

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:27 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.074.html>

◇ 综 述 ◇

脐带间充质干细胞治疗缺血性心脏病的新进展

童珊珊^{1,2}, 张宁坤² 综述 陈 宇^{1,2} 审校

摘要 目前心脏移植是终末期缺血性心脏病(IHD)患者唯一有效的治疗手段,但由于供体来源短缺、免疫排斥和费用昂贵等限制,无法广泛应用于临床。随着干细胞研究的深入,人们看到了新的曙光。干细胞治疗,尤其是间充质干细胞(MSC)的替代治疗成为终末期 IHD 患者的另一有效治疗选择。MSC 是来源于发育早期中胚层内的具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的多能干细胞,广泛存在于骨髓、脐带、脂肪等组织中,能够产生多种细胞因子和化学因子,具有组织再生、免疫调节等功能,因此, MSC 在再生医学中具有重要的科研和临床实用价值。现就脐带间充质干细胞(UC-MSCs)在 IHD 治疗应用中的研究进展进行综述。

关键词 脐带间充质干细胞; 干细胞移植; 缺血性心脏病

中图分类号 R 541.4; R 329.2

2015-11-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81370238); 北京市自然科学基金(编号: 7142156)

作者单位: ¹安徽医科大学海军临床学院, ²海军总医院心脏中心, 北京 100048

作者简介: 童珊珊,女,硕士研究生;

陈 宇,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:

YuChen911@hotmail.com

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)02-0307-04

心肌梗死导致心肌细胞数量减少、心肌纤维化形成瘢痕,使心脏失去正常的舒缩功能。目前的介入、药物等治疗手段只能改善心脏缺血,而不能减少梗死面积,患者的 5 年死亡率达 50%; 同时心肌梗死的患者反复住院,也增加了社会经济负担^[1]。细胞治疗不仅能减少心肌细胞损伤和瘢痕形成,而且能重建梗死区心肌细胞和血管,成为研究的热点。

1 缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD) 的治疗现状

IHD 又称冠状动脉性心脏病,是一种最常见的心脏疾病,由于其高发病率和死亡率,是当今社会致死的主要原因^[2]。Krumholz et al^[3] 的统计结果表明美国每年约有 11 万人死于心肌梗死,我国每年死于心血管病的约有 350 万人,致死人群中有超过一半的患者与冠心病等诱发的心肌缺血关系密切。目前,虽然药物、介入、外科手术等治疗手段不断改进,但 IHD 导致的死亡仍在不断增加。全国疾病监测

Comparative study of the two-dimensional, three-dimensional ultrasound and female stress urinary incontinence severity under Valsalva maneuver

Wu Jun, Jiang Fan, Zhang Shujie, et al

(Dept of Ultrasound Diagnosis, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract 49 patients diagnosed as stress urinary incontinence(SUI) by clinic and laboratory have been examined through urodynamics and pelvic ultrasound. According to the three levels assessed by the International Advisory Committee of incontinence score, we selected important indicators related to SUI, including abdominal leak point pressure(ALPP) of urodynamics, parameters of two-dimensional, three-dimensional ultrasound under Valsalva maneuver [bladder neck mobility, urinary bladder posterior horn, pubic area of pelvic diaphragm hiatus(A), antero-posterior diameter(M), transverse diameter(N) and visceral muscles thickness(T1, T2)] and then conducted a One-Way ANOVA analysis on the correlation between these indicators and the severity of SUI. The result showed that ALPP, bladder neck mobility, urinary bladder posterior horn, pubic area A, and muscle thickness T1 were associated with the severity of SUI under Valsalva maneuver($P < 0.05$).

Key words stress urinary incontinence; urodynamics ALPP; ultrasonography, pelvic floor

系统 2004 ~ 2010 年死因监测数据显示, IHD 所致的死亡仍在以每年 5.05% 的幅度上升^[6]。其主要原因是心肌没有足够的再生和修复能力, 一旦发生缺血坏死, 坏死区心肌就会逐渐纤维化而形成瘢痕, 致使心脏发生不可逆的器质性损害, 最终导致患者死亡。由于供体来源短缺、手术创伤大及移植后可能出现急性排斥反应、致命性心律失常等严重并发症, 使心脏移植很难广泛应用于临床。这就使得终末期心脏病患者的治疗陷入困境, 但随着再生医学的发展和干细胞研究的深入, 有望通过干细胞治疗, 替代坏死心肌, 实现心脏再生, 来根本改善患者的预后。

2 脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs) 概述

UC-MSCs 是来源于胎儿脐带血、脐血管周围、内皮下及华尔通氏胶质(Wharton's jelly, WJ)等脐带组织的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)^[7]。脐带属于医疗废弃物, 来源广泛, 取材方便, UC-MSCs 易于获取、冻存、培养简单、增殖活性高, 且不受伦理道德等的限制, 有望取代胚胎干细胞、骨髓 MSC, 成为再生医学中理想的种子细胞^[8]。UC-MSCs 有自我更新能力, 传代后无形态学变化, 在体内外特定条件下可分化为骨、软骨、脂肪、心肌等多种细胞^[9]。其表达多种免疫耐受和免疫调节相关蛋白, 而不表达造血干细胞、内皮细胞特异性抗原及移植排斥反应相关抗原, 因此免疫原性较低, 很少引起免疫排斥反应。

3 UC-MSCs 的作用机制

3.1 分化为心肌细胞 移植细胞分化为心肌细胞, 并与宿主心肌整合, 重建梗死心肌, 实现心脏再生, 进而能够彻底改善患者预后。何红艳等^[8]将 BrdU 标记的 UC-MSCs 移植到大鼠心肌梗死模型中, 2 周后发现移植细胞仍然存活, 且能表达成熟心肌细胞标志物, Wu et al^[8]在体外和大鼠模型中证实 UC-MSCs 可向心肌分化, 且细胞移植后心功能有明显的改善。

3.2 旁分泌作用 移植细胞仅有很少一部分到达靶器官, 且细胞移植后 72 h 内即可观察到心功能的改善, 提示这种显著的效果并非来自于移植细胞的心肌再生作用, Ballard et al^[10]认为干细胞是通过旁分泌机制发挥改善心功能的作用。MSC 分泌多种因子发挥旁分泌的作用, MSC 分泌的因子包括: 干细胞因子、胰岛素样生长因子-1、血管内皮生长因

子、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、单核细胞趋化因子、白细胞介素-1、白细胞介素-6 等, 通过分泌这些生长因子和化学因子, 诱导新生血管形成、降低心肌梗死面积、减少瘢痕形成和心肌细胞凋亡、改善心肌收缩力, 同时血管内皮生长因子和成纤维细胞生长因子表达的增强, 可促进缺血区移植细胞和宿主细胞的存活。

3.3 免疫调节作用 UC-MSCs 表达免疫耐受和免疫调节基因, 不表达免疫反应相关基因。如表达 MHC I 类分子、MHC-E、MHC-F、MHC-G、CD90、CD105、CD29, 不表达 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ、CD40、CD40L。可通过抑制 T 细胞的激活^[11]、化学因子的分泌^[12]参与免疫调节。因此, UC-MSCs 可以降低心肌梗死后免疫机制介导的心肌细胞丢失, 减少心肌瘢痕形成, 减少心肌损害^[13]。

4 UC-MSCs 在 IHD 方面的试验研究

4.1 体外试验 UC-MSCs 诱导心肌分化的方法有多种, 目前常用的诱导剂有 5-氮胞苷(5-AZA)、维生素 C、催产素、5-氮-2 脱氧胞苷、bFGF、TGF- β 1、PDGF 等。5-AZA 可诱导 UC-MSCs 表达 Nkx2.5、cTnT、 β MHC 等成熟心肌细胞特异性标志物^[14], 体内心肌细胞的分化是多种因子与局部微环境共同作用的结果, 有研究^[15]表明小鼠心脏提取液能够促进心肌的分化。Jiang et al^[16]表明 0.5 μ mol/L 的磷脂酰鞘醇能够促进 UC-MSCs 分化为有功能的心肌细胞。随后 Konstantinou et al^[17]用磷脂酰鞘醇、苏拉明、旋滴培养及生物发生器技术首次培养出了心脏微小组织, 这些小组织块有望像补丁一样修复受损心脏。

4.2 体内试验 虽然大量体外试验表明 UC-MSCs 可诱导分化为心肌细胞, 但诱导心肌是否与受体心肌整合、能否发挥功能学的作用、移植细胞的结局及安全性等问题尚不清楚。一些动物的心肌梗死模型有助于了解移植细胞的功能效率、生理学机制及安全性等(表 1), 为进一步的临床研究提供了理论基础。

2009 年, Wu et al^[8]成功从完整脐带组织中分离出 UC-MSCs, 然后将分离得到的细胞经 5-AZA 体外诱导 24 h, 2 周后发现细胞由长梭形逐渐增大呈球形, 心肌细胞特异性标志物 α -actin、connexin43、cTnT、myosin 在诱导 4 周后高表达; 随后, 将 CM-Dil 标记的 UC-MSCs 通过心肌注射的方式移植到大鼠心肌梗死模型中, 移植后 4 周发现梗死区存在 CM-

表1 动物心肌梗死模型中 UC-MSCs 移植的相关研究

细胞类型	受体动物	移植细胞数(个)	移植途径	试验结果		随访时间
WJ-MSC ^[13]	猪	4 × 10 ⁷	IM	↑ LVEF、WT	↓ 凋亡细胞数量	6 周
hUCM ^[14]	兔子	5 × 10 ⁶	IM	↑ LVEF、LVFS	↓ 瘢痕组织	30 d
UCMSC ^[15]	大鼠	5 × 10 ⁶	IM	↑ LVEF		6 周
WJ-MSC ^[13]	大鼠	10 × 10 ⁶	IV	↑ LVEF	↓ LA/Ao	68 周
hUC-MSC/hUCB-CD34 + ^[21]	兔子	5 × 10 ⁶	IM	↑ LVFS	↓ LVESD、胶原沉积	8 周
hUCB-MSC/CD105 + hUCB-MSC ^[21]	小鼠	4 × 10 ⁵	IM	↑ LVEF	↓ 心肌重塑、心梗面积	6 周
hUCBC/HUVEC ^[23]	小鼠	1 ~ 2 × 10 ⁶	IM	↑ LVFS、LVEF	↓ 心梗面积	4 周
hWJ-MSCs/hWJ-MSCs-H ₂ O ₂ ^[23-24]	小鼠	1 × 10 ⁶	IV	↑ LVFS、MVD	↓ LVESD、CVF	4 周
HUCPVC ^[23]	小鼠	2 × 10 ⁶	IV	↑ LVFS		16 周

WJ-MSC: 脐带华通胶 MSC; hUCM: 脐带血单核细胞; hUCB-CD34 + : 人脐带血 CD34 + 细胞; CD105 + hUCB-MSC: CD105 + 的脐带血 MSC; HUVEC: 脐静脉内皮细胞; IM: 心肌内注射; IV: 静脉注射; LVEF: 左室射血分数; WT: 室壁厚度; LVFS: 左室短轴缩短率; LA/Ao: 左房与主动脉根部直径的比值; LVESD: 左室收缩末期内径; MVD: 微血管密度; CVF: 心肌胶原容积分数

Dil 标记的 UC-MSCs,且免疫荧光显示 cTnT 表达,证明了 UC-MSCs 在体内、体外都有向心肌分化的能力。Latifpour et al^[19] 在心肌梗死模型兔中发现,移植细胞同样可以在体内分化为心肌细胞,与对照组相比,细胞移植组 LVEF 较高且心肌梗死面积缩小。Lopez et al^[13] 的实验表明,心肌梗死 24 ~ 48 h 内给大鼠静脉注射 UC-MSCs,4 d 后心肌梗死边缘可检测到注射的 UC-MSCs,25 周后左室射血分数较对照组高,LA/Ao 比值减小。对于经典的心肌内注射的移植方式,移植细胞易被血流冲走而不易定位,且由于心肌收缩对细胞的挤压,导致细胞损害,近年来有研究^[23] 表明,用甲基纤维素水凝胶制备的三维细胞聚集体,不仅可以使移植细胞稳定定位,而且可以减轻心脏收缩对移植细胞的损害。

4.3 临床试验 不同类型的动物试验证实了干细胞应用的广阔前景,梗死区心肌细胞的再生能够增强心脏功能,而基于 UC-MSCs 的细胞治疗可减少心肌细胞损伤、降低瘢痕形成及诱导新生血管形成,展现出优于现有疗法的独特一面。但目前将 UC-MSCs 应用于 IHD 的实验较少,2015 年 5 月 30 日,在 clinical trial gov 官网上查找“脐带间充质干细胞”和“缺血性心脏病”的实验,注册的实验仅有 4 个。徐州医学院附属淮安医院对 30 例心肌梗死的患者分别实行了冠脉介入 + 支架植入术和冠脉介入 + 支架植入 + hUC-MSCs 移植,移植组将 5×10^7 个细胞经冠状动脉移植入患者体内,移植 8 周后,移植组的 LVEF 明显高于非移植组,心肌梗死面积小于非移植组。实验证明冠脉介入治疗、支架植入结合细胞移植治疗心肌梗死优于冠脉介入和支架植入^[26-28]。Li et al^[29] 将慢性冠状动脉完全闭塞的老年患者随机分成 3 组,分别给予 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 不同剂量的 UC-MSCs 进行治疗,随访 2 年,无再

发急性心肌梗死及死亡等严重心脏不良事件发生,证明了干细胞用于移植治疗的安全性和可行性。

5 问题及展望

目前可用于心脏再生医学的干细胞主要有胚胎干细胞、诱导多能干细胞、骨髓 MSCs、心脏干细胞和 UC-MSCs 等,胚胎干细胞、诱导多能干细胞可分化成心肌或心肌样细胞,但 ESCs 由于致瘤性且存在伦理道德及免疫方面的问题而应用受限,虽然诱导多能干细胞可避免伦理问题,但由于其编程难度大、效率低且有较大致瘤风险等使其临床应用困难较大。骨髓 MSCs 适合移植,但其存在感染的风险,且随着年龄的增大,骨髓 MSCs 的增殖和分化能力都受到不同程度的影响。心脏干细胞可定向分化为心肌细胞且不存在伦理道德及免疫排斥,是用于自体移植的良好种子细胞,但由于其数量较少且分离困难,应用于临床仍面临众多的困难。UC-MSCs 由于其自身的生物学特性而有广阔的应用前景。

然而从基础研究到临床应用仍然有很多的问题需要解决,目前 UC-MSCs 的作用机制尚不完全清楚,移植细胞的数量及途径尚不统一。同时如何选择安全性好、重复性高的培养基,如何避免细菌污染,如何根据病情的轻重选择合适的移植方法等仍需要不断的探索。此外,现有 UC-MSCs 的研究大都建立在动物模型上,临床研究并不多,尚不能完全证明干细胞治疗的可行性和安全性。干细胞治疗心血管病的远期效果如何仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Elnakish M T, Hassan F, Dakhllallah D, et al. Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration: translation to bedside reality [J]. Stem Cells Int, 2012, 2012: 646038.

- [2] Finegold J A, Asaria P, Francis D P. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(2): 934–45.
- [3] Krumholz H M, Normand S L, Wang Y. Trends in hospitalizations and outcomes for acute cardiovascular disease and stroke, 1999–2011 [J]. *Circulation*, 2014, 130(12): 966–75.
- [4] 高润霖, 胡盛寿, 陈伟伟, 等. 中国心血管病报告 2013 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2014, 29(7): 487–91.
- [5] Ding D C, Chang Y H, Shyu W C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 339–47.
- [6] Fan C G, Zhang Q J, Zhou J R. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(1): 195–207.
- [7] Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014, 297(1): 98–110.
- [8] 何红燕, 林晓波, 应文娟, 等. 人脐带间充质干细胞经体内定植并向心肌样细胞分化的研究 [J]. *中国输血杂志*, 2009, 22(3): 188–91.
- [9] Wu K H, Mo X M, Zhou B, et al. Cardiac potential of stem cells from whole human umbilical cord tissue [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(5): 926–32.
- [10] Ballard V L. Stem cells for heart failure in the aging heart [J]. *Heart Fail Rev*, 2010, 15(5): 447–56.
- [11] Chen H Y, Zhang N K, Gao L R, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells: Immune property genes assay and effect of transplantation on the immune cells of heart failure patients [J]. *Cell Immunol*, 2012, 276(1-2): 83–90.
- [12] Liu Y, Mu R, Wang S, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(6): R210.
- [13] Lopez Y, Lutjemeier B, Seshareddy K, et al. Wharton's jelly or bone marrow mesenchymal stromal cells improve cardiac function following myocardial infarction for more than 32 weeks in a rat model: a preliminary report [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013, 8(1): 46–59.
- [14] Qian Q, Qian H, Zhang X, et al. 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(1): 67–75.
- [15] Pham T L, Nguyen T T, Van Bui A, et al. Fetal heart extract facilitates the differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into heart muscle precursor cells [J]. *Cytotechnology*, 2014; {Epub ahead of print}.
- [16] 姜丽丽, 刘天庆, 宋克东, 等. 1-磷酸鞘氨醇促进间充质干细胞向心肌分化 [J]. *生物工程学报*, 2013, 29(11): 1617–28.
- [17] Konstantinou D, Lei M, Xia Z, et al. Growth factors mediated differentiation of mesenchymal stem cells to cardiac polymicrotissue using hanging drop and bioreactor [J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(4): 502–7.
- [18] Zhang W, Liu X C, Yang L, et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction [J]. *Coron Artery Dis*, 2013, 24(7): 549–58.
- [19] Latifpour M, Nematollahi-Mahani S N, Deilamy M, et al. Improvement in cardiac function following transplantation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells [J]. *Cardiology*, 2011, 120(1): 9–18.
- [20] Li T, Ma Q, Ning M, et al. Cotransplantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in a rabbit model of myocardial infarction [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 387(1-2): 91–100.
- [21] Gabel R, Furlani D, Sorg H, et al. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e15652.
- [22] Lee W Y, Wei H J, Wang J J, et al. Vascularization and restoration of heart function in rat myocardial infarction using transplantation of human cbMSC/HUVEC core-shell bodies [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2127–36.
- [23] Zhang J, Chen G H, Wang Y W, et al. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2012, 125(19): 3472–8.
- [24] Dayan V, Yannarelli G, Billia F, et al. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(6): 1299–310.
- [25] Chen D Y, Wei H J, Lin W W, et al. Intramuscular delivery of 3D aggregates of HUVECs and cbMSCs for cellular cardiomyoplasty in rats with myocardial infarction [J]. *J Control Release*, 2013, 172(2): 419–25.
- [26] 郭殿选, 李侠, 陈颖, 等. 脐带间充质干细胞治疗对老年陈旧性心肌梗死患者肝 X 受体 OL 和可溶性 CD40 配体的影响 [J]. *中华损伤与修复杂志*, 2014, 9(3): 44–8.
- [27] 李侠, 郭燕, 胡有东, 等. 脐带间充质干细胞治疗老年人陈旧性心肌梗死对血小板糖蛋白和内皮细胞黏附分子的影响 [J]. *中华老年医学杂志*, 2013, 32(6): 582–5.
- [28] 徐培敬, 胡有东, 张枫林, 等. 人脐带间充质干细胞治疗老年心肌梗死的 CD34+ 细胞、Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 的表达水平分析 [J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2013, 8(5): 487–91.
- [29] Li X, Hu Y D, Guo Y, et al. Safety and efficacy of intracoronary human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell treatment for very old patients with coronary chronic total occlusion [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(11): 1426–32.