

## · 综 述 ·

## 骨髓干细胞移植修复梗死心肌的最新进展

孟玲 (综述) 刘国树 裴雪涛 (审校)

近年来,冠心病发病率和死亡率逐步增高,冠心病急性心肌梗死和充血性心力衰竭严重损害人类的健康。急性心肌梗死后心肌细胞坏死和疤痕形成,继之发生左室重塑、甚至室壁瘤形成,心功能下降。虽然人体心脏具有一定自我修复的能力,但是过程短暂,不足以防止急性或慢性心肌病理性改变,最终发展为严重的临床心脏疾病。目前冠心病的主要治疗方式包括药物治疗、介入治疗和手术搭桥,这些治疗只能缓解症状,重建血运,不能再生心肌以替代疤痕组织,而心脏移植手术费用昂贵,供体少,手术具有一定风险和难度,难以推广,从而促使人们寻找新的治疗方式。

越来越多的证据表明<sup>[1-3]</sup>,骨髓来源的干细胞如骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、血谱系阴性(血谱系特异性抗厚干细胞因子受体)骨髓干细胞等均能够再生心肌,参与血管新生,改善心脏功能,因而骨髓来源的干细胞移植修复心肌梗死和防止梗死后充血性心力衰竭是一个颇具前途的治疗方向。笔者结合相关的体内外实验研究结果,阐述有关骨髓来源干细胞移植治疗缺血性心脏病的最新进展,重点讨论心肌梗死后干细胞移植对心肌再生的效果。

### 1 移植细胞及其可塑性

实验表明不同类型的干细胞可以分化为修复损伤心肌所必需的心肌细胞和组织,同时一些动物实

验提示移植骨骼肌(成肌细胞)、骨髓(间质、内皮或造血祖细胞),甚至普通心肌细胞均能改善心脏收缩功能。然而,由于骨髓来源干细胞在体外可以定向分化和表达为心肌细胞表型<sup>[4]</sup>,如果将其植入在体心肌,它们受微环境信号影响,能够变成心肌细胞<sup>[2]</sup>。实验证明,心肌梗死时这些干细胞可以从骨髓进入血液循环,归巢到损伤部位,并参与组织损伤修复的病理生理过程<sup>[5,6]</sup>。因此,可以应用骨髓来源干细胞来修复损伤心肌,防止心力衰竭发生,从而达到治疗目的。更由于初步研究发现骨髓来源干细胞MSCs具有独特的免疫耐受性,它们有可能成为“万能供体”,这对于临床应用意义深远。因而,MSCs是细胞移植修复损伤心肌的最佳种子细胞来源之一<sup>[1-4,7]</sup>。

Yau等<sup>[8]</sup>应用猪心肌梗死模型,研究比较了自体MSCs与心肌细胞移植的治疗效果。结果发现,在组织学水平证实梗死区内均有MSCs和心肌细胞植入,且表现为肌细胞形态。在梗死区新形成的灌注血管,一些MSCs分化为内皮细胞。<sup>99m</sup>Tc-MIBI单光子发射体层显像(<sup>99m</sup>Tc-sestamibi single-photon emission tomography, <sup>99m</sup>Tc-MIBI SPECT)扫描显示细胞移植组猪梗死区灌注增加,对照组梗死区灌注减少。心肌细胞移植组猪左心前负荷峰值作工(preload-recruitable stroke work)提高,心肌细胞和MSCs移植组猪左室收缩末期压力-容量曲线左移。研究表明,MSCs和心肌细胞可移植入梗死区,并通过防止梗死区室壁变薄和伸展来改善左室功能。由于MSCs在体外显示出较强的可塑性,它比心肌细胞移植修复梗死心脏更具优势和可行性。

Gojo等<sup>[9]</sup>将分离的MSCs [CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> Sca-1<sup>high</sup>]直接注射至动物心脏,继而分化成心肌细胞、内皮细胞和外周细胞或平滑肌细胞。MSCs在骨骼肌和肺也能参与血管系统的形成,但MSCs没有转化为恶性肿瘤细胞或形成多余的细胞外基质,进一步证实MSCs是心脏病患者一种理想

收稿日期:2004-04-27

基金项目:国家973高技术研究发展计划资助项目(2001CB509906、G1999053903),国家863高技术研究发展计划资助项目(2003AA205160、2002AA205051),北京市科委资助项目(H020220010190)

作者单位:100850北京市,军事医学科学院野战输血研究所干细胞研究室(孟玲,裴雪涛);100853北京市,解放军总医院老年心肾科(孟玲,刘国树)

