

骨髓间充质干细胞干预心肌纤维化的增效措施

韦余 胡科 温鈔麟 邓玮

(重庆医科大学附属第二医院老年病科, 重庆 400010)

【摘要】 心肌梗死等缺血性疾病均可导致心肌纤维化。干细胞疗法可用于修复受损的心脏组织, 促进微血管形成, 减少瘢痕形成, 抑制心肌纤维化。但干细胞归巢、存活、移植效率尚待提升。现总结了系列增效措施: 优化干细胞(干预基因重组、预处理干细胞等)、提高靶向性、改善归巢微环境等。干细胞疗法可从“种子”“播种”“土壤”等环节提高干细胞的归巢、移植效率。

【关键词】 心肌纤维化; 干细胞; 提高

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.05.027

Synergistic Measures of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Intervention of Myocardial Fibrosis

WEI Yu, HU Ke, WEN Chaolin, DENG Wei

(Department of Gerontology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

【Abstract】 Ischemic diseases such as myocardial infarction can lead to myocardial fibrosis. Stem cell therapy can be used to repair damaged heart tissue, promote microangiogenesis, reduce scar formation and inhibit myocardial fibrosis. However, the efficiency of homing, survival and transplantation of stem cells needs to be improved. This paper summarizes a series of synergistic measures: optimizing stem cells (intervening gene recombination, pretreatment of stem cells, etc.), improving targeting, improving homing microenvironment, etc. Stem cell therapy can improve the efficiency of homing and transplanting stem cells from the links of “seed” “sowing” and “soil”.

【Key words】 Myocardial fibrosis; Stem cells; Improvement

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是心肌梗死等多种心血管疾病的必经过程。MF是指成纤维细胞在缺血缺氧刺激下向肌成纤维细胞过度转化、增殖后异常分布的一种瘢痕沉积。心肌受损后,机体内源性修复启动,成纤维细胞在受损微环境中受一系列相关信号通路及因子的活化,过度合成肌成纤维细胞和细胞外基质、心肌纤维排列不规则、微血管重构,导致MF,成为心室重构持续发展和难以逆转的重要原因^[1]。

多功能干细胞具有多向分化潜能,分泌生物活性物质,调节免疫和炎症细胞,促进微血管形成,参与心肌细胞修复及再生,减少心肌纤维组织过度增生及心力衰竭的发生,心肌细胞成形术具有良好前景。干细

胞以发育阶段形式可分为胚胎干细胞和成体干细胞,而后者中骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem Cells, MSCs)、神经干细胞、脂肪干细胞等是干细胞移植治疗MF的“常客”。其中,MSCs具有低免疫排斥性,是干预MF有效、有力、有前途的治疗方法^[1]。

现已有大量研究数据证明MSCs治疗MF的疗效确切,涉及到细胞分化迁移、微血管生成、心肌修复等,但干细胞存活分化、局部微环境、炎症、缺氧等因素使其移植存活率极低,1%的骨髓间质细胞在移植后能存活4 d左右,心功能改善3%左右^[2]。因此,探讨MSCs干预MF的增效措施,具有实用价值。

本文综述了干细胞干预MF的增效措施,通过优化干细胞、动员细胞迁移、改善缺血缺氧微环境可增

基金项目: 重庆市科委 2015 年基础与前沿研究计划一般项目(cstc2015jcyjA10074);重庆市卫计委 2015 年医学科研计划项目(2015MSXM019);重庆市教委高校人文社科项目(17SKG022);国家留学基金 2016 年度资助(201608500012);社区教育与老年教育融合发展战略研究(SJ2018-001)

