROUNT对于MSCs的极化、细胞结构重组和CCR2表达有重要调节作用。炎症感染除具有促进心肌趋化因子表达外,同时还可促进MSCs趋化受体的表达。Shi等^[14]研究表明,多种细胞因子协同作用,可上调CXCR4在细胞膜和细胞内的表达,增强MSCs向SDF-1 α 趋化。Croitoru-Lamoury等^[15]表明, TNF- α 、IFN- γ 、IFN- β 均可影响趋化因子和MSCs趋化受体的表达。这些实验表明, MSCs归巢到受损组织依赖于全身和局部的炎症状态。

MSCs表达的许多分子,如整合素、选择素等参与了其跨血管转运。MSCs可表达整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 5$,大约50%的人类MSCs表达整合素迟缓抗原4 (very late antigen-4, VLA-4)^[16]。VLA-4在有血流剪切力的情况下,促进MSCs与内皮细胞的黏附,应用VLA-4的中和抗体,两者的黏附功能消失。封闭内皮细胞上VCAM-1的结合抗体, MSCs与内皮细胞的黏附受到抑制。这些结果表明, VLA-4/VCAM-1轴可调节MSCs与内皮细胞的相互作用。

MSCs具有表达黏附分子VCAM-1、ICAM-1、ICAM-3、ALCAM和CD₁₀₅功能。Segers等^[17]研究显示,应用TNF- α 、IL-1 β 活化心肌微血管内皮细胞和MSCs,可提高MSCs与内皮细胞的黏附力。MSCs移植前应用TNF- α 进行活化,可加强MSCs在体内向心肌组织的归巢能力。对心肌微血管内皮细胞进行预处理后,或对MSCs应用VCAM-1单克隆抗体进行阻断,由TNF- α 诱导的黏附作用消失。因此循环血液中的MSCs的黏附是一内皮依赖过程,炎症感染或VCAM-1均具有调节MSCs的黏附作用。

关于MSCs是如何通过内皮层的目前知之甚少。白细胞可从血液中游出进入组织内,需借助PECAM-1/CD₃₁分子的表达,而MSCs却不能表达此分子,因此尽管MSCs在血管内的移动、与内皮细胞的黏附同白细胞相似,但其通过内皮层的过程却需要自己独特的细胞因子。Schmidt等^[18]用人MSCs和内皮细胞在体外作共培养发现,30 min后MSCs形态发生改变,呈扁平状,2 h后进入内皮细胞层。该研究

同时在小鼠离体心脏上灌注MSCs, 观察体内实验效果。MSCs进入血管后, 紧密连接的血管内皮细胞间出现裂隙, MSCs与内皮细胞发生紧密接触, 然后“钻入”内皮层。应用激光共聚焦显微镜观察发现, 在灌注30 min后大约30%的MSCs跨过内皮层, 1 h大约50%跨过内皮层。Steingen等^[19]研究显示, MSCs的黏附、整合、跨内皮层时间与内皮细胞类型有关, 在心脏静脉血管中所需时间最短。

MSCs通过内皮层后, 需穿过细胞外基质方能进入到受损组织。MSCs可合成和表达基质金属蛋白酶2 (matrix metalloproteinases 2, MMP-2)、膜型基质金属蛋白酶1 (membrane type 1 MMP, MT1-MMP)、组织金属蛋白酶抑制剂1 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1)、TIMP-2。MMP-2、MT1-MMP可降解胞外基质, 促进MSCs进入受损心肌。应用RNA基因干扰技术, 敲除MMP-2、MT1-MMP、TIMP-2基因, MSCs的跨血管移动明显受限, 而TIMP-1基因沉默, 可促进MSCs的迁移。这些结果表明, 不同TIMP对MSCs的作用存在差异。

