

心脏原位干细胞修复心肌的研究

金 秋综述 李一文审校

【摘要】 心尖和心房内存在少量的原位干细胞,在生理情况下心脏原位干细胞(cardiac stem cells, CSCs)对于维持心肌细胞稳态有重要作用。该文对 CSCs 用于心脏再生治疗的优势,体外扩增 CSCs 的技术,心脏修复机制(包括分化机制和旁分泌机制),各种心脏疾病中 CSCs 的变化以及目前 CSCs 治疗遇到的问题作一简介。

【关键词】 心脏原位干细胞;心肌再生;分化;旁分泌

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2011.02.007

长期以来,成年哺乳动物的心脏被认为是终分化器官,心肌细胞在出生后很快停止分裂,分化的心肌细胞不能再次进入细胞周期。近年来一系列研究证明,心肌细胞可以自我更新^[1-3]。有研究从一个全新的角度证明人类心肌细胞存在再生现象,在冷战时期因大规模核爆破试验心肌被标记上¹⁴C 的人群中,心肌细胞更新率在 25 岁时为 1%,在 75 岁时为 0.45%,正常人一生有 <50% 的心肌细胞更新过^[4]。以上研究结果表明心脏内存在干细胞,即心脏原位干细胞(cardiac stem cells, CSCs),只是这些细胞的更新率较低。刺激放大或是诱导这一再生过程或将成为心脏疾病治疗的新方向。

1 CSCs 用于心脏再生治疗的优势及可行性

CSCs 在重建死亡的心肌组织中比造血干细胞(haematopoietic stem cells, HSC)更有效率,因为 HSC 必须先分化成心脏细胞谱系后代,然后再激活并迁徙到损伤部位^[5]。CSCs 可以在很短时间内获得成熟的具有心肌和冠状血管功能和结构特点的细胞^[5]。因此, CSC 在心脏修复方面具有独特优势。Smith 等^[6]通过心内膜下心肌穿刺标本体外扩增得到心源细胞(cardiosphere derived cells, CDCs),从而解决了临床应用中心脏原位干细胞来源的问题。近年来越来越多的实验室从患者心脏穿刺标本中成功分离得到 CSCs^[7,8]。大批量培养的来自心脏来源的 c-kit⁺ CSCs 能传代生长到 40 代,且仍有心肌干细胞表型^[9],从而为 CSCs 移植提供了可能。

2 CSCs 的体外扩增

CSCs 移植研究大多集中于两个领域,即体外

扩增 CSCs 后注入体内和刺激局部 CSCs 增殖分化。目前认为 c-kit⁺ 细胞可能是心脏修复过程中具有持续增殖能力的细胞^[7]。在体外扩增过程中 c-kit⁺ 细胞的百分比从 P1-P8 没有显著变化,每个群体倍增时间端粒酶缩短约 130 bp。尽管端粒酶长度在不断缩短,但是 hCSCs 能在体外充分扩增而不失去扩增能力^[10]。另有研究将原代分离的 c-kit⁺ CSCs 培养至 40 代,发现 GATA-4 高表达的 CSCs 分化成心肌细胞的能力更强。这提示 CSCs 是个异质的细胞群,选取哪些细胞进行移植还需要进一步界定^[9]。CSCs 的扩增条件也是亟待解决的问题,心肌球(cardiosphere)悬浮培养较传统的贴壁培养获得的细胞能更好地改善急性心肌梗死后的心功能情况。心肌球悬浮培养可以模拟干细胞生存的微环境的作用^[11]。低氧(5% O₂)能提高 CSCs 的存活能力,低氧培养的细胞输入小鼠体内后有更好的活力。这是因为组织中的实际氧浓度约 1%~7%,常用的培养箱氧浓度在 20%,培养时细胞处于高氧环境,而氧化应激可能造成 DNA 损伤和细胞衰老^[12]。

3 CSCs 修复心脏的机制

CSCs 修复心脏的机制主要包括分化机制和旁分泌机制。近年来对 CSCs 的分化机制存在许多争议,认为并没有可信证据支持这种机制。新的观点认为:移植的 CSCs 不仅自发转化为心肌细胞和血管细胞,同时促进内源性再生和改善缺血应激导致的组织抵抗力下降,这一作用可能比分化更有效^[13]。

