

## ·综述·

# 骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死的困惑与争议

瞿海龙<sup>1</sup>,彭广军<sup>1</sup>,麻晓静<sup>2</sup>,张冰<sup>1</sup>,曹国辉<sup>1</sup>

(1.河北大学附属医院 急诊科,河北 保定 071000; 2.保定同济男科医院 内科,河北 保定 071000)

中图分类号:R541 文献标志码:A 文章编号:1674-490X(2009)-06-0074-03

1999年Makino等<sup>[1]</sup>首次在体外应用5-氮胞苷(5-Aza)将骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells MSCs)定向分化成心肌细胞,为MSCs移植治疗心肌梗死提供了细胞生物学基础。2001年,Orlic等<sup>[2]</sup>将Lin-C-Kit<sup>+</sup>干细胞注射到心肌梗死小鼠的存活心肌内,发现其分化为心肌样细胞,开创了干细胞在体内移植治疗心肌梗死的先河。然而,随着研究的不断深入,众多学者对MSCs能否分化为心肌细胞、其改善心功能机制等方面产生质疑,本文就干细胞移植治疗心肌梗死存在问题与争议综述如下。

### 1 MSCs的定义及分离纯化方法

我们通常将MSCs定义为一种位于骨髓中具有自我更新、分化增殖和多向分化潜能的干细胞,在无诱导物的培养液中生长成纺锤状成纤维细胞样,并表达SH<sub>2</sub>、SH<sub>3</sub>、CD<sub>29</sub>、CD<sub>44</sub>、CD<sub>27</sub>、CD<sub>90</sub>、CD<sub>105</sub>、CD<sub>166</sub>、CD<sub>120a</sub>、CD<sub>124</sub>细胞表面标志。然而这类干细胞除分化为心肌细胞外,还能够向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、上皮细胞、内皮细胞、肌肉细胞等方向分化,表明此种定义的干细胞并非为一均质干细胞,其在体内移植治疗心肌梗死时存在分化为其他细胞的风险。Martin Breitbach等<sup>[3]</sup>研究发现,将MSCs植入到大鼠心梗模型中时, MSCs在梗死区域内形成骨化,因此寻找一种定向分化为心肌细胞的干细胞仍需深入研究。

目前,用于分离MSCs的方法主要有贴壁筛选法、密度梯度分离法、免疫磁珠法。贴壁筛选法根据MSCs可粘附在培养瓶上贴壁生长的特性,将抽取的骨髓细胞直接贴壁培养,经多次换液后去掉未贴

收稿日期:2009-09-03

作者简介:瞿海龙(1976-),男,河北涞水人,主治医师,硕士。

壁细胞。密度梯度分离法将骨髓与DMEM培养液混匀,利用分离液对其离心,收集位于分离液和悬浮液界面的单个核细胞层培养。免疫磁珠法是根据细胞表面标志,利用抗原抗体反应提取干细胞的一种方法。由于目前所采用的方法不同,致使各个实验室提取的干细胞存在差异,寻找一种迅速、准确的提取MSCs方法急需解决。

### 2 MSCs体内能否分化为心肌细胞

以往认为MSCs移植进入梗死的心肌后能够分化为心肌细胞,再生心肌,防止心室重构。Orlic等<sup>[2]</sup>在小鼠冠状动脉断流5h后将Lin-C-Kit<sup>+</sup>干细胞注射进入心肌梗死区域内,于第9日发现干细胞源性子细胞分布于68%的梗死区域,其中53%的子细胞表达心肌细胞特异性标记物,移植细胞分化为形态较小的肌细胞,与胚胎和新生肌细胞相似,而且子细胞与宿主心肌细胞之间可以形成缝隙连接。

然而,Murry等<sup>[4]</sup>以同样的细胞进行移植时,在第1周和第4周均未发现干细胞分化成为心肌细胞。Thoelen等<sup>[5]</sup>将MSCs移植进入心肌梗死羊的心脏,一个月以后,免疫组化发现MSCs的肌钙蛋白I和心肌特异性肌球蛋白均为阴性。

