

间充质干细胞及相关衍生治疗方法促进心肌梗死后心肌修复

杨天云 王长谦

【摘要】 间充质干细胞疗法可以改善心肌梗死后左心室功能,其主要作用包括抑制炎症反应、抑制纤维化、促进血管生成以及刺激内源性心肌干细胞增殖分化。该疗法的不足之处在于间充质干细胞移植效率低下,且长期安全性有待进一步证明,而由间充质干细胞衍生的组织工程技术则有望弥补上述缺陷。

【关键字】 心肌梗死;间充质干细胞疗法;组织工程技术;脱细胞脂肪提取物疗法

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.03.004

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)发病率高,溶栓、经皮冠状动脉介入术和冠状动脉旁路移植术已明显改善了心肌梗死的死亡率,但这些方法仍无法逆转已经坏死的心肌,不能从根本上改善心脏功能。

细胞疗法是基于将自体或同种异体干细胞输送到受伤心脏中的新型治疗方法。目前,多种干细胞类型包括胚胎干细胞(ESC)、造血干细胞(HSC)、诱导多能干细胞(iPSC)和间充质干细胞(MSC)已用于心肌梗死的细胞疗法^[1]。在不同类型的干细胞和祖细胞中,对 MSC 的研究最为深入。MSC 为中胚层来源的多能干细胞,可以衍生自多种组织,包括骨髓、脂肪、肌肉和滑膜组织^[2]。

MSC 治疗改善心功能的主要机制包括:(1)移植的 MSC 可以分泌大量细胞因子及旁分泌因子对抗炎症反应,在受损可逆的心肌细胞中激活细胞保护通路^[3-4],阻止纤维化及左心室重构^[1],刺激留存的心脏干细胞(CSC)增殖、分化^[5-6]。(2)移植的 MSC 可以分化为内皮细胞及平滑肌细胞,促进血管生成。(3)移植的 MSC 可能分化为心肌细胞^[1]。

1 MSC治疗的作用

1.1 MSC的抗炎作用

MSC 可以通过旁分泌机制抑制炎症反应。研究表明,外泌体可由骨髓 MSC 生成,在缺血性损伤后刺激血管新生,抑制炎症反应并改善心脏功能^[7]。

在急性心肌梗死后,心脏中主要存在 2 种巨噬细胞亚型。M1 型巨噬细胞具有促炎作用并能释放白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和 γ 干扰素(IFN- γ);M2 型巨噬细胞具有抗炎作用,促进血管生成及疤痕组织形成。MSC 可增强巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞的转化,从而抑制心肌梗死后的促炎状态^[8]。

1.2 MSC的抗纤维化作用

发生心肌梗死后,梗死区心肌细胞死亡,并被成纤维细胞替代,心室重构可引起心力衰竭,导致心血管死亡。细胞外基质(ECM)重构在调节心肌细胞的迁移、分化和再生中起着重要作用,基质金属蛋白酶(MMP)可维持 ECM 稳态。干细胞可通过调节 MMP 和 MMP 抑制剂,抑制成纤维细胞活化,减少胶原蛋白和其他 ECM 的沉积,从而减少左室重构,改善心肌梗死后心脏功能^[9]。研究证明,体外培养的 MSC 发挥抗纤维化功能依赖于肝实质细胞因子(HGF)的作用^[10]。

1.3 MSC的促血管生成作用

血管生成对于梗死心肌的功能恢复有着重要意义。MSC 可以通过以下 4 种方式促进血管生成:(1)释放生长因子和细胞因子;(2)分化为内皮细胞;(3)分化为血管平滑肌细胞;(4)作为血管周细胞发挥作用。

移植到梗死周围区的 MSC 可以释放大量旁分泌因子,如血管内皮生长因子(VEGF)和基质细胞衍生因子-1(SDF-1),这些细胞因子参与调节血管生成^[9]。MSC 还可以传递囊泡和微囊泡至梗死

区域,这些囊泡内含 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子、血管生成素,在血管形成相关的细胞信号转导中具有重要作用^[11-12]。MSC 移植可在缺血情况下显著增加存活心肌的毛细血管床密度。

