

骨髓间质干细胞与心肌重建研究进展

夏思良 综述, 王建安 审校

(浙江大学医学院 附属邵逸夫医院心内科, 浙江 杭州 310016)

[摘 要] 心肌细胞的死亡是不可逆的, 坏死心肌的修复是科研工作者和临床医生面临的严峻挑战。骨髓间质干细胞移植替代受损心肌用于心肌重建, 具有来源充足、细胞培养成活率高、骨髓穿刺操作简单安全、自体无免疫排斥等优点。作者介绍了骨髓间质干细胞的来源以及体、内外向心肌细胞定向诱导分化的实验研究。讨论了骨髓间质干细胞向心肌细胞分化的可能机制, 还简要分析了骨髓间质干细胞用于心肌重建的临床可行性, 并提出了许多目前亟待研究和解决的问题。

[关键词] 骨髓细胞; 干细胞/细胞学; 骨髓间质干细胞; 移植; 心肌细胞

[中图分类号] R 457.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2004)06-0556-05

心肌细胞不可逆性的死亡和纤维瘢痕组织增生, 是心血管患者心功能进行性恶化甚至引起死亡的重要原因。坏死心肌的修复一直是科研工作者和临床医生面临的严峻挑战。尽管近 20 年来在介入治疗、手术治疗领域取得了可喜的进展, 但心血管疾病仍是发病率、死亡率居先的全球性疾病。心脏移植虽能取代受损心肌, 但供体来源困难, 手术技能要求高, 费用昂贵, 难以在临床推广。自体心肌细胞^[1~3]移植替代治疗用于心肌重建因存在自体心肌细胞培养棘手, 获得的心肌细胞数量有限, 移植后存活率低等问题而只能取得有限的成果。自体平滑肌细胞^[4]和骨骼肌细胞移植^[5]后因他们与周边宿主细胞未能建立紧密联系和缝隙连接, 不太可能存在有效的收缩功能。目前的研究表明干细胞具有可塑性, 这为心肌重建提供了可能性, 特别是胚胎干细胞^[6,7](embryonic stem cells, ESC)、骨骼肌生肌干细胞^[8,9](skeletal myoblast cells, SMC)及骨髓干细胞倍受瞩目。ESC 因取材、伦理道德等问题限制了其在临床的应用, 而 SMC 用于心肌重建已从动物实验进入临床^[10~12]。近年来, 新兴的骨髓干细胞, 尤其是骨髓间质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 移植替代受损心肌用于心肌重建^[13], 因其具有来源充足、细胞培养成活率高和骨髓穿刺操作简单安全及自体 MSCs 无免疫排斥等优点, 已为国内外众多研究者所关注。下面就这一

领域中有关 MSCs 的来源、MSCs 向心肌细胞的定向诱导分化、MSCs 用于心肌重建的临床可行性等的研究进展作一综述。

1 MSCs 的来源

1.1 体外分离培养 目前, 用于分离 MSCs 的方法主要有 3 种: 贴壁筛选法^[14~16]、密度梯度离心法^[17,18]和流式细胞仪分离法^[19]。贴壁筛选法提出最早, 也是大多数研究者所采用的方法, 这种方法根据 MSCs 贴壁生长的特性对其分离, 通过连续换液将悬浮的造血细胞筛除。密度梯度离心法是根据 MSCs 与其它细胞的密度不同, 用细胞分离液将其分离出来。流式细胞仪分离法是根据 MSCs 细胞体积小, 相对缺少颗粒的特征进行分选。为进一步提高分离效率可将贴壁筛选法和密度梯度离心法两种方法结合起来。将经骨髓穿刺术获得的骨髓, 用 Percoll 或 Ficoll 密度梯度离心主要得到两种类型的干细胞: 间质干细胞和造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSCs)。MSCs 呈梭形, 能紧紧吸附于培养瓶壁, 并在合适的培养基中生长。HSCs 呈圆形, 不贴壁, 在更换培养基

