

心脏干细胞修复梗死心肌作用机制的研究进展

王艳¹ 综述 石蓓^{1,2} 审校

(1. 遵义医学院研究生院, 贵州 遵义 563003; 2. 遵义医学院附属医院心内科, 贵州 遵义 563003)

【摘要】心脏干细胞被发现于哺乳动物心脏组织中已有十余年,在此期间的大量研究均证实了心脏干细胞可再生修复梗死心肌,改善心脏功能。研究者们认为心脏干细胞发挥修复梗死心肌的作用机制可能与其固有特性相关,包括直接分化为功能心肌细胞,通过旁分泌各种细胞因子改善心肌梗死区域微环境,促进血管新生。现对心脏干细胞作用机制的研究现状及所面临的问题进行综述,以期对转化医学发展与心脏疾病的防治开拓新的方向与策略。

【关键词】心脏干细胞;外泌体;心肌梗死;再生治疗

【中图分类号】R543.3

【文献标志码】A

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2016.03.027

Research Progress of Cardiac Stem Cells Repairing Infarction Myocardial Function Mechanism

WANG Yan¹, SHI Bei^{1,2}

(1. The Graduate School of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China; 2. The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China)

【Abstract】Cardiac stem cells (CSCs) were found in the tissue of the mammalian heart has more than 10 years. During this time many of the studies have confirmed that CSCs can regenerate and repair infarcted myocardium and improve heart function. The researchers argue that CSCs play the role of the repair infarcted myocardium mechanism may be related to its inherent characteristics including direct differentiation into functional myocardial cells. Through paracrine microenvironment of various cytokines, myocardial infarction area will be improved and angiogenesis promoted. In this paper, the current research mechanisms of CSCs that repair infarcted and the problems facing were reviewed in order to find a new direction and strategy for the development of transforming medicine and heart disease prevention.

【Key words】Cardiac stem cells; Exosome; Myocardial infarction; Regeneration treatments

1 前言

既往认为哺乳动物的心脏为终末分化器官,在衰老或受损后不再具备自我更新能力,但最近一些研究显示,心脏具有不同程度的再生能力并能形成新的心肌细胞^[1]。2003 年 Beltrami 等^[2]就发现在成年哺乳动物心脏中含有少量具有再生功能的固有心脏干细胞(cardiac stem cells, CSCs),这些 CSCs 不光维持着心肌细胞衰老与新生的平衡,也负责心脏内其他类型细胞的新老交替,可能在心肌梗死后的心肌再生和心肌损伤的修复中发挥重要作用。后续研究进一步证实了 CSCs 为未分化细胞,主要存在于心房、心耳等部位,并具有较强的增殖分化能力,部分表达 Nkx2.5、GATA4 等早期转录因子,不仅可定向分化为心肌谱系细胞,如心肌细胞、血管平滑肌细胞及内皮细胞等,并

具有组织特异性与低免疫原性等特点。其致瘤、致畸、致心律失常率较其他干细胞类型低,在移植治疗心血管疾病中相对安全^[3-4]。

2 CSCs 的来源和分类

目前在部分啮齿类动物以及人的心脏组织中均发现 CSCs 的存在。但对于 CSCs 来源问题一直以来都备受争议,一项异基因心脏移植的研究发现,部分 CSCs 表现骨髓系表型,这提示心脏外源性原始细胞可在某种内外源性刺激下,归巢至心脏从而形成 CSCs,而后分化为心肌谱系细胞^[5];此外 Barile 等^[6]使用增强型绿色荧光蛋白(EGFP)转染至小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC),随后将其移植到野生型小鼠体内,心肌梗死后分离培养野生型小鼠 CSCs,发现均表达 EGFP,进一步验证了 CSCs 骨髓来

源的推测。然而大部分研究者更倾向于认为 CSCs 形成于胚胎期,出生后仍存在于心脏的干细胞龛中,并有研究证实可从大鼠和小鼠心脏组织中分离培养出 CSCs^[7-8],随后一项以小鼠为研究对象的实验也证实了 CSCs 起源于胚胎期,并在小鼠成熟后仍持续存在^[9]。

