综述

文章编号:1000-5404(2005)04-0366-03

骨髓基质细胞移植治疗缺血性心脏病

Therapy of ischemic heart diseases by transplantation of MSCs

张 坡,刘 伟 综述,黄 岚 审校 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037)

缺血性心脏疾病是对所有由于心肌供血供氧障碍而产生的心脏病症的总称,包括冠状动脉粥样硬化性心脏病,以及其它心脏疾病引发的心肌缺血。这些疾病共同特点是由于各种原因引起心肌血供发生障碍或心肌需氧增加超过了冠脉供血能力,从而使心肌发生缺血甚至坏死,严重损害心脏功能。尽管现有的内外科治疗手段可以改善冠脉血供,挽救缺血心肌,但对已坏死或无功能的心肌尚无办法。骨髓中存在一群具有多向分化潜力的干细胞,被称为骨髓间充质干细胞,目前,大量扩增人骨髓间充质干细胞而不丧失其多向分化能力的技术已逐渐完善,这些干细胞在修复因心肌缺血而破坏或丧失的心肌细胞方面有广阔的应用前景。应用干细胞移植入心脏,诱导分化为有功能的心肌组织替代坏死及无功能的心肌,已成为目前心肌细胞成形术研究的新方向。

1 骨髓基质细胞的生物学特性

骨髓中不仅存在生血球干细胞($CD34^+$ 干细胞),也能产生非造血组织干细胞($CD34^-$ 干细胞)。这些非造血组织粗略地被定义为间质,非造血组织干细胞被称为间充质干细胞(mesenchymal stem cells)或骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)。骨髓间充质干细胞是第一群从成体分离出的非造血干细胞,它易于粘附、易增殖使其在数次换液和传代后得到分离、纯化[1],有自我更新能力[2]和多向分化潜能[1]。将 MSCs 经静脉途径或局部注射移植到不同组织时,它们即可在相应的组织内分化形成该类组织细胞[3]。最初人们认为体外培养的 MSCs 形态表现为成纤维状或纺锤状[2],目前发现至少存在 3 种形态的 MSCs。Woodbury 等[4]发现以低密度种植的大鼠 MSCs 为大而扁平的细胞,当接近汇合时,它们转变为小的梭形细胞。Colter 等[5]从培养的人的骨髓细胞中分离出 MSCs 后,将它们以低密度种植在培养基中,5 d 后发现来自单细胞的克隆中除了含有小的梭形和大的扁平 MSCs 外,还有一种非常小的圆形细胞,这种小圆形细胞有更强的折光性,它们比大的 MSCs 能更快分裂、增殖,并且有更强的多向分化能力。

2 MSCs 诱导分化为心肌细胞

2.1 MSCs 在体外诱导分化为心肌细胞

虽然骨骼肌干细胞和胚胎干细胞均可作为心肌成形术的细胞供体,但骨骼肌干细胞在心肌内分化的不是心肌细胞,而是能够负担心脏工作的慢收缩细胞[6],且骨骼肌干细胞数量有限,难以大量采集。胚胎干细胞虽然也可向心肌分化,但存在取材困难和伦理学问题。Wakitani 等[7]报道用骨髓间充质干细胞体外诱导分化心肌细胞成功。随后,Hakuno 等[8]报道了用 5-氮杂胞苷体外诱导骨髓间充质干细胞生成的心肌细胞(CGM cells)表面有自主神经受体的表达。诱导分化前细胞表达 α1A、α1B 和 α1D 肾上腺素能受体,诱导后细胞表达 β1、β2 肾上腺素能受体和 M1、M2 毒蕈碱样受体。苯福林剂量依赖性诱导 ERK1/2 磷酸化作用,哌