收稿日期: 2003-07-10 修回日期: 2003-09-30

作者简介: 夏思良 (1970—), 男, 硕士研究生, 从事心血管病研究。

通讯作者: 王建安 (1961—), 男, 教授, 博士生导师, 从事心血管病研究。

时易被冲洗掉。体外进行细胞培养 7 d 后,培养瓶中剩余的几乎全为梭形的 MSCs。这是获得骨髓间质干细胞的主要来源。

1.2 自身骨髓动员 MSCs 主要存在于骨髓,大约 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 骨髓单核细胞中有一个 MSCs。采用干细胞动员剂使骨髓中的间质干细胞进入外周循环,并迁移到心肌损伤处增殖分化为心肌细胞来修复坏死心肌。这也是心肌重建时骨髓间质干细胞比较理想的来源。同体外分离培养方法相比,操作更简单,更易于接受。但间质干细胞的数量可能不如体外分离培养法多,直接影响间质干细胞分化为心肌细胞的转换率。Orlic^[20]等用 SCF50 $\mu\text{g/kg}$ 、G-CSF 200 $\mu\text{g/kg}$ 皮下注射,冠脉结扎术前 5 d,术后 3 d 或更多,来动员骨髓细胞(bone marrow cell, BMC)修复实验性小鼠心肌梗塞,术后 6 d 与 9 d 提前死亡的 4 只小鼠的心肌梗塞区域可见新生心肌,27 d 后发现梗塞区域有 15×10^6 心肌细胞形成,占梗塞区域(76 ± 11)%,并见新生的小动脉($15 \pm 5/\text{mm}^3$)和毛细血管($348 \pm 82/\text{mm}^3$),结果梗塞面积从 64% 减少到 39%,心室腔扩张减少 26%,病死率下降 68%,EF 值增加和血液动力学改善。

2 MSCs 向心肌细胞的定向诱导分化

2.1 体外诱导分化 MSCs 同其它干细胞一样,也是一种多能干细胞,具有自我更新和多向分化潜能,目前已成功向骨、软骨、肌腱、脂肪、神经等组织诱导分化。MSCs 同样在体外也可向心肌方向诱导分化。1999 年,Makino^[21]等体外用 5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-aza)处理从小鼠股骨中获得的骨髓基质细胞,结果大约 30% 的 BMC 分化为类心肌细胞,表现为成纤维细胞样的形态和特征:①1 周后分化细胞与相邻细胞连接,形成肌管样结构,2 周后出现自主性搏动,3 周后可见同步起搏;②分化细胞表达出心肌特异性基因,包括心房利钠肽(ANP)、脑利钠肽(BNP)、 α -肌凝蛋白重链(α -MHC)、 β -肌凝蛋白重链(β -MHC)、 α -心肌肌动蛋白、MEF_{2A}、MEF_{2D}等;③电镜检查发现类心肌细胞样的结构:特征性肌节、中心核、心房颗粒;④分化的 BMC 出现几种类型的动作电位:

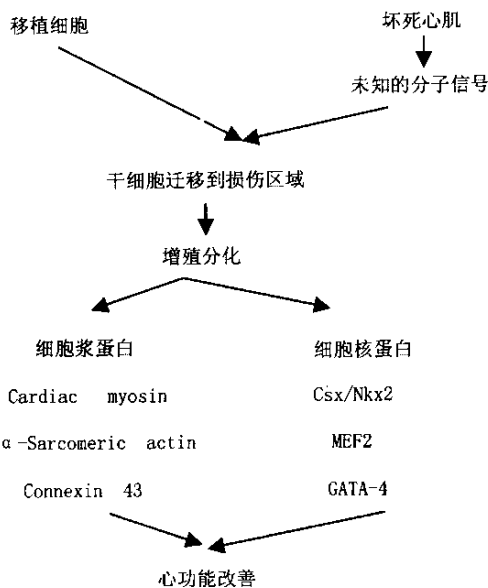
类窦房结动作电位和类心室动作电位。同年, Tomita^[18]等将大鼠的 BMC 在体外分为 3 组:经转移生长因子 β_1 (TGF β_1)作用的 BMC 组、胰岛素(Insulin)作用的 BMC 组、5-aza 作用的 BMC 组,用溴化脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记 MSCs。结果只有 5-aza 作用的 BMC 在培养第 10 d 分化形成肌管,出现多核,培养第 21 d,肌钙蛋白 I(TnI)染色、肌凝蛋白重链(MHC)染色阳性,而 TGF β_1 、Insulin 组无肌管形成,TnI、MHC 染色阴性。并对不同浓度的 5-aza 处理的 BMC 进行筛选,20 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理的 BMC 大于 50% 的细胞坏死,小于 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理的 BMC 形态学与正常组织相似,从而得出最佳的 5-aza 刺激分化的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。最近,Fukuda^[22]研究了 MSCs 经 5-aza 诱导分化后类心肌细胞的分子特征:①2 周后出现自主性搏动,3 周后可见同步起搏,亦可显示类窦房结动作电位和类心室动作电位;②分化细胞可表达 MEF_{2A} 和 MEF_{2D};③诱导分化后细胞 β_1 、 β_2 肾上腺素能受体和 M1、M2 毒蕈碱受体 mRNA 表达阳性,去氧肾上腺素可诱导 ERK1/2 的磷酸化,哌唑嗪抑制磷酸化;④异丙肾上腺素可增加分化细胞 cAMP 水平 38 倍,跳动频率、细胞运动、缩短速度及收缩速度增加分别为 48%、38%、27%、和 51%,这些增加指标可被 CGP20712A(β_1 肾上腺素能受体选择性阻滞剂)阻断;⑤氯化氨甲酰胆碱可增加三磷酸肌醇(IP3)32 倍,IP3 增加被 AFDX116(M2 选择性阻滞剂)抑制。

