

脂肪来源细胞在缺血性心脏病中的应用

杨 华, 沈珠军*

(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 心内科, 北京 100730)

摘要:脂肪来源细胞(褐色脂肪来源细胞、脂肪干细胞和去分化脂肪细胞)可分化成心肌样细胞, 移植后可改善心梗后心功能, 降低心室重塑, 有可能成为最有潜力的治疗缺血性心脏病的干细胞来源。

关键词:脂肪组织; 脂肪干细胞; 去分化脂肪细胞; 缺血性心脏病; 心力衰竭

中图分类号:R 54 文献标志码:A

Application of adipose tissue-derived cells in ischemic heart disease

YANG Hua, SHEN Zhu-jun*

(Dept. of Cardiology; PUMC Hospital, PUMC & CAMS, Beijing 100730, China)

Abstract: Ischemic heart disease leading to heart failure seriously affects the life quality of patients. Stem cell transplantation has been proposed to be a promising therapy for ischemic heart disease. Adipose-tissue derived stem cells (ADSC) and dedifferentiated fat (DFAT) cells are able to differentiate into multiple cell lineages including cardiac myocytes. Transplantation of adipose-derived cells after myocardial infarction significantly improves heart function, reduces ventricular remodeling. Hence, adipose-derived cells are emerging as a new source of adult stem cells for cardiovascular repair.

Key words: adipose tissue; adipose-tissue derived stem cell; dedifferentiated adipocyte; ischemic heart disease; heart failure

无论急性还是慢性心肌缺血, 都会引起心肌细胞死亡或凋亡, 细胞数量减少, 瘢痕形成, 失去结构完整性, 最终导致心脏功能异常和电生理活动的异常。心肌细胞属于终末分化的细胞, 再生能力极低。利用外源性干细胞治疗心力衰竭是当前研究热点。2007年, Gimble等^[1]人提出用于再生医学的干细胞理想标准: 细胞量大; 获取创伤小; 可操控; 可重复地向多细胞系分化; 可安全有效自体或异体移植; 生产符合FDA的优质生产工艺标准(good manufacturing practice, GMP); 可规范地商品化生产。脂肪组织被认为符合以上所有的标准, 成为最有前途的干细胞

来源。本文就脂肪来源的细胞在缺血性心脏病领域的研究做一综述。

1 褐色脂肪来源细胞

脂肪组织分两种: 褐色脂肪及白色脂肪。褐色脂肪主要存在于小型哺乳动物及人类的婴儿时期, 最近发现也少量存在于成人体内。体外培养CD29+褐色脂肪细胞, 大于20%可分化为心肌细胞, 在急性心肌梗死大鼠心肌梗死边缘区域心肌肌肉内注射CD29+褐色脂肪细胞, 部分可分化为心肌细胞, 表达心肌特异基因, 部分分化为内皮细胞、平滑肌细

胞。心脏超声显示心功能(射血分数、梗死部位心室厚度)较对照组显著提高,而 CD29+白色脂肪细胞无上述特性^[2]。CD133+褐色脂肪细胞不但自己能分化为心肌细胞,还可通过与骨髓单个核细胞或脐带血单个核细胞共培养,诱导后者分化为心肌细胞^[3-4]。褐色脂肪在成人含量很少,脂肪来源干细胞主要来自白色脂肪组织。

2 脂肪来源干细胞

2.1 来源

白色脂肪组织经过消化离心,沉淀为基质血管成分(stromal vascular fraction, SVF),其中含有脂肪来源干细胞(adipose derived stem cells, ADSC)。ADSC 有多能分化性,不同诱导条件下可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞及心肌细胞等中胚层来源细胞,甚至外胚层来源的神经细胞。400~600 μg 脂肪组织约有 5×10^5 个 ADSC^[5],人脂肪组织中干细胞含量与年龄、体质指数(body mass index, BMI)无关,与解剖部位有关。ADSC 在下腹部含量最高,大腿内侧,膝盖次之^[6]。皮下脂肪较网膜内脂肪含有更多 ADSC^[7]。

