

缺血性心脏病干细胞治疗进展

向仕钊 唐其柱

【摘要】 干细胞移植使缺血再灌注中损伤心肌的再生和修复成为可能。研究表明,移植的干细胞活性低且不能存留于心肌组织,所以再生心肌能力有限。优化干细胞移植的各环节成为缺血性心脏病受损心肌干细胞治疗的关键。该文从干细胞来源、体外诱导方法、干细胞预处理、移植方式、移植时机及移植后的监测等方面对心肌干细胞治疗进展作一介绍。

【关键词】 缺血性心脏病;干细胞移植;心肌再生

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.05.013

缺血性心脏病是心血管病患者死亡的主要原因,也是导致充血性心力衰竭的首要原因。冠状动脉阻塞后 15~20 min 心肌细胞开始坏死。有“细胞水平的心肌成形术”之称的干细胞肌肉内注射使缺血再灌注中受损心肌的再生和修复成为可能,是继传统药物治疗和心脏移植的新治疗手段^[1]。然而,干细胞移植后活性低且不能存留于心肌组织,导致其心肌再生能力有限。优化干细胞移植的各个环节将成为缺血性心脏病受损心肌干细胞治疗成功的关键。

1 干细胞来源

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的高度未分化细胞。目前用于治疗缺血性心脏病的干细胞可分为全能干细胞和组织干细胞两大类,主要有骨髓干细胞、胚胎干细胞、骨骼肌干细胞及诱导多能干细胞(iPSC)。

1.1 全能干细胞

全能干细胞分为胚胎干细胞和 iPSC。胚胎干细胞是体外培养形成的具有发育全能性的细胞,可定向诱导分化为几乎所有种类的细胞。胚胎干细胞在基础研究和再生医学方面有巨大潜力。全基因组 RNA 干扰筛选技术在细胞基因水平研究的运用,促进了胚胎干细胞增殖和分化分子机制的研究^[2]。然而,将胚胎干细胞移植用于临床尚有技术上的困难,包括如何诱导干细胞定向分化,如何克服移植排斥反应以及如何解决伦理问题等。

iPSC 是由体细胞通过转录因子异位表达而获得,无限自我更新能力、增殖能力及来源的便利性

赋予了 iPSC 较高的应用价值。iPSC 在再生医学、细胞治疗、建立疾病模型及药物研发等方面具有广阔的应用前景^[3],但存在分化效率低、耗时、易分化成肿瘤等问题。Ieda 等^[4]研究发现,利用 iPSC 心肌治疗和心肌细胞重编程技术相结合的方法,可使纤维母细胞分化为心肌细胞时避免上述问题。

以往对心肌再生的研究主要集中于心肌实质,对心肌组织间质的研究较少。近年来研究发现,体外诱导心脏间质细胞(如成纤维细胞)分化为心肌细胞成为可能。此外,心脏间质内 Telocytes 网络也参与心肌细胞更新和再生,这使人们对心脏间质在心肌再生中的意义有了全新认识,可能为心肌再生治疗提供新的方向^[5]。

1.2 组织干细胞

组织干细胞包括间充质干细胞(MSC)、造血干细胞和成血管细胞。现已明确这 3 种干细胞中每一种均可横向分化为心肌细胞、内皮细胞及平滑肌细胞。只有具有特殊标志物(如 c-kit⁺、sca-1⁺ 及 Isl1⁺)的干细胞可定向分化为心肌细胞。骨骼肌损伤后具有较强的自我再生能力,是组织再生的细胞库。骨骼肌来源的干细胞可分化为骨母细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肌母细胞及内皮细胞,此外这类细胞还具抗炎反应和抗凋亡的潜能^[6]。

2 体外诱导方法

胚胎干细胞的体外成功分离以及 iPSC 的成功诱导为心血管疾病干细胞治疗的研究及临床应用开辟了新方向^[7]。诱导分化来源的心肌干细胞有以下作用:(1)用于体外心脏培育,以满足更多患者心脏移植的需求;(2)用作心脏细胞电生理及蛋白质生物化学的基础研究模型;(3)来自先天性心脏病