通讯作者: 邓玮, E-mail: Dengwei1176@163.com

效干细胞移植率及存活率。

1 优化干细胞

1.1 调整干细胞基因及表达

干细胞优化的方法有:基因(如 Nkx2.5、GATA-4、miRNA 等)转染和预处理(如低氧)干细胞,能够有效提高“种子”的存活,增效干细胞治疗 MF。

随着基因工程的发展,有研究者将特定基因整合到干细胞基因组中。通过转染抗凋亡基因、促进微血管生成基因或敲除部分基因等增效干细胞干预 MF。研究证明 Nkx2.5、GATA-4、Mef2c 和 Tbx5 等基因转染 MSCs,可诱导干细胞定向分化为心肌细胞,可使 I 和 III 型胶原相关转录翻译减少,达到抗细胞凋亡和减轻 MF 的效果^[3]。而过表达的 SIRT1^[4]、整合素 $\beta 1$ ^[5] 等转染 MSCs 可以减少炎症因子(白介素-1 β , 白介素-6 和肿瘤坏死因子- α)和增加抗炎因子(转化生长因子- β 、碱性成纤维细胞生长因子),增加 Bcl-2、整合素连接激酶和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,增加干细胞存活率,促进微血管生成,减少梗死面积和纤维化面积。通过敲除 Mst1^[6]、Rab27a^[7] 等进行遗传消融修饰,可上调相关蛋白激酶活性,增强 MSCs 增殖和存活。

微小 RNA(mi-RNA)作为内源性非编码 RNA 分子可调节基因表达,它抑制炎症反应、减轻细胞损伤、促进血管生成、调节 MF。通过特定 mi-RNA 转染到干细胞中,诱导 mi-RNA 过表达,可以提高细胞动员。如常见的 miR-101a、miR-146a^[8]、miR-15 家族等。其中外泌体(Exosomes)作为细胞外泌囊泡的一种,携带重要 mi-RNA 和蛋白质,它可调节 mi-RNA 的表达、改善心功能,甚至可作为潜在无细胞治疗剂(如干细胞释放的外泌体)用于心脏修复^[9]。

目前通过干细胞基因遗传修饰治疗 MF,其中修饰基因表达相关组蛋白和 mi-RNA 是研究热点。同时,不同类型干细胞治疗 MF 的侧重点各不相同。而外源性诱导多功能干细胞(iPSC-MSCs)具有较强增殖能力;而 MSCs 则表现出更好地促血管活性及免疫抑制作用,其中骨髓来源 CD34⁺ 细胞和 CD31⁺ 也不尽相同^[10]。外源性干细胞(含其外泌体)具有更好的外分泌及修复心脏的能力^[11]。而内源性心脏干细胞如 c-kit(+)细胞在改善心功能效果上不显著^[12]。

1.2 干细胞培育条件的改变

低氧预处理是指在培养基中对干细胞进行类似梗死灶或者纤维化区低氧预适应,使干细胞移植后能够适应局部低氧、缺氧、灌注不足、缺血的微环境。研

究发现:适度短期低氧可以影响外泌体功能、调节炎症因子、提高增殖分化潜能、促进血管内皮细胞的生成。其中干细胞缺氧时间波动在 24 ~ 72 h,而低氧浓度控制在 0% ~ 5%^[13-15],可以增效抗凋亡基因 bcl-2 等的表达,抑制基质金属蛋白酶(MMP)、I 和 III 型胶原合成,增效抗纤维化。过氧化氢预处理 MSCs,2 ~ 5 d 后内皮细胞的密度明显增加,刺激微血管生成,与低氧处理干细胞类似。

在体外培养基添加或心内注射透明质酸^[16]等,不但增强干细胞迁移和活力,还可促使干细胞分泌更多的细胞因子、纳米囊泡和 mi-RNA,促使血管新生和心肌修复。而梓醇^[17]、骨形态发生蛋白 9^[18] 预处理 MSCs 可分别促进 VEGF、转化生长因子 β 分泌及微血管形成,上述预处理方法可有效减少干细胞损伤、促进 MSCs 增殖分化,增效 MSCs 干预 MF 的效力。