2.2 生物学特性

ADSC 细胞表面免疫表型与骨髓间充质干细胞 90% 相同^[8];传代培养超过 4 个月会发生恶变,使用前必须做核型分析及肿瘤发生分析;HLA-DR 为阴性,适合异体移植,不但不引起细胞毒性 T 细胞反应,还抑制免疫反应,被用来治疗移植植物抗宿主病^[9];学者发现其更适合被用来诱导多能干细胞(iPS),诱导速度及效率均优于人皮肤成纤维细胞^[10]。

2.3 心肌分化能力

ADSC 在半固体培养基 MethoCult GF M3534 中自动分化为搏动心肌细胞,分化率只有 0.02%~0.07%,VEGF 受体被阻断后,心肌自动分化现象消失^[11]。用转化生长因子 β1 (transforming growth factor β1, TGF-β1) 诱导 ADSC 2 周,17% 出现心肌特异性基因及蛋白的表达,诱导效率与诱导时间有关,诱导时间短于 2 周的对照组未出现心肌分化^[12]。

2.4 治疗方法及效果

在冠脉内输入自体 ADSC 治疗猪急性心肌梗死,核素心肌显像提示,左室射血分数提高 11.4%

± 4.6%,绝对心肌挽救率较对照组高 12% ± 7.9%,组织切片提示,毛细血管密度增加,但发现这些细胞主要分化为内皮细胞及平滑肌细胞,未发现向心肌细胞分化^[13]。比较 ADSC 冠脉输入、静脉输入、心肌内注射 3 种移植方式,经冠脉输入的移植存活量最高,为输入量的 6%,缺点是减慢冠脉血流,增加微栓塞的面积;心肌内注射次之,3% 存活;静脉输入后心脏内检测不到移植细胞^[14]。增强表达 ADSC 上的肝细胞生长因子(HGF)治疗急性心肌梗死大鼠,28 d 后肝细胞生长因子增强表达组与单纯 ADSC 组相比,明显提高急性心肌梗死大鼠的左室射血分数和梗死区域毛细血管密度,减少 I、III 型胶原生成,抑制 TNF-α、TGF-β1 表达,缩小纤维化瘢痕面积^[15]。床旁 ADSC 分离系统 Celution system 使医师可在介入室局麻下对患者行脂肪抽吸,1 h 内分离处理 1 L 左右脂肪组织,所得 ADSC 单细胞悬液可立即用于自体移植^[16]。目前 2 项采用此系统的随机对照双盲临床试验 APOLLO(针对 ST 拾高性心肌梗死患者)及 PRECISE(针对无法血管再通的心肌缺血患者)正在进行中^[16]。材料工程方面,在培养皿表面包被上温度敏感多聚物聚 N-异丙基丙烯酰胺类聚合物[poly(N-isopropylacrylamide), PIPAAm)],此材料在 37 ℃ 时疏水,细胞可贴壁生长,当温度低于 32 ℃ 时亲水,细胞与吸附表面之间因吸满水分而分离,形成单层细胞片,避免胰蛋白酶消化损伤,不破坏细胞之间联系。在大鼠急性心肌梗死后 4 周,将 ADSC 单层细胞片植入瘢痕部位,通过旁分泌作用促进血管生成,减小瘢痕面积,增强心功能。单层 ADSC 补片与单层表皮成纤维细胞补片相比,释放更多 VEGF 和 HGF。将多层补片重叠铺放,分 10 次移植,可形成 1 mm 厚心肌组织。近年来,将单层 ADSC 在体外卷成能自主收缩的管状结构用于治疗心力衰竭有极大潜力^[17]。