作者简介:孟玲,女,1966年9月生,黑龙江省牡丹江市人,在读医学博士,副主任医师

通讯作者:裴雪涛, Email: peixt@nic.bmi.ac.cn

的心血管细胞的移植细胞来源。

晚近研究<sup>[10]</sup>提示骨髓细胞具有广泛的分化潜能,能够形成新的心肌细胞、肝细胞和神经元。一些学者将这种可塑性归结为“横向分化”,而其他学者则提出细胞融合可以解释这些现象。人们采用一项基于 Cre/lox 重组的简单方法来观测细胞融合现象,发现在体外骨髓来源干细胞与神经祖细胞自发发生融合,而且,在体内骨髓移植后骨髓来源干细胞与心脏心肌细胞、肝脏干细胞和大脑 Purkinje 神经细胞发生融合,形成多核细胞。在这些组织中,人们观察到没有融合就没有横向分化的证据。该报告首次提供了在体骨髓来源干细胞与心肌细胞和神经元发生细胞融合的证据,提出细胞融合可能参与发展或保持这些关键细胞类型。

## 2 干细胞归巢与迁移

心肌梗死时心肌再生是通过干细胞动员来完成的,然而干细胞归巢至梗死组织的机制和该方法是否能够应用于临床治疗缺血性心脏病尚不清楚。Bittira 等<sup>[5]</sup>从同基因(isogenic) Lewis 大鼠分离 MSCs,体外扩增及用 LacZ 报告基因标记,然后给大鼠( $n = 30$ )静脉注射  $1 \times 10^7$  个标记细胞。1 周后,其中 10 只大鼠被处死并检测标记其 MSCs 的组织分布,其余大鼠接受冠状动脉结扎( $n = 14$ )手术或假手术( $n = 6$ )。在 1~8 周不同时间点摘取心脏,染色检测  $\beta$  半乳糖苷酶活性,免疫组织化学染色鉴定标记细胞的表型。结果发现,在注射细胞 1 周处死的正常大鼠,标记细胞已经归巢至骨髓,心脏中没有发现标记细胞。冠状动脉结扎组梗死区及其附近均发现标记细胞(14/14),但在假手术组心脏中未见标记细胞(6/6)。4 周时其中一些标记细胞心肌特异性肌钙蛋白 I-C 染色阳性,这些是向成肌分化的证据。那些存在于血管壁的移植细胞表达平滑肌  $\alpha$ -肌动蛋白。据此,研究人员认为心肌梗死后其自身 MSCs 受信号驱使运行到损伤心脏,进行分化并可能参与心肌梗死后重塑、血管形成和疤痕形成的病理生理过程,而进行 MSCs 移植可以进一步加强这种作用。

Saito 等<sup>[11]</sup>采用 LacZ 报告基因标记大鼠 MSCs,并用 5-氮胞苷诱导,然后临时夹闭大鼠升主动脉远端,将重悬的  $150 \mu\text{l} \times 1 \times 10^6$  移植细胞经升主动脉远端灌注入大鼠冠状动脉。结果发现,注射细胞后即

刻在梗死区与非梗死区的冠状动脉血管内均可见到移植细胞,然而 8 周后,大多数细胞只在疤痕与疤痕周边组织存在,并表达肌凝蛋白重链和心肌特异性蛋白肌钙蛋白 I-C。一些 MSCs 与相邻宿主心肌细胞产生缝隙连接,左室缩短分数和舒张末期、收缩末期直径显著改善(分别为  $P = 0.0465, 0.002, 0.0004$ )。虽然许多报道指出,直接注射 MSCs 到心肌疤痕组织可以改善心脏功能,该研究却是首次证实通过冠状动脉途径移植, MSCs 能够靶向性迁移到疤痕及其周边组织,并分化为心肌细胞,改善心脏功能,为临床应用提供了实验依据。

经循环途径移植骨髓来源 MSCs 修复心肌是一个吸引人的方法。有学者<sup>[12]</sup>短暂阻塞冠状动脉制作大鼠心肌梗死模型,用 <sup>99m</sup>Tc exametazime、荧光染料、LacZ 标记基因或溴脱氧尿苷(BrdU)标记 MSCs,于心肌梗死后 2 d 或 10~14 d 将  $4 \times 10^6$  <sup>99m</sup>Tc 标记的 MSCs 注射到大鼠左心室腔,并与静脉移植方式进行了比较。静脉注射细胞 4 h 后  $\gamma$  照射成像,摘取脏器计数,结果显示 <sup>99m</sup>Tc 标记细胞主要分布在肺,肝、心和脾等脏器分布明显较少,而左心室腔内注射方式显著减少了移植细胞在肺的分布,心脏摄取增多,与假心肌梗死组相比梗死部位分布更高。注射细胞后 1 周行组织学检查,于梗死区或缺血边缘区发现标记细胞,但在离缺血区远处存活心肌或假心肌梗死心脏不能识别出标记细胞。标记细胞还出现在肺、肝、脾和骨髓。该研究表明,从心肌梗死大鼠外周静脉注射 MSCs 的细胞移植方法是可行的,但因肺截流移植细胞过多,不提倡应用于临床;直接左室注射方式增加移植细胞优先迁移和定居到缺血心肌部位。