1.4 MSC刺激内源性CSC增殖分化

MSC 移植后是否能分化为心肌细胞并具有相应功能具有颇多争议,而 MSC 刺激内源性 CSC 的增殖分化则更受认可。Hatzistergos 等^[5]在猪的心肌缺血模型中将异体骨髓源性 MSC 经心内膜注射到梗死区域,结果显示心脏内源性 c-Kit⁺干细胞增加了 20 倍,有丝分裂的 CSC 增加了 4 倍。

2 MSC治疗存在的问题

2.1 MSC移植、存活及分化

与 MSC 的细胞效应相比,植入 MSC 的存活和分化率相对较低。研究发现,单纯移植骨髓 MSC,细胞死亡率可高达 (52.4 ± 4.8) %^[13]。这可能是由于心肌梗死后 MSC 的移植区处于缺氧缺血、高氧化应激水平、高炎症反应水平的微环境中。除了较高的移植细胞死亡率,MSC 移植的可操作性也较差。在结扎左前降支 (LAD) 动脉后,给予小鼠人胎盘来源的羊膜间充质干细胞 (AMC),小鼠心脏未显示出植入干细胞的免疫组织学证据^[14]。在猪急性心肌梗死模型中,将自体骨髓来源的 MSC 移植到缺血心肌中,注射后第三周可检测到移植部位 MSC,但第十周则未能检测到^[15],这提示移植 MSC 难以长时间存活。植入的 MSC 分化为心肌细胞的可能性低。在狗慢性缺血性心肌病模型的心肌内注射 MSC,移植的细胞可表达内皮细胞和平滑肌细胞的标志物,但未能发现心肌细胞分化的证据^[16]。

2.2 MSC移植安全性

基于 MSC 的心血管疾病治疗方法,已被临床前研究^[5]及部分临床研究^[17]证明了其短期的安全性。从年轻且健康的供体获得同种异体 MSC,可以很大程度上排除衰老及异常微环境的影响,且具有与自体细胞相似的安全性^[17]。然而,目前尚未对长期安全性进行深入研究。

3 MSC相关组织工程

常规方法制备 MSC 及心肌内注射存在多种缺陷。首先,使用胰蛋白酶使 MSC 从胶原蛋白表面脱落会引起 ECM 的部分降解及细胞间联系的损失,进而诱发细胞凋亡;其次,将 MSC 悬浮液进行心肌内注射的操作本身就会造成 MSC 损伤,导致

递送效率低下;最后,将 MSC 注射在心肌梗死周围区这种离散的给药方式不可避免地引起 MSC 分布不均^[18]。因此,近年来很多研究者希望借助组织工程的手段避免这些缺陷。

3.1 MSC球体

MSC 球体是多个 MSC 不借助其他物质结合的一种形式。Lee 等将人脐带血来源的 MSC 组成的球体,在大鼠左前降支结扎 3 d 后注射入大鼠心肌,结果显示该 MSC 球体能够显著改善大鼠心肌收缩力并防止左室扩张。另一种由 MSC 装配的 3D 微组织已在体外展现了强大的存活能力以及 ECM 的形成能力,这可能会成为心脏治疗的递送工具^[20]。

3.2 仿生支架及基质

仿生支架及基质是另一类保存、递送、释放 MSC 的平台,目前的研究多将支架或基质植入梗死区域的心肌表面。在对鼠急性心肌梗死模型的研究中,已有多种装载 MSC 的生物支架或类似基质被植入心脏中并有不同程度的获益,如装载 MSC 的聚电解质复合物支架可改善左室射血分数 (LVEF)、促进血管新生,减缓疤痕形成及左室扩张^[21]。装载 MSC 的可生物降解纳米纤维心脏贴片移植到梗死区域心外膜上,可使 MSC 向梗死区域迁移并起到改善左室扩张、减少纤维化、促血管生成等作用^[22]。在小鼠心肌梗死模型中使用血浆包被的装载 MSC 的聚 ε-己内酯 (PCL) 移植物流可以稳定心脏功能,减轻心脏扩张,在心肌梗死后 4 周,植入心脏贴片组的 LVEF 只降低了 6%,而假手术组和无贴片植入组分别降低了 13% 和 20%^[23]。

