

临床骨髓间充质干细胞移植治疗不同时期心肌梗死的研究进展与展望

李彬 汤素琼 刘敬辉 李耀发 杨浩 刘家明 王汉生 周建国 (综述)

【摘 要】 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)是中胚层来源的具有自我更新及多向分化能力的干细胞,主要存在于全身结缔组织和器官间质中,以骨髓组织含量最为丰富。在一定的诱导条件下能分化为成骨细胞、成软骨细胞、肌腱细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞、神经细胞、骨骼肌细胞及心肌细胞等。近年来其在心肌梗死修复中的作用已有多方面的研究,多种细胞因子、骨髓间充质干细胞的培养代数、心肌梗死后的炎症因子及不同时间点的组织内环境等均可影响移植 MSCs 的增值与分化。本文即从以上几方面探讨移植时机对不同时期梗死心肌修复的影响。成人体的干细胞虽然数量稀少,但由于其可塑性强,取材容易,可实现自体化治疗,避免了 ES 细胞或异体细胞治疗的免疫排斥、伦理和未知病源感染等问题。干细胞的研究进展极大地促进了生命科学研究和生物技术产业的发展,同时也预示着一些目前难以治愈的疾病可能由于干细胞的研究与应用而得到有效治疗,最近几年受到相关研究者和社会各阶层的广泛重视,笔者就此方面的研究现状展开综述。

【关键词】 间充质干细胞; 心肌梗死; 研究进展

中图分类号: R473.5 文献标识码: A

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4351.2014.02.005

作者单位: 432000 湖北省孝感市中心医院 CT 室 (李彬, 汤素琼);
孝感市中医院 (刘敬辉); 湖北省孝感市惠民医院 (李耀发); 孝感
市卫生监督局 (杨浩); 清华大学医学部基础医学院 (刘家明, 王汉
生, 周建国)

通信作者: 李彬, E-mail: hubeixiaogan@126.com

Research progress of mesenchymal stem cells transplantation treating Myocardial infarction during different periods

Li Bin, Tang Suqiong, Liu Jinghui, Li Yaofa, Yang Hao, Liu Jiaming, Wang Hansheng, Zhou Jianguo. Xiaogan Center Hospital, Xiaogan 432000, China

【Abstract】 Mesenchymal stem cell have the ability of self updates and multi-directional differentiation, mainly existed in the connective tissue and organ interstitial, especially in the bone marrow tissue. Under the condition of certain induction, it can differentiate into osteoblasts, chondroblast, tendon cells, adipose cell, fibroblast, endothelial cells, nerve cell, skeletal muscle cell and myocardial cell etc. In recent years, the role of it in the restoration of myocardial infarction had been studied. Many factors can influence the MSCs' transplantation and differentiation including many kinds of cytokines, the number of generation of mesenchymal stem cells, inflammatory cytokines after myocardial infarction and the organization environment at different time points and so on. In this paper, the author studied the effect of transplantation opportunity on infarction myocardial repair during different periods. Although adult stem cells in the body were rare, but due to its high plasticity, materials easily, it can realize the self treatment, avoid the ES cells or with treatment of immune rejection, ethics and unknown pathogenic infection and other problems. The research progress of stem cell has greatly promoted the development of the biological technical estate and research of life science, At the same time it also indicates some difficult to cure disease can probably get well be treated because of application and the research of stem cell. It was been paid close attention to.

【Key words】 Mesenchymal stem cell; Myocardial infarction; Research progress

1 骨髓间充质干细胞的生物学特性

间充质干细胞(MSCs)具有如下特点:①MSCs 容易在体外分离培养:将骨髓自髓腔取出后,接种至培养基进行细胞培养,培养 1 h 以上,贴附于培养瓶壁的细胞即为 MSCs。接种之前采用相应抗体除去骨髓中造血细胞和内皮细胞可提高分离方法的特异性^[1]。②不受体内免疫系统的影响:LeBlanc 等^[2]检测体外分离培养 MSCs 与 T 细胞的相互作用,结果未发现增殖性抗原。Saito 等^[3]发现,取自 C57BL/6 小鼠的 MSCs 经静脉植入成年 Lewis 大鼠体内 3 个月,预先标记的 MSCs 向骨髓转移但并不引起排斥反应。③无特异性的表面标记:现在所发现的一些表面标记并不适合作为确认某种或某类干细胞的手段,因为这些标记在非干细胞也能表达,或者一些特异的标记只在某种干细胞的某一特定阶段表达,例如位于 HSC 上的 CD34。在 MSCs 上,发现了大量的表面标志物,如 CD13, CD29, CD44, CD51, CD58, CD71, CD73, CD90, CD123, CD124, CD126, CD127, CD166, TGFβ1R, HLA-A、B、C, SSEA-3, SSEA-4, D7 等,接下来的工作是,确认是否有 MSCs 表面标志物,如有,能否作为分析和检测干细胞,并作细胞分离的依据。