总之, MSCs 在体外能够被诱导剂 5-aza 定向诱导分化为类心肌细胞,并且最佳的 5-aza 刺激分化的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。5-aza 如何诱导 BMC 分化为类心肌细胞,到目前为止,其确切的机制还不清楚。Kenieczny^[23]等提出,鼠胚胎细胞包含了心肌细胞起源基因,在甲基化阶段以转录非活性的形式存在,当类心肌基因甲基化后变可转录,恢复活性,5-aza 可能促进甲基化过程。

2.2 体内移植分化 MSCs 移植于损伤心肌组织,可分化为类心肌细胞以修复受损的心脏,从而改善心功能。许多动物实验证实了这一点。Tomita^[18]等将新鲜的 BMC、培养扩增后的

BMC、5-aza 诱导分化的 BMC 这 3 种 BMC 分别移植于液氮冷冻的大鼠心肌梗塞模型,8 周后心功能测定发现只有 5-aza 处理的 BMC 移植组峰收缩压和发展压较另 2 组高 ($P < 0.05$)。移植后 5 周 Brdu 标记的移植细胞在 3 组均分化为类心肌细胞, TnI 染色阳性, 而对照组阴性。3 组 BMC 移植后毛细血管数(分别为: 6.29 ± 0.58 、 5.93 ± 0.33 、 5.74 ± 0.57 血管数/ 0.2 mm^2)比对照组高(2.12 ± 0.38 血管数/ 0.2 mm^2), 而且移植区域淋巴细胞浸润和免疫排斥反应不明显, 也无骨、软骨、脂肪组织形成。Orlic 等^[24]用 Lin-Kit^{POS}的骨髓细胞($1.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 细胞数)移植于冠脉结扎的大鼠心肌梗塞的边缘, 9 d 后 68% 的梗塞区域形成新的心肌细胞, 这些分化的心肌细胞均能表达 MEF₂ 和 TAGA₄, 但只有 $(40 \pm 9)\%$ 表达 Csx/Nkx2.5, 细胞浆 Connexin43 也很明显。移植组同非移植组心功能比较, LVEDP 低 36%, LVDP、LV + dp/dt、LV-dp/dt 分别高 32%、40%、41%。Wang 等^[15]将体外分离培养扩增的大鼠骨髓基质细胞(细胞数: 1×10^6), 用 DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) 标记, 心肌内注射移植, 4 周后移植细胞在心肌环境下表现出生长能力, 部分 DAPI 标记的细胞整合到宿主心肌细胞; 6 周后移植细胞 MHC 染色阳性, Connexin43 染色阳性。Shake^[25]的动物试验亦表明: MSCs 也能够移植存活在宿主心肌细胞上, 表达出心肌特异性蛋白, 减弱了梗塞后左室壁病理性变薄和收缩功能不全 ($5.4\% \pm 2.2\%$ versus $3.37\% \pm 2.7\%$); MSCs 成心肌细胞性说明, 其在减轻心肌梗塞相关性病理过程中有重要的临床应用潜能。最近, Mangi 等^[26]研究表明, MSCs 转导 Akt1 基因后移植比转导 LacZ 基因后移植多增加 4 倍的心肌细胞数量。人 MSCs 移植在动物心肌上能够存活分化为心肌细胞, 说明 MSCs 向临床心肌重建应用迈出了一大步^[27]。

移植的 MSCs 能够在损伤心肌存活、增殖、分化的机制, 以及分化的信号调控途径方面, 目前还不太清楚。Orlic^[18]认为干细胞迁移、分化、增殖的信号来自心室壁坏死区的损伤心肌, 并提出如下的心肌再生可能机制:



Wang 等^[15]提出“环境依赖性分化”(milieu-dependent differentiation)的观点, 认为生长因子、细胞因子、细胞外基质等以及它们在干细胞/宿主细胞之间的相互作用, 在诱导 MSCs 向心肌分化方面起着重要作用。Kenneth 等^[28]亦认为: 特异性微环境支持了移植 MSCs 的存活和分化, 但刺激 MSCs 增殖、分化的信号是不知道的。从体外高效分化所需的不同条件分析, MSCs 的分化受基础营养、细胞密度、空间组织、机械力量、生长因子、细胞因子等诸多因素影响^[29]。尽管 MSCs 向心肌分化的具体机制不清楚, 但一致倾向认为: 组织损伤和高水平的多能细胞是其分化的两个重要的决定因素。MSCs 向心肌分化的具体信号转导和调控机制是今后的研究的重点。

