

# 骨骼肌成肌细胞移植治疗急性心肌梗死的研究进展

刘 琦 孙晓薇 杜文娟

**【摘要】** 骨骼肌成肌细胞具有来源广泛、易于获得,自体移植不受供体来源限制,增殖能力及抗缺血、缺氧能力强大,易在梗死区内存活等多种优点,是干细胞治疗的重要来源。该文主要阐述骨骼肌成肌细胞移植治疗急性心肌梗死的研究进展。

**【关键词】** 骨骼肌成肌细胞;干细胞;移植;急性心肌梗死

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2015.02.005

通过干细胞移植修复梗死心肌来治疗急性心肌梗死是近年的研究热点。

心脏中有一定数量的心脏干细胞,但其再生能力极为有限,不足以替代心肌梗死导致的大量心肌细胞丧失,而且心脏干细胞难以分离、培养和分化,无法成为干细胞移植的主要细胞来源。合适的移植供体细胞应该满足如下特征:(1)不诱发肿瘤及心律失常;(2)可提高心脏功能;(3)形成可整合到受体心脏中的健康、有功能的心肌和脉管系统;(4)不产生免疫排斥反应;(5)符合伦理学要求<sup>[1]</sup>。目前对于应用哪种细胞作为供体尚存争议。

干细胞来源主要包括胚胎心肌细胞、胚胎干细胞和成体干细胞。尽管研究证实前两者可以分化为心肌样细胞,改善心肌梗死后心脏功能,但其移植受到免疫排斥反应和伦理因素的限制。成体干细胞主要包括骨髓干细胞和骨骼肌成肌细胞等。骨髓干细胞成分复杂,移植后细胞的分化和功能鉴定比较困难。骨骼肌成肌细胞来源广泛、易于获得、自体移植不受供体来源限制,可避免免疫排斥反应和伦理因素的限制。骨骼肌成肌细胞增殖能力及抗缺血、缺氧能力强大,易在梗死区内存活;体外培养阶段易于接受外源基因,是基因的优良载体;移植后不会分化为肿瘤细胞<sup>[2]</sup>。因此,骨骼肌成肌细胞是干细胞移植治疗心肌梗死的重要细胞来源之一。

## 1 临床研究进展

临床试验发现,接受骨骼肌成肌细胞心肌移植的患者左室射血分数明显升高,移植部位的瘢痕收

缩能力提高,梗死区面积减少,但部分患者出现持续的单一型室性心动过速<sup>[3]</sup>。有研究发现,移植骨骼肌成肌细胞后,梗死心肌中出现了有活力的区域,组织学分析证实在梗死区移植的细胞存活,有部分患者发生心房颤动、室性心动过速、心室颤动等不良事件,但大部分患者的心律失常在治疗后得到了有效控制<sup>[4]</sup>。上述试验证实,尽管部分移植后患者会发生心律失常,但骨骼肌成肌细胞移植治疗急性心肌梗死安全、可行。

然而,MAGIC 及 SEISMIC II a 研究发现,骨骼肌成肌细胞移植组与对照组患者相比,心功能没有明显的差异,并且在 MAGIC 试验中,移植组比安慰剂组的心律失常发生率高了 2 倍<sup>[5-6]</sup>。在 MAGIC II 期试验后,对存活患者进行的长期随访显示,尽管这些患者的左室功能没有明显改善,但是他们的左室舒张末期容积明显减少,且并未发现患者出现额外的心律失常事件<sup>[7]</sup>。临床试验结果相差较大,可能是由于目前细胞移植操作方式、移植细胞数量、移植时间等问题尚未统一。因此,研究优化骨骼肌成肌细胞移植的方法,制定合适的标准操作流程尤为重要。