2 骨髓间充质干细胞移植修复梗死心肌的机制

MSCs 移植修复心肌梗死的可能机制如下:①MSCs 通过直接转化为心肌细胞修复梗死心肌组织^[4];②移植的 MSCs 在梗死心肌组织内形成浦肯野纤维,促进心肌修复^[5];③移植的 MSCs 形成心肌连接蛋白并且形成功能性的连接,促进梗死心肌修复^[6];④移植的 MSCs 通过促进梗死心肌血管增生改善心肌功能^[7];⑤移植的 MSCs 通过旁分泌作用产生多种细胞因子,促进梗死心肌的修复作用^[8]。MSCs 移植的不同时期或多或少的会对以上机制产生影响,从而影响骨髓 MSCs 在心肌梗死中的修复作用。

3 移植时期对不同时期梗死心肌修复功能的影响

3.1 细胞培养代数及是否纯化对梗死心肌修复的影响

比较不同时间贴壁细胞的生长增殖和形态变化,目前广泛认为选用早期贴壁-4~24 h 贴壁细胞进行培养最合适。在 MSCs 传代培养过程中发现:第 4~5 代之前的细胞增殖能力比较旺盛,以后其活力逐渐减弱,提示细胞脱离了体内环境之后,逐渐发生退化。Bonab MM^[9]等通过试验研究发现:体外培养的 MSCs,在体外培养 6 代以后,其分化为其他细胞的能力显著下降,因此,取用 MSCs 做实验研究时,细胞的传代次数不宜超过 4~5 代;Djouad F 等^[10]分别将纯化的与未纯化的 MSCs 注射入小鼠的心肌组织,证明纯化的 MSCs 具有免疫耐受性,不用加免疫抑制剂即可在同种异体间进行移植,而未经纯化的 MSCs 则可引起免疫排斥反应,不能在同种异体间的正常心肌组织内存活。所以细胞的传代时期及是否纯化也对 MSCs 移植后的分化产生重要影响。

3.2 细胞因子及组织微环境对骨髓间充质细胞移植最佳时期的影响

Fernández-Avilés F 等^[11-14]用实验观察了细胞因子对 MSCs 增殖的影响,发现 INF-γ(γ 干扰素)、TNF-α(肿瘤坏死因子)、SCF(干细胞因子)和 IGF-1(胰岛素样生长因子)能明显促进细胞的增殖,而 IL-4、IL-1, bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)对细胞的生长无影响。Abbott 等^[15]证明 SCF 作为一种作用于早期造血细胞的细胞因子,也加速 MSCs 的增殖并作为心肌梗死修复中一种重要的细胞因子,但不是单独足够的因子,还需要其他细胞因子的共同参与。Li TS 等^[14]发现干细胞转化生长因子 B 也可以促进 MSCs 在心脏组织中的分化及促进心肌梗死的重建,实验组心肌梗死后 bFGF 产生量迅速增加,梗死区 bFGF 的表达在梗死后第 7 天达高峰,28 d 开始下降,42 d 和 56 d 时表达明显下降,新生毛细血管密度与两者产生量成正相关,与对照组比较差异有统计学意义;Francisco 等^[11-12,15-16]发现干细胞因子可以增强 MSCs 表达心肌特异性肌球蛋白重链(MHC)及肌钙蛋白 T(TNT)的表达,从而促进 MSCs 向心肌细胞的分化;Yang JF 等^[16]通过实验证明在梗死心肌注射血管内皮细胞生长因子