目前对于 CSCs 的鉴定尚无统一的标准,根据其表面标志物及生物学特征大致分为以下几种类型:即 c-Kit⁺ 细胞、Sca-1⁺ 细胞、侧群细胞、心肌球细胞、Islet1⁺ 细胞、心外膜衍生细胞等。其中:(1) c-Kit⁺ 细胞:发现最早,研究也最为深入,它表达许多心肌谱系标记,如 GATA-4、Nkx2.5 和 MEF2,而不表达骨骼肌系、血细胞系及神经系的表面标记。生理状态下, c-Kit⁺ 细胞静止于心脏微环境中,与周围支持细胞通过钙黏素与链接蛋白相连,在机体衰老或损伤等内外源性刺激下,可迁移至损伤区域参与心脏修复与再生^[10]。目前研究发现, c-Kit⁺ 细胞有肌源性和血管源性两种亚型,肌源性主要分化为心肌细胞,而血管源性主要分化为内皮细胞;(2) Sca-1⁺ 细胞:不同于 c-Kit⁺ 细胞的是, Sca-1⁺ 细胞同时也是造血系干细胞表面标记,可表达心脏结构基因(如肌球蛋白重链),却不表达 Nkx2.5 和编码肌小节蛋白基因,在体内外具有一定克隆和增殖、分化潜能。(3) 侧群细胞:最初在一些成年器官中发现,随后在新生小鼠心脏中也发现了这类细胞,并被证明具有干细胞样特征和心肌细胞分化潜能。有研究认为 ABCG2 是心脏侧群细胞表型的决定因素。但到目前为止,尚无报道提示侧群细胞具有克隆性和自我更新能力,故其特性还需进一步研究。(4) 心肌球细胞与心脏球形干细胞(cardiosphere-derived cells CDCs),心肌球细胞意为多种 CSCs 的混合物,心脏组织在体外贴壁培养时可形成聚集为团状的细胞而得名,其中 c-Kit⁺ 细胞为心肌球细胞核心,周围环绕 CD105⁺ 支持细胞及丰富的 IV 型胶原。心肌球细胞经过传代扩增后获得的细胞单层称为心肌球细胞衍生细胞。两者均具有克隆性和多向分化潜能,且在 I 期临床试验中(CADUCEUS)发现,心肌梗死患者冠状动脉输注 CDCs 治疗与常规治疗组比较,心肌梗死面积明显减小,心功能得以改善^[11]。

3 CSCs 修复梗死心肌的机制

目前大量啮齿类动物实验和 I 期临床试验(SCIPIO 和 CADUCEUS)均显示急、慢性心肌梗死和缺血性心肌病时,通过冠状动脉输入或者心肌内注射 CSCs 可使心肌细胞再生,心肌梗死区心室壁厚度增加,瘢痕面积减少,左心室重构受到抑制,左心室射血分数提高,心脏功能改善,同时可调节梗死区心肌的

电生理特性,减少心律失常的发生,治疗效果好^[12-13]。然而 CSCs 在体内发挥心脏修复作用的机制目前各家报道不一。

3.1 CSCs 直接分化为功能心肌细胞

心肌缺血后再生坏死心肌细胞,建立有效的血液循环对保护心脏功能、改善远期预后起关键作用。大量研究表明从大鼠心脏中分离的固有 CSCs 在某些生长因子作用下,可在体外诱导分化形成心肌细胞、平滑肌细胞和内皮细胞,再生修复坏死心肌细胞,重建血液循环。