3 去分化脂肪细胞

3.1 来源

脂肪组织中最多的是成熟脂肪细胞。利用成熟脂肪细胞的漂浮特性进行天花板培养,部分细胞再次进入细胞周期,逐渐吐出胞内脂滴,去分化为多能分化的干细胞样细胞,命名为去分化脂肪细胞(dedifferentiated fat, DFAT)。DFAT 来自纯度 99.9% 的成

熟脂肪细胞^[18],受其他细胞污染机会少,不会出现混杂细胞大量繁殖的情况。

3.2 生物特性

1 g 皮下脂肪可分离 $(4 \sim 6) \times 10^6$ 个成熟脂肪细胞,能获得约 3×10^7 个 DFAT 细胞。DFAT 的分化增殖能力受供者年龄影响很小,免疫表型与脂肪干细胞相似,具有多能分化性,适合异体移植^[19]。

3.3 心肌分化能力

在普通培养基中,10% ~ 15% 的 DFAT 细胞可自发分化为具有动作电位的自主搏动心肌细胞,异丙肾上腺素可加快其收缩频率,而普萘洛尔则相反。自主搏动在体外培养中可维持 2 个月^[18]。DFAT 比 ADSC 表达更高比例的 c-kit 和 Sca-1,而 c-kit、Sca-1 与多种干细胞的心肌分化有关。DFAT 细胞传代 4 次后,c-kit 表达消失,同时 DFAT 细胞心肌分化能力明显下降,推测 DFAT 的心肌分化与 c-kit 的关系更加密切^[18]。在急性心肌梗死大鼠心肌内直接注射 DFAT 细胞,8 周后心脏切片免疫组化显示,存活的移植细胞表达心肌特异标记,主要分布于梗死区域,但非梗死区域也有散在分布,梗死区域毛细血管密度增高,心脏超声显示心功能改善^[20]。抑制 BMP

或 Wnt 通路,可增强 DFAT 细胞的心肌分化^[20]。BMP 或 Wnt 两条通路在心脏发育与胚胎干细胞心肌分化中起重要作用,推测脂肪细胞与心肌细胞发育起源相近^[20]。

4 结束语

脂肪组织来源干细胞及 DFAT 为缺血性心脏病再生替代治疗提供了一个很好的细胞来源,但是未来的路还很长,细胞移植最佳时机、最佳细胞数量、最佳的输入途径、细胞移植后存活数量、分化情况以及有多少比例的移植细胞最终分化成有收缩能力的心肌细胞来加强心肌收缩? 我们究竟需不需要刻意去追求心肌分化,是否干细胞输入后所起到的旁分泌作用、促进血管生成作用、增加局部血运就已经足够了呢? 这些问题还需要更加深入的研究才能解答。过去手术中常规被丢弃的脂肪组织,今日成了再生医学研究中宝贵的资源,无偿捐献脂肪将是未来的发展趋势。从健康,年轻人群中获得的 DFAT 和 ADSC 存入细胞银行,日后可用于异体移植,将不再是一个梦想。

参考文献:

- [1] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine[J]. Circ Res, 2007, 100: 1249 – 1260.
- [2] Yamada Y, Wang XD, Yokoyama S, et al. Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342: 662 – 670.
- [3] Yamada Y, Yokoyama S, Wang XD, et al. Cardiac stem cells in brown adipose tissue express CD133 and induce bone marrow nonhematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes[J]. Stem Cells, 2007, 25: 1326 – 1333.
- [4] Yamada Y, Yokoyama S, Fukuda N, et al. A novel approach for myocardial regeneration with educated cord blood cells cocultured with cells from brown adipose tissue[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353: 182 – 188.
- [5] Zhu Yanxia, Liu Tianqing, Song Kedong, et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC[J]. Cell Biochem Funct, 2008, 26: 664 – 675.
- [6] Padoi AV, Braga-Silva J, Martins P, et al. Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration[J]. Plast Reconstr Surg, 2008, 122: 614 – 618.
- [7] Toyoda M, Matsubara Y, Lin K, et al. Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues[J]. Cell Biochem Funct, 2009, 27: 440 – 447.
- [8] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13: 4279 – 4295.
- [9] Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease[J]. Stem Cells, 2006, 24: 2582 – 2591.