(VEGF165) 及促血管生成素 (Ang-1) 可以显著改善心肌梗死大鼠心脏功能, 其与干细胞的动员有密切关系, 实验组心肌梗死区 VEGF 及 Ang-1 的表达在梗死后第 7 天达高峰, 28 d 开始下降, 42 d 和 56 d 时表达明显下降。Ma J 等^[17]发现, 心肌梗死的急性期, 机体启动自限性修复过程, 局部血管内皮细胞在缺血状态下分泌可以促进 MSCs 向心肌梗死部位归巢的基质细胞因子 (SDF-1), 从而促进骨髓干向心肌梗死区归巢, 改善心肌梗死区域的心室重构及血管再生, 心肌梗死后 1 d SDF-1 表达最高, 为 (2.62 ± 0.28) ng/ml, 7 d 时为 (0.24 ± 0.11) ng/ml, 浓度迅速降低, 两者比较 $P < 0.01$, 至 14 d 时已检测不到 SDF-1 的表达。

3.3 其他正常心肌细胞存在的机械牵拉作用及正常与梗死心肌组织对 MSCs 分化为心肌组织的影响

Niu LL 等^[18]将分离纯化后的小鼠 MSCs 移植进入正常的与梗死的小鼠心肌组织内, 发现在梗死的心肌组织内小鼠的 MSCs 分化为心肌细胞, 而在正常的小鼠心肌组织内则不发生分化。Meifeng Xu 等^[19]用实验证明, 当 BMSCs 与肌细胞一起培养时, BMSCs 转化为有心肌表型的细胞, 分化的肌细胞表达心肌转录因子 GATA-4 和心肌加强因子 2, 而相应的没有与肌细胞一起培养的 BMSCs 则为阴性。Jan Kajstura 等^[20]证明 BMSCs 的分化需要心肌细胞之间的融合。Rangappa S 等^[21]证明与 CM 直接接触前提下, CM 对 MSCs 的机械牵拉为诱导 MSCs 分化为心肌细胞的必须条件, 而单纯的心肌细胞条件培养液则非关键因素。Li GR 等^[22]分别用四种培养基对 MSCs 进行培养, 证明心肌细胞溶菌产物是一个理想的 MSCs 分化为心肌细胞的诱导物, 其促分化作用比 5-氮杂胞苷更为明显。

3.4 炎症反应对 MSCs 移植时期的影响

曹丰等^[23]证明: ①心肌梗死后 1 周内炎症反应强烈, 中性粒细胞及网状内皮吞噬系统功能活跃, 非特异性杀伤自体及异体细胞, 移植细胞的生存环境较差, 对存活不利; ②在梗死早期炎症反应尚未开始时 (1 h 内) 进行 MSCs 移植以及梗死后 2~4 周细胞移植, 细胞存活率高。其 2 周组的左室收缩末压力, 左室最大上升速率及瘢痕面积百分比的改善显著优于 1h 和 4 周移植组。

3.5 干细胞移植不同时期对梗死心肌血管生成的影响

Boyle 等^[24]阐述的早期临床实验认为是移植的干细胞本身的增值造成梗死心肌的修复, 而新近的研究则认为是移植进入的外源干细胞通过新的血管形成作用刺激内源性的心肌细胞或者干细胞增殖, 从而修复梗死的心肌组织。Strauer 等^[4]首次证明在临床条件下有选择性的经冠状动脉植入自体 BMCs 是安全和有效的, 其显著的治疗功能归功于 BMCs 相关的心肌重建及血管再生功能。Linke^[25]通过移植自体 BMCs 在狗心肌梗死自身修复与重建作用中的研究证明: 成年动物的心脏属于自我更新器官, 拥有强大的生长储备, 可以逐渐修复被破坏的和已经失去的心肌组织。Oswald J^[26], Sheng XG^[27], Fang LJ^[28]等通过在体内外的实验证明 MSCs 可以分化为血管内皮细胞, 可以作为心肌细胞重建的基础, 成为 MSCs 修复心肌细胞的机制之一。Wang JA 等^[29]于梗死心肌内注射经 BrdU 标志的自体骨髓干细胞, 4 周后发现移植组坏死