Askari 等<sup>[13]</sup>采用 Lewis 大鼠缺血性心肌病模型(结扎前降支动脉),观察使用粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, GCSF)伴和不伴有细胞移植后自体干细胞动员对心脏组织的作用,超声多普勒显像测量大鼠左室缩短分数和心肌张力。结果表明单独使用 GCSF 不能引起骨髓来源干细胞归巢至损伤组织。如果在心肌梗死 8 周大鼠梗死周边区移植稳定转染表达基质细胞衍生因子 1(stromal derived factor, SDF-1)的同种心脏纤维原细胞,再合并应用 GCSF,结果发现在转染 SDF-1 细胞移植组,归巢至损伤心肌的 CD117 阳性干细胞数量

明显增多,与对照组比较为平均 33.2 比 7.2 个细胞/ $\text{mm}^2$  ( $n=4, P<0.02$ ),并且左室重量增加(1.57 g vs 1.24 g)、心功能改善(缩短分数 17.2% vs 9.2%,  $n=8, P<0.05$ )。研究表明 SDF-1 在干细胞归巢至损伤心肌中发挥重要作用,给临床应用提供一项直接将干细胞移植至损伤组织的治疗策略,并且提示除非重新建立干细胞归巢信号系统,临床上干细胞动员再生心肌务必在心肌梗死数天内进行。

Aicher 等<sup>[14]</sup>发现在内皮-氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)缺乏的小鼠[Nos3(-/-)],其新血管形成与祖细胞动员有关,提出 eNOS 在干细胞和祖细胞动员中起一定作用。他们先抑制 eNOS 缺乏小鼠骨髓,然后再用血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)动员内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs),结果疗效不佳,死亡率增加;而给下肢缺血 Nos3(-/-)小鼠静脉输注祖细胞,但不进行骨髓移植,却可以改善其新血管形成的缺陷,提示 Nos3(-/-)小鼠祖细胞从骨髓中动员过程受阻。在临床上,缺血性心脏病患者全身 NO 生物活性减弱,这可能削弱其心肌再生过程,影响自身组织修复<sup>[14]</sup>。笔者认为如果针对该现象制订出合理的治疗措施,恢复患者自身 NO 生物活性,对于损伤心肌的修复有望是一有效的辅助措施。

### 3 临床应用与安全性

细胞移植治疗心脏疾病的主要方式包括经心外膜直接注射、经导管冠状动脉内注射、心内膜注射和外周静脉注射。心外膜直接注射移植细胞效果较确切,但需要开胸手术,创伤较大,临床上一般配合心脏外科冠状动脉搭桥手术同时进行;经导管冠状动脉内注射移植细胞治疗有效,患者痛苦小,易于开展。心内膜注射要求装备 NOGA 标识系统(NOGA system, Biosense-Webster),成本昂贵。无论采用何种移植方式,都需要根据具体情况,权衡利弊来制订。

由于大量动物实验结果令人鼓舞,近年国内外均已开始进行一些细胞心肌成形术和干细胞移植治疗缺血性心脏病的临床前期研究。Stamm 等<sup>[15]</sup>进行了一项自体骨髓干细胞移植再生心肌的 I 期临床试验。入选 6 例已经患有心肌梗死并进行冠状动脉搭桥的患者,分别在其心肌梗死边缘区注射  $1.5 \times 10^6$  个  $\text{AC}_{133}$  自体骨髓细胞。手术 3~9 个月后,6 例患

者均存活,状态良好,其中 4 例左室功能改善,5 例梗死区组织灌注显著增加,因此认为给心脏植入  $\text{AC}_{133}$  干细胞是安全的,并可引起血管新生,从而增加梗死区心肌组织的灌注,改善心功能。