4 MSCs的静脉应用

由于MSCs具有归巢特性, 静脉滴注MSCs后可达炎性心肌组织。与冠脉注入和心肌内注射相比, 静脉输注的MSCs归巢到心肌的数量虽然减少, 但该途径却有自己独特的优势。静点MSCs后, 其可通过血流到达脾脏, 而脾脏是单核细胞的储存库。当心肌受损时可释放MCP-1, 募集单核细胞进入心脏, 使心肌发生炎症反应。然而, 过度的炎症反应是有害的, Leuschner等^[20]研究显示, 在心肌梗死患者中应用血管紧张素转化酶抑制剂, 减少进入心肌的单核细胞量, 可促进梗死心肌的恢复。对于炎症性心肌病患者而言, 脾脏内的MSCs具有抗炎效应, 可避免过多单核细胞入侵心脏, 减轻心脏的炎症反应。因此, 静脉应用MSCs更具有心肌保护作用。

CVB-3导致的炎症性心肌病患者, 其脾脏内的前B细胞、B细胞、CD₄⁺的辅助T细胞受到病毒感染。静脉应用的MSCs到达脾脏后, 可影响这些免疫细胞的功能, 包括它们的活性、凋亡以及进入心脏的能力, 进而减少此类免疫细胞进入心肌, 减轻心脏损伤。

尽管目前研究表明炎症性心肌病时MSCs可归巢到心肌, 在心肌组织内发挥免疫调节、抑制心肌细胞凋亡、促进局部血管形成的作用。但众多研究证实归巢到心肌的MSCs数量少且不易存活, 因此如何促进更多MSCs归巢到心肌、如何使其在心肌炎性环境下存活将是以后MSCs的研究重点。

参考文献:

- [1] FRUSTACI A, RUSSO M A, CHIMENTI C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(16):1995-2002.
- [2] KHL U, PAUSCHINGER M, SCHWIMMBECK P L, et al. Interferon- β treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction[J]. *Circulation*, 2003, 107(22):2793-2798.
- [3] VAN LINTHOUT S, SAVVATIS K, MITEVA K, et al. Mesenchymal stem cells improve murine acute Coxsackievirus B3-induced myocarditis[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(17):2168-2178.
- [4] 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.
- [5] QUEVEDO H C, HATZISTERGOS K E, OSKOEI B N, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33): 14022-14027.
- [6] SOTIROPOULOU P A, PEREZ S A, GRITZAPIS A D, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1):74-85.

- [7] NAGAYA N, KANGAWA K, ITOH T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2005,112(8):1128–1135.
- [8] REN Guangwen, ZHANG Liying, ZHAO Xin, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2):141–150.
- [9] REN Guangwen, ZHAO Xin, ZHANG Liying, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression[J]. *J Immunol*, 2010,184(5):2321–2328.
- [10] OH I, OZAKI K, SATO K, et al. Interferon- γ and NF- κ B mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(4):956–962.
- [11] YAMANI M H, RATLIFF N B, COOK D J, et al. Peritransplant ischemic injury is associated with up-regulation of stromal cell-derived factor-1[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(6):1029–1035.
- [12] ABBOTT J D, HUANG Y, LIU D, et al. Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury[J]. *Circulation*, 2004,110(21):3300–3305.
- [13] BELEMA-BEDADA F, UCHIDA S, MARTIRE A, et al. Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6):566–575.
- [14] SHI Mingxia, LI Jing, LIAN Lingliao, et al. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice[J]. *Haematologica*, 2007, 92(7):897–904.
- [15] CROITORU-LAMOURY J, LAMOURY F M J, ZAUNDERS J J, et al. Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN- β , and copaxone[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2007, 27(1):53–64.
- [16] RSTER B, GTTIG S, LUDWIG R J, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells[J]. *Blood*, 2006, 108(12):3938–3944.
- [17] SEGERS V F, VAN RIET I, ANDRIES L J, et al. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(4):H1370–H1377.
- [18] SCHMIDT A, LADAGE D, STEINGEN C, et al. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier[J]. *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(11):1179–1188.
- [19] STEINGEN C, BRENIG F, BAUMGARTNER L, et al. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(6):1072–1084.
- [20] LEUSCHNER F, PANIZZI P, CHICO-CALERO I, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2010,107(11):1364–1373.

(责任编辑: 刘俊华)