

急性心肌梗死后心肌再生治疗的研究现状

冷建春

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 的心肌再生治疗是在干细胞研究的基础上产生的, 目的是通过干细胞的移植促进梗死区心肌细胞再生、防止心室重构和改善心脏功能。目前, 国内外已尝试应用多种类型的干细胞移植促进心肌再生, 其中因骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 分化为心肌细胞的可能性最大, 是近年研究的热点。现对心肌再生的国内外相关研究现状概述如下。

1 基础实验研究

1.1 骨髓间充质干细胞 (MSCs)

MSCs 是一种在骨髓和外周血中分离出的多潜能成体干细胞, 具有很强的增殖和分化潜能, 在一定条件下可分化为心肌细胞。和其他干细胞相比, MSC 有易于体外扩增、来源广泛、无免疫排斥等优势。Hu 等^[1]分别在大鼠心肌梗死后 1 h、1 周和 2 周经心外膜移植 MSCs, 在移植后 4 周行血流动力学、梗死面积等检查发现 1 周移植组获益最大。Nassiri 等^[2]用 5-氮胞苷诱导兔的 MSCs, 2 周后表达心肌样标记物如肌球蛋白、结蛋白和肌钙蛋白 T, 电镜下可见到胞浆中有肌丝形成, 移植后 28 d 电镜下可见 MSCs 与邻近细胞以闰盘相连, 并有缝隙连接和 T 管形成, 表明两组移植的 MSCs 均能分化为成熟的心肌细胞。洗绍祥等^[3]采用同种异体 MSCs 移植治疗 AMI 大鼠, 显示 MSCs 移植能够改善 AMI 模型大鼠心脏的结构和功能。孙广龙等^[4]在兔自体 MSCs 移植基础上, 联合激光心肌血运重建治疗急性心肌梗死, 结果显示 MSCs 移植组及联合组缺血区均检出岛状分布的双染阳性细胞, 胞核呈黑色、胞浆呈棕色, 细胞移植组、激光组、联合组缺血区血管密度均显著增高 (均 $P < 0.05$), 联合组增加幅度则明显高于细胞移植组、激光组 (均 $P < 0.05$), 治疗后 4 周细胞移植组、联合组

LVEF、心尖段位移和应变值均明显改善 ($P < 0.05$)。侯淑红等^[5]将血管生成素 1 (angiopoietin 1, Angl) 基因转导的 MSCs 移植入大鼠心肌梗死区, 可促进血管再生、改善心功能。李金铁等^[6]发现 MSCs 体外诱导可分化为自发搏动的心肌样细胞, 表达心肌特异性肌钙蛋白 T、形成肌丝结构, 而细胞移植后 4、8、12 周后 PR 间期、QRS 时限和心室有效不应期缩短, 而室颤阈值增加 ($P < 0.05$), 左室收缩末期内径减小, LVEF、左室短轴缩短率均显著增加 ($P < 0.05$); 移植后 8、12 周心肌梗死面积明显缩小 ($P < 0.05$), 移植后 4 周在荧光显微镜下梗死区可见 DAPI 标记带蓝色荧光的移植 MSCs 细胞核, 至 12 周仍然存在, 但随移植时间延长荧光强度逐渐减弱, 提示 MSCs 具有分化为心肌样细胞的可塑性, 并能有效改善心肌梗死后的心电生理异常和心室结构。

1.2 成肌细胞 (skeletal myoblasts, SMs)、内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 和造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 由于 SMs 与心肌细胞同属横纹肌, 都起源于中胚层, 其分化过程相似, 且有取材方便、易于体外培养、再生能力强等特点而受关注, 早在 2003 年 Tambara 等就发现当移植的 SMs 数量足够多时 (5×10^7), 细胞能存活并定位到宿主心脏受损部位, 分化成肌管, 使梗死面积缩小、心脏功能有所改善。随后 Stagg 等^[7]发现用表达 connexin-43 基因的 SMs 移植后, 细胞间联系增加、心室紊乱得到有效控制。TOPCARE-AMI 研究及亚组研究^[8]发现 EPCs 移植能明显改善 AMI 左室功能, 梗死区心肌存活数增加、心室重构改善, 而 Numaguchi 等^[9]发现 EPCs 分化能力对细胞移植后心功能的改善有影响, CD31、VEGFR2 上调者梗死面积、左室收缩末期容积均显著缩小。田文等^[10]最近的研究结果显示 HSCs 不能有效分化为心肌细胞, 因此不能修复梗死区心肌。

