

脂肪间质干细胞在心肌缺血性疾病中的应用

张雅永 综述 蒋立虹, 侯宗柳 审校

(昆明医学院附属延安医院心胸外科, 云南 昆明 650051)

[摘要] 脂肪间充质干细胞来源于脂肪组织, 易于体外分离培养, 大量扩增。很多临床前及临床研究已经证实其可以通过分化为心肌样细胞, 促血管生成、旁分泌等作用参与心肌梗死后组织修复, 改善心脏功能。脂肪间充质干细胞是理想的心肌再生治疗的细胞来源。就相关领域研究现状及进展作一综述。

[关键词] 间质干细胞; 间质干细胞移植; 缺血性心肌病; 脂肪组织

[中图分类号] R318; R654.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-4706 (2009) 3B-0046-04

Application of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells in Myocardial Ischemia Disease

ZHANG Ya-yong, JIANG Li-hong, HOU Zong-liu

(Dept. of Cardiac Surgery, Yan'an Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650051, China)

[Abstract] Adipose tissue-derived Mesenchymal stem cells (Ad-MSCs) are present in adipose tissue, from which they can be easily isolated and cultured ex vivo. Several preclinical and clinical studies have supported the notion that therapy using MSCs may be applicable for: myocardial repair, improving ventricular function mediated through differentiating into myocardial-like cells, and angiogenesis or paracrine effects. Overall Ad-MSCs are an attractive cell population for cardiovascular repair. This paper reviews the current status of the use of Ad-MSCs, and advances in related areas.

[Key words] Mesenchymal stem cells; Mesenchymal stem cell transplantation; Myocardial ischemia; Adipose tissue

目前, 心肌缺血性疾病, 主要是心肌梗死已成为影响我国居民平均寿命的主要因素。传统的治疗手段主要包括药物治疗、冠状动脉介入治疗、冠状动脉旁路手术等, 这些手段只能在一定程度上挽救濒死心肌细胞, 防止梗死扩大, 缩小心肌缺血范围; 但不能从根本上重塑心肌。干细胞移植的研究进展为重塑心肌带来了希望。胚胎干细

胞虽然可以在体外被诱导成心肌细胞, 但伦理学问题使其研究举步维艰。成体干细胞多向潜能的发现给人们带来了新的希望, 相较胚胎干细胞, 成体干细胞有不存在伦理学问题、可自体取材而完全避免免疫排斥反应等优点。其中脂肪组织来源的间质干细胞 (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, Ad-MSCs) 又具有上述的

[基金项目] 云南省社会发展科技计划资助项目 2007CA005

[作者简介] 张雅永 (1981~), 男, 河北定兴县人, 在读硕士研究生, 住院医师主要从事心胸外科临床工作。

[通讯作者] 蒋立虹. E-mail: jianglihong2@hotmail.com

各种独特优点,它与骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)的分化潜能相似,而且具有更长的体外培养时间和更大的扩增量. Ad-MSCs的研究进展为心肌梗死的治疗开辟了一条可喜的途径.

1 Ad-MSCs的发现与发展

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)也被称为多能间充质基质细胞(multipotent mesenchymal stromal cells),是多能成体干细胞的一种,具有来源广泛、易体外分离扩增、组织修复能力强等特性;具有向三胚层细胞分化的多向分化潜能^[1]. 20世纪90年代Prockop成功地分离出骨髓间充质干细胞^[2]. 自2001年Zuk等^[3]人发现人脂肪组织中存在具有多向分化潜能的干细胞以来,Ad-MSCs以其来源广泛、取材方便、自体取材创伤小等独特优点而很快成为人们的研究热点. 有研究已经证实Ad-MSCs在适当条件下可以向脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞、心肌细胞、神经细胞、上皮细胞等方向诱导分化. Ad-MSCs具有以下特点^[4]:在标准培养条件下粘附于塑料制品生长;表达CD105, CD73和CD90;不表达CD45, CD34, CD14(或CD11b), CD79a(或CD19),也不表达主要组织相容性抗原HLA-DR;在体外培养,能分化成为骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞.

2 Ad-MSCs胞生物学特性及自身优势

大量的研究已经证实,Ad-MSCs与BM-MSCs一样具有间质干细胞的共性:强大的增殖力,多向分化潜能,迁移性,免疫逃逸及免疫调节特性. 但是,目前我们对Ad-MSCs的认识还非常有限,Ad-MSCs的生物学特点主要表现在以下几个方面:①核型是正常的;②具有活跃的端粒末端转移酶;③增殖大于200群体倍增数;④可以向脂肪细胞、肌细胞、成骨细胞、神经祖细胞、内皮细胞及心肌细胞转化;⑤流式细胞仪检测人脂肪组织干细胞,CD44、CD49、CD105、CD90、CD13阳性,Stro-1、CD34、CD15、CD117、Flk-1、gly-A、CD113和MHC-DR阴性,MHC-I可疑阳性^[5]. 虽然到目前

为止还没有明确的表面标记物来鉴定Ad-MSCs,但根据Ad-MSCs的以上生物学特点及表面标记物对干细胞进行筛选,能够在体外获得大量的高纯度的Ad-MSCs^[6],这是其临床应用的基础.

