

干细胞对心肌细胞再生影响的研究进展

段 宇 涂应锋

摘 要 骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)在体内或体外特定的诱导条件下,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝脏、心肌、内皮等多种组织细胞,连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能,可作为理想的种子细胞用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复。MSC 用于再生治疗已数十年,在心血管疾病治疗方面也初见成效。心血管疾病的动物模型和临床试验中,干细胞已经成为一种新型的治疗模式。不同来源的 MSC 可以转化为心肌细胞以及血管细胞。虽然 MSC 在心血管疾病的治疗中已取得一定成效,但是干细胞技术能否广泛应用于临床,仍有待于进一步研究。

关键词 间充质干细胞 心脏再生 归巢作用 细胞治疗

中图分类号 R543

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.002

心血管疾病是一种严重威胁人类健康的常见病,具有高发生率、高致残率和高病死率的特点,即使应用目前最先进、完善的治疗手段,仍可有 50% 以上的心血管意外幸存者生活不能完全自理,全世界每年死于心血管疾病的人数高达 1500 万人,居各种死因首位^[1]。在低等脊椎动物中(如热带鱼等),他们的心肌具备一定的再生能力,然而成年哺乳动物的心肌细胞,不具备天然的再生能力,因此我们针对心肌细胞的再生和修复进行了一些研究^[2]。在 21 世纪初期的干细胞临床试验中, MSC 已可以用于治疗某些心血管疾病,包括心力衰竭、肺动脉高压、心肌梗死等。目前的心脏再生研究主要是针对心肌梗死后心肌细胞再生的某些通路,通过激活内源性再生机制,以非心肌组织作为一个有效的再生的环境,诱导心肌再生,进而治疗该疾病^[2]。该综述针对 MCS 治疗心肌细胞再生的一些新进展进行总结。

一、骨髓间充质干细胞的来源与分化

成年哺乳动物的间充质干细胞主要来源于骨髓。干细胞(stem cell, SC)具有分化功能,在特定条件下转变成为一种或多种组织或器官的细胞。干细胞根据其来源可分为两种类型:胚胎干细胞和非胚胎干细胞,胚胎干细胞能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型;非胚胎干细胞分为两种类型,造血干细胞以及少量的 MSC。间充质干细胞可根据其潜能,进一步

分化成不同的细胞类型,包括全能性干细胞、多能性干细胞和多向分化性干细胞。所有的干细胞都具有三个共同的特征,即自我更新能力,不对称分裂以及不可逆转的分化过程。

二、骨髓间质干细胞的特点及作用机制

1. MSC 的生物学特点:间充质干细胞是一种多能干细胞,在一定条件下,可以分化为中胚层细胞(脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌成细胞)。人们利用 MSC 的这种分化功能,临床上用于解决心血管疾病、血液系统疾病、肝硬化、神经系统疾病、自身免疫性疾病、膝关节半月板部分切除损伤修复等,并且取得了重大突破。在器官移植方面,骨髓间充质干细胞具有一定的免疫调节作用,通过抑制 B 细胞和 T 细胞的增殖,进而阻碍树突状细胞和 NK 细胞趋化作用,促进移植物存活;但是也有一些文献表明,骨髓间充质干细胞具有免疫原性,可激活 T 细胞对移植的 MSCs 产生免疫效应,继而引发排斥反应^[3]。近期研究发现,人类的 MSC 在基因表型以及生理学上的特点类似于人类心脏成纤维细胞^[4]。动物实验和临床应用研究均发现 MSC 对骨或软骨损伤、心脏疾病、中枢神经系统损伤、肝损伤,脊髓损伤等许多方面具有一定突破。根据国际细胞疗法学会组织干细胞委员会, MSC 干细胞分类的基本标准包括以下 3 个主要功能:①在基本培养条件下,细胞必须具有黏附性;②该细胞表达 CD73、CD90 和 CD105,而缺乏对 CD11b、CD19、CD79 α 、CD14、CD34、CD45 和白细胞表面抗原(HLA-DR)的表达;③体外培养的细胞必须能够分化为脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞及肌成细胞。

2. MSC 的作用机制:现阶段 MSC 在缺氧环境中

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81401457);
中国博士后基金资助项目(第 9 批)(2016T90313)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院心内科