## 2 优化细胞移植的基础研究进展

骨骼肌成肌细胞心肌移植成功受以下因素影响:是否移植到目标区域、存活时间、移植细胞分化为心肌细胞的能力及与周围微环境整合的能力。

### 2.1 增加缝隙连接蛋白表达

缝隙连接蛋白主要在未分化的骨骼肌成肌细胞中表达,当其分化成肌管后,这些蛋白表达减少,而在移植入心脏的骨骼肌成肌细胞中这些蛋白表达缺失。由于缺少与心肌细胞形成正常电-机械偶联的心脏特异蛋白——钙黏着蛋白(N-cadherin)和

缝隙连接蛋白 43 (connexin43, Cx43), 移植的骨骼肌成肌细胞不能与周围心肌细胞同步兴奋、收缩<sup>[8]</sup>。这可能导致移植后心律失常的发生。

Roell 等<sup>[9]</sup>使用转基因小鼠模型证实, 向心肌梗死瘢痕区移植过表达 Cx43 的骨骼肌成肌细胞能够避免梗死后心律失常的发生。Fernandes 等<sup>[10]</sup>也发现了上述现象。此外, 还可通过机械方法得到能与心肌细胞形成电偶联的骨骼肌成肌细胞。骨骼肌成肌细胞在分化为肌管的时候 Cx43 蛋白表达缺失。在缺氧条件下诱导骨骼肌成肌细胞分化为肌管, 并将分化成的肌管利用组织工程学整合, 得到的骨骼肌成肌细胞生存时间更长, 排列有序, 更易分化为能收缩的肌管, 并且此种肌管经被动的纵向抗拉力处理后, Cx43 保持表达甚至表达增高, 这说明机械负荷可以增加骨骼肌成肌细胞与心肌细胞之间的电偶联<sup>[11]</sup>。Zhang 等<sup>[12]</sup>的研究也证明, 机械力促进组织成形, 增加细胞外基质的固定及形成心脏肌肉组织结构。通过激活或者抑制某些信号通路也可使骨骼肌成肌细胞中缝隙连接蛋白表达增加, 明显减少移植后的心律失常。过表达 Cx43 的骨骼肌成肌细胞可能是治疗心肌梗死及心力衰竭的重要干细胞之一<sup>[13]</sup>。

## 2.2 调节生长因子表达

骨骼肌成肌细胞心脏移植后大量细胞因移植导致的炎症及梗死区域缺血而死亡。因此, 抑制炎症过程或改善梗死区血液供应可以提高移植细胞存活率。通过调节骨骼肌成肌细胞生长因子基因的表达, 以提高损伤心肌的血液循环, 可能会避免供体细胞的大量凋亡<sup>[14]</sup>。

研究发现, 过表达血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的骨骼肌成肌细胞移植后, 可诱导新生血管形成, 增加梗死区血管密度, 改善心功能; 同时可抑制移植细胞及损伤区域心肌细胞凋亡<sup>[15]</sup>。Tambara 等<sup>[16]</sup>对心肌梗死动物模型的研究发现, 通过增加成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 及肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 的释放, 可以改善骨骼肌成肌细胞心肌移植治疗效果, 使新生血管和移植细胞的存活率增加。因此, 调节生长因子表达, 促进梗死区毛细血管形成, 改善梗死区血液供应, 能够大大减少移植细胞的死亡, 提高治疗效果。

Mikhail 等<sup>[17]</sup>在骨骼肌成肌细胞中分别过表达类胰岛素样生长因子-1、VEGF、间质细胞衍生因子

(stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ )、HGF, 结果发现经过处理的骨骼肌成肌细胞中多种蛋白的表达增加, 包括基质金属蛋白酶、Cx43、低氧诱导因子-1、Wnt-3、促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、信号传导及转录激活因子 (Stat3)、核因子- $\kappa$ B (nuclear transcription factor, NF- $\kappa$ B)、蛋白激酶 C 等, 推测可能激活了多条信号通路。处理后的骨骼肌成肌细胞移植后可促进血管内皮细胞迁移, 有助于新生血管的形成, 并能募集体内多种来源的干细胞至梗死区, 缩小梗死面积, 改善心功能。这种处理后的骨骼肌成肌细胞不仅可以使移植细胞存活数量增加, 减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对心肌细胞的损伤, 更有利于损伤心肌的功能恢复。