区内有大量的血管生成 ($24 \pm 5/\text{HPE}$), 而对照组却较少发现血管生成 ($11 \pm 1/\text{HP}$); Amado LC^[30]在心肌梗死后 3 天将体外培养的 MSCs 移植进入梗死的心肌组织, 结果发现与对照组相比, 移植组的左室功能及收缩面积得到显著改善^[31]。吕菁君等^[32]分别在心肌梗死后 1 周、2 周、4 周、8 周、12 周将 BrdU 标志的骨髓单个核细胞直接注射至梗死心肌周边区域, 结果发现, 在心肌梗死后 4 周内进行干细胞移植在心功能、心肌梗死面积方面优于 AMI 后 8 周、12 周移植。证明 AMI 后 1~4 周可能是较佳的移植时间, 其可能机制为 BM-MNCs 分化为血管平滑肌细胞和血管内皮细胞, 直接形成新的血管以拯救濒临凋亡的心肌组织, 并且 BM-MNCs 以自分泌或旁分泌的方式分泌多种促进血管生成的细胞因子, 促进原始血管从已存在的血管形成新的毛细血管, 以改善侧支循环。

综上所述, 影响干细胞在心肌梗死后的存活及对梗死心肌的改善功能的方面可分为: ①干细胞方面; ②梗死的心肌所产生的组织微环境及各种细胞因子对移植后干细胞的影响等方面; ③移植时间对梗死心肌血管生成方面等。选用早期贴壁、传代 4~5 代的细胞增殖能力较旺盛, 也利于纯化; 在心肌梗死后 1 周左右, 患者血液中各种促进 MSCs 向梗死心肌归巢的细胞因子浓度达最高; 在心肌梗死后早期 (1 周以内), 尚未完全梗死的心肌细胞可对移植的 MSCs 产生牵拉作用, 有利于梗死心肌的修复; 在梗死早期炎症反应尚未开始时进行 MSC 移植 (1h 内) 以及梗死后 2~4 周行细胞移植, 梗死区的炎症反应对移植的 MSCs 影响较小, 细胞存活率高; AMI 后 1~4 周进行 MSCs 移植, 其对梗死区血管生成的作用最大, 促进新生血管的形成, 从而改善侧支循环, 可能是较佳的移植时间。综合以上多种因素, 在心肌梗死后 1 周左右进行 MSCs 移植, 其对梗死心肌功能改善的作用最大^[33]。

4 问题与展望

目前干细胞移植时期存在的问题主要在于: ①已经有较多的研究证明 MSCs 移植可以有效地改善梗死的心脏功能及可以有效改善心室重构, 但是有关干细胞移植时期对梗死心脏组织修复影响方面的研究目前还较少^[34]; ②关于心梗后影响 MSCs 移植定向与分化的各种细胞因子在受体心肌组织或血液中出现的具体时间目前还不完全清楚, 各个实验室的检查结果之间也有差异; ③虽然有试验证明正常的心肌组织的存在可以促进 MSCs 向心肌细胞的分化, 但是也有试验证明梗死的心肌组织才更有效的促进 MSCs 的分化, 是否这两种作用同时存在, 哪一种作用较大, 目前还不完全清楚; ④虽然有研究证明心梗后的炎症可以影响心肌细胞的分化, 但是具体的机制目前还不完全清楚; ⑤目前虽有多种机制说明 MSCs 移植可以改善梗死心脏的功能, 但到底是哪种或哪几种机制占主要作用, 还不完全清楚。但是我们相信, 随着有关方面研究的深入, 以上问题均可以解决, MSCs 必将成为治疗心肌梗死的一项有效的临床及实验室治疗手段。

参考文献

- 1 Osiris T. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics [J]. Circ Res, 2004, 95 (1): 9-20.