通讯作者:涂应锋,电子邮箱:tyfdoctor@163.com

的作用备受关注,低氧(即 O_2 水平低于 8% ~ 9%)环境可以导致心肌细胞的损伤和凋亡,间充质干细胞经过缺氧预处理,转化为心肌细胞后,在低氧环境下的病死率降低,促存活基因蛋白激酶 B (Akt 基因)过表达时,可阻断细胞的凋亡并继而促进细胞的存活,从而降低低氧环境下心肌细胞的病死率^[5]。低氧刺激可以将低氧诱导因子(HIF-1 α)转移至间充质干细胞中,从而提高间充质干细胞的增殖率和分化率^[6]。此外,E1A 刺激基因(CREG)的抑制剂也通过降解 HIF-1 α 的阻遏蛋白来激活 HIF-1 α 。该过程进一步影响旁分泌信号,上调血管生成因子的表达,包括血管内皮生长因子(VEGF),基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α),肝细胞生长因子(HGF)和 IL-6 等^[7-9]。当心肌梗死发生时,CREG 也导致梗死后纤维组织的减少和心肌细胞的增殖^[5]。

间充质干细胞在缺氧条件下能够释放胞外囊泡(EVs),EVs 通过传递促血管生成因子(例如 VEGF、bFGF、PDGF 等)和基质金属蛋白酶(MMP9、MMP2),导致新生血管的形成和心脏功能的增强^[10]。在动物实验中,当人类间充质干细胞转导至大鼠的心脏时,人类组织激肽释放酶(TK)基因与内皮细胞受体结合,通过释放 NO 及前列环素(PGI₂),发挥扩血管及抗增殖效应,保护心脏内储存的高能磷酸物,增加对糖的摄取和利用来拮抗血管紧张素 II,从而使心血管内环境得到稳定^[11]。在缺血或缺氧条件下,曲美他嗪(TMZ)和中期因子(midkine, MK)也可以保护细胞的能量代谢,防止细胞内 ATP 的下降,保护了离子泵的正常运作,维持内环境的稳定,从而对心脏产生保护作用^[12]。胱天蛋白酶(caspases,又称半胱天冬酶)是半胱氨酸蛋白酶的统称,其参与细胞发育、炎症等生理过程;在大鼠心肌梗死模型中,microRNA 中 Let7b 转染的 MSCs 可靶向促进胱天蛋白酶-3 表达,上调原始存活基因,包括 p-ERK、Bcl-2 和 p-MEK 等,继而提高使左心室射血分数(LVEF)^[13]。间充质干细胞可上调 VEGF 的表达和提高半胱天冬酶-3 活性,从而导致抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平升高^[11]。总而言之,间充质干细胞可促进新血管形成和心脏功能的恢复。

三、骨髓间充质干细胞在心脏再生治疗的应用

1. 骨髓间充质干细胞的归巢作用:心肌梗死后骨髓间充质干细胞的移植研究表明,MSC 细胞可通过细胞外基质(ECM)转运至损伤组织,对心脏功能有显著的修复作用^[14]。为了解 MSC 渗透到受损的心

脏组织的一般机制,一些研究已经证明了凋亡性心肌细胞产生肝细胞生长因子(HGF),而坏死性心肌细胞不具备这一功能。MSCs 通过 HGF 的受体 MET 激活了广泛的信号通路迁移至凋亡细胞^[15]。此外,这项研究还发现,血小板通过高迁移率族蛋白 box-1(HMGB1)的相互作用迁移至凋亡细胞中去。当激活血小板时,MSC 中的 HMGB1/核蛋白(TLR-4)使 MET 下调,从而抑制细胞的募集,因此,可以应用基因敲除的方法去除 TLR-4,从而提高 MSC 的疗效^[15]。