旁分泌机制最早由 Gneccchi 等^[14]提出,他们在间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)移植 72 h 后发现损伤部位新生的细胞和血管不足以解释心功能的显著改善,因此,提出了旁分泌机制的

作者单位:310003, 浙江大学医学院附属第一医院肾脏病中心

假说。同样 CSCs 移植研究也有类似发现^[6,17]。旁分泌因子可分为 3 类:生长因子、激素和合成因子^[15]。最近的实验则直接证明干细胞分泌因子在心梗早期的心脏修复作用^[16]。

旁分泌的具体作用机制主要有 4 方面。(1)抗凋亡作用:研究发现 CSCs 培养基上清中有少量的血管内皮生长因子(VEGF),肝细胞生长因子(HGF)和胰岛素生长因子-1(IGF-1),而在对照组的上清中却检测不到这些生长因子^[17]。这些因子能显著降低暴露于低氧环境的心肌细胞的凋亡和坏死^[14]。分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled related protein, SFRP)是 IGF-1 发挥抗凋亡作用的关键蛋白^[18]。(2)分泌促血管生成因子:以往大多是间接证据^[19],直接的证据来自于 Markel 等^[20]的一项研究,他们发现,减少移植干细胞的 VEGF 分泌会明显减弱干细胞修复缺血后心肌的效果^[20]。通过芯片技术分析发现,在 CSCs 的条件培养基中 VCAM-1 水平较高,并且其在组织中水平的变化与心功能的改善程度一致。值得一提的是,外周血 VCAM-1 的水平始终没有变化。进一步说明局部分泌的各种因子在心肌修复过程中发挥重要作用^[21]。(3)改善心脏重塑:移植的干细胞可以通过旁分泌方式分泌与细胞外基质合成相关的分子,抑制心肌纤维化^[22]。还可以通过旁分泌作用于心肌成纤维细胞,减轻心肌成纤维细胞的增生,抑制心肌成纤维细胞 I 型和 III 型胶原基因的表达^[23],间接改善心脏重塑。(4)分泌收缩性和营养因子:Akt-MSK 细胞移植后 72 h 内即可观察到心功能显著改善,而此时干细胞尚不可能转化为功能成熟的心肌细胞,并且新生血管密度也没有增加,这就提示可能是移植细胞分泌收缩性因子和营养因子促进心肌功能恢复^[19]。

旁分泌机制为不同来源干细胞移植的相似治疗效应提供了合理的解释^[15],为干细胞移植治疗的临床应用提供了新的方向:即可将干细胞分泌的可溶性因子在合适的时间以适当浓度注入患者体内以达到治疗目的^[24]。这种方法可以更好地控制剂量和靶浓度,或许较干细胞注射疗法更适用于临床。

4 CSCs 与心脏病

慢性心功能不全患者是最迫切需要改善心功能的人群。这些患者多为老年人,心脏干细胞功能是否随年龄已发生改变,是否仍适合于干细胞移植,移植后是否还有修复能力,将直接影响干细胞

治疗的效果。研究表明,冠状动脉疾病和慢性缺血性疾病不会影响从心房组织中分离 c-kit⁺ 细胞的产量,仅患者年龄和 c-kit⁺ 细胞获得率存在负相关^[8]。随着患者年龄的增加,老的非复制细胞端粒酶长度缩短,并表达衰老相关蛋白^[25],这种变化可能与过氧化损伤介导的端粒酶长度缩短有关,而过氧化损伤过程是个时间依赖过程^[26]。但是,也有研究提示慢性缺血性心脏病患者的 c-kit⁺ 细胞量减少^[27]。

在急性心梗模型小鼠冠状动脉永久性闭塞后 8 h 的心脏切片可以发现,梗死区仅有少数 c-kit⁺ 细胞胞核显示有活力。因此,缺血性心肌病的进行性恶化是由于其他部位 CSCs 不能转移、归巢到梗死部位,而非坏死区域的 CSCs 生长能力有限。梗死区的 CSCs 已经在缺血过程中与其他类型细胞一起坏死或凋亡^[28]。