3 MSCs 用于心肌重建的临床可行性

2001 年, Strauer 等^[30]开创了首例人类骨髓干细胞移植心肌重建术, 对一急性心肌梗塞患者进行自身骨髓干细胞移植。这是冠脉前降支闭塞的患者, 于梗塞后 6 d, 将 10^7 个骨髓单核细胞移植到相关闭塞动脉, 用铊²⁰¹SPECT 于移植前及术后 10 d 检测左心室功能、梗塞面积、心室容积及心肌灌注指标, 并结合多巴酚丁胺试验, 以及超声、右心导管测定与放射性核素心室造影检查, 发现干细胞移植后 10 周, 左心

室周长缩小,射血分数、心脏指数、心输出量均升高,运动时左室舒张末期容积和左室充盈压下降。最近,国外部分学者进行了自体骨髓干细胞移植治疗急性心肌梗死的临床研究,产生了较好的效果^[31,32]。以上结果表明,在临床上,对心肌梗塞患者行骨髓干细胞移植是可行的,它能明显改善心功能。骨髓干细胞移植对心肌重建及改善心脏功能具有十分重要的作用,必将成为临床医师治疗相关心血管疾病的一种新的手段。

4 问题及展望

近年来,在多学科人员的努力下,同造血干细胞和胚胎干细胞一样,MSCs的研究取得了长足的进展,对其生物学特征和分化潜能有了更进一步的认识。MSCs在心肌重建术方面也取得了可喜的进步,为临床医师治疗相关心血管疾病提供了一种新的手段。但由于目前绝大多数研究处于实验阶段,临床治疗刚刚起步,仍有许多问题亟待研究和解决:①合适的移植细胞数: $1.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$? 1×10^6 ?②合适的移植途径:心肌内注射?冠脉内注射?外周静脉注射?③合适的心肌环境:生长因子?细胞因子?机械压力?④合适的移植时间:心肌梗死后即刻?2周?4周?⑤向心肌分化的信号分子和调控途径如何?⑥临床治疗的可行性、安全性、有效性如何?等等。这些问题亦是今后研究的方向和热点。随着上述相关问题的解决和干细胞技术的发展,以前一直严重困扰人们的心肌衰竭问题也有望得到解决。MSCs无论它的来源和分离方法,以及在分化的组织类型上都有其独特的优势。MSCs与组织工程、基因工程相结合,利用其多向分化潜能,将在细胞移植治疗以及基因治疗中展现出美好的前景。

References:

- [1] SAKAI T, LI R K, WEISEL R D, et al. Autologous heart cell transplantation improves heart function after myocardial injury [J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68: 2074—2080.
- [2] LI R K, WEISEL R D, MICKLE D A, et al. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction [J]. *J Thorac Cardiovas Surg*, 2000, 119: 62—68.
- [3] SAKAKIBARA Y, TAMBARA K, LU F, et al.

Cardiomyocyte transplantation does not reverse cardiac remodeling in rats with chronic myocardial infarction [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74(1): 25—30.

- [4] YOO K J, LI R K, WEISEL R D, et al. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70: 859—865.
- [5] SUZUKI K, MURTUZA B, HESLOP L, et al. Single fibers of skeletal muscle as a novel graft for cell transplantation to the heart [J]. *J Thorac Cardiovas Surg*, 2002, 123(5): 984—992.
- [6] KLUG M G, SOONPAA M H, KOH G Y, et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiation embryonic stem cells form stable intracardiac grafts [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98: 216—224.
- [7] MIN J Y, YANG Y K, CONRERSO, K L, et al. Transplantation of embryonic stem cells improve cardiac function in postinfarcted rats [J]. *J Appl Physiol*, 2001, 92(1): 288—296.
- [8] DIB N, DIETRICH E B, CAMPBELL A, et al. Endoventricular transplantation of allogenic skeletal myoblasts in a porcine model of myocardial infarction [J]. *J Endovasc Ther*, 2002, 9(3): 313—319.
- [9] CHAZAUD B, HITTINGER L, SONNET C, et al. Endoventricular porcine autologous myoblast transplantation can be successfully achieved with minor mechanical cell damage [J]. *Cardiovas Res*, 2003, 58(2): 444—450.
- [10] MENASCHE P, HAGEGE A A, VILQUIN J T, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(7): 1078—1083.
- [11] PAGANI F D, DERSIMONIAN H, ZAWADZKA A, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans, Histological analysis of cell survival and differentiation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(5): 879—888.
- [12] HAGEGE A A, CARRION C, MENASCHE P, et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy [J]. *Lancet*, 2003, 361(9356): 491—492.
- [13] FAN You-qi (樊友启). Progress and actuality of cell transplanlation as therapy for cardiovascular disease [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报:医学版), 2002, 31(5): 396—400. (in Chinese)
- [14] WAKITANI S, SAITO, CAPLAN A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine [J]. *Muscle Nerve*, 1996, 18: 1417—1426.