- 2 LeBlanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells [J]. *Exp Hematol*, 2003, 31 (10): 890-896.
- 3 Saito T, Kuang JQ, Bittira B. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74 (1): 19-24.
- 4 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans [J]. *Circulation*, 2002, 106: 1913-1918.
- 5 Airey JA, Almeida - Porada G, Porada CD, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Form Purkinje Fibers in Fetal Sheep Heart [J]. *Circulation*, 2004, 109 (11): 1401-1407.
- 6 Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, et al. Human Mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions [J]. *J Physiol*, 2004, 555 (Pt 3): 617-626.
- 7 Lim SY, Kim YS, Ahn Y, et al. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70 (3): 530-542.
- 8 Gneccchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt - modified mesenchymal stem cell - mediated cardiac protection and functional improvement [J]. *FASEB J*, 2006, 20 (6): 661-669.
- 9 Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro [J]. *BMC Cell Biol*, 2006, 7: 14.
- 10 Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of Mesenchymal Stem cells favors tumor growth in allogenic animals [J]. *Blood*, 2003, 102 (10): 3837-3844.
- 11 Fernández - Avilés F, San Román JA, Garcia - Favde J, et al. Experimental and Clinical Regenerative Capability of Human Bone Marrow Cells After Myocardial Infarction [J]. *Circ Res*, 2004, 95 (7): 742-748.
- 12 Chedrawy EG, Wang JS, Nguyen DM, et al. Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: Anatomic basis for functional improvements [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 124 (3): 584-590.
- 13 Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, et al. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem Cells [J]. *J Physiol*, 2003, 554 (Pt 3): 659-672.
- 14 Li TS, Hayashi M, Ito H, et al. Regeneration of Infarcted Myocardium by Intramyocardial Implantation of Ex Vivo Transforming Growth Factor - β - Preprogrammed Bone Marrow Stem Cells [J]. *Circulation*, 2005, 111: 2438-2445.
- 15 Abbott JD, Huang Y, Liu D, et al. Stromal Cell - derived factor - 1 alpha 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.
- 16 Yang JF, Zhou WW, Tang T, et al. Effects of myocardial transplantation of mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial factor gene on improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction: experiment with rats [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2006, 86 (15): 1027-1034.
- 17 Ma J, Ge J, Wang J, 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.
- 18 Niu LL, Zheng M, Zhou Yi, et al. Migration and differentiation of exogenous rat mesenchymal stem cells engrafted into normal and injured heart of rats [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2004, 84 (1): 38-42.
- 19 Xu M, Wani M, Dai YS, et al. Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells Into the Cardiac Phenotype Requires Intercellular Communication With Myocytes [J]. *Circulation*, 2004, 110 (17): 2658-2665.
- 20 Kajstura J, Rota M, Whang B, et al. Bone Marrow Cells Differentiate in Cardiac Cell Lineages After Infarction Independently of Cell Fusion [J]. *Circ Res*, 2005, 96 (1): 127-137.
- 21 Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, et al. Cardiomyocyte - mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126 (1): 124-132.
- 22 Li GR, Sun H, Deng X, et al. Characterization of Ionic Currents in Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow [J]. *Stem Cells*, 2005, 23 (3): 371-382.
- 23 曹丰, 贾国良, 牛丽丽, 等. 移植时机对骨髓间充质干细胞修复梗死心肌的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26 (1): 22-27.
- 24 Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM, et al. Controversies in Cardiovascular Medicine: Is Stem Cell therapy ready for patients? [J]. *Circulation*, 2006, 114 (4): 339-352.
- 25 Axel Link, Patrick Muller, Entwistle, et al. Stem cells in the dog heart are self renewing, donogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function [J]. 2005, 102 (25): 8966-8971.
- 26 Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro [J]. *Stem Cells*, 2004, 22 (3): 377-384.
- 27 Sheng XG, Feng JZ, Li GR, et al. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into myogenic cells in vitro and expression of vascular endothelial growth factor gene after transfection [J]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Bao*, 2004, 24 (3): 290-294.
- 28 Fang LJ, Fu XB, Sun TZ, et al. An experimental study on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into vascular endothelial cells [J]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2003, 19 (1): 22-24.
- 29 Wang JA, Li CL, Fan YQ, et al. Allograft bone marrow - derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate infarcted heart [J]. *J Zhejiang Univ Sci*, 2004, 5 (10): 1279-1285.
- 30 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.
- 31 Wollert KC, Meyer GP, 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.
- 32 吕菁君, 徐红新, 魏捷, 等. 骨髓单个核细胞自体移植治疗不同时期心肌梗死的研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2005, 14 (8): 624-628.
- 33 高传玉, 牛振民, 高恩民, 等. 骨髓单个核细胞冠状动脉内移植治疗缺血性心力衰竭的新探索 [J]. *中国临床医学*, 2004, 11 (3): 303-305.
- 34 高传玉, 牛振民, 高恩民, 等. 骨髓单个核细胞治疗缺血性心力衰竭初步研究报告 [J]. *中国心血管病研究杂志*, 2004, 2 (4): 285-286.

(本文编辑: 王溪婷)