- [10] Sun Ning, Panetta NJ, Gupta DM, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 15720–15725.
- [11] Song Yaohua, Gehmert S, Sadat S, et al. VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354: 999–1003.
- [12] Gwak SJ, Bhang SH, Song YH, et al. *In vitro* cardiomyogenic differentiation of adipose-derived stromal cells using transforming growth factor-beta1 [J]. Cell Biochem Funct, 2009, 27: 148–154.
- [13] Valina C, Pinkernell K, Song Yaohua, et al. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction [J]. Eur Heart J, 2007, 28: 2667–2677.
- [14] Freyman T, Polin G, Osman H, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction [J]. Eur Heart J, 2006, 27: 1114–1122.
- [15] Zhu Xiao yu, Zhang Xiangzhong, Xu Lei, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379: 1084–1090.
- [16] Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, et al. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system [J]. Cytotherapy, 2008, 10: 417–426.
- [17] Shimizu T, Sekine H, Yamato M, et al. Cell sheet-based myocardial tissue engineering: new hope for damaged heart rescue [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15: 2807–2814.
- [18] Jumabay M, Zhang Rui, Yao Yucheng, et al. Spontaneously beating cardiomyocytes derived from white mature adipocytes [J]. Cardiovasc Res, 2010, 85: 17–27.
- [19] Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential [J]. J Cell Physiol, 2008, 215: 210–222.
- [20] Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S, et al. Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47: 565–575.

手机能对抗阿尔茨海默病?

据美国 WedMD 大众医疗新闻网(2010-01-06)报道,最新研究显示,接触手机有助于对抗阿尔茨海默病。对大鼠的研究显示,长期暴露在与使用手机有关的电磁波之下能对抗、甚至逆转阿尔茨海默病。这篇研究刊载在《阿尔茨海默病期刊》(Journal of Alzheimer's Disease)中。

参与研究的南佛罗里达大学 Gary Arendash 博士表示,从成年初期开始接触手机会保护大鼠的记忆,让它们免于罹患阿尔茨海默病,这并不让他感到惊讶。令人惊讶的是,手机产生的电磁波确实能扭转阿尔茨海默病年老老鼠的记忆力损伤。

研究人员表示,他们发现,年长、有阿兹海默氏症的老鼠暴露在手机产生的电磁波下,会降低脑中乙型淀粉样蛋白的沉淀物。脑中乙型淀粉样蛋白不正常聚集形成的斑块,是阿兹海默氏症的标志,而这也是大多数疗法想要针对这种蛋白质治疗的原因。

研究人员表示,这篇研究让科学家们弄清楚接触手机与运动、饮食等其他生活方式对记忆力的功效。

科学家们用 96 只大鼠进行研究,包括用基因改造而罹患阿尔茨海默病的大鼠与正常的大鼠在内。阿尔茨海默病大鼠与正常大鼠都要暴露在有电磁波的田地中,而电磁波是在 7~8 个月内、每天使用 2 次各 1 h 手机所产生的强度。

这些大鼠并没有戴耳机,耳朵上也没有使用微小的电话,它们的笼子中央设置天线来产生手机讯号。

每只大鼠都住在与天线距离相等的地方,暴露在电磁波下,强度就与手机对着人的头部所发射出来的强度相当。

研究人员表示,如果是从成年初期的阿尔茨海默病大鼠、而且是在记忆丧失征兆出现之前开始接触手机,那它们的认知能力会得到保护;如果是年长的阿尔茨海默病大鼠,则它们的记忆损伤会加重。更甚之,接触数个月能让正常的大鼠增进记忆力。

研究人员表示,接触手机数个月的正常的大鼠显示出对记忆力的益处,在人类可能要花数年才会有类似的效果。然而,他们也警告,依结果推断,应该注意人类使用手机与接触电磁波的部分。