

心肌球和心肌球源性干细胞的研究进展

谭妙欣 孙 勇 吴 健

【摘要】 心肌球和心肌球源性干细胞来源于心脏,具有无性繁殖、自我更新、多向分化的潜能,移植到受损心脏后能通过直接再生、旁分泌及激活内源性修复等多种修复机制,降低心肌梗死面积、抑制心室重塑、提高心脏功能等。联合应用基因修饰、组织工程等为进一步优化心肌梗死的治疗效果带来了新的希望。

【关键词】 心肌球;心肌球源性干细胞;心脏干细胞;心肌梗死

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.02.007

心肌球(cardiosphere,CSP)和心肌球源性干细胞(cardiosphere derived cells,CDCs)是心脏干细胞(cardiac stem cell,CSCs)的一个类型。在体外培养时,CSP 和 CDCs 具有较强的向心肌细胞分化和血管再生的能力,并能产生多种血管生成因子和抗凋亡因子;当注入动物体内后,CSP 和 CDCs 又能很好地定植、迁移和分化,通过再生和旁分泌等作用维持心脏稳态和病理修复^[1],并能降低梗死面积、抑制心室重塑、减轻心肌细胞凋亡、改善血流动力学及心脏功能^[2],给心肌梗死后心力衰竭的治疗带来了新的希望。

1 CSP 和 CDCs 概述

1.1 CSP 和 CDCs 的区别及起源

CSP 是心肌活组织的组织经贴壁培养形成外植体细胞后,再种植在多聚赖氨酸包被的培养皿中,自发形成具有三维结构的混合细胞团^[3-4]。这种混合细胞大致可分为 2 层:中心是可增殖的原始细胞层,表达 c-kit 等,外层是间质细胞及分化细胞层,表达 CD105、CD90 及心肌细胞特异性蛋白、缝隙连接蛋白等。CDCs 是 CSP 在铺有黏连蛋白的培养皿中培养形成的单层混合细胞,CDCs 多数为 CD105⁺、CD166⁺ 的细胞,且阳性表达 CD90、c-kit、CD34 和 CD31,而阴性表达 CD45、CD133 和 MDR1 等血液谱系^[4]。关于心脏干细胞的起源,White 等^[5]经短串联重复核苷酸的 DNA 分析,发现 CDCs 起源于心脏本身,而并非血液源性或其他来源种植到心脏。

1.2 CSP 和 CDCs 的获取方法

目前对两者的获取多是通过心内膜活检^[4],主要

位于心房组织,可获得足量稳定表达的 CDCs,通过体外培养能满足临床需求^[6-7]。研究显示婴幼儿期的细胞更佳,因为此期心脏再生和修复能力更强^[8-9]。

1.3 CSP 和 CDCs 的输注手段

目前常用的干细胞移植途径有经静脉、经冠状静脉、经心内膜、经心外膜及经冠状动脉注射等。其中经静脉移植创伤小,但心脏滞留少,多数滞留于肺。经心内膜和经心外膜心肌内注射,能直接将细胞注入受损组织,滞留率较高,但同时创伤大^[10]。经导管冠状动脉内注射是一种微创移植方式,也是临床首选的方法,可使细胞尽量弥散到心脏,现已应用到临床试验中^[11-12]。

2 CSP 和 CDCs 的作用机制

体内实验表明,无论是小鼠、大鼠,还是猪心肌梗死后,CSP 和 CDCs 移植都能发挥良好的治疗作用,包括降低梗死区域面积和心室重塑,增加有活力的心肌和毛细血管密度,促进局部室壁运动,提高心室功能^[13-15]。CSP 和 CDCs 除能够表达干细胞抗原外,还表达与心肌收缩和电活动相关的蛋白;与心肌细胞共培养后能表现为肌细胞特性,还可与周围细胞形成钙瞬变同步;注入到梗死边缘区后,梗死区室壁变厚,活性心肌明显增加^[4,15]。将分选后克隆的 Sca-1⁺ CD45⁻ CDCs 移植到小鼠梗死心脏,发现其能在梗死区域内部增殖,并可分化为心肌细胞、平滑肌细胞和内皮细胞,诱导血管生成,从而进一步改善心脏功能。表明 CDCs 能通过心肌再生和血管生成实现心脏的保护作用^[16]。

研究表明,直接分化所起到的有益作用仅占 20%~50%。移植的 CDCs 除了向心脏和血管分化,还能募集内源性干细胞,促进内源性再生,改善组织弹性^[17]。此外,还发现新生肌细胞不仅来源于