目前认为MSCs能否向心肌细胞分化取决于其所处的周围环境以及细胞与细胞间的接触,如何保证移植的MSCs分化为心肌细胞,需何种诱导因子的刺激,需进一步研究。

### 3 MSCs移植途径问题

目前MSCs移植的途径主要有4种:心外膜注射、心内膜注射、静脉注射和冠状动脉导管注射。心外膜注射需开胸将细胞注射到心肌梗死部位,具有定位准确的特点,可使MSCs准确移植于梗死区及

周边,最大程度实现细胞移植效果,但其手术创伤较大。Perin 等<sup>[9]</sup>在 NOGA 标测系统引导下,经主动脉瓣在心内膜下多部位注射自体骨髓干细胞,这种方法定位准确,但相关操作技术要求高。在新近的一项研究中<sup>[7]</sup>,MSCs 经心肌内注射移植到心脏后,其增殖失去控制,染色体发生突变,形成多分子层肿瘤。经导管在梗死相关冠状动脉内注射干细胞<sup>[8]</sup>,细胞可以迁移到冠状动脉外,到达梗死区域,该法将细胞治疗和介入技术相结合,手术创伤小,操作简单。然而 Vullier 等<sup>[9]</sup>研究发现,将 MSCs 经冠脉途径移植到正常狗的心脏中,发生了急性心肌缺血和亚急性心肌梗死,使其安全性受到质疑。静脉移植是最简单的方法,Haokos 等<sup>[10]</sup>研究表明,静脉途径移植 MSCs 能够促进血管形成,增加心肌局部灌注,提高左室功能。但经静脉移植的骨髓细胞很可能被其他器官阻留,因为其他器官(如肺、脾、肝等)也会发出归巢信号,这样移植细胞就会发生向肺、脾、肝等脏器“归巢”的现象,只有非常少的一部分能到达心肌梗死区<sup>[11]</sup>。

MSCs 进入机体途径不同,其在心肌内的作用效度必然不同,何种移植方法更安全、有效,目前尚有争议。

#### 4 MSCs 移植时间问题

急性心肌梗死后何时行干细胞移植才能使受体获益最大,一直是干细胞移植领域倍受关注的问题。Hu 等<sup>[12]</sup>对急性心肌梗死大鼠模型分别在1小时、1周、2周进行 MSCs 的心肌内注射移植,在移植4周后进行心功能、组织学及肌钙蛋白 T 的免疫检测,实验发现,1周移植组在 MSCs 存活数量、血管形成及心功能改善方面明显高于其他组别。作者认为此时心肌瘢痕组织尚未形成,而炎症反应较心肌梗死发病初期明显较弱,有利于移植后的 MSCs 的存活,能够产生最佳的移植效果。然而 Ma 等<sup>[13]</sup>研究发现,与其他时间移植相比,在梗死后第1天植入的细胞表现出更强的向梗死区聚集以及血管发生的能力,并认为梗死 4 d 后植入的细胞不会再发挥改善心功能的作用。

炎症反应、纤维基质形成、各种生长因子分泌等病理过程在心肌梗死后不同时期占据优势,把握最好的移植时机,使 MSCs 更好地参与心肌与新生血管形成是非常重要的,何时进行 MSCs 移植能够

取得最佳效果,需进一步实验证实。

#### 5 MSCs 治疗心肌梗死的机制

众多实验研究证实, MSCs 移植治疗心肌梗死具有改善心功能、缩小瘢痕面积的作用。其有关机制主要有以下几个方面:(1)MSCs 能够分化为具有收缩功能的心肌样细胞,表达心肌特异性收缩蛋白,与正常心肌细胞形成闰盘连接,参与宿主心肌的同步收缩,缩小瘢痕面积。(2)MSCs 本身分化为血管内皮细胞、平滑肌细胞及通过旁分泌机制分泌各种细胞活性物质,如成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子和干细胞归巢因子等<sup>[14-15]</sup>,形成血管侧支循环,增加心肌灌注,阻止细胞凋亡。(3)增加心脏粘蛋白的表达和神经的萌生以及心房交感神经的过度分布。(4)通过调节细胞外基质,缓解梗死壁变薄和左室腔扩大,提高局部室壁运动,改善舒张期松弛,减少不利的心室重塑<sup>[16]</sup>。(5)抗炎作用,Guo 等<sup>[17]</sup>研究发现, MSCs 移植到心脏后,能够抑制炎性因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素-1、白介素-6 的基因表达和蛋白产生,抑制 I 型胶原及 III 型胶原的沉积,可减小瘢痕面积。