在心肌受损的情况下,基质细胞衍生因子-1(SDF-1)会介导内源性 MSCs 归巢^[16]。虽然尚未发现趋化因子受体 CXCR4 在 MSC 表面上大量表达,但约 80% ~ 90% 的 MSC 在受体的细胞内存在。在 mR-NA 核转染过表达后,受体通过其配体 SDF-1 α 刺激 Ca^{2+} 信号转导^[17]。SDF-1 作为器官损伤部位的 CD34⁺ 祖细胞募集剂而起作用^[18]。在扩张型心肌病(DCM)中,也已建立单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)作为 MSC 的归巢因子^[19]。MCP-1 可诱导表达于单核细胞、内皮细胞及平滑肌细胞,能够诱导内皮细胞和平滑肌细胞增殖分裂,还可诱导单核细胞浸润。然而,MSC 是否导致分化、旁分泌作用或自身分化成心肌细胞的作用仍无研究证明^[19]。MSC 的多次体外和体内研究中证明,MSC 可以募集到受损组织的位置进行修复以发挥保护特性。MSCs 通过转分化或诱导再生过程发生的旁分泌作用下分化为有功能心肌细胞^[20]。

2. 骨髓间充质干细胞的旁分泌作用:骨髓间充质干细胞的分泌功能,在治疗心肌细胞再生中也起到了非常重要的作用。据研究发现,促红细胞生成素作为旁分泌因子,可以使 MSC 通过 ERK1/2 信号通路影响线粒体膜电位(MMP)的表达。研究发现,在大鼠心梗模型中,将转染有 MMP-3(TIMP3)和 VEGF 组织抑制剂的 MSC 移植到梗死区,发现 MSC 对其具有血管生成能力^[21]。在心肌梗死区,由于其低氧的环境,使得 MSC 分泌细胞因子,如 VEGF、HGF、IL-6 等细胞因子及生长因子。进而发现,将 MSC 注射致心肌梗死区,可促使心肌细胞毛细血管生长,梗死区缩小,提高心脏功能,证实干细胞通过旁分泌细胞,使心脏细胞得到恢复。这些细胞因子既可以将 MSC 向心肌细胞分化,又可使周围的内源性心肌细胞共同参与损伤的修复。还有研究发现,经注射 MSC 后,还明显增加肺血管壁面积,使 VEGF 及血管性假血友病因子(vWF)抗体增加显著,这表明 MSC 也可生成肺血管

内皮细胞,导致右心室收缩压(RVSP)、右心室内压(MRVP)、肺动脉平均压(MPAP)降低,从而使肺的循环血供及右心室肥大得到改善,降低肺动脉高压,改善右心衰竭。

四、干细胞治疗面临的挑战

干细胞在治疗心脏再生方面所面临的挑战,首先表现在干细胞的分离、体外扩增的频率;其次是干细胞的稳定性,要确保获取的细胞数量能够满足临床的治疗要求;再者是干细胞的可控性,包括传代细胞核型检测、治疗过程中可操控性及治疗后的监控等;最后是干细胞缺乏伦理性和致畸性的特点。这些问题在现阶段的研究中未得到完全的解决,只有解决这几方面的问题,干细胞才能更广泛的推广和应用。

五、展望

干细胞治疗心肌细胞再生,在近十几年来发展迅速。采用细胞疗法作为治疗心脏疾病,不论是动物实验还是临床试验都取得了喜人的结果,如CAD的新型治疗策略和严重心力衰竭的治疗。然而,这些细胞疗法虽然取得了在安全性和有效性方面的进步,但在该领域中,功能改善方面的平均成功率还是令人失望的。因此,笔者将重点放在再生医学领域,通过进一步调查MSC的来源,使这些具有“真正”修复潜力的细胞来治疗更多疾病。