3.3 脱细胞化和再细胞化

脱细胞化是通过使用洗涤剂,从组织或器官中去除细胞,并保留 ECM 组成、结构和生物活性的过程,将该过程与干细胞再细胞化相结合,可以作为心脏再生医学的重要生物工程工具^[24]。已有研究尝试了人类心肌 ECM 片的脱细胞化,后续可进行特定细胞的种植^[25]。大多数心脏领域脱细胞/再细胞化的研究集中于心脏瓣膜方面,心肌梗死治疗相关的应用有待更多探索。

4 MSC疗法衍生的脱细胞生物活性蛋白制剂

4.1 脱细胞脂肪活性物质主要成分

MSC 旁分泌作用是其治疗潜力的关键部分之一,Yu 等^[26]发现人体脂肪中除含有脂肪 MSC,还含有大量生长因子,该团队研究了相关提取方

法,并将这些生长因子定义为脱细胞脂肪活性物质 (CEFFE)。酶联免疫反应检测证实 CEFFE 中富含胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF)、VEGF、肝细胞生长因子 (HGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、表皮生长因子 (EGF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 等多种与组织再生修复相关的活性因子。虽然 TGF- β 可诱导心脏成纤维细胞介导的纤维化和心肌重构过程,但是这个过程可被 bFGF 抑制^[27]。在大鼠心肌梗死模型中,向心肌梗死区及梗死周围区递送 bFGF 能起到减轻心肌纤维化的作用^[28]。运动训练减轻心肌梗死后心功能减退的机制研究显示,运动训练能增加成熟的 BDNF, BDNF-酪氨酸激酶受体 B (TrkB) 信号通路可能是潜在的治疗靶标^[29]。

4.2 CEFFE制备方法

从吸脂手术获得脂肪抽吸物,用盐水冲洗脂肪抽吸物以去除红细胞,然后以 1 200 g 离心 3 min。第一次离心后,将上层油性液和下层液丢弃,收集中层脂肪并进行机械乳化。将乳化的脂肪在-80 °C 下冷冻,并在 37 °C 下解冻,以进一步破坏脂肪组织。将脂肪再次以 1 200 g 离心 5 min,第二次离心后,产物分为 4 层,将上层的油液、第二层的脂肪和第四层的杂物丢弃,小心地吸出第三层,灭菌并去除细胞碎片,制得最终提取物。将脂肪提取物储存在-20 °C,以便将来使用^[26]。

4.3 CEFFE的应用

通过结扎股动脉及分支制备裸鼠单侧后肢缺血模型,在小鼠缺血的后肢肌肉内注射 CEFFE 可增加缺血组织的血流量和毛细血管密度^[26]。在将脂肪颗粒移植至裸鼠,CEFFE 能降低移植裸鼠的细胞凋亡率并促进细胞增殖^[30]。

4.4 CEFFE的缺陷及展望

CEFFE 是基于人脂肪提取物所获得的生物活性物质,尽管可以采集年轻、健康的捐赠者的脂肪,但捐助者的个体差异仍无法避免,需要进一步研究以获得成分稳定性更好的 CEFFE。另外,目前 CEFFE 的递送方式局限于原位注射,若应用于心脏领域,心肌内注射造成的损伤无法忽视,一种有效且损伤轻微的递送方式可能是后续研究的重点。