1.3 心肌干细胞 (cardiac stem cell,

CSC) 2001 年美国纽约医学院 Beltrami 等在发作心脏病 7 ~ 17 h 后死亡患者受损心肌中的心肌细胞存在有丝分裂活动, 说明心肌并非终末分化的细胞。2006 年美国 Johns Hopkins 大学对 70 例成年患者的心肌组织标本, 经细胞分离确立 c-Kit⁺ 和 CD90⁺ 为 CSC, 当将这些 CSC 注射到免疫缺陷的小鼠梗死心肌边缘, 与注射成纤维细胞对照组比较, CSC 组 2 d 后 LVEF、3 周时心功能及活力心肌均明显改善 ($P < 0.01$)^[11]。

2 临床应用研究

李占全等^[12]将收治的 70 例 AMI 患者随机分为两组, 干细胞治疗组在常规治疗 (药物与介入治疗) 基础上应用粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 皮下注射动员自体骨髓于细胞, 连用 5 d, 第 6 天分离外周血干细胞悬液, 将采集后的干细胞悬液经 over the wire 球囊导管中心腔注入梗死相关动脉 (IRA); 对照组经常规方法治疗, 结果 6 个月时干细胞移植组心脏收缩末容积 (ESV) 明显减小 ($P = 0.01$)、LVEF 显著增高 ($P < 0.001$)、左室壁节段性运动积分指数 (WMSI) 明显减低 ($P < 0.001$), 而舒张末容积 (EDV) 则无显著变化 ($P = 0.07$), 显示经皮经腔冠状动脉内移植自体外周血干细胞治疗 AMI 可在近期有效地减少心肌梗死缺血面积、减轻左室重构、改善心功能。金波等^[13]报告 PCI 联合经冠状动脉自体骨髓单个核细胞 (BMMNCs) 移植治疗 ST-AMI 14 例, PCI 当天, 选取左髂后上棘为穿刺点行骨髓单个核细胞的分离纯化后冠状动脉植入; 并与 12 例仅接受 PCI 治疗者随机对照, 移植组 3 个月后 LVEF 明显提高 ($P < 0.05$), PET/CT 示移植组心肌 ¹⁸F-FDG 代谢显像明显改善, 明尼苏达生存质量评分亦明显改善; BMMNCs 移植组 6 个月后 LVEF 进一步提高, 至 12 个月时移植组 LVEF 有进一步增加的趋势; 移植组 6 个月后血清氮末端脑钠素前体水平明显降低 ($P = 0.001$), 术后 6 个月与 12 个月比较,

血清氮末端脑钠素前体水平仍有进一步下降的趋势;心力衰竭问卷评分提示移植组患者生存质量改善。杨水祥等^[14]报告 PTCA 加支架植入联合 BMMNCs 移植治疗 AMI 患者 6 例,移植前 1 周皮下注射 G-CSF 行干细胞动员,外周血采集的 BMMNCs 经纯化后由球囊导管注入梗死相关血管,随访 4 年,心肌梗死面积在干细胞移植后 3 个月时平均下降 42.7% 的基础上进一步缩小 8.03%,总梗死面积平均下降 50.73%,LVEF 增加至 55.4%,冠状动脉造影无严重狭窄和需要行血运重建的病态出现。刘品发等^[15]将 33 例 AMI 患者随机分为 BMSCs 移植组($n = 14$)和对照组($n = 19$),BMSCs 移植组在 PCI 术中分离的 BMSCs 悬液经微导管中心腔内注入梗死动脉远端,结果显示两组组内比较术前与术后 6 个月 LVEF 值差异显著($P < 0.05$),术前、术后静息心肌灌注显像的 F 值比较差异显著($P < 0.05$)。

