

· 综述 ·

间充质干细胞治疗心肌梗死的研究现状

赵越 朱争艳 李彤

冠心病急性心肌梗死后,大量心肌细胞坏死不能再生,引发左室重构和扩大,最终导致患者心力衰竭死亡。介入和手术治疗虽然可以改善心肌供血,缓解心室重构,但由于不能修复坏死的心肌而效果不佳。心脏移植是治疗终末期缺血性心脏病的有效方法,但由于供体缺乏、手术技术要求高和免疫排斥等因素影响,临床开展有限。干细胞治疗是一种新兴治疗手段,已进入大规模临床试验阶段,有可能成为一种新的常规治疗终末期缺血性心脏病的方法。常用于治疗的干细胞有骨髓单核细胞、间充质干细胞、心脏干细胞、胚胎干细胞、骨骼肌成肌细胞和诱导多潜能干细胞等,其中,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在分泌功能、分化作用和免疫调节等多方面优势明显,被广泛采用。现对 MSCs 治疗心肌梗死的研究状况综述如下。

概 述

MSCs 来源于中胚层,具有自我更新和多向分化的潜能,广泛存在于骨髓、脐带、肌肉、脂肪、外周血和连接组织等多种组织和器官中。其在培养基中呈成纤维样附壁生长,易从混合干细胞中分离提取^[1]。MSCs 具有异质性,来源于不同组织的 MSCs 其表面标志不完全相同,但一般都表达 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD146,而不表达 CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a、CD19 和 HLA-DR 表面分子^[2-3]。体外诱导培养, MSCs 能分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肝细胞、神经细胞和内皮细胞等,5-氮杂胞苷诱导下可以分化为心肌细胞。因为 MSCs 能调节免疫活性,可以最大限度地抑制免疫排斥反应^[4],使干细胞异体移植成为可能。

细胞来源

目前, MSCs 主要来自于骨髓。骨髓间质包括一系列未分化的原始细胞, MSCs 是其中一小部分,约占有核细胞总数的 0.001%~0.01%。许多研究已经确定了骨髓 MSCs 分离、扩增以及在体内外分化的条件,方法已十分成熟,分离效率

可以达到 100%。但骨髓中 MSCs 的数量、扩增和分化能力均随着供者年龄增长和体质下降而逐渐下降,且抽取骨髓是有创、剧痛的操作,这些问题限制了骨髓来源 MSCs 的应用。

近年来,脐带等新生儿附件组织来源的 MSCs 备受关注,与骨髓、外周血和脂肪细胞等成人来源的 MSCs 相比,脐带等新生儿附件组织来源的 MSCs 具有明显优势。首先,脐带在胎儿分娩后容易获得,安全无创,不存在伦理道德问题,与抽取骨髓相比,其潜在的供者数量明显增多。其次,脐带来源 MSCs 的群体倍增时间更短,体外扩增速度更快,且 30 代内基本保持稳定,体外扩增较骨髓来源方便。第三,脐带来源的 MSCs 较成人组织来源的 MSCs 表面表达 HLA-ABC 比例更低,免疫原性更低,异体移植产生排斥的可能性更小^[5]。

移植方法

干细胞移植治疗心肌梗死的移植方法主要有静脉输注、基于导管的细胞移植(包括经冠状动脉输注和心内膜注射)和心外膜注射等。

1. 静脉输注(intravenous infusion)。此方法是最简单的灌注方法,对设备要求低,移植方法简单,易被患者接受,临床试验证实了其 6 个月内的安全性及有效性^[6]。但是,大部分干细胞不能归巢至损伤的心肌中^[7],通过示踪可在肝脏、肺、脾及骨髓等器官找到^[8],虽然通过增加趋化因子的表达能够提高干细胞的归巢^[9],但效率与其他移植方式比仍然很低,而且长期的安全性有待考证。

2. 基于导管的细胞移植

(1) 经冠状动脉输注(intracoronary infusion)。此方法在前、实验和临床试验中应用均较广泛^[10-13]。细胞通过可以防止反流的球囊导管输注到梗死区域的冠脉末端,操作过程与经皮冠状动脉介入治疗(PCI)相似。优点是成本低,易于操作,可重复进行,靶向较准确。随着此法的广泛应用,临床上出现的不良事件也越来越多,如 MSCs 移植同时置入支架的患者术后发生再狭窄^[14],冠状动脉血流减少,甚至出现微血管栓塞^[8]。理论上,心肌梗死急性期经冠状动脉输注干细胞十分合理,因为间质细胞衍生因子(SDF-1)、黏附分子以及细胞因子的表达^[15]在心肌梗死后迅速上调,使输注的干细胞在内源性趋化作用下更多地驻留在心脏中,但实际仍有相当比例的干细胞归巢到了其他器官^[16-17]。另外,经冠状动脉输注一般需要大量干细胞,这对于年老多病的患者采用自

