

干细胞再生心肌研究进展

李 鹏 臧旺福

【摘要】 干细胞移植使真正修复和再生心肌成为可能,是治疗缺血性心肌病的一种新方法。目前试验研究表明,由于大量移植的干细胞不能存留在心肌组织,细胞活性较低,再生心肌的能力被明显削弱。如何运用更为优化的干细胞移植策略和现实可行的方法,解决移植后干细胞再生心肌的效率成为细胞治疗的关键。此文从再生心肌的干细胞来源和选择、移植干细胞的方式、预处理干细胞提高其分化能力等方面综述当前的研究进展和前景。

【关键词】 干细胞;心肌再生;缺血性心脏病

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2011.04.012

如何提高移植后干细胞再生心肌的效率是影响干细胞治疗效果的关键因素。本文从干细胞的来源、移植的方式、干细胞预处理提高分化能力等几个方面作综述。

1 干细胞来源和选择

干细胞是具有再生、分化和增殖能力的一类细胞。通常分为组织干细胞和全能干细胞。

1.1 组织干细胞

包括间充质干细胞(MSCs)、外周血循环祖细胞及心脏祖细胞(CPCs)等。干细胞具多向分化潜能,并不是所有移植的干细胞都能分化为心肌细胞,筛选出能特定分化为心肌的干细胞对细胞治疗的效果会有很大的提升。新近研究发现具有特殊表面标志物如 c-kit⁺, sca-1⁺, Isl1⁺ 的干细胞定向分化为心肌的能力较强,这使体外修饰干细胞增强其心肌分化能力成为可能。

1.2 全能干细胞

分为胚胎细胞(ESCs)和诱导性多能干细胞(IPSC)。存在使用人的 ESCs 具有伦理问题、免疫排斥反应和可能形成肿瘤的缺点。IPSC 和 ESCs 在细胞形态、表面标志物和畸胎瘤形成的特性上非常相似,而 IPSC 为非胚胎来源的,避免了使用 ESCs 带来的伦理问题。但 ESCs 或 IPSC 源性心肌细胞的应用有两个先决条件:较高的分化效率及分化的心肌细胞能被纯化和增殖。目前还没有一个公认有效的方法能达到应用的标准^[1]。

2 干细胞移植方式的选择

将体外培养的干细胞植入体内,必然伴随着干细胞的丢失和活性的损伤,如何选择理想的移植方式以保持干细胞良好的再生能力将显得至关重要。

2.1 移植干细胞输注技术

目前大部分临床试验使用经冠状动脉、经心肌和逆行冠状静脉途径移植干细胞,只有美国 Osiris Therapeutics 公司赞助的 MSCs 项目是经静脉注射。然而这些细胞输注技术对于移植细胞的存留率只有不到 10%,特别是远期的检测甚至更低,再生心肌的能力则明显削弱^[2]。干细胞输注方式的选择与移植细胞类型、临床疾病特点和移植时间点有很大关系。急性心肌梗死的细胞治疗多采用经冠状动脉途径,因为梗死相关动脉还未关闭,输注的细胞可以到达目标组织。因为需要短时间内体外扩增,所以较多使用非选择性的全骨髓干细胞、选择性的骨髓干细胞或骨髓 MSCs 治疗。对于已经梗死的组织,因为微循环堵塞,需要经心肌直接注射途径才能使细胞达到目标部位。研究表明,直接心肌注射后细胞在心肌内的存留率较高,然而存留细胞的活性却大大降低^[3]。对于移植时机的选择还没有明确结论,近期有两个临床试验 TIME 和 LATE-TIME 值得注意,前者在心肌梗死后 3 或 7 d 对患者实施细胞治疗,后者在心肌梗死后 2 到 3 周移植细胞,然后同时评价其安全性和有效性^[4]。由于这些细胞输注技术的限制,研究人员希望通过应用生物组织工程技术以提高细胞的存留率,同时能保留细胞活性,促进细胞增殖和分化,预处理干细胞。

2.2 心肌生物组织工程

组织工程技术的策略是把可用于再生心肌的

基金项目:教育部博士点基金(20090073110086)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院心内科