5 小结

基于 MSC 的心脏再生医学已取得重大进展,尽管大量的临床前和临床工作支持其安全性和修复作用,但其确切的作用机制仍未完全明确。MSC 旁分泌作用是其治疗潜力的关键,由此衍生出相应的脱细胞疗法,相较于 MSC 疗法有一定的制备存储、安全性方面的优势,但其有效性、稳定性仍待进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Karpov AA, Udalova DV, Pliss MG, et al. Can the outcomes of mesenchymal stem cell-based therapy for myocardial infarction be improved? Providing weapons and armour to cells[J]. Cell Prolif, 2017, 50(2):e12316.
- [2] Lee S, Choi E, Cha MJ, et al. Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015:632902.
- [3] Ratajczak MZ, Kucia M, Jadczyk T, et al. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: Can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies?[J]. Leukemia, 2012, 26(6):1166-1173.
- [4] Mirotso M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, et al. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(2):280-289.
- [5] Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskoue BN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation[J]. Circ Res, 2010, 107(7):913-922.
- [6] Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007, 4(Suppl 1):S21-S26.
- [7] Teng X, Chen L, Chen W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(6):2415-2424.
- [8] Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair[J]. Circ Res, 2012, 110(1):159-173.
- [9] Miao C, Lei M, Hu W, et al. A brief review: the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):242.
- [10] Li X, Zhao H, Qi C, et al. Direct intercellular communications dominate the interaction between adipose-derived MSCs and myofibroblasts against cardiac fibrosis[J]. Protein Cell, 2015, 6(10):735-745.
- [11] Chen J, Liu Z, Hong MM, et al. Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. PLoS One, 2014, 9(12):e115316..

- [12] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal LA, et al. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(14):1635-1647.
- [13] Liu XB, Wang JA, Ji XY, et al. Preconditioning of bone marrow mesenchymal stem cells by prolyl hydroxylase inhibition enhances cell survival and angiogenesis in vitro and after transplantation into the ischemic heart of rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(5):111.
- [14] Kim PJ, Mahmoudi M, Ge X, et al. Direct evaluation of myocardial viability and stem cell engraftment demonstrates salvage of the injured myocardium[J]. *Circ Res*, 2015, 116(7):e40-e50.
- [15] Tao B, Cui M, Wang C, et al. Percutaneous intramyocardial delivery of mesenchymal stem cells induces superior improvement in regional left ventricular function compared with bone marrow mononuclear cells in porcine myocardial infarcted heart[J]. *Theranostics*, 2015, 5(2):196-205.
- [16] Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model[J]. *Circulation*, 2005, 111(2):150-156.
- [17] Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the Poseidon randomized trial[J]. *JAMA*, 2012, 308(22):2369-2379.
- [18] Karpov AA, Udaloa DV, Pliss MG. Can the outcomes of mesenchymal stem cell-based therapy for myocardial infarction be improved? Providing weapons and armour to cells[J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(2):e12316.
- [19] Lee EJ, Park SJ, Kang SK, et al. Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood for myocardial infarction[J]. *Mol Ther*, 2012, 20(7):1424-1433.
- [20] Emmert MY, Wolint P, Wickboldt N, et al. Human stem cell-based three-dimensional microtissues for advanced cardiac cell therapies[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(27):6339-6354.
- [21] Ceccaldi C, Bushkalova R, Alfarano C, et al. Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(2):901-911.
- [22] Kai D, Wang QL, Wang HJ, et al. Stem cell-loaded nanofibrous patch promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in rat model[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(6):2727-2738.
- [23] Guex AG, Frobert A, Valentin J, et al. Plasma-functionalized electrospun matrix for biograft development and cardiac function stabilization[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(7):2996-3006.
- [24] Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 3:43.
- [25] Oberwallner B, Brodarac A, Choi YH, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(9):3263-3272.
- [26] Yu Z, Cai Y, Deng M, et al. Fat extract promotes angiogenesis in a murine model of limb ischemia: a novel cell-free therapeutic strategy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):294.
- [27] Svystonyuk DA, Ngu JM, Mewhort HE, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates human cardiac myofibroblast-mediated extracellular matrix remodeling[J]. *J Transl Med*, 2015, 13:147.
- [28] Fan Z, Xu Z, Niu H, et al. Spatiotemporal delivery of basic fibroblast growth factor to directly and simultaneously attenuate cardiac fibrosis and promote cardiac tissue vascularization following myocardial infarction[J]. *J Control Release*, 2019, 311-312:233-244.
- [29] Lee HW, Ahmad M, Weldrick JJ, et al. Effects of exercise training and TrkB blockade on cardiac function and BDNF-TrkB signaling postmyocardial infarction in rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6):H1821-H1834.
- [30] Zheng H, Yu Z, Deng M, et al. Fat extract improves fat graft survival via proangiogenic, anti-apoptotic and pro-proliferative activities[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1):174.

(收稿:2021-08-06 修回:2022-01-15)

(本文编辑:胡晓静)