## 2.3 增强移植细胞的存活能力

通过激活促进存活的信号通路, 抑制凋亡信号通路, 能有效提高供体细胞存活率。Nakamura、Hirai 等<sup>[18-19]</sup>研究发现, MyoD 基因缺失的骨骼肌成肌细胞对缺氧有较强的抵抗能力。抑制骨骼肌成肌细胞 MyoD 基因表达, 移植后细胞增殖速度快, 死亡减少, 小鼠左心室舒张期末及收缩期末容积减少, 射血分数增加。上述效应可能是通过上调 Pax3、Bcl-2、Bcl-xL 等抗凋亡基因实现的。

## 2.4 优化细胞移植途径

自体骨骼肌成肌细胞移植需要解决的另一个问题是移植细胞的数量以及移植时间。同时注射大量细胞存在大量细胞死亡以及组织过度肥大的风险。对猪模型的研究表明, 与单次大量骨骼肌成肌细胞移植相比, 反复多次移植可更有效地降低大量移植细胞死亡的风险, 更能改善心功能<sup>[20]</sup>。

利用组织工程使骨骼肌成肌细胞长成片状形态, 可解决细胞损失和移植区域受限的问题<sup>[21-23]</sup>。对犬、仓鼠、大鼠心力衰竭模型的研究显示, 与直接心肌注射相比, 自体骨骼肌成肌细胞片能更好地修复受损心肌, 抑制心室纤维化, 增加毛细血管密度, 改善心功能。

左室功能的改善可能与梗死区域弹性蛋白纤维的数量相关。Sekiya 等<sup>[24]</sup>在大鼠模型中证实, 骨骼肌成肌细胞的分层方法可减弱心肌梗死后的反向心肌重塑。将分层的骨骼肌成肌细胞植入受损区域后, 弹性纤维数量增加, 弹性蛋白的表达可能是移植治疗有效的关键因素。Uchinaka 等<sup>[25-26]</sup>研究发现, 在植入的骨骼肌成肌细胞中进行弹性蛋白基因修饰可改善心功能, 阻止组织重构。弹性蛋白

基因转染的骨骼肌成肌细胞片有改善心脏功能的长期效果,其治疗早期可分泌 HGF、VEGF、SDF-1 $\alpha$  等旁分泌生长因子,促进血管形成并抑制梗死区重构,晚期可在梗死区产生弹性蛋白纤维结构。还有研究证明,骨骼肌成肌细胞片移植技术大大减少了移植后心律失常的发生,提高了治疗效果<sup>[22]</sup>。一些研究者将促进 Cx43 和旁分泌因子表达、改善移植方式等多种移植优化方法结合,明显提高了治疗效果<sup>[27]</sup>。另外,可利用光学相干断层扫描技术实时评价细胞片的治疗效果<sup>[28]</sup>。

### 3 存在的问题

骨骼肌成肌细胞移植尚存在一些问题:(1)目前研究均表明骨骼肌成肌细胞不能分化成心肌细胞;(2)在梗死瘢痕中移植的骨骼肌成肌细胞不能与心肌细胞形成有效的电-机械偶联,导致室性心律失常的风险增高;(3)骨骼肌成肌细胞移植后早期大量死亡,存活率低。这些问题大大限制了骨骼肌成肌细胞移植的临床应用。

### 4 小结

对于急性心肌梗死患者,骨骼肌成肌细胞心肌移植是较有前景的治疗方法之一,但仍存在很多问题。未来的研究将聚焦于整合多种方法使骨骼肌成肌细胞移植效果最优化,从而为心肌梗死患者带来生命的希望。