患者的 iPSC 可用于心肌细胞疾病研究^[8-10]。

目前体外诱导干细胞分化的方法有:(1) 胚体调控分化^[11];(2) 含特定生长因子的培养基诱导,如骨形态发生蛋白 4、激活素 A、成纤维生长因子 2、Wnt 竞争与抗竞争因子以及血管内皮生长因子(VEGF)等^[12-13];(3) 胚体自旋:应用硅片微通孔技术使向心肌细胞分化的胚体在分化第 3 天最佳直径控制在 250~300 μm ;(4) 微孔胚体诱导;(5) 微列胚体诱导;(6) 单层分化诱导;(7) 共培养诱导;(8) 从不同培养基的混合物中筛选心肌细胞:筛选方法包括物理方法、基因方法及非基因方法。尽管体外心肌细胞的诱导方法在过去几十年里取得了长足进步,但是这些方法都有局限性,如分化心肌细胞的量和纯度不足、诱导方案可重复性差、试剂成本过高及方案过于复杂等。

3 干细胞移植前预处理

干细胞移植是治疗缺血性组织损伤的有效手段,然而移植后细胞存活率低限制了其有效运用,多数移植后早期死亡的干细胞与自身凋亡有关^[14]。目前抑制移植后干细胞凋亡的方法主要是对细胞生存微环境进行移植前预处理,主要分为物理、化学法预处理和分子生物学预处理两类。

3.1 物理、化学法预处理

研究发现,药物预处理比低氧预处理具有更好的细胞保护效应^[15-18]。例如,在缺血环境下,经七氟醚预处理的 MSC 可通过上调缺氧诱导因子(HIF)-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)与总蛋白激酶 B(Akt)的比值,以增强细胞自身存活、迁移和治疗的潜力^[19]。Cao 等^[20]研究发现,丹参酚酸 B 能通过抑制经低氧和无血清诱导的鼠 MSC 的 caspase-3 活性,发挥抗早期凋亡的作用。此外,尚有研究发现,经去铁胺诱导的离子缺陷可抑制 c-kit⁺ 心肌干细胞的增殖能力,并抑制其向心肌细胞的分化^[21]。

3.2 分子生物学预处理

研究发现,由 MSC 释放的富含微小 RNA-22(miR-22)的外分泌体能有效减少缺血心肌细胞凋亡、改善心肌细胞纤维化以及增强心肌梗死后心脏功能, MSC 经缺血预处理后释放的外分泌体在保护缺血性心脏病心肌细胞中发挥关键作用^[22]。骨髓 MSC 可用于再生心肌细胞,但移植后骨髓 MSC 存活率低限制了其临床运用。骨髓基质细胞分化因子-1(SDF-1)可抑制内皮祖细胞和胚胎干细胞的

凋亡。SDF-1 α 预处理可通过激活磷脂酰激酶 3 激酶(PI3K)-Akt-细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)信号途径调控线粒体通路,降低 caspase-3 的活性以减少骨髓 MSC 凋亡^[23]。此外,研究发现一种类似脂联素的名为 C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 3 的脂肪因子,可通过 PI3K/Akt 信号途径抑制低氧和无血清培养诱导的骨髓 MSC 凋亡^[24]。

4 移植方式

干细胞移植方式与干细胞种类、疾病临床特点及移植时间相关。目前临床上已有的心肌干细胞移植途径包括心外膜注射、经导管介导从心内膜向心肌注射、经导管介导的冠状动脉内注射。Zakharova 等^[25]认为,可将心肌祖细胞视为心肌基质细胞构成的细胞层,细胞层移植可抑制心肌梗死后左室重塑,逆转变薄的室壁及有效改善心脏收缩功能。无支架自体衍生细胞层移植不仅可以通过促进血管再生来改善梗死后心功能,还可以通过促进心肌发育来改善梗死后心功能。每种移植方法各有优缺点,具体哪种方法更优,需进一步研究。

5 移植时机

干细胞分化需要特殊的微环境,包括诸多细胞因子的刺激、细胞间相互接触和信号传递。心肌梗死期间及梗死后受损心肌细胞的微环境表现为组织缺氧、代谢紊乱、凋亡及坏死,该时期不适于行干细胞移植。因此,过早(梗死 5 d 内)或过晚(梗死 2 周后)移植干细胞都有可能降低治疗效果。心肌梗死动物模型干细胞治疗的荟萃分析表明,心肌梗死 24 h 内或梗死后 7 d 内进行干细胞移植能有效提高心脏射血分数达 7.5%^[26]。目前确切的干细胞移植时机仍存在分歧,尚需大量研究进一步阐明。