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-4497.2011.11.022

本课题受天津市科教攻关计划(06YFSZSF001500)资助

作者单位:300170 天津医科大学(赵越);天津市第三中心医院人工细胞重点实验室(朱争艳),心脏中心(李彤)

通信作者:李彤 Email: Litongtj@163.com

体干细胞移植十分有限。

(2) 心内膜注射 (transendocardial injection)。在能准确定位梗死区心脏显像图系统的引导下,将干细胞经心室内直接注射到梗死边界区域。该方法避免了经冠状动脉或经静脉弥漫灌注导致干细胞广泛分布的问题,可以提高移植细胞的治疗效果^[8]。临床试验已证实其 6 个月内的安全性和有效性^[18]。心脏显像图系统主要通过测定心内膜的电生理进行定位,临床较常用的是心脏电机械标测系统 (NOGA)^[19-20]。由于经心内膜注射所需设备成本和技术条件均较高,国内研究一般不采用此法。

3. 心外膜注射 (transepical injection)。通过暴露心脏表面,将干细胞直接由心外膜注射入心肌。该方法有创,常用于动物实验研究,也可在冠状动脉旁路移植术中应用^[21]。其优点和心内膜注射一样,能提高移植的干细胞在心脏的驻留比例,从而达到更好的治疗效果。一项磁共振成像 (MRI) 研究显示,通过心外膜注射移植 3 天后大部分干细胞仍停留在注射的梗死周边区域^[22]。但心内膜注射和心外膜注射时由注射针头穿刺所造成的局部炎症反应不容忽视,会影响植入细胞的存活数量和功能状态,部分干细胞很可能会因参与局部炎症反应而失去其分化为心肌细胞或旁分泌保护心肌的作用^[23]。

4. 干细胞与生物工程组织联合移植。干细胞嵌入在生物工程组织中并由细胞外基质支持,与经输注或注射等直接暴露干细胞的方法相比,移植的细胞在心脏微环境中存活率提高,移植效率提高^[24]。组织的准备和移植通常有两种方法:

(1) 将干细胞与细胞外基质材料在体外混合后作为心外膜补片移植到损伤心肌的表面。

(2) 将细胞外基质材料支持的干细胞与注射用生物可降解凝胶混合后注射到损伤心肌的位置。

移植时机

心肌梗死后数天到数周,心肌内环境的变化对移植细胞的存活数量和功能状态影响显著,这是一个多因素共同作用的复杂过程。急性心肌梗死后,缺血再灌注损伤使心脏内环境发生变化,依次经历炎症反应期、损伤修复期、瘢痕形成期和结构重塑期。缺血性损伤坏死再灌注后,局部活性因子和活性氧诱导炎症细胞迅速趋向性聚集,中性粒细胞在梗死区弥漫浸润,并产生大量细胞因子。梗死后 24~72 h 中性粒细胞聚集达到高峰,此后急性炎症反应逐渐消退。在梗死后 5~7 天,巨噬细胞逐渐清除坏死残余,成纤维母细胞开始增殖渗透,肉芽组织形成。随着损伤修复的进行,成纤维母细胞通过形成 I 型和 III 型胶原逐步取代肉芽组织的细胞外基质。心肌瘢痕组织的形成在 6~8 周基本完成,随着成纤维

母细胞增生,胶原组织流失和瘢痕缓慢收缩,瘢痕组织仍然处于动态变化。由于瘢痕组织结构致密,不易破裂,使得心脏在正常跳动时不会在坏死部位发生穿孔,在病变初期保护心脏,降低心脏破裂发生的可能。但是瘢痕组织不具有心肌细胞的收缩性和电传导性等正常功能,不能与周围正常心肌组织耦合,远期将严重影响心功能的恢复。