### 参 考 文 献

- [1] Malliaras K, Marbán E. Cardiac cell therapy: where we've been, where we are, and where we should be headed [J]. Br Med Bull, 2011, 98: 161-185.
- [2] Menasché P. Skeletal myoblasts and cardiac repair[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(4): 545-553.
- [3] Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(7): 1078-1083.
- [4] Dib N, McCarthy P, Campbell A, et al. Feasibility and safety of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy [J]. Cell Transplant, 2005, 14(1): 11-19.
- [5] Menasché P, Alfieri O, Janssens S, et al. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation [J]. Circulation, 2008, 117(9): 1189-1200.
- [6] Duckers HJ, Houtgraaf J, Hehrlein C, et al. Final results of a phase II a, nfracted, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial[J]. EuroIntervention, 2011, 6(7): 805-812.
- [7] Brickwedel J, Gulbins H, Reichenspurner H. Long-term follow-up after autologous skeletal myoblast transplantation in ischaemic heart disease [J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2014, 18(1): 61-66.
- [8] Gandolfi F, Vanelli A, Pennarossa G, et al. Large animal models for cardiac stem cell therapies[J]. Theriogenology, 2011, 75(8): 1416-1425.
- [9] Roell W, Lewalter T, Sasse P, et al. Engraftment of connexin43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia [J]. Nature, 2007, 450(7171): 819-824.
- [10] Fernandes S, van Rijen HV, Forest V, et al. Cardiac cell therapy: overexpression of connexin43 in skeletal myoblasts and prevention of ventricular arrhythmias [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(9B): 3703-3712.
- [11] Perumal Srinivasan S, Neef K, Treskes P, et al. Enhanced gap junction expression in myoblast-containing engineered tissue[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(3): 462-468.
- [12] Zhang H, Landmann F, Zahreddine H, et al. A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis [J]. Nature, 2011, 471(7336): 99-103.
- [13] Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Cell-sheet therapy with omentopexy promotes arteriogenesis and improves coronary circulation physiology in failing heart[J]. Mol Ther, 2014, Nov 25. [Epub ahead of print]
- [14] Bialas M, Krupka M, Janeczek A, et al. Transient and stable transfections of mouse myoblasts with genes coding for proangiogenic factors [J]. J Physiol Pharmacol, 2011, 62(2): 219-228.
- [15] Zhu K, Guo C, Xia Y, et al. Transplantation of novel vascular endothelial growth factor gene delivery system manipulated skeletal myoblasts promote myocardial repair [J]. Int J Cardiol, 2013, 168(3): 2622-2631.
- [16] Tambara K, Tabata Y, Komeda M, et al. Factors related to the efficacy of skeletal muscle cell transplantation and future approaches with control-released cell growth factors and minimally invasive surgery[J]. Int J Cardiol, 2004, 95(1): 13-15.
- [17] Konoplyannikov M, Haider KH, Lai VK, et al. Activation of Diverse Signaling Pathways by Ex-Vivo Delivery of Multiple Cytokines for Myocardial Repair [J]. Stem Cells And Dev, 2013, 22(2): 204-215.
- [18] Nakamura Y, Asakura Y, Piras BA, et al. Increased angiogenesis and improved left ventricular function after transplantation of myoblasts lacking the MyoD gene into infarcted myocardium[J]. PloS One, 2012, 7(7): e41736.
- [19] Hirai H, Verma M, Watanabe S, et al. MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3[J]. J Cell Biol, 2010, 191(2): 347-365.

(下转 93 页)