干细胞分化,而且发现原本存在的内源性肌细胞。因此,CDCs 能通过促进内源性干细胞和自身肌细胞增殖或分化进一步修复受损心肌^[18]。

除了通过直接再生和促进内源性修复外,CSP 和 CDCs 还可旁分泌血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)、类胰岛素样生长因子(IGF)等在心肌梗死中发挥促进血管生成的作用。将罗猴来源 CDCs 及培养基分别注入心肌梗死的免疫缺陷小鼠,发现 CDCs 注射组小鼠心脏梗死区域 CDCs 增殖显著,而且心功能改善情况较培养基注射组更明显。表明 CDCs 的作用不仅来源于心脏再生,而且在诱导释放旁分泌因子或诱发延长的旁分泌效应也发挥着重要作用^[19]。通过对比研究 CDCs、骨髓单个核细胞、骨髓间充质干细胞、脂肪源性间充质干细胞、c-kit⁺ CDCs 对心肌梗死的治疗效果,发现 CDCs 拥有更强的心脏修复能力,原因归结于更均衡更强大的旁分泌功能及混合细胞的综合作用^[20]。此外,CDCs 能通过下调蛋白激酶 B、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspases-3)等凋亡基因的表达发挥抗凋亡效应^[17]。

3 CSP 和 CDCs 的安全性和有效性

3.1 自体移植的安全性和有效性

经冠状动脉内注射干细胞可能会由于细胞凝集和血栓形成而导致血管闭塞,进而加重心肌梗死。因此,Johnston 等^[15]通过向细胞悬液中加入肝素及硝酸甘油来减少细胞移植相关的血栓发生,发现自体 CDCs 可以被安全移植入猪的心肌梗死模型,且移植的 CDCs 能够迁移、分化为成熟的心肌细胞、降低梗死面积、改善血流动力学,不伴有心律失常、肿瘤或异位组织形成^[15, 21]。CDCs 的 1 期临床研究(CADUCEUS),通过给心肌梗死后 2~4 周、射血分数值为 25%~45%的患者,梗死相关冠状动脉内注入自体 CDCs 或磷酸盐缓冲液(PBS),发现治疗 6 个月后,CDCs 组比 PBS 组的瘢痕面积明显缩小,增加了活力心肌的质量、局部的收缩能力及室壁的厚度;治疗 12 个月时瘢痕面积和重量进一步下降。瘢痕面积的缩小与有活力的心肌增加成正比。实验过程中并未发现肿瘤形成及心脏主要不良事件发生,显示出了 CDCs 自体移植的安全性和有效性^[12]。

3.2 同种异体移植的安全性和有效性

动物同种异体移植 CSP 和 CDCs 显示安全有效。同种异体 CSP 和 CDCs 移植可引起短暂、微弱的局部免疫反应,但不引起组织学上的免疫排斥或

系统的免疫源性;不会导致非致命心肌梗死、死亡、肿瘤形成、室性心律失常、全身感染、卒中、过敏反应等发生。同种异体移植的 CDCs 诱导心肌直接再生、刺激内源性的再生能力和促进 VEGF、HGF、IGF1 表达的能力与自体移植的 CDCs 相当,在增加活性心肌、降低梗死面积、减弱心室重塑方面无明显差异^[22-23]。

4 CSP 和 CDCs 治疗效果的优化

为了进一步提高心脏干细胞的治疗效果,研究人员探索了各种优化方案,如联合应用旁分泌因子、基因修饰、组织工程等。

4.1 联合应用旁分泌因子

旁分泌因子具有改善细胞存活、募集内源性心脏干细胞、诱导增殖或分化等多重作用。Aghila 等^[24]通过对比研究多种生长因子对 CDCs 的影响,发现表皮生长因子(EGF)较碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)、VEGF、IGF、HGF 等其他生长因子更能促进心肌球形成。心肌梗死后,移植 EGF 预处理的 CDCs,发现 EGF 能诱导 CDCs 向心肌细胞分化,心肌细胞标志物心肌肌钙蛋白-I 及 β -肌球蛋白重链的表达明显上调。b-FGF 还能够通过调节心肌梗死后微环境,促进 CDCs 的定植及分化,增加心肌梗死后 CDCs 移植的获益^[25]。可能与基质细胞衍生因子-1 a 及其受体的表达上调有关^[26]。

4.2 基因修饰与心脏干细胞

Notch/RBPJ 通路,能够通过调节多种心脏特异性转录因子表达,调控干细胞的定向分化。研究表明,通过基因修饰的手段上调 CSCs Notch1 的表达,能促进 Nkx2.5 合成并启动向心肌细胞分化。而抑制其表达,CSCs 向心肌谱系分化明显受抑制。表明 Notch1 能促进心脏干细胞向心肌特异性分化^[27]。此外,Notch1 还能通过 RBPJ 促进 CDCs 向内皮和平滑肌的分化,表现为肌球蛋白重链和转胶蛋白(transgelin)等的合成增加,表明 Notch1 对 CDCs 介导的血管生成也发挥重要作用^[28]。