发生心肌梗死数天内形成的炎症环境不利于干细胞的生存,部分干细胞会在炎症反应中消耗,发挥心脏保护作用的干细胞数量减少。但此期间高表达的内源性干细胞归巢因子 SDF-1 等却有利于干细胞向受损心肌归巢。不同临床随机试验研究观察的 7 天内移植效果并不相同^[25-27]。Wang 等认为,为了使内源性促干细胞归巢和促存活的因子达到最大效应,移植干细胞的最佳时间应是心梗后 3 周^[28]。一般认为,从炎症反应消退到瘢痕组织形成之前是干细胞移植的最佳时机^[23,29]。但是这一阶段的持续时间并不确定,可从数天到数周不等,受心梗面积、年龄、有无其他疾病等多种因素共同影响,临床上应在准确评估病人的病情发生发展后再确定最佳移植时机。

机制研究

传统的理论认为,注入的 MSCs 转化成心肌细胞可改善心肌血供。实验报道骨髓来源的成体 MSCs 无论在体内或体外都能转化成有功能的心肌细胞^[30],但亦有研究证明,MSCs 无论是转化还是与自体心肌细胞融合在移植后的心肌内所占的比重都很小。另一种假设认为,移植的 MSCs 转化为内皮细胞,从而促进血管生成,但转化的概率太小。目前,尚无可靠证据证明左室功能的改善是由于移植的细胞分化成了心肌细胞^[31],也无充分理由肯定治疗效果与植入细胞的长期存活和扩增有关^[32]。

MSCs 能够分泌一系列细胞因子和生长因子,因此有假说认为左室功能恢复可能是由于旁分泌作用加强了血管化并抑制梗死周围区域的凋亡^[33]。另外,MSCs 的调节可能刺激内源性心脏干细胞的扩增^[34],这点可能促成了损伤后的心肌修复。大量的研究认为,MSCs 的旁分泌效应是改善心功能的主要原因^[31,35],单纯将 MSCs 培养基注入梗死心肌也能有效地促进血管生成和抗心肌细胞凋亡,这提示了 MSCs 旁分泌的细胞因子对梗死心肌具有保护作用。

随着研究的深入开展,一部分学者通过对 MSCs 进行示踪研究,认为 MSCs 的作用机制可能是旁分泌和移植分化为心肌细胞产生的联合效应^[36]。应用多重标记(荧光染色、纳米颗粒标记和性别染色体标记等)技术有效证明了相当比例的干细胞移植分化为心肌细胞^[37]。

通过对机制的研究,越来越多的研究者选择先对干细胞预处理后再进行移植,均获得了明显的效果,在加强 MSCs 发

挥作用的同时也促进了对治疗机制的研究。通过基因修饰能够加强 MSCs 的存活时间、归巢能力或功能状态,优化治疗效果^[9,35,38-39]。除了加强基因表达外,也有学者通过敲掉某些基因来证明 MSCs 的作用。如 Poynter 等将信号传导及转录活化因子 3(STAT3)敲掉后的 MSCs 与未处理 MSCs 相比,其免疫调节和抗凋亡作用均明显下降,因此认为, MSCs 通过 STAT3 机制减轻缺血左室的凋亡和炎症反应^[40]。Shinmura 等通过吡格列酮预处理活化细胞核受体 PPAR- γ 使 MSCs 在体内外向心肌细胞分化效率均有效提高,在促进 MSCs 旁分泌的同时也增加了毛细血管生成数量,从而更有效地改善了心功能^[41]。