3 中医药的相关研究

3.1 中药对干细胞动员的研究 杨敏等^[16]用大鼠 AMI 模型研究人参皂甙 Rg1 对干细胞的动员及心肌细胞分化的影响,结果显示经人参皂甙 Rg1 治疗后,外周血中 CD34 阳性细胞数和百分率均比制模前和对照组明显升高($P < 0.05$),治疗组在第 2 周、第 4 周时,心室肌质量/体重均比对照组明显低($P < 0.05$);治疗组心肌梗死区可见大量 CD34 阳性细胞浸润,其梗死面积明显减小,心肌梗死程度减轻,心肌的基本结构得到保护,提示人参皂甙 Rg1 可显著提高外周血的干细胞数量,促进干细胞归巢梗死心肌,并分化为心肌细胞样细胞,缩小梗死面积,保护缺血心肌的基本结构、减轻心室重塑。杨庆有等^[17]对比观察了益气温阳活血方(人参、黄芪、制附子等)和 G-CSF 动员骨髓干细胞对 AMI 大鼠左室重构的影响,结果显示治疗后外周血干细胞数在造模 5 天后显著升高($P < 0.001$);停药 5 d 仍高于西药组($P < 0.001$),中药组心脏重量指数下降($P < 0.001$),左室壁面积、左室腔面积均较模型组下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 中药联合 MSCs 的研究 李艳芬等^[18]研究了复方丹参滴丸(CDDP)对 MSCs 移植治疗 AMI 大鼠的干预作用,显示 CDDP 可能通过多靶点诱导植入

干细胞的成活以及向心肌样细胞的分化,能显著减小梗死面积。倪玉霞等^[19]以大鼠 AMI 模型,研究冠心 II 号方(丹参、川芎等)联合 MSCs 移植治疗后心功能变化,观察移植细胞、心肌梗死边缘区微血管密度和血管内皮生长因子的表达,显示冠心 II 号汤剂联合 MSCs 移植治疗可进一步改善心肌梗死大鼠心功能、减少心室扩张程度,两者对心肌梗死治疗具有协同作用,可促进 MSCs 移植后的血管新生,增加移植细胞区域的血供。李广斌等^[20]探索了中药心复康(西洋参、白术、枸杞子等)联合 BMSCs 移植对 AMI 大鼠心功能的影响,结果联合治疗组较单纯细胞移植组能明显减小心肌梗死面积,左心功能也有不同程度改善,显示中药联合 BMSCs 移植治疗对 AMI 更具保护作用。

4 问题与展望

AMI 的心肌再生治疗是一个快速发展的领域,尽管面临心肌修复再生的机制尚不明确和安全性等诸多问题,但心肌细胞的修复、再生作为治疗 AMI 的一种崭新手段显示了其强大生机。随着对分化调控、信号转导、归巢分子机制等研究的深入,尤其是更多临床研究的开展,必将为 AMI 治疗带来新的希望。

4 参考文献

- [1] 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.
- [2] Nassiri S M, Khaki Z, Soleimani M, et al. The similar effect of transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells with or without prior differentiation in duetion in experimental myocardial infarction [J]. Biomed Sci, 2007, 14(6): 745-755.
- [3] 洗绍祥,喻锦扬,陈洁,等.同种异体骨髓间充质干细胞移植对心梗大鼠心脏结构与功能的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4): 320-323.
- [4] 孙广龙,屈正,房芳.兔自体骨髓间充质干细胞移植联合激光心肌血运重建治疗急性心肌梗死 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(19): 3759-3764.
- [5] 侯淑红,王挹青,陈东平,等.血管生成素 1 基因修饰骨髓间质干细胞移植后心肌梗死大鼠的心功能变化

[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(19): 3665-3670.