中药如丹参或大麻素受体 II 型激活剂^[19] 预处理干细胞,可减轻干细胞氧化应激损伤及细胞凋亡,增强细胞活力。

2 动员干细胞迁移至靶器官

外源性干细胞靶向能力较低,移植的 MSCs 归巢于受损心肌的数目较少。促进移植干细胞迁移和驻留是重中之重。当前研究发现,靶向注射 MSCs 及其载体、增加细胞间黏附作用和增效趋化因子等均可有效动员 MSCs 迁移至受损心肌。

有研究利用超声微泡携带基因(如生长分化因子 II(GDF II)^[20]、双特异性抗体^[21]或心脏归巢肽^[22]促进 MSCs 靶向到达受损心肌,增效干细胞归巢、分化,改善 MF 和瘢痕大小。

在缺血条件下增强细胞间或细胞基质间黏附作用,诱导细胞间骨架形成,介导 MSCs 增殖。VEGF 囊泡包裹 MSCs^[23]、心肌营养素-1^[24] 和佛波酯^[25] 预处理 MSCs,可分别增强趋化受体配体-1 的趋向性、增效蛋白激酶 C 介导的细胞间黏附作用,增加细胞间或细胞基质间黏附作用。研究还发现,趋化因子如单核细胞趋化蛋白-1、碱性成纤维细胞生长因子、血管细胞黏附分子 1 等均可增效干细胞迁移、聚集、归巢至心肌病受损处^[26]。

粒细胞集落刺激因子作为细胞因子的分类之一,除了可以诱导骨髓中粒系的聚集分化成熟,诱导趋化因子血管细胞黏附分子-1 和干细胞因子动员自身 MSCs 向梗死纤维化心肌处迁移、降解 MMP-2 和 MMP-9、重塑细胞外基质减轻 MF^[27],在此基础上,有研究证明糖化的粒细胞集落刺激因子有更强的促进

干细胞再生、改善 MF 的能力。

3 改善心肌微环境

无论是体外培育或直接注射到靶器官,干细胞的存活力均离不开微循环供氧供能及归巢后的微环境。而心肌梗死后的缺血缺氧微环境可能导致干细胞逃逸、凋亡、突变等^[28]。改善受损心肌微环境,可望提高干细胞存活力。

改善体外培育条件可选用 3D(无支架球状体)培养,其较普通 2D 培养能诱导分泌更多可溶性生长因子,改善细胞-细胞间或细胞-基质间相互作用,维持较好分化潜力、活力,增加干细胞植入病灶数量^[29]。目前可选用细胞水凝胶、脱细胞基质或合成基质可构建 3D 心肌微环境。目前基于支架培养干细胞,其中环状 RGDfK 肽藻酸盐支架、胶原支架^[30]等有高度抗蛋白酶性和非免疫原性,使干细胞尽可能保留在梗死灶,诱导微血管生成,改善缺血微环境。Waters 等^[31]研究证实,在受损心肌,干细胞的旁分泌效应较干细胞本身更能有效挽救缺血心肌。

同时在培养基中加入适宜浓度的细胞因子可以调节梗死灶细胞因子的失衡状态,如生长转化因子 $\beta 1$ 、肝细胞生长因子、缺氧诱导因子-1 等通过旁/自分泌途径促进自身及邻近细胞的存活^[32]。CTRP9 是一种新型细胞存活因子,与干细胞达到靶器官后的存活关系密切,而急性心肌梗死后 CTRP9 表达明显下调。CTRP9 联合干细胞治疗 MF 促进细胞迁移及维持靶器官健康微环境^[33]。

此外,某些药物可改善心肌微环境、辅助干细胞归巢。有研究证实他汀类药物可抑制炎症介质水平,改善干细胞生存环境;丹红等可促进微血管生成,增效抗凋亡基因的表达,介导干细胞的驻留,促进细胞增殖。