为了评估经心内膜注射移植自体骨髓单个核细胞治疗晚期缺血性心脏病患者的效果,Perin 等<sup>[16]</sup>进行了一项前瞻性、非随机、开放式临床对照试验。入选 21 例患者,前 14 例为治疗组,后 7 例为对照组。基础评估包括临床和实验室全套检查、运动负荷试验、二维多普勒超声心动图、计算机单光子发射断层显像灌注扫描和 24 h 动态心电图监测等。运用 NOGA 标识系统识别出存活心肌(单极电压  $\geq 6.9$  mV),经导管注射用生理盐水重悬的骨髓单个核细胞(0.2ml/点,共 15 个点)进行细胞治疗。之后对治疗组和对照组患者行非创伤性随访 2 个月,对治疗组患者又行介入性随访 4 个月。随访时治疗组和对照组之间患者人群人口统计学和运动试验变量无明显差异,只有在对照组患者的血清肌酐和脑利钠肽两项实验室指标水平相对较高。4 个月时,治疗组患者射血分数从治疗前的 20% 增至 29% ( $P=0.003$ ),收缩末期容量减少 ( $P=0.03$ ),心脏电机械图显示其注射细胞部位机械活动明显加强 ( $P<0.0005$ )。因此,该研究证明经心内膜注射骨髓来源干细胞治疗严重心力衰竭的方法是相对安全有效的,并具有改善局部和整个左室功能、增加心肌血流的潜能。

### 4 问题与展望

相对于传统的心肌梗死后心力衰竭的治疗,干细胞治疗的概念可能是全新的,但仍然存在问题:(1) 应该应用哪些种类的干细胞?(2) 细胞移植的最佳途径是什么?(3) 能够改善心脏功能的最佳移植细胞数量是多少?(4) 干细胞治疗是否安全?(5) 哪些患者应该接受干细胞治疗?(6) 干细胞治疗是否比传统治疗方法更有效?已经发表的实验研究其设计各不相同,很难得出有关该治疗疗效的确切结论。例如:缺血模型、供体和受体种类、细胞移植方法、细胞类型、细胞数量和实验时间点的选择等各不相同,还需要较大规模的随机试验来明确移植后风险、长期安全性和效果。

最近,在心肌损伤后骨髓细胞再生心肌方面,一

些研究人员得出与以往观点不同的研究结果,从而引起重大争议。Balsam 等<sup>[17]</sup>应用小鼠心肌梗死模型,进行了富含 c-kit<sup>+</sup> 的骨髓细胞、血谱系阴性 c-kit<sup>+</sup> 骨髓细胞和 c-kit<sup>+</sup> Thy1.1<sup>low</sup> Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> 造血干细胞再生心肌的研究。结果发现,这些移植细胞不表达心肌组织特异性标志物,其中多数细胞表达造血细胞标志物 CD45 和粒细胞标志物 Gr-1。Murry 等<sup>[18]</sup>给 145 只正常和心肌梗死成年小鼠移植造血干细胞后,发现在梗死心肌,造血干细胞不分化为心肌细胞,而且与假移植组相比,干细胞移植组小鼠心脏心肌没有明显增加。该结果提示造血干细胞不容易获得心肌细胞表型,提醒正在进行有关修复梗死心肌临床试验的研究人员们予以关注。

尽管如此,在该领域的研究成果已经凸现出这样一个里程碑式概念,即干细胞治疗将在治疗心血管方面发挥重要作用。应该注意的是,干细胞治疗不仅仅局限于治疗缺血性心脏病,非缺血性心肌病、周围血管疾病、衰老等也可以采用干细胞治疗。另外,干细胞能够替代病毒,作为基因治疗的载体工具,它还可以联合药物治疗、外科手术、介入治疗等提高疗效。

参 考 文 献

- 1 Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, 1999, 100: 247-256.
- 2 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410: 701-705.
- 3 Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001, 7: 430-436.
- 4 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stem cell *in vitro*. *J Clin Invest*, 1999, 103: 697-705.
- 5 Bittira B, Shum-Tim D, Al-Khalidi A, et al. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur J Cardio-thorac Surg*, 2003, 24: 393-398.
- 6 Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of

- ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, 107: 1395-1402.
- 7 Chiu RC. Bone-marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail Rev*, 2003, 8: 247-251.
- 8 Yau TM, Tomita S, Weisel RD, et al. Beneficial effect of autologous cell transplantation on infarcted heart function: comparison between bone marrow stromal cells and heart cells. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75: 169-176; discussion 176-177.
- 9 Gojo S, Gojo N, Takeda Y, et al. *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 2003, 288: 51-59.
- 10 Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 2003, 425: 968-973.
- 11 Saito T, Kuang JQ, Lin CC, et al. Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126: 114-123.
- 12 Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 2003, 108: 863-868.
- 13 Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 2003, 362: 697-703.
- 14 Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rühm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*, 2003, 9: 1370-1376.
- 15 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, 361: 45-46.
- 16 Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 2003, 107: 2294-2302.
- 17 Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 2004, 428: 668-673.
- 18 Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 2004, 428: 664-668.