将体外培养扩增的 CSCs 注射到心脏的梗死区域,可形成大量新的心肌细胞^[14]。Carr 等^[15] 在新生大鼠心脏组织中分离培养 CDCs,并以绿色荧光蛋白(GFP)及氧化铁标记,采用心肌内注射方法移植到梗死区后立即再灌注心肌,随后继续系统给予 CDCs 2 d,16 周后通过磁共振成像(MRI)检测到 GFP 与氧化铁标记的 CDCs 表达肌钙蛋白 I、血管性血友病因子和平滑肌激动蛋白,大鼠心功能改善,且心肌梗死交界区域毛细血管密度增加,提示移植到心脏的 CDCs 分化成了心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞并形成新生血管。而成体小鼠心肌梗死后内源性 CSCs 可分化成心肌细胞和血管细胞,再生修复梗死心肌,实现心功能改善^[16]。Ellison 等^[17] 发表于 2013 年《Cell》杂志的一篇研究成果显示 90% CSCs 处于休眠状态,用异丙肾上腺素损伤心肌后,大部分 CSCs 即进入细胞周期,复制并定向分化为心肌细胞谱系,修复坏死心肌组织,实现其功能恢复作用,而骨髓衍生的 c-Kit⁺ 细胞则没有再生能力。然而,一些使用成年心肌固有 CSCs 的研究则报道了相反的结果:这些 CSCs 在体内水平不具备分化为心肌细胞的能力。对于这一争议,Jop 及其团队的最新研究成果解释了这一现象,他们将一种互补性 DNA 编码 Cre 重组酶或他莫西芬(tamoxifen)诱导性 MerCreMer 嵌合体蛋白嫁接入小鼠的 Kit 基因位点,然后将这种小鼠与带有报告基因品系的小鼠进行杂交,形成细胞带有永久性标记的小鼠品系。这种品系小鼠心脏固有 CSCs 确实能产生出新的心肌细胞,只是所占百分比为 3%。如考虑细胞融合的作用,则内源性 c-Kit⁺ 细胞产生心肌细胞的百分率 < 0.8%。且在整个过程老年化,或是心脏受损情况下,其形成心肌细胞的百分率显得更低,因此 CSCs 虽然可产生出心肌细胞,但这种作用可能在改善心脏功能方面并不具有显著性^[18]。更重要的是,目前鲜有 CSCs 分化为有功能心肌细胞的报道,大多数的研究成果仅发现诱导 CSCs 分化后,可表达心脏谱系细胞早期标志物,然而分化而来的细胞是否具有功能却仍未

明晰。

3.2 CSCs 旁分泌效应

随着研究的不断深入发现,虽然心肌受损后移植干细胞可通过直接分化作用改善心功能,但是由于干细胞分化的心肌细胞数量有限,不足以替补心脏受损丢失的细胞数量,因此,不能单纯用直接分化机制解释干细胞再生修复受损心肌的作用。有学者认为干细胞不但可直接再生心肌组织,而且还能通过旁分泌效应,增加细胞因子的表达,促进血管再生^[19]。并有报道称在心脏长期修复的过程中,CSCs 间接的旁分泌作用强于其直接分化为心肌细胞的作用。例如:Tang 等^[20]在动物陈旧性心肌梗死模型中证实,移植的外源性 CSCs 不但可分化成心肌谱系细胞,而且还可通过旁分泌作用促进固有 CSCs 的增殖、分化,共同修复心脏组织,而且后者作用大于前者。

既往大量研究显示在 CSCs 体外培养过程中,可在其培养液中检测出许多因子。根据其生物学特性,大致可分为三类:(1)血管发生相关因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子、 β -成纤维细胞生长因子等,其中 VEGF 是血管发生强效因子,除诱导新生血管形成外,还能通过促进一氧化氮释放,清除氧自由基等多途径共同发挥保护心肌作用;(2)各种趋化因子,如 SDF-1、SCF 等,SDF 与其配体 CXCR4 广泛表达于多种组织细胞中,可趋化造血干细胞及内皮细胞形成有效新生血管,而 SCF/c-Kit 可活化 c-Kit⁺ 细胞,并能维持其生物学功能;(3)炎症相关因子,白介素-1、白介素-6 等,白介素-6 可通过诱导 VEGF 的产生,促进梗死心脏的修复。而研究既往认为胰岛素生长因子-1 可促进心肌生长,提高心肌收缩,抗细胞凋亡以及促进梗死后的重建。

体内移植 CSCs 到急性心肌梗死的模型时,这些分泌的细胞因子同时参与 CSCs 的心肌再生和心脏的修复过程。它们可招募活化自身 CSCs,促进其迁移、生存、增殖、分化。还能促进血管新生和抗凋亡,同时能趋化其他细胞参与受损心肌的修复。从而减少瘢痕面积,改善心脏收缩、舒张期容积,抑制心室重构,改善心脏血流动力学水平,提高左室射血分数,从而修复心脏,改善心脏功能。CSCs 移植治疗心血管疾病时直接和间接机制均起到了积极的作用^[21-24]。在不需要 CSCs 输注的情况下,治疗性血管形成时给予 CSCs 所分泌的细胞因子逐渐成为人们的选择。然而,CSCs 旁分泌的细胞因子种类较多,功能复杂,目前还没有证据表明某一种或几种细胞因子在治疗性血管形成中起决定性作用,其对损伤组织的修复作用很可能是各种细胞因子共同作用的结果,但机制不明。