在众多的机制中,究竟是哪一个起主要作用,还是它们共同参与的结果,在不同的实验条件下是否有明显的差异,还需要进一步研究。

#### 6 加重再狭窄问题

2004 年,韩国学者 Kang 等<sup>[18]</sup>应用粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor G-CSF)动员心梗患者外周血干细胞,并将这些干细胞于冠脉介入治疗后注入到梗死相关动脉,6 个月后发现,接受 G-CSF 动员和干细胞移植的患者其支架再狭窄明显增高,使其实验被迫终止。同样,新近一项动物实验研究发现,在大鼠胸主动脉血管成形术后,经球囊导管将 MSCs 移植到动脉内,发现 MSCs 粘附于受损的动脉内膜上,并表达平滑肌细胞表明标志物  $\alpha$ -肌动蛋白,6 周后血管再狭窄率明显高于对照组<sup>[19]</sup>。然而 Wollert 等<sup>[20]</sup>实验证实将人体自身骨髓干细胞经冠脉途径移植到心脏后,并未加重再狭窄。

MSCs 经冠脉途径移植治疗心梗时,其能否停留于梗死相关动脉,并于梗死动脉分化为平滑肌细胞加重再狭窄,需动物及临床实验深入研究。

## 参考文献:

- [1]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
- [2]Orlic D,Kajstura J,Chimenti S,et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. *Nature*,2001,410(6829):701-705
- [3]Breitbach M,Bostani T,Roell W,et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts[J]. *Blood*,2007,110(4):1362-1369
- [4]Murry C E,Soonpaa M H,Reinecke H,et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts[J]. *Nature*,2004,428 (6983):664-668
- [5]Thoelen M,Vandenabeele F,Rummens JL,et al.Ultrastructure of transplanted mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction[J]. *Heart*,2004,90(9):1046
- [6]Perin E C,Dohmann H F,Borojevic R,et al. Transendothelial,autologous bone marrow cell transplantation for severe,chronic ischemic heart failure[J]. *Circulation*,2003,107(18):2294-2302
- [7]Furlani D,Li W,Pittermann E,et al. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart[J]. *Cell Transplant*,2009,18(3):319-331
- [8]Strauer B E,Brehm M,Zeus T,et al. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction[J]. *Dtsch Med Woehenschr*,2001,126(34-35):932-938
- [9]Vulliet P R,Greeley M,Halloran S M,et al. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs[J]. *Lancet*,2004,363:783-784
- [10]Halkos M E,Zhao Z Q,Kerendi F,et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction[J]. *Basic Res Cardiol*,2008,103(6):525-536
- [11]Kocher A A,Schuster M D,Szabolcs M J,et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function [J]. *Nat Med*,2001,7(4):430-436
- [12]Hu X,Wang J,Chen J,et al. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*,2007,31(3):438-443
- [13]Ma J,Ge J,Zhang S,et al. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction[J]. *Basic Res Cardiol*,2005,100(3):217-223
- [14]Haynesworth S E,Baber M A,Caplan A I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alapha[J]. *J Cell Physiol*,1996,166:585-592
- [15]Tang Y L,Zhao Q,Qin X,et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction [J]. *Ann Thorac Surg*,2005,80:229-236
- [16]Pak H N,Qayyum M,Kim D T,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
- [17]Guo J,Lin G S,Bao C Y,et al. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction[J]. *Inflammation*,2007,30(3-4):97-104
- [18]Kang H J,Kim H S,Zhang S Y,et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial[J]. *Lancet*,2004,363(9411):751-756
- [19]Chen X C,Shan H W,Qu H L,et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation aggravates postangioplasty aortic restenosis in rats[J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*,2007,35(9):802-806
- [20]Wollert K C,Meyer G P,Lotz J,et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial [J]. *Lancet*,2004,364(9429):141-148