4.3 组织工程与心脏干细胞

为了提高干细胞移植后的驻留率和存活率低等问题,应用组织工程方法,设计出具有缓慢降解、逐步释放、可注射等特点的凝胶组织,不仅能作为黏附底物防止干细胞随血流流失,还能为其提供一种暂时的保护微环境,避免低氧、炎症反应等所引起的细胞凋亡。应用可降解聚 N-异丙基丙烯酸酯热敏水凝胶将 CDCs 输送到心肌梗死部位,不仅能保护心肌抵抗物理应力而且能促进 CDCs 增殖及向

心肌细胞分化^[29]。透明质酸水凝胶及血小板凝胶的应用,还增强了对梗死心肌内源性 c-kit⁺ 的细胞的募集,从而更好地改善重塑^[30-31]。此外, Li 等^[32]在水凝胶的基础上设计了一种氧释放系统,通过化学反应能够为干细胞缓慢提供氧气,进一步提高了 CDCs 的驻留及存活,促进了向心肌分化。此外,输注 CDCs 前,诱导降低心室率,能明显提高细胞驻留;输注后,注射部位给予纤维蛋白胶封闭也能促进细胞驻留,进而提高 CDCs 的治疗效果^[33]。

4.4 其他优化策略

静电磁场能够影响多种生物学过程。静态和交变电磁场适当结合,能够影响细胞内钙离子的水平,诱导祖细胞的增殖和分化。极低频率的电磁场能够增加 CSP 和 CDCs 的代谢活性,并能促进其向心肌分化^[34]。此外,有学者将骨髓间充质干细胞(MSCs)与 CSCs 进行联合移植到梗死心肌,发现在降低梗死面积,改善心脏功能及增强射血分数方面,显著优于 MSCs 及 c-kit⁺ CSCs 本身^[35]。这为优化 CSP 和 CDCs 的移植效果提供了一种策略。

5 CSP 和 CDCs 的对比

优化 CSP 和 CDCs 的植入剂量,两者均能安全有效改善心功能,在降低射血分数方面效果相当,而在改善血流动力学和衰减心室重塑方面 CSP 更佳,可能与其特有的三维结构有关,不仅能提高细胞驻留,而且拥有一个稳定的自身内环境利于细胞存活^[36],而转化生长因子- β 依赖的上皮细胞向间充质细胞转化在心肌球形成中发挥着重要作用^[37]。此外,还发现其含有丰富的干细胞基因表达、细胞外基质和细胞黏附分子,可能是 CSP 优于 CDCs 的原因^[38]。Cho 等^[39]将 CDCs 再次经过成球培养形成次级心肌球,注入到小鼠心肌梗死模型后,发现次级 CSP 能较 CSP 明显提高迁移能力、改善左心功能、缩小梗死面积,原因是 VEGF 合成和分泌更多,更能促进新生血管生成。

从已有的临床研究结果,可以欣喜地看到心脏干细胞移植治疗心肌梗死和心力衰竭的安全性和有效性。现在关于心脏干细胞的多项临床研究正在探索中,其中优化 CSCs 治疗的 AutoLogous Human cArDiac-Derived Stem Cell to Treat Ischemic cArDiomyopathy (ALCADIA)研究和关于 CDCs 同种异体移植的 Allogeneic Heart Stem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) 研究备受关注,可能会给我们带来新的启示。