而且,Ad-MSCs与其他干细胞相比有显著的优势^[5,7,8]:①取材容易,损伤较小,减轻患者痛苦且避免引起道德争论;②从患者本身来源的细胞进行自体移植,可以克服免疫排斥情况;③体外增殖速度快,不必进行永生化处理即可获得足量的细胞来源用于移植;④在体外适当条件可导入外源基因,作为基因治疗的目的基因载体. 这些使Ad-MSCs的临床应用更加便捷.

3 在心肌缺血性疾病治疗中的应用前景

3.1 向心肌细胞分化的潜能

多个研究小组已证明啮齿类的Ad-MSCs具有分化为心肌细胞的能力. Planat-Bernard等^[9]在半固体培养基甲基纤维素中培养鼠类脂肪来源的细胞,并添加重组的造血生长因子,经过3周培养,发现簇状的自发搏动的细胞,并检测电生理学、药理学和亚显微结构的特性,显示与心肌细胞分化相一致,证实可以直接从脂肪组织获得心肌样功能细胞. Rangappa等^[10]将体外培养的新西兰大白兔Ad-MSCs中加入5氮胞苷诱导,发现脂肪组织源性干细胞可以转化成能够搏动的心肌细胞,转化率20%~30%. 随后Gaustad等^[11]用大鼠心肌细胞提取液诱导人Ad-MSCs向心肌细胞分化,Ad-MSCs出现双核和横纹,表达肌小节 α 肌动蛋白、肌钙蛋白和缝隙连接蛋白,观察到自发性搏动细胞. 诱导后细胞表达核lamin A/C(终末分化细胞标记),细胞周期明显延长. 他们还发现,加入大鼠心肌细胞抽提物体外培3周后,脂肪组织源性干细胞不仅表达心肌细胞抗原,而且出现横纹和自发性搏动^[11]. 最近,赵金超等^[12]证实梗死心肌组织裂解液能够促进大鼠的Ad-MSCs向心肌细胞分化,这对于进一步揭示干细胞分化的分子信号机制及干细胞在临床的进一步应用有着重要意义. 这些研究表明,Ad-MSCs能在特定的条件下向心肌细胞分化,而且具有较强的分化能力. 甚至Ad-MSCs冻存及长期传代后也有较强的心肌样细胞分化能力^[13]. 因此,脂肪组织源性干细胞移植治疗缺血性心脏病将具有很大的应用价值.

3.2 临床应用

最近, Schenke-Layland 等^[14]研究证实了, 在大鼠梗死的心肌中注射 5×10^6 个 Ad-MSCs, 12 周后, 细胞治疗组左心室功能及心输出量明显改善. 但是梗死心肌中 Ad-MSCs 绝对植入率较低, 这可能部分的解释 Ad-MSCs 诱导的毛细血管的增殖. 棕色脂肪组织源性 Ad-MSCs 或经温皿培养的 Ad-MSCs 移植入梗死的大鼠的心脏内, 脂肪组织源性干细胞出现心肌细胞表型, 并使梗死的面积减少, 左室功能得到改善, 大鼠存活率增加^[8, 15]. 同样, 大鼠腹部脂肪组织可分离培养出大量 Ad-MSCs, 而且移植治疗组左心室收缩压高于对照组, 舒张末压显著降低, 左室内压最大上升、下降速率明显加快; 病理组织切片显示梗死边缘区心肌面毛细血管计数明显增加, 梗死区心肌组织内及毛细血管壁中均可见移植标记细胞^[6]. 而且, 在犬心肌梗死模型中, Ad-MSCs 治疗组的心脏功能明显改善, 存活时间明显延长. 而且他们在移植术后 4 周, 发现移植组心肌组织冰冻切片中 DAPI 标记的 Ad-MSCs. 因此, Ad-MSCs 可在心肌细胞内存活, 并可分化为心肌细胞, 改善急性心肌梗死后的心脏功能^[6].

然而, Mazo 等^[17]对比了 Ad-MSCs 和 BM-MSCs 在大鼠慢性心肌梗死模型中的作用, 虽然结果显示: 细胞移植后 1 个月, Ad-MSCs 治疗组与移植前相比心功能明显改善, (射血分数 $46.3 \pm 9.6\%$ 比 $27.7 \pm 8\%$; 梗死心肌新生毛细血管增多, 纤维化减轻. 但是与对照组相比, 治疗组的大鼠心功能及心肌再生能力没有明显改善, 这可能是由于实验条件的差异, 也说明了 Ad-MSCs 在体内诱导分化为心肌细胞, 治疗心肌梗死的机制比较复杂.