[15] WANG J S, DOMINIQUE S T, GALIPEAU J, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty : feasibility and potential clinical advantages [J]. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 2000, (120): 999—1006.

[16] CEN Hang-hui, HAN Chun-mao, LAI Ping-ping, et al (岑航辉, 韩春茂, 赖平平, 等). Isolation, culturation and adipogenesis committed differentiation of adult human mesenchymal stem cell [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences** (浙江大学学报: 医学版), 2003, 32(2): 137—140. (in Chinese)

[17] FORTIER L A, NIXON A J, WILLIAMS J, et al. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone-marrow -derived mesenchymal stem cells [J]. **Am J Vet Res**, 1998, 59(9): 1182—1187.

[18] TOMITA S J, LI R K, WEISEL R D, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function [J]. **Circulation**, 1999, 100(suppl II): II 247—II 256.

[19] GHILZON R, McCULLOCH C A, ZOHAR R. Stromal mesenchymal progenitor cells in process citation [J]. **Leuk Lymphoma**, 1999, 32(3-4): 211—221.

[20] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival [J]. **Proc Nat Acad Sci USA**, 2001, 98(18): 10344—10349.

[21] MAKINO S J, FUKUDA K, MIYOSHI S, et al. Cardiaomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro [J]. **J Clin Invest**, 1999(103): 697—705.

[22] FUKUDA K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells [J]. **Congenit Anom Kyoto**, 2002, 42(1): 1—9.

[23] KENIECZNY S F, EWERSON C P. 5-azacytidine induction of stable mesoderm cell lineage from 10T1/2 cells : evidence for regulatory genes controlling determination [J]. **Cell**, 1984, 38: 791—800.

[24] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, et al. Bone marrow cell regenerate infarcted myocardium [J]. **Nature**, 2001, (410): 701—705.

[25] SHAKE J G, GRUBER P J, BAUMGARTNER W A, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects [J]. **Ann Thorac Surg**, 2002, 73(6): 1919—1925.

[26] MANGI A A, NOISEUX N, KONG D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts [J]. **Nat Med**, 2003, 9(9): 1195—1201.

[27] TOMA C, PITTENGER M F, CAHILL K S, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart [J]. **Circulation**. 2002, 105(1): 93—98.

[28] KENNETH W, LIECHTY, AIMEN T C, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep [J]. **Nat Med**, 2000, 6(11): 1282—1286.

[29] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. **Science**, 1999, 284(2): 143—147.

[30] STRAUER B E, BREHM M, ZEUS T, et al. Intracoronary human autologous stem cells transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction [J]. **Dtsch Med Wochenscher**, 2001, 126(34-35): 932—938.

[31] BODO E, MICHAEL B, TOBIES Z, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans [J]. **Circulation**, 2002, 106: 1913—1918.

[32] BIRIGIT A, VOLKER S, CLAUDIUS T, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction [J]. **Circulation**, 2002, 106: 3009—3017.

[责任编辑 张荣连]

(上接第 549 页)

[4] MITTAL S K, AHERN L, FLASTER E, et al. Self-assessed physical and mental function of haemodialysis patients [J]. **Nephrol Dial Transplant**, 2001, 16(7): 1387—1394.

[5] MENDELSSOHN D C, MULLANEY S R, JUNG B, et al. What do American nephrologists think about dialysis modality selection [J]. **Am J Kidney Dis**, 2001, 37(1): 22—29.

[6] KIMMEL P L. Psychosocial factors in adult end-stage renal disease patients treated with hemodialysis: correlates and outcomes [J]. **Am J Kidney Dis**, 2000, 35(Suppl 1): 132—140.

[7] JIANG Min-min, LI Lu (姜敏敏, 李 鲁). Overview of health-related quality of life in patients with end-stage renal disease [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences** (浙江大学学报: 医学版), 2003, 32(3): 267—269. (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]