参 考 文 献

- [1] Ellison GM, Torella D, Dellegrottaglie S, et al. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(9): 977-986.
- [2] Johnston PV, Sasano T, Mills K, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy [J]. Circulation, 2009, 120(12): 1075-1083.
- [3] Barile L, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. Human cardiospheres as a source of multipotent stem and progenitor cells[J]. Stem Cells Int, 2013, 2013: 916837.
- [4] Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens[J]. Circulation, 2007, 115(7): 896-908.
- [5] White AJ, Smith RR, Matsushita S, et al. Intrinsic cardiac origin of human cardiosphere-derived cells[J]. Eur Heart J, 2013, 34(1): 68-75.
- [6] Aghila Rani KG, Jayakumar K, Srinivas G, et al. Isolation of c-kit-positive cardiosphere-forming cells from human atrial biopsy[J]. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2008, 16(1): 50-56.
- [7] Chan HH, Meher Homji Z, Gomes RS, et al. Human cardiosphere-derived cells from patients with chronic ischaemic heart disease can be routinely expanded from atrial but not epicardial ventricular biopsies [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2012, 5(5): 678-687.
- [8] Simpson DL, Mishra R, Sharma S, et al. A strong regenerative ability of cardiac stem cells derived from neonatal hearts[J]. Circulation, 2012, 126(11 Suppl 1): S46-S53.
- [9] Mishra R, Vijayan K, Colletti EJ, et al. Characterization and functionality of cardiac progenitor cells in congenital heart patients[J]. Circulation, 2011, 123(4): 364-373.
- [10] Bonios M, Terrovitis J, Chang CY, et al. Myocardial substrate and route of administration determine acute cardiac retention and lung bio-distribution of cardiosphere-derived cells[J]. J Nucl Cardiol, 2011, 18(3): 443-450.
- [11] Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCPIO): initial results of a randomised phase 1 trial[J]. Lancet, 2011, 378(9806): 1847-1857.
- [12] Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomized phase 1 trial[J]. Lancet, 2012, 379(9819): 895-904.
- [13] Carr CA, Stuckey DJ, Tan JJ, et al. Cardiosphere-derived cells improve function in the infarcted rat heart for at least 16 weeks—an MRI study[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25669.
- [14] Kreke M, Smith RR, Marbán L, et al. Cardiospheres and cardiosphere-derived cells as therapeutic agents following myocardial infarction[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2012,

- 10(9):1185-1194.
- [15] Johnston PV, Sasano T, Mills K, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2009, 120(12):1075-1083.
- [16] Ye J, Boyle A, Shih H, et al. Sca-1+ cardiosphere-derived cells are enriched for Isl1-expressing cardiac precursors and improve cardiac function after myocardial injury [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e30329.
- [17] 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.
- [18] Palacios JA, Schneider MD. Heart to heart: grafting cardiosphere-derived cells augments cardiac self-repair by both myocytes and stem cells [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(2):177-179.
- [19] Martens A, Gruh I, Dimitroulis D, et al. Rhesus monkey cardiosphere-derived cells for myocardial restoration [J]. *Cytotherapy*, 2011, 13(7):864-872.
- [20] Li TS, Cheng K, Malliaras K, et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(10):942-953.
- [21] Lee ST, White AJ, Matsushita S, et al. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(4):455-465.
- [22] Malliaras K, Li TS, Luthringer D, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells [J]. *Circulation*, 2012, 125(1):100-112.
- [23] Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, et al. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(10):1108-1119.
- [24] Aghila Rani KG, Kartha CC. Effects of epidermal growth factor on proliferation and migration of cardiosphere-derived cells expanded from adult human heart [J]. *Growth Factors*, 2010, 28(3):157-165.
- [25] Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, et al. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(23):1858-1865.
- [26] Zhang YH, Zhang GW, Gu TX, et al. Exogenous basic fibroblast growth factor promotes cardiac stem cell-mediated myocardial regeneration after miniswine acute myocardial infarction [J]. *Coron Artery Dis*, 2011, 22(4):279-285.
- [27] Boni A, Urbanek K, Nascimbene A, et al. Notch1 regulates the fate of cardiac progenitor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(40):15529-15534.
- [28] Chen L, Ashraf M, Wang Y, et al. The role of notch 1 activation in cardiosphere derived cell differentiation [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(12):2122-2129.
- [29] Li Z, Guo X, Matsushita S, et al. Differentiation of cardiosphere-derived cells into a mature cardiac lineage using biodegradable poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(12):3220-3232.
- [30] Cheng K, Blusztajn A, Shen D, et al. Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(21):5317-5324.
- [31] Cheng K, Shen D, Smith J, et al. Transplantation of platelet gel spiked with cardiosphere-derived cells boosts structural and functional benefits relative to gel transplantation alone in rats with myocardial infarction [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(10):2872-2879.
- [32] Li Z, Guo X, Guan J. An oxygen release system to augment cardiac progenitor cell survival and differentiation under hypoxic condition [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(25):5914-5923.
- [33] Terrovitis J, Lautamäki R, Bonios M, et al. Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(17):1619-1626.
- [34] Gaetani R, Ledda M, Barile L, et al. Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(3):411-420.
- [35] Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation [J]. *Circ Res*, 2010, 107(7):913-922.
- [36] Lee ST, White AJ, Matsushita S, et al. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(4):455-465.
- [37] Forte E, Miraldi F, Chimenti I, et al. TGF β -dependent epithelial-to-mesenchymal transition is required to generate cardiospheres from human adult heart biopsies [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(17):3081-3090.
- [38] 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.
- [39] Cho HJ, Lee HJ, Youn SW, et al. Secondary sphere formation enhances the functionality of cardiac progenitor cells [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(9):1750-1766.

(收稿:2013-09-22 修回:2013-10-22)

(本文编辑:金谷英)