- [6] 李金轶,钟国强,何燕,等.同种异体骨髓间充质干细胞移植对大鼠心肌梗死后心电生理异常和左室重构的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(27): 5201-5206.
- [7] Stagg M A, Coppen S R, Suzuki K, et al. Evaluation of frequency, type, and function of gap junctions between skeletal myoblasts over expressing connexin43 and cardiomyocytes: relevance to cell transplantation [J]. FASEB, 2006, 20(6): 744-746.
- [8] Schachinger V, Assmus B, Honold J, et al. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler sub study of the TOPCARE-AMI trial [J]. Clin Res Cardiol, 2006, 95(1): 13-22.
- [9] Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, et al. The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction [J]. Circulation, 2006, 114(1 Suppl): S114-119.
- [10] 田文,曾定尹,Michael Kuhlmann,等.骨髓动员对骨髓造血干细胞在心肌梗死后心脏中定植及分化的影响 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(3): 304-310.
- [11] Rachel R S, Barile L, Cho H C, et al. Cardiogenicity and regenerative potential of cardiac-derived stem cells isolated from adult human and porcine endomyocardial biopsy specimens [J]. Circulation, 2006, 114: II-51.
- [12] 李占全,张明,金元哲,等.粒细胞集落刺激因子动员自体外周血干细胞移植治疗急性心肌梗死的临床研究 [J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(2): 99-102.
- [13] 金波,杨云贵,施海明,等.经冠状动脉自体骨髓单个核细胞移植治疗急性前壁心肌梗死:12 个月疗效评价 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(12): 2267-2271.
- [14] 杨水祥,徐静,徐桂玉,等.自体骨髓干细胞移植治疗急性心肌梗死 6 例 4 年随访 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(10): 1969-1972.
- [15] 刘品发,余海茹,高琴,等.西宁地区经冠状动脉自体骨髓干细胞移植治疗急性心肌梗死的临床研究 [J]. 陕

- 西医学杂志, 2009, 38(8): 965-968.
- [16] 杨敏, 陈广玲, 陈畅, 等. 人参皂甙 Rg1 可促进大鼠心肌梗死后心肌再生 [J]. 心脏杂志, 2008, 20(6): 697-701.
- [17] 杨庆有, 陆曙, 苏伟. 益气温阳活血方动员骨髓干细胞治疗大鼠急性心肌梗死的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2): 55-57.
- [18] 李艳芬, 孙兰军, 赵英强, 等. 复方丹参滴丸干预骨髓间充质干细胞移植后心肌再生的实验研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2009, 7(9): 81-83.
- [19] 倪玉霞, 刘小青, 李貽奎, 等. 骨髓间充质干细胞移植联合冠心 II 号对大鼠急性心肌梗死心功能和血管新生的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(47): 9201-9209.
- [20] 李广斌, 苏金玲, 姜希娟, 等. 中药心复康联合骨髓间充质干细胞移植对大鼠急性心肌梗死后心功能的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2009, 28(2): 78-80.
- (收稿: 2010-09-13 编辑: 黄月薪)

蛋白质组学及其在糖尿病肾病中的应用

杨刚 范秋灵 刘晓丹 张从笑 郭佳音 王力宁

随着人们生活水平的提高以及生活方式的改变, 糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 发病率逐年上升, 目前我国约有 400 万糖尿病患者。糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 作为糖尿病常见的微血管并发症, 已成为西方国家终末期肾病最常见的原因, 占美国肾移植患者 40% 以上^[1]。DN 的发病受多种因素影响, 发病机制至今未完全阐明。蛋白质组学技术作为一种全新的系统生物学研究方法为揭示 DN 的病因病机提供了强有力帮助, 本文综述了蛋白质组学技术及其在 DN 研究中的应用情况。

1 蛋白质组学

Wilkins 等^[2]首次提出“蛋白质组 (proteome)”的概念 2009 AASM, 即微生物基因组表达的整套蛋白质。Wasinger 等^[3]第一次提出了“蛋白质组学 (proteomics)”的概念, 即存在于一种细胞内的全部蛋白质。一般来说, 蛋白质组学的研究内容主要分为两类, 即表达蛋白质组学和功能蛋白质组学^[4]。蛋白质组学研究的技术平台包括样品分离^[5-6]、鉴定和生物信息分析。其中蛋白质组学质谱技术是最重要的鉴定方法。可检测 fmol 水平级蛋白。质谱技术的主要原理是将多肽样品离子化, 离子化