4 总结

综上所述,运用基因转染干细胞(优化种子)、动员迁移(促进播种施肥)、改善微环境(改良土壤)等措施,均可增效 MSCs 干预 MF。(1)优化种子:基因工程过表达抗凋亡基因、促进微血管生成基因等,增强 MSCs 的修复效果。各种预处理方法改善培育条件,提高细胞对氧化应激的耐受性,促进细胞增殖分化,提高干细胞存活率;(2)促进播种施肥:利用双特异性抗体、细胞间连接蛋白、培养基黏附作用等可以动员干细胞迁徙至靶器官,提高干细胞归巢率;(3)改良土壤:3D 培养、细胞因子等均可改善心肌微环境,进而提高干细胞活力及分化能力。

5 问题与展望

目前沸沸扬扬的“心脏 c-kit 干细胞撤稿事件”表明,干细胞疗法尚有许多不明之处。动物实验中,细胞疗法提高射血分数 $< 4\%$,其临床治疗效果仍需进一步的大型动物的转化研究^[34]。干细胞增殖、修复的争议处于柳暗花明之中,选择更合适的干细胞、最佳移植手段以及微环境改善等都需要我们进一步探索。干细胞疗法中,改善“种子”、“播种”和“土壤”,可望增效 MSCs 干预 MF 的效果。

参考文献

- [1] Thakker R, Yang P. Mesenchymal stem cell therapy for cardiac repair [J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2014, 16(7): 323.
- [2] Povsic TJ. Emerging therapies for congestive heart failure [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103(1): 77-87.
- [3] Tong YF. Mutations of NKX2.5 and GATA4 genes in the development of congenital heart disease [J]. *Gene*, 2016, 588(1): 86-94.
- [4] Ozawa H, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Sirtuin 1 regulates the stem cell therapeutic effects on regenerative capability for treating severe heart failure in a juvenile animal model [J]. *Ann Thorac Surg*, 2016, 102(3): 803-812.
- [5] Zeng B, Liu L, Wang S, et al. ILK regulates MSCs survival and angiogenesis partially through AKT and mTOR signaling pathways [J]. *Acta Histochem*, 2017, 119(4): 400-406.
- [6] Robertson A, Mohamed TM, El Maadawi Z, et al. Genetic ablation of the mammalian sterile-20 like kinase 1 (Mst1) improves cell reprogramming efficiency and increases induced pluripotent stem cell proliferation and survival [J]. *Stem Cell Res*, 2017, 20:42-49.
- [7] Hu M, Guo G, Huang Q, et al. The harsh microenvironment in infarcted heart accelerates transplanted bone marrow mesenchymal stem cells injury: the role of injured cardiomyocytes-derived exosomes [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 357.
- [8] Seo HH, Lee SY, Lee CY, et al. Exogenous miRNA-146a enhances the therapeutic efficacy of human mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor secretion in the ischemia/reperfusion-injured heart [J]. *J Vasc Res*, 2017, 54(2): 100-108.
- [9] Wernly B, Mirna M, Rezar R, et al. Regenerative cardiovascular therapies: stem cells and beyond [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1420.
- [10] Stempien-Otero A, Helterline D, Plummer T, et al. Mechanisms of bone marrow-derived cell therapy in ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist device bridge to transplant [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(14): 1424-1434.
- [11] Bagno L, Hatzistergos KE, Balkan W, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for cardiovascular disease: progress and challenges [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(7): 1610-1623.
- [12] van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, et al. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart [J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 337-341.
- [13] Zhu J, Lu K, Zhang N, et al. Myocardial reparative functions of exosomes from mesenchymal stem cells are enhanced by hypoxia treatment of the cells via transferring microRNA-210 in an nSMase2-dependent way [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(8): 1659-1670.
- [14] Bekhtie MM, Finkensieper A, Rebhan J, et al. Hypoxia, leptin, and vascular

- endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(4): 333-351.
- [15] Zhang Z, Yang C, Shen M, et al. Autophagy mediates the beneficial effect of hypoxic preconditioning on bone marrow mesenchymal stem cells for the therapy of myocardial infarction [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 89.
- [16] Kanda P, Alarcon EI, Yeuchyk T, et al. Deterministic encapsulation of human cardiac stem cells in variable composition nanoporous gel cocoons to enhance therapeutic repair of injured myocardium [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(5): 4338-4350.
- [17] Ju X, Xue D, Wang T, et al. Catalpol promotes the survival and VEGF secretion of bone marrow-derived stem cells and their role in myocardial repair after myocardial infarction in rats [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 18(5): 471-481.
- [18] Redgrave RE, Tual-Chalot S, Davison BJ, et al. Cardiosphere-derived cells require endoglin for paracrine-mediated angiogenesis [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(5): 1287-1298.
- [19] Han D, Li X, Fan WS, et al. Activation of cannabinoid receptor type II by AM1241 protects adipose-derived mesenchymal stem cells from oxidative damage and enhances their therapeutic efficacy in myocardial infarction mice via Stat3 activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(39): 64853-64866.
- [20] Zhou Y, Jiang Z, Harris EC, et al. Circulating concentrations of growth differentiation factor 11 are heritable and correlate with life span [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2016, 71(12): 1560-1563.
- [21] Deng W, Chen QW, Li XS, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells with CD47 high expression via the signal transducer and activators of transcription signaling pathway preventing myocardial fibrosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10555-10564.
- [22] Vandergriff A, Huang K, Shen D, et al. Targeting regenerative exosomes to myocardial infarction using cardiac homing peptide [J]. *Theranostics*, 2018, 8(7): 1869-1878.
- [23] Liu G, Li L, Huo D, et al. A VEGF delivery system targeting MI improves angiogenesis and cardiac function based on the tropism of MSCs and layer-by-layer self-assembly [J]. *Biomaterials*, 2017, 127: 117-131.
- [24] Bortolotti F, Ruozzi G, Falcione A, et al. In vivo functional selection identifies cardiostrophin-1 as a cardiac engraftment factor for mesenchymal stromal cells [J]. *Circulation*, 2017, 136(16): 1509-1524.
- [25] Singh RM, Cummings E, Pantos C, et al. Protein kinase C and cardiac dysfunction: a review [J]. *Heart Fail Rev*, 2017, 22(6): 843-859.
- [26] Kim Y, Park SJ, Chen YM. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF), a new player in endoplasmic reticulum diseases: structure, biology, and therapeutic roles [J]. *Transl Res*, 2017, 188: 1-9.
- [27] Huber BC, Beetz NL, Laskowski A, et al. Attenuation of cardiac hypertrophy by G-CSF is associated with enhanced migration of bone marrow-derived cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(5): 1033-1041.
- [28] Lim HS. Cardiogenic shock: failure of oxygen delivery and oxygen utilization [J]. *Clin Cardiol*, 2016, 39(8): 477-483.
- [29] Vidyasekar P, Shyamsunder P, Sahoo SK, et al. Scaffold-free and scaffold-assisted 3D culture enhances differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(2): 204-217.
- [30] Sondermeijer HP, Witkowski P, Seki T, et al. RGDfK-peptide modified alginate scaffold for cell transplantation and cardiac neovascularization [J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(9-10): 740-751.
- [31] Waters R, Alam P, Pacelli S, et al. Stem cell-inspired secretome-rich injectable hydrogel to repair injured cardiac tissue [J]. *Acta Biomater*, 2018, 69: 95-106.
- [32] Cho N, Razipour SE, McCain ML. Featured article: TGF-beta1 dominates extracellular matrix rigidity for inducing differentiation of human cardiac fibroblasts to myofibroblasts [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243(7): 601-612.
- [33] Yan W, Guo Y, Tao L, et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein-9 regulates the fate of implanted mesenchymal stem cells and mobilizes their protective effects against ischemic heart injury via multiple novel signaling pathways [J]. *Circulation*, 2017, 136(22): 2162-2177.
- [34] Fisher SA, Doree C, Taggart DP, et al. Cell therapy for heart disease: Trial sequential analyses of two Cochrane reviews [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2016, 100(1): 88-101.

收稿日期: 2018-09-19