参考文献

- 1 Doppler SA, Deutsch MA, Lange R, Krane M. Cardiac regeneration: current therapies – future concepts[J]. J Thorac Dis, 2013,5:683 – 697
- 2 Choi WY, Poss KD. Cardiac regeneration[J]. Curr Top Dev Biol, 2012,100:319 – 344
- 3 Hoogduijn MJ, Roemeling – van Rhijn M, Engela AU, *et al.* Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion[J]. Stem Cells Dev, 2013,22:2825 – 2835
- 4 Ngo MA, Muller A, Li Y, *et al.* Human mesenchymal stem cells express a myofibroblastic phenotype in vitro: comparison to human cardiac myofibroblasts[J]. Mol Cell Biochem, 2014,392:187 – 204
- 5 Udartseva OO, Andreeva ER, Buravkova LBI. WNT – associated gene expression in human mesenchymal stromal cells under hypoxic stress [J]. Dokl Biochem Biophys, 2015,465:354 – 357
- 6 Cerrada I, Ruiz – Sauri A, Carrero R, *et al.* Hypoxia – inducible factor 1 alpha contributes to cardiac healing in mesenchymal stem cells – mediated cardiac repair[J]. Stem Cells Dev, 2013,22:501 – 511
- 7 Kim SH, Moon HH, Kim HA, *et al.* Hypoxia – inducible vascular endothelial growth factor – engineered mesenchymal stem cells prevent myocardial ischemic injury[J]. Mol Ther, 2011,19:741 – 750
- 8 Huang B, Qian J, Ma J, *et al.* Myocardial transfection of hypoxia – inducible factor – 1alpha and co – transplantation of mesenchymal stem cells enhance cardiac repair in rats with experimental myocardial

- infarction[J]. Stem Cell Res Ther, 2014,5:22
- 9 Sullivan KE, Quinn KP, Tang KM, *et al.* Extracellular matrix remodeling following myocardial infarction influences the therapeutic potential of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2014,5:14
- 10 Bian S, Zhang L, Duan L, *et al.* Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model[J]. J Mol Med (Berl), 2014,92:387 – 397
- 11 Gao L, Bledsoe G, Yin H, *et al.* Tissue kallikrein – modified mesenchymal stem cells provide enhanced protection against ischemic cardiac injury after myocardial infarction[J]. Circ J, 2013,77:2134 – 2144
- 12 Zhao SL, Zhang YJ, Li MH, *et al.* Mesenchymal stem cells with overexpression of midkine enhance cell survival and attenuate cardiac dysfunction in a rat model of myocardial infarction[J]. Stem Cell Res Ther, 2014,5:37
- 13 Ham O, Lee SY, Lee CY, *et al.* let – 7b suppresses apoptosis and autophagy of human mesenchymal stem cells transplanted into ischemia/reperfusion injured heart 7by targeting caspase – 3[J]. Stem Cell Res Ther, 2015,6:147
- 14 Shi B, Liu ZJ, Zhao RZ, *et al.* Effect of mesenchymal stem cells on cardiac function and restenosis of injured artery after myocardial infarction[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2011,91:2269 – 2273
- 15 Vogel S, Chatterjee M, Metzger K, *et al.* Activated platelets interfere with recruitment of mesenchymal stem cells to apoptotic cardiac cells via high mobility group box 1/Toll – like receptor 4 – mediated down – regulation of hepatocyte growth factor receptor MET[J]. J Biol Chem. 2014,289,11068 – 11082
- 16 Zamani M, Prabhakaran MP, Thian ES, Ramakrishna S. Controlled delivery of stromal derived factor – 1alpha from poly lactic – co – glycolic acid core – shell particles to recruit mesenchymal stem cells for cardiac regeneration[J]. J Colloid Interface Sci, 2015,451:144 – 152
- 17 Wiehe JM, Kaya Z, Homann JM, *et al.* GMP – adapted overexpression of CXCR4 in human mesenchymal stem cells for cardiac repair [J]. Int J Cardiol, 2012,167:2073 – 2081
- 18 Lau TT, Wang DA. Stromal cell – derived factor – 1 (SDF – 1): homing factor for engineered regenerative medicine[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011,11:189 – 197
- 19 Guo J, Zhang H, Xiao J, *et al.* Monocyte chemotactic protein – 1 promotes the myocardial homing of mesenchymal stem cells in dilated cardiomyopathy[J]. Int J Mol Sci, 2013,14:8164 – 8178
- 20 Wang T, Sun S, Wan Z, *et al.* Effects of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction[J]. Resuscitation, 2012,83:1391 – 1396
- 21 Yao J, Jiang SL, Liu W, *et al.* Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase – 3 or vascular endothelial growth factor transfection of aged human mesenchymal stem cells enhances cell therapy after myocardial infarction[J]. Rejuvenation Res, 2012,15:495 – 506

(收稿日期:2017 – 08 – 16)

(修回日期:2017 – 09 – 04)