的肽段因质荷比 (m/z) 不同而发生分离, 通过测量肽段离子长度、数目、氨基酸组成的不同, 结合其 PI、分子质量、物种来源、修饰情况等参数即可获得肽质量指纹图 (PMF)^[7]。目前主要有基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)、液相色谱-电喷雾串联质谱 (LC-ESI-MS/MS) 和表面增强激光解吸电离飞行时间质谱 (SELDI-TOF-MS) 等^[8-9]。

2 蛋白质组学在 DN 研究中的应用

2.1 DN 肾小球蛋白质组学研究

Barati 等^[10]利用 MALDI-TOF-MS 技术研究了 db/db 糖尿病鼠的肾小球蛋白表达谱变化, 鉴定出 40 种差异表达蛋白, 其中过氧化还原因子 I、III、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶 I 等抗氧化酶表达上调, 提示氧化应激的适应性反应与糖尿病肾病有关。然而, 谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶 I 的活性并没有改变。醛酮变位酶 I 表达亦上调, 但其活性降低。这些数据表明, 糖尿病诱导的醛酮变位酶 I 的活性降低可能是由于存在谷胱甘肽依赖性和非依赖性机制, 并且醛酮变位酶 I 的表达增加可能是由于真对丙酮醛形成过多的适应性反应能力不足引起的。

Schordan 等^[11]利用 MALDI-TOF MS 研究了长期高糖环境下人足细胞蛋白表达谱变化, 鉴定出 39 个差异表达蛋白, 包括细胞骨架蛋白、特异性膜联蛋白 (III 和 IV) 等, 并且利用 Western blot 和 immunostaining 证实了膜联蛋白 (III 和 IV) 在 DN 患者的肾小球中表达下调。这表明高血糖本身就足够大幅度改变足细胞蛋白表达谱。

2.2 DN 肾小管蛋白质组学研究

Cummins 等^[12]利用 (2D-LC-MS/MS) 研

究了 I 型糖尿病 OVE26 鼠肾小管蛋白表达谱变化。鉴定出 476 个差异表达蛋白, 这些差异表达蛋白广泛参与 TGF- β 信号传导、氧化应激和葡萄糖代谢。其中 Grb2-related adaptor protein (GRAP) 表达上调, 并且证实 GRAP 是 TGF- β 信号传导通路的新组件。表明其在 TGF- β 介导的糖尿病肾小管损伤中具有重要的潜在作用。

2.3 DN 肾组织蛋白质组学研究

Thongboonkerd 等^[13]应用 MALDI-TOF-MS 测定了 OVE26 糖尿病鼠肾组织蛋白表达谱的变化, 鉴定出 30 种差异表达蛋白, 包括弹性蛋白、凋亡相关蛋白、抗氧化物调节蛋白和细胞信号蛋白等。而且用免疫组化研究证实, OVE26 鼠弹性蛋白在致密斑表达显著增加, 并沉积于肾小管上皮细胞中, 提示弹性蛋白在糖尿病肾病肾小管异常和间质纤维化中具有重要作用。

Gong 等^[14]利用同位素标记相对和绝对定量技术和质谱技术研究了非糖尿病、糖尿病和三亚乙基胺 (TETA) 处理糖尿病鼠肾脏蛋白质质谱。与参与氧化应激和氧化磷酸化通路蛋白表达改变相比, 糖尿病鼠肾脏小管间质性肾炎抗原表达上调, 而线粒体 HSP 60、Cu/Zn 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽 S-转移酶 $\alpha 3$ 和 aquaporin-1 表达下调。TETA 处理后, 糖尿病鼠肾脏 D-氨基酸氧化酶-1、环氧化物水化酶-1、aquaporin-1 和许多线粒体蛋白表达趋于正常化, 同时伴有蛋白尿的减少。其研究表明小管间质功能相关性蛋白表达的改变, 足细胞结构变化和线粒体凋亡与 DN 病理机制相关, 并可通过 TETA 干预逆转。

2.4 DN 尿液蛋白质组学研究

由于

doi: 10.3969/j.issn.1006-5725.2011.10.083

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30700369); 留学回国人员科研启动基金资助项目 (编号: 教外司留 (2006) 331 号); 辽宁省教育厅高校科研计划项目 (编号: L2010658)

作者单位: 110001 沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肾内科

通信作者: 范秋灵 E-mail: cmufql@163.com