通信作者:臧旺福, Email:zangwf@hotmail.com

细胞与生物材料如水凝胶、3-D 生物支架相结合,创造一个适合细胞存活、增殖、分化的良好环境,从而为其进行原位的心肌塑性提供条件。心肌组织工程主要有 3 种方法:(1)原位组织工程,是将细胞和可注射的生物材料一起注射到梗死心肌。Yeh 等^[5]将水凝胶和人胎膜干细胞同时注入梗死心肌,干细胞在水凝胶中保存了其内源性的细胞基质和细胞表型,从而提升细胞存留率,阻止心肌壁变薄,改善心脏功能;(2)体外组织工程,是将细胞在体外种植到 3-D 支架中进行培养,然后移植到体内再生心肌,已被证实是有效的方法。Valarmathi 等^[6]更是利用胎鼠心肌和 MSCs 在 I 型胶原 3-D 支架中共同培养形成一种 3-D 心肌结构,大幅度提高了干细胞的分化效率和活性;(3)细胞片组织工程,是一种无支架的方法,用单层的细胞片建造成一个三维组织,再覆盖到梗死的心肌上。Zakharova 等^[7]用心脏祖细胞片移植到梗死心肌,3 周后存活和分化的心肌细胞可达 14.6%,减缓了心肌壁变薄的过程。应用组织工程的方法提供了细胞生存可以附着的支架,改善细胞存活的微环境,提高干细胞再生心肌的效率。

3 预处理干细胞

细胞本身的存活分化能力是决定分化效果的基本因素,目前提高这种能力的方法主要有以下几种:

3.1 蛋白分子和药物预处理干细胞

Chan 等^[8]用成纤维细胞生长因子(FGF-10)处理 ESCs 和 iPSC,增强了干细胞的心肌分化能力,在体内实验中同时注射 FGF-10 和 ESCs 于大鼠心肌提高了 ESCs 的分化效率。Chang 等^[9]研究表明,经 Hph-1-Hsp70 蛋白预处理的 MSCs 与非预处理 MSCs 组相比,移植后显示出较高的活力和抗凋亡能力,提高了左心室功能。另外,用一些药物比如苯丙酸诺龙处理 ESCs,可促使其分化为心肌细胞^[10]。

3.2 缺氧预处理

缺氧预处理分为体外缺氧环境下的细胞培养和体内的心肌梗死模型两种形式。如果 MSCs 处于缺氧环境下,细胞会开始表达一些利于存活的信号蛋白和生血管因子如缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子、CXCR4、c-Met 等^[11]。Tang 等^[12]研究表明,缺氧预处理提高了心肌干细胞对心肌梗死的疗效。

3.3 基因改良预处理

通过基因改良可以使干细胞过表达利于存活

的细胞表面蛋白信号,如过表达抗死亡信号 Akt 提高抗凋亡能力,过表达 CXCR4 增强新生血管能力等^[13]。而提高干细胞的心肌分化能力无疑是基因改良的理想目标。Cho 等^[14]移植过表达 GSK-3 β 的 MSCs 治疗心肌梗死,发现 MSCs 的心肌分化能力显著加强。He 等^[15]也发现转导 Wnt11 会促进 MSCs 定向心肌分化。

4 慢性缺血性心肌病的细胞治疗

尽管临床中再血管化技术的提高明显改善了急性心肌梗死患者的生存和生活质量,但对微血管堵塞而不能再血管化的慢性心绞痛或慢性心肌梗死患者,目前的治疗效果还是非常有限。如何通过干细胞再生心肌,从而阻止慢性缺血性心肌病进一步向心力衰竭的方向发展也是干细胞治疗的研究热点之一。

慢性缺血性心肌病的特点是炎症反应已经消退,新生血管过程也基本停止。因此移植的干细胞应当具备生成血管的条件,并在新的环境中保持生存。目前已用于研究的细胞类型有肌原细胞,脐带血干细胞、骨髓 MSCs 和全能干细胞等。Mazo 等^[16]研究表明,在慢性心肌梗死模型中,骨髓 MSCs 比骨髓单核细胞有更好的疗效。Behfar 等^[17]用心肌分化“鸡尾酒”处理 MSCs 引导其分化为心肌,提高干细胞对慢性缺血性心肌病的疗效。而 He 等^[18]在慢性心肌梗死模型中注入 ESCs 并没有发现有明显的改善心脏功能作用,可能与 ESCs 引起的免疫反应有关。

在慢性心肌梗死模型中,输注细胞的数量和方式对疗效也有明显影响。对移植 20×10^6 和 200×10^6 MSCs 对慢性心肌梗死的疗效差别分析显示,低剂量对提高心肌功能有趋势上的改变,而高剂量才可以看到统计学上的差异^[19]。比较经静脉或心肌注射干细胞发现,只有直接心肌注射能改善慢性心肌梗死的心肌收缩力,这可能与干细胞能否移行到心肌梗死部位有关^[20]。Tan 等^[21]用组织工程的方法将种植有 MSCs 的小肠黏膜移植到慢性梗死心肌的表面,使细胞能缓慢移行到梗死部位并分化为心肌,起到了很好的疗效。