对干细胞旁分泌作用的最新研究发现,在干细胞条件培养液中,存在一种纳米级囊泡状物质,即外泌体,其直径为 55 ~ 65 nm,对细胞之间的相互作用至关重要,可介导细胞间信息交流,参与机体组织多种病理生理反应,如抗原呈递、免疫应答、遗传信息交换、血管生成、炎症及肿瘤转移等。有研究证实心肌球细胞及 CDCs 均能分泌外泌体。动物实验亦证实缺氧状态下心脏祖细胞及其他干细胞通过旁分泌途径分泌外泌体作用于受损心肌组织,并能有效减少小鼠急性心肌梗死后的梗死面积^[25-26]。损伤细胞分泌含有细胞特异 miRNAs 的外泌体,干细胞内在化后可诱导其转化为组织特征性的表型。外泌体也可由干细胞分泌,通过上调受体细胞中 BCL2L1、BCL2 和 BIRC8 等抗凋亡基因的表达及下调 CASP1、CASP8 和 LTA 等促凋亡基因的表达抑制损伤细胞的凋亡,促进细胞增殖和血管再生,促进组织的自身修复^[27-28]。Chen 等^[21]发现心肌祖细胞的外泌体中富含 miR-451,将心肌细胞与含该外泌体的培养基中共培养时发现,心肌细胞可以内化心脏祖细胞释放的外泌体,并利用 miR-451 启动细胞内信号通路而减少缺血-再灌注心肌细胞的凋亡,促进损伤细胞的修复。可见干细胞分泌的外泌体在细胞间进行信息传递,可通过旁分泌机制对受损组织进行修复。然而,不同细胞及体液来源的外泌体所包含的蛋白组分有所不同,此外,外泌体还含有大量遗传物质,这些遗传信息可通过在细胞间水平转移的方式激活靶细胞产生一系列生物学效应。因此,探索与发现外泌体的功能作用成为今后干细胞治疗的研究热点。

3.3 CSCs 与其他干细胞类型相互作用

此外,心脏外源性干细胞与 CSCs 协同作用也可能是其发挥生物学功能的一个机制。如骨髓间充质干细胞所分泌的外泌体与 c-Kit⁺ 细胞共培养后,可促进增殖、分化^[29]。心肌梗死后移植骨髓间充质干细胞可通过激活内源性 CSCs 参与受损心肌细胞的更新和修复,最终减小梗死面积,改善左室射血分数。另有研究发现骨髓间充质干细胞可促进体内外环境中 CSCs 的增殖及分化潜能,在猪心肌缺血后再灌注损伤模型中,将 c-Kit⁺ 细胞和间充质干细胞联合移植至梗死心肌区域,心肌梗死后 14 d,通过心脏 MRI 分析显示,两种细胞联合使用更能显著提高 CSCs 的治疗效能,减小梗死面积,改善心功能^[30]。

4 当前面临的问题及展望

对于 CSCs 移植治疗仍处于初级阶段,尚有许多问题需要解决:(1) CSCs 在离体环境中如何维持其未分化状态;(2) 疾病或者衰老状态是否影响 CSCs 的数

量及心源性分化能力;(3) CSCs 分化为心肌谱系细胞的确切机制至今仍未阐明,分化而来的细胞是否具有心肌细胞功能仍需进一步验证。(4) CSCs 释放因子种类繁多,对组织修复的调控作用复杂多样。此外,值得重点关注的是,随着对 miRNA 的深入研究发现,其对于心血管谱系细胞的分化过程中具有重要调控作用,参与胚胎干细胞多能性维持,对胚胎干细胞向心肌起搏细胞分化发挥重要作用,但 miRNA 对于 CSCs 是否具有类似效应目前还未得知,因此这方面的可研究空间还很大。对于 CSCs 移植治疗心肌梗死,仍有待细胞生物学对其机制的进一步研究,但干细胞疗法仍然是今后研究的热点,也是未来治疗缺血性心脏病的趋势所在。