现存问题

虽然 MSCs 治疗心肌梗死取得了巨大进展,但是仍有一些问题亟待解决。

第一,安全性。虽然有关 MSCs 移植致畸性的报道极少,但尚无研究能证明 MSCs 的移植远期结果安全、可靠,尤其是在异体移植时。

第二,移植数量。实验所用 MSCs 的数量为 105 ~ 107,但临床治疗中病人的病情轻重程度不同,适合的移植途径也不同,个体化的移植数量仍需探索。

第三,移植方案。虽然对 MSCs 进行修饰或共移植能优化治疗效果,但是目前仍没有公认的最佳方案。

第四,治疗机制。MSCs 的作用机制是多方面的,目前仍未能全面的阐释。

参考文献

- [1] Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev*, 2004,13:436-448.
- [2] 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. *Cytotherapy*, 2006,84:315-317.
- [3] Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, et al. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*, 2010,98:93-107.
- [4] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005,105:1815-1822.
- [5] Maligni A, Kantzari E, Patrizi MP, et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med*, 2010,3:248-269.
- [6] Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Am Coll Cardiol*, 2009,54:2277-2286.
- [7] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 2005,111:2198-2202.
- [8] Freyman T, Polin G, Osman H, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2006,27:1114-1122.
- [9] Cheng Z, Ou L, Zhou X, et al. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Mol Ther*, 2008,16:571-579.
- [10] Dill T, Schächinger V, Rolf A, et al. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J*, 2009,157:541-547.
- [11] Gyögyösi M, Lang I, Dettke M, et al. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2009,6:70-81.
- [12] Yu YS, Shen ZY, Ye WX, et al. AKT-modified autologous intracoronary mesenchymal stem cells prevent remodeling and repair in swine infarcted myocardium. *Chin Med J (Engl)*, 2010,123:1702-1708.
- [13] Jiang YB, Zhang XL, Tang YL, et al. Effects of heme oxygenase-1 gene modulated mesenchymal stem cells on vasculogenesis in ischemic swine hearts. *Chin Med J (Engl)*, 2011,124:401-407.
- [14] Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, 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. *Lancet*, 2004, 363:751-756.
- [15] 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. *Basic Res Cardiol*, 2005,100:217-223.
- [16] Doyle B, Kemp BJ, Chareonthaitawee P, et al. Dynamic tracking during intracoronary injection of 18F-FDG-labeled progenitor cell therapy for acute myocardial infarction. *J Nucl Med*, 2007, 48:1708-1714.
- [17] Kurpisz M, Czepczyński R, Grygielska B, et al. Bone marrow stem cell imaging after intracoronary administration. *Int J Cardiol*, 2007, 121:194-195.
- [18] Beeres SL, Bax JJ, Zeppenfeld K, et al. Feasibility of trans-endocardial cell transplantation in chronic ischaemia. *Heart*, 2007,93:113-114.
- [19] Perin EC, Silva GV, Assad JA, et al. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*,

- 2008,44:486-495.
- [20] Psaltis PJ, Carbone A, Leong DP, et al. Assessment of myocardial fibrosis by endoventricular electromechanical mapping in experimental nonischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2011, 27:25-37.
- [21] Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al. Intramyocardial delivery of CD133 + bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 133:717-725.
- [22] Zhang H, Song P, Tang Y, et al. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 134: 1234-1240.
- [23] Hu X, Wang J, Chen J, et al. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007, 31:438-443.
- [24] Tan MY, Zhi W, Wei RQ, et al. Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits. *Biomaterials*, 2009, 30:3234-3240.
- [25] Schächinger V, Assmus B, Erbs S, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail*, 2009, 11:973-979.
- [26] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, 355:1199-1209.
- [27] Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 2006, 367:113-121.
- [28] Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart*, 2006, 92:768-774.
- [29] Jiang CY, Gui C, He AN, et al. Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9:630-637.
- [30] Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 2005, 112:1128-1135.
- [31] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*, 2005, 85:1373-1416.
- [32] Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, et al. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation*, 2007, 116(11 Suppl):I38-I45.
- [33] Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, et al. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*, 2006, 114:2163-2169.
- [34] Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*, 2010, 107:913-922.
- [35] Tang J, Wang J, Guo L, et al. Mesenchymal stem cells modified with stromal cell-derived factor 1 alpha improve cardiac remodeling via paracrine activation of hepatocyte growth factor in a rat model of myocardial infarction. *Mol Cells*, 2010, 29:9-19.
- [36] Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106:14022-14027.
- [37] Reinecke H, Minami E, Zhu WZ, et al. Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells. *Circ Res*, 2008, 103: 1058-1071.
- [38] Huang J, Zhang Z, Guo J, et al. Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary density in the injured myocardium. *Circ Res*, 2010, 106:1753-1762.
- [39] Cho J, Zhai P, Maejima Y, et al. Myocardial injection with GSK-3 β -overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res*, 2011, 108:478-489.
- [40] Poynter JA, Herrmann JL, Manukyan MC, et al. Intracoronary mesenchymal stem cells promote postischemic myocardial functional recovery, decrease inflammation, and reduce apoptosis via a signal transducer and activator of transcription 3 mechanism. *J Am Coll Surg*, 2011, 213:253-260.
- [41] Shinmura D, Togashi I, Miyoshi S, et al. Pretreatment of Human Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved Efficiency of Cardiomyogenic Transdifferentiation and Improved Cardiac Function. *Stem Cells*, 2010, 29:357-366.

(收稿日期:2011-06-08)