6 移植后的监测

缺血性心脏病心肌干细胞移植治疗成功的关键,是对移植后干细胞活性及迁移情况的实时监测。传统监测方法包括原位杂交技术、PCR 技术及免疫组织化学技术。近年来,干细胞移植后的监测技术得到了飞速发展,目前能够于体外对移植的组织或细胞进行分子水平的监测,即分子成像技术,如放射性核素显像技术、核磁共振成像技术、生物体发光技术、荧光显微技术、多分子成像技术等^[27]。

7 结语

缺血性心脏病干细胞移植治疗的最终目的是尽可能实现受损心肌的再生,以恢复心脏正常的生理功能,进而提高患者生活质量。该治疗能够解决

临床上心脏移植供体短缺的问题,但干细胞移植的有效方式、时机及移植后的监测等问题仍有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Huang CC, Liao ZX, Chen DY, et al. Injectable cell constructs fabricated via culture on a thermoresponsive methylcellulose hydrogel system for the treatment of ischemic diseases[J]. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3(8):1133-1148.
- [2] Zheng X, Hu G. Use of genome-wide RNAi screens to identify regulators of embryonic stem cell pluripotency and self-renewal[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1150:163-173.
- [3] Teoh HK, Cheong SK. Induced pluripotent stem cells in research and therapy[J]. *Malaysian J Pathol*, 2012, 34(1): 1-13.
- [4] Ieda M. Heart regeneration using reprogramming technology[J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2013, 89(3):118-128.
- [5] 陈俊佑,赵强. 心肌再生——从实质到间质[J]. *国际心血管病杂志*, 2013, 40(5):285-287.
- [6] Meregalli M, Farini A, Sitzia C, et al. Advancements in stem cells treatment of skeletal muscle wasting[J]. *Front Physiol*, 2014, 5(48):1-12.
- [7] Park IH, Lerou PH, Zhao R, et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(7): 1180-1186.
- [8] Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cell-derived models of leopard syndrome[J]. *Nature*, 2010, 465(7299):808-812.
- [9] Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2011, 471(7337):225-229.
- [10] Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cell models for long-QT syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(15):1397-1409.
- [11] Mummery CL, Zhang J, Ng ES, et al. Differentiation of Human ES and iPS Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview[J]. *Circ Res*, 2012, 111(3): 344-358.
- [12] Elliott DA, Braam SR, Koutsis K, et al. Nkx2-5 (egfp/w) hescs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(12):1037-1040.
- [13] Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, et al. Stagespecific optimization of activin/nodal and bmp signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(2):228-240.
- [14] Fan W, Cheng K, Qin X, et al. mTORC1 and mTORC2 play different roles in the functional survival of transplanted adiposederived stromal cells in hind limb ischemic mice via regulating inflammation in vivo[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(1): 203-214.
- [15] Xinaris C, Morigi M, Benedetti V, et al. A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(3): 423-436.
- [16] Xie X, Sun A, Zhu W, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with hydrogen sulfide enhances repair of myocardial infarction in rats[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 226(1): 29-36.
- [17] Noiseux N, Borie M, Desnoyers A, et al. Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(11): 5361-5372.
- [18] Suzuki Y, Kim HW, Ashraf M, et al. Diazoxide potentiates mesenchymal stem cell survival via NF-kappaB-dependent miR-146a expression by targeting Fas[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(4): H1077-H1082.
- [19] Sun X, Fang B, Zhao X, et al. Preconditioning of mesenchymal stem cells by sevoflurane to improve their therapeutic potential. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90667.
- [20] Cao W, Guo XW, Chen K, et al. Inhibition of hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis by salvianolic acid in rat mesenchymal stem cells[J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(2): 222-228.
- [21] Silverberg D, Iaina A, Wexler D, et al. Iron repletion in heart failure patients[J]. *Hypertension*, 2011, 57(3): 381-382.
- [22] Feng Y, Huang W, Wani M, et al. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Meep2 via miR-22[J]. *PloS One*, 2014, 9(2):e88685.
- [23] Yin Q, Jin P, Liu X, et al. SDF-1a inhibits hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells through PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1):9-16.
- [24] Hou M, Liu J, Liu F, et al. C1q tumor necrosis factor-related protein-3 protects mesenchymal stem cells against hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis through the phosphoinositide[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(1): 97-104.
- [25] 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.
- [26] van der Spoel TI, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P, et al. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(4): 649-658.
- [27] Pei Z, Lan X, Cheng Z, et al. Multimodality molecular imaging to monitor transplanted stem cells for the treatment of ischemic heart disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90543.

(收稿:2014-04-03 修回:2014-08-01)

(本文编辑:梁英超)