4 应用前景

综上所述, Ad-MSCs 具有强大的增殖力, 向心肌细胞分化的潜能, 免疫逃逸及免疫调节特性. 可以利用自身的体外培养扩增进行移植, 不存在组织配型及免疫排斥问题, 而且冻存及长期传代后生物学性状稳定. 这使 Ad-MSCs 在缺血性心肌病的治疗研究中具有广阔的前景. 虽然目前 Ad-MSCs 心肌分化的体外研究取得了可喜进展,

但是体内研究大多还停留在动物实验阶段. 首先, 移植的 Ad-MSCs 在损伤心肌中促进心肌修复的机制尚未清楚, 而且心功能恢复的程度也不能令人满意; 其次, 分化诱导条件、移植细胞与心肌细胞的整合, 以及长期存活等方面问题有待进一步研究; 还有, Ad-MSCs 输入体内的安全性至今没有被证实. 因此, 其应用于临床前尚有大量的问题需要解决. 但是随着科技的发展和研究的深入, Ad-MSCs 的应用将为缺血性心肌病治疗开辟一条全新的途径.

[参考文献]

- [1] PITTINGER MF, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284 (5411): 143—147.
- [2] PROCKOP D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. Science, 1997, 276 (5309): 71—74.
- [3] ZUK P, ZHU M, MIZUNO H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng, 2001, 7 (2): 211—228.
- [4] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8 (4): 315—317.
- [5] BOGT K E, SCHREFFER S, YU J, et al. Comparison of transplantation of adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart [J]. Transplantation, 2009, 87 (5): 642—652.
- [6] 王燕, 陈光辉, 邵建华, 等. 同种异体脂肪组织源性间质干细胞移植治疗大鼠急性心肌梗死 [J]. 中国病理生理杂志, 2007 (12): 48—51.
- [7] 张端珍, 盖鲁粤, 刘宏伟. 脂肪干细胞与间充质干细胞体外诱导分化为心肌细胞的差别 [J]. 生理学报, 2008, (3): 35—41.
- [8] STREMB M, HICOK K C, ZHU M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. Keio J Med, 2005, 54 (3): 132—141.
- [9] PLANAT-BENARD V, MENARD C, ANDRE M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells [J]. Circ Res, 2004, 94 (2): 223—229.
- [10] RANGAPPA S, FEN C, LEE E H, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tis-

- sue into cardiomyocytes [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75 (3): 775—779.
- [11] GAUSTAD K G, BOQUEST A C, ANDERSON B E, et al. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314 (2): 420—427.
- [12] 赵金超, 顾春虎, 王云雅, 等. 梗死心肌组织裂解液对鼠脂肪间充质干细胞体外诱导分化作用的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2008, 36 (4): 366.
- [13] 郭勇, 李瑞欣, 张西正, 等. 冻存和传代后脂肪间充质干细胞向心肌样细胞的分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, (23): 165—169.
- [14] SCHENKE-LAYLAND K, STREMB M, JORDAN M C, et al. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction [J]. *J Surg Res*, 2009, 153 (2): 217—223.
- [15] YAMADA Y, WANG X D, YOKOYAMA S, et al. Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342 (2): 662—670.
- [16] 夏菁, 陈光辉, 刘宏斌, 等. 脂肪间充质干细胞移植对犬心肌梗死后心功能的影响 [J]. *中国临床康复*, 2006, (45): 41—43.
- [17] MAZO M, PLANAT-BENARD V, ABIZANDA G, et al. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction [J]. *Eur J Heart Fail*, 2008, 10 (5): 454—462.
- (2009—09—15 收稿)

(上接第 4 页)

用琼脂蚀斑法和甲基纤维素蚀斑法滴定两种方法无显著差别. 后者斑稍大, 斑数稍多, 而更主要的是在琼脂法中, 琼脂温度不易控制, 细胞容易被烫死. 纤维素蚀斑法免去了这一过程, 比较省事、省料. 因此甲基纤维素蚀斑法是一个比较理想的重组痘苗病毒蚀斑滴定的方法, 即简捷又准确. 期望本研究建立的方法给重组痘苗病毒相关的痘病毒属的实验室诊断提供了借鉴.

[参考文献]

- [1] 邓钢. 痘病毒感染[A]//黄祯祥主编. *医学病毒学基础及实验技术*[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 869—876.
- [2] 文喻玲, 尹兴晓, 李传印, 等. 轮状病毒感染细胞蚀斑纯化及感染性滴度测定[J]. *中华现代内科学杂志*, 2008, 5 (2): 97—99.
- [3] 陈元鼎, GARCIA R, BARALLE F. 人免疫缺陷病毒 I 型外膜糖蛋白 gp120 和 gp160 在重组痘苗病毒中的表达及其抗原性研究[J]. *中国医学科学院学报*, 1997, 19 (2): 120—126.
- [4] 王继麟, 朱家鸿. 用蚀斑滴定痘苗病毒的准确性及精确数学模型的探讨 [J]. *中国病毒学*, 1997, 12 (2): 178—184.
- (2009—09—19 收稿)

[1] 邓钢. 痘病毒感染[A]//黄祯祥主编. *医学病毒学基础*