5 结语

干细胞治疗缺血性心肌病的最终目标就是能再生丢失的心肌细胞。提高干细胞移植后的存活和再生心肌效率需要综合多方面考虑。另外,在对鱼类和两栖类动物的研究中显示心肌细胞存在自身再生现象。同样,人的心肌细胞也存在某种程度

的再生和新旧交替^[22],这可能与 CPCs 的存在密切相关。Tang 等^[23]在研究慢性心肌梗死的过程中发现,虽然 CPCs 没有新生血管的功能,但是经冠脉移植的 CPCs 却可以通过激活内源性 CPCs 来再生心肌组织从而减少瘢痕的形成。通过外源性因子激发这种内在心肌再生机制,使其能及时填补丧失的心肌细胞,或许可以将内源性再生和外源性干细胞治疗联合起来以获取最大的疗效。

参 考 文 献

- [1] Yoshida Y, Yamanaka S. Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell - based regeneration [J]. *Circulation*, 2010, 122(1):80-87.
- [2] Schachinger V, Aicher A, Dobert N, et al. Pilot trial on determinants of progenitor cell recruitment to the infarcted human myocardium [J]. *Circulation*, 2008, 118 (14): 1425-1432.
- [3] 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]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(3):486- 495.
- [4] Traverse JH, Henry TD, Vaughn DE, et al. Rationale and design for TIME: a Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial evaluating the safety and effect of timing of administration of bone marrow mononuclear cells after acute myocardial infarction [J]. *Am Heart J*, 2009, 158(3):356-363.
- [5] Yeh YC, Lee WY, Yu CL, et al. Cardiac repair with injectable cell sheet fragments of human amniotic fluid stem cells in an immune-suppressed rat model[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(25):6444-6453.
- [6] Valarmathi MT, Goodwin RL, Fuseler JW, et al. A 3-D cardiac muscle construct for exploring adult marrow stem cell based myocardial regeneration [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(12): 3185-3200.
- [7] Zakharova L, Mastroeni D, Mutlu N, et al. Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(1):40-49.
- [8] Chan SS, Li HJ, Hsueh YC, et al. Fibroblast growth factor-10 promotes cardiomyocyte differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):e14414.
- [9] Chang W, Song BW, Lim S, et al. Mesenchymal stem cells pretreated with delivered Hsp-1-Hsp70 protein are protected from hypoxia-mediated cell death and rescue heart functions from myocardial injury [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (9) : 2283-2292.
- [10] Xu C, Police S, Hassanipour M, et al. Efficient generation and cryopreservation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells[J]. *Regen Med*, 2011, 6(1):53-66.
- [11] Chacko SM, Ahmed S, Selvendiran K, et al. Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(6):C1562-C1570.
- [12] Tang YL, Zhu W, Cheng M, et al. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression[J]. *Circ Res*, 2009, 104(10): 1209-1216.
- [13] Huang W, Zhang D, Millard RW, et al. Gene manipulated peritoneal cell patch repairs infarcted myocardium[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(4):702-712.
- [14] 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[J]. *Circ Res*, 2011, 108(4):478-489.
- [15] He Z, Li H, Zuo S, et al. Transduction of wnt11 promotes mesenchymal stem cells transdifferentiation into cardiac phenotypes [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, Feb 13. [Epub ahead of print].
- [16] Mazo M, Gavira JJ, Abizanda G, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts a greater long-term effect than bone marrow mononuclear cells in a chronic myocardial infarction model in rat [J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(3): 313-328.
- [17] Behfar A, Yamada S, Crespo-Diaz R, et al. Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(9):721-734.
- [18] He Q, Trindade P T, Stumm M, et al. Fate of undifferentiated mouse embryonic stem cells within the rat heart; Role of myocardial infarction and immune suppression[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(1):188-201.
- [19] Schuleri K H, Feigenbaum G S, Centola M, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(22): 2722-2732.
- [20] Nakajima H, Sakakibara Y, Tambara K, et al. Delivery route in bone marrow cell transplantation should be optimized according to the etiology of heart disease[J]. *Circ J*, 2008, 72(9):1528-1535.
- [21] Tan MY, Zhi W, Wei RQ, et al. Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(19): 3234-3240.
- [22] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans [J]. *Science*, 2009, 324(5923):98-102.
- [23] Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction [J]. *Circulation*, 2010, 121(2):293-305.

(收稿:2011-02-15)

(本文编辑:金谷英)