5 问题和展望

心脏病患者能否耐受经皮心肌穿刺的创伤,穿刺后患者心肌瘢痕形成是否会抵消部分干细胞移植的疗效,目前仍不清楚。再者,穿刺获得的 CSCs 体外分离和扩增需要较长时间。心肌干细胞在体外扩增到何种程度时再移植到体内。这些问题都有待解决。MSCs 能够感受微环境并根据微环境不同决定自身分化的方向,而心肌梗死或其他心脏疾病时,心脏的微环境发生改变,移植的干细胞分化方向及最后的功能是否会受到影响,也仍是未知^[29]。因此,研究如何激活自身 CSCs,促进其分化和旁分泌功能是目前有临床价值的研究方向。然而慢性缺血性心脏病患者的心脏干细胞耗竭使得心肌再生功能减弱,从而导致心功能减退^[30],这部分患者的心脏干细胞来源也是问题。但是,就目前的研究结果来看,CSCs 用于心脏疾病治疗的前景仍是光明的。

参考文献

- [1] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiomyocytes divide after myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2001, 344(23):1750-1757.
- [2] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: coming, differentiation, and fusion after infarction [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(21):12313-12318.
- [3] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration[J]. Cell, 2003, 114(6): 763-776.
- [4] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for

- cardiomyocyte renewal in humans [J]. *Science*, 2009, 324(5923):98-102.
- [5] Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling [Review]. *Nature*, 2002, 415(6868):240-243.
- [6] Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative Potential of cardiosphere derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy [J]. *Circulation*, 2007, 115 (7): 896-908.
- [7] Messnia E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart [J]. *Circ Res*, 2004, 95(9):911-921.
- [8] Aghila Rani KG, Jayakumar K, Sarma PS, et al. Clinical determinants of ckit-positive cardiac cell yield in coronary disease [J]. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 2009, 17 (2): 139-142.
- [9] Miyamoto S, Kawaguchi N, Ellison GM, et al. Characterization of long-term cultured c-kit⁺ cardiac stem cells derived from adult rat hearts [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(1):105-116.
- [10] Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. Human cardiac stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (35): 14068-14073.
- [11] Li TS, Cheng K, Lee ST, et al. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair [J]. *Stem Cells*, 2010, 28 (11): 2088-2098.
- [12] Li TS, Cheng K, Malliaras K, et al. Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, Aug 21. [Epub ahead of print].
- [13] Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice [J]. *Circ Res*, 2010, 106(5):971-980.
- [14] Gnecci M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells [J]. *Nat Med*, 2005, 11 (4): 367-368.
- [15] Maltais S, Tremblay JP, Perrault LP, et al. The paracrine effect: pivotal mechanism in cell-based cardiac repair [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3(6):652-662.
- [16] Nguyen BK, Maltais S, Perrault LP, et al. Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3(5):547-558.
- [17] Chimenti I, Smith RR, Leppo MK, et al. Human cardiac progenitor cells secrete paracrine factors in vitro and in vivo [J]. *J Moll Cell Cardiol*, 2008, 44(4):802-803.
- [18] Gehmert S, Sadat S, Song YH, et al. The anti-apoptotic effect of IGF-1 on tissue resident stem cells is mediated via PI3-kinase dependent secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) release [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(4):752-755.
- [19] Gnecci M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stemcell-mediated cardiac protection and functional improvement [J]. *FASEB J*, 2006, 20(6):661-669.
- [20] Markel TA, Wang Y, Herrmann JL, et al. VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(6): H2308-H2314.
- [21] Matsuura K, Honda A, Nagai T, et al. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(8):2204-2217.
- [22] Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, et al. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mono-nuclear cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (5): 1166-1177.
- [23] Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, et al. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(21):3961-3966.
- [24] Gnecci M, Zhang ZP, Ni A, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy [J]. *Circ Res*, 2008, 103(11):1204-1219.
- [25] Rota M, Hosoda T, De Angelis A, et al. The young mouse heart is composed of myocytes heterogeneous in age and function [J]. *Circ Res*, 2007, 101(4):387-399.
- [26] von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 908:99-110.
- [27] Pouly J, Bruneval P, Mandet C, et al. Cardiac stem cells in the real world [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135(3): 673-678.
- [28] Urbanek K, Rota M, Cascapera S, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival [J]. *Circ Res*, 2005, 97(7): 663-673.
- [29] Lyngbak S, Schneider M, Hansen J, et al. Cardiac regeneration by resident stem and progenitor cells in the adult heart [J]. *Basic Res Cardiol*, 2007, 102(2):101-114.
- [30] Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(24): 8692-8697.

(收稿:2010-08-17 修回:2010-12-07)

(本文编辑:丁媛媛)