- of dabigatran compared to warfarin in patients with paroxysmal, persistent, and permanent atrial fibrillation; results from the RE-LY (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy) study [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59(9):854-855.
- [11] Doggrel SA. Adherence to medicines in the older-aged with chronic conditions: does intervention by an allied health professional help? [J]. Drugs Aging, 2010, 27(3):239-254.
- [12] Chin PK, Vella-Brincat JW, Walker SL, et al. Dosing of dabigatran etexilate in relation to renal function and drug interactions at a tertiary hospital[J]. Intern Med J, 2013, 43(7):778-783.
- [13] Noble S, Goa KL. Ticlopidine. A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the prevention of cerebral ischaemia and stroke [J]. Drugs Aging, 1996, 8(3):214-232.
- [14] Bytzer P, Connolly SJ, Yang S, et al. Analysis of upper gastrointestinal adverse events among patients given dabigatran in the RE-LY trial [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013, 11(3):246-252.
- [15] Diener HC, Connolly SJ, Ezekowitz MD, et al. Dabigatran compared with warfarin in patients with atrial fibrillation and previous transient ischaemic attack or stroke: a subgroup analysis of the RE-LY trial[J]. Lancet Neurol, 2010, 9(12):1157-1163.
- [16] Huisman MV, Lip GY, Diener HC, et al. Dabigatran etexilate for stroke prevention in patients with atrial fibrillation; Resolving uncertainties in routine practice[J]. Thromb Haemost, 2012, 107(5):838-847.
- [17] Uchino K, Hernandez AV. Dabigatran association with higher risk of acute coronary events: meta-analysis of noninferiority randomized controlled trials[J]. Arch Intern Med, 2012, 172(5):397-402.
- [18] Stangier J, Stähle H, Rathgen K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the direct oral thrombin inhibitor dabigatran in healthy elderly subjects [J]. Clin Pharmacokinet, 2008, 47(1):47-59.
- [19] van Ryn J, Stangier J, Haertter S, et al. Dabigatran etexilate—a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity[J]. Thromb Haemost, 2010, 103(6):1116-1127.
- [20] Clemens A, van Ryn J, Sennewald R, et al. Switching from enoxaparin to dabigatran etexilate: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety profile [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2012, 68(5):607-616.
- [21] DeRemer CE, Gujral JS, Thornton JW, et al. Dabigatran falsely elevates point of care international normalized ratio results[J]. Am J Med, 2011, 124(9):e5-e6.
- [22] Pragst I, Zeitler SH, Doerr B, et al. Reversal of dabigatran anticoagulation by prothrombin complex concentrate (Beriplex P/N) in a rabbit model[J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(9):1841-1848.
- [23] Lee FM, Chan AK, Lau KK, et al. Reversal of new, factor-specific oral anticoagulants by rFVIIa, prothrombin complex concentrate and activated prothrombin complex concentrate: a review of animal and human studies[J]. Thromb Res. 2014, 133(5):705-713.

(收稿:2014-09-23 修回:2015-02-09)

(本文编辑:孙 雯)

(上接第 81 页)

- [20] Gavira JJ, Nasarre E, Abizanda G, et al. Repeated implantation of skeletal myoblast in a swine model of chronic myocardial infarction [J]. Eur Heart J, 2010, 31(8):1013-1021.
- [21] Narita T, Shintani Y, Ikebe C, et al. The use of cell-sheet technique eliminates arrhythmogenicity of skeletal myoblast-based therapy to the heart with enhanced therapeutic effects [J]. Int J Cardiol, 2013, 168(1):261-269.
- [22] Tadakuma K, Tanaka N, Haraguchi Y, et al. A device for the rapid transfer/transplantation of living cell sheets with the absence of cell damage [J]. Biomaterials, 2013, 34(36):9018-9025.
- [23] Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, et al. Transplantation of elastin-secreting myoblast sheets improves cardiac function in infarcted rat heart[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 368(1-2):203-214.
- [24] Sekiya N, Matsumiya G, Miyagawa S, et al. Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 138(4):985-993.
- [25] Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, et al. Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts [J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(1):102-110.
- [26] Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Cell-sheet Therapy with Omentopexy Promotes Arteriogenesis and Improves Coronary Circulation Physiology in Failing Heart [J]. Mol Ther, 2014, Nov 25. [Epub ahead of print]
- [27] Kolanowski TJ, Rozwadowska N, Malcher A, et al. In vitro and in vivo characteristics of connexin 43-modified human skeletal myoblasts as candidates for prospective stem cell therapy for the failing heart[J]. Int J Cardiol, 2014, 173(1):55-64.
- [28] Kobayashi M, Haraguchi Y, Shimizu T, et al. Real-time, noninvasive optical coherence tomography of cross-sectional living cell-sheets in vitro and in vivo[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2014, Oct 28. [Epub ahead of print]

(收稿:2014-10-23 修回:2014-01-27)

(本文编辑:梁英超)