【参考文献】

- [1] Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration[J]. *Nature*, 2011, 473(11): 326-335.
- [2] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration[J]. *Cell*, 2003, 114(6): 763-776.
- [3] Zeng B, Tong S, Ren X, et al. Cardiac cell proliferation assessed by EdU, a novel analysis of cardiac regeneration[J]. *Cytotechnology*, 2014, 107(3): 115-121.
- [4] Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, et al. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance [J]. *Circulation*, 2012, 126(11): 54-64.
- [5] Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(1): 5-15.
- [6] Barile L, Cerisoli F, Frati G, et al. Bone marrow-derived cells can acquire cardiac stem cells properties in damaged heart[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(1): 63-71.
- [7] Sun Q, Zhang Z, Sun Z, et al. The potential and challenges of using stem cells for cardiovascular repair and regeneration[J]. *Genes Dis*, 2014, 223(12): 113-119.
- [8] Smith AJ, Lewis FC, Aquila I, et al. Isolation and characterization of resident endogenous c-Kit cardiac stem cells from the adult mouse and rat heart[J]. *Nat Protoc*, 2014, 321(21): 1662-1681.
- [9] Gan J, Sonntag HJ, Tang MK, et al. Integrative analysis of the developing post-natal mouse heart transcriptome[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): 119-206.
- [10] Hosoda T. C-kit-positive cardiac stem cells and myocardial regeneration [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2012, 2(1): 58-67.
- [11] Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial[J]. *Lancet*, 2012, 379(9819): 895-904.
- [12] Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (SCPIO): initial results of a randomized phase 1 trial [J]. *Lancet*, 2011, 378(9806): 1847-1857.
- [13] Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomized phase 1 trial[J]. *Lancet*, 2012, 379(9819): 895-904.
- [14] Keith MC, Bolli R. "String Theory" of c-kit(+) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results[J]. *Circ Res*, 2015, 116(11): 1216-1230.
- [15] Carr CA, Stuckey DJ, Tan JJ, et al. Cardiosphere-derived cells improve function in the infarcted rat heart for at least 16 weeks—an MRI study[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25669.
- [16] Fioret BA, Heimfeld JD, Paik DT, et al. Endothelial cells contribute to generation of adult ventricular myocytes during cardiac homeostasis[J]. *Cell Rep*, 2014, 52(8): 229-241.
- [17] Ellison G, Vicinanza C, Smith AJ, et al. Adult c-kit(+) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair [J]. *Cell*, 2013, 154(12): 827-842.
- [18] van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, et al. c-kit(+) cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart[J]. *Nature*, 2014, 509(3): 337-341.
- [19] Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice[J]. *Circ Res*, 2010, 106(5): 971-980.
- [20] Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction[J]. *Circulation*, 2010, 121(2): 293-305.
- [21] Chen L, Wang Y, Pan Y, et al. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(3): 566-571.
- [22] Wang K, Zhao X, Kuang C, et al. Overexpression of SDF-1 α enhanced migration and engraftment of cardiac stem cells and reduced infarcted size via CXCR4/PI3K pathway[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e43922.
- [23] Zakharaev L, Mastroeni D, Mutlu N, et al. Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(1): 40-49.
- [24] Maxeiner H, Krehbiel N, Weitasky N, et al. New insights into paracrine mechanisms of human cardiac progenitor cells [J]. *Eur J Heart Fail*, 2010, 12(7): 730-737.
- [25] Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary S, et al. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology[J]. *Circ Res*, 2015, 116(2): 255-263.
- [26] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(6): 214-222.
- [27] Camussi G, Deregibus MC, Cantaluppi V, et al. Role of stem cell derived microvesicles in the paracrine action of stem cells[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(1): 283-287.
- [28] Malik ZA, Kott KS, Poe AJ, et al. Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(7): 954-965.
- [29] Zhang Z, Yang J, Yan W, et al. Pretreatment of cardiac stem cells with exosomes derived from mesenchymal stem cells enhances myocardial repair[J]. *Am Heart Assoc*, 2016, 5(1): e002856.
- [30] Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, et al. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2013, 127(2): 213-223.

收稿日期: 2015-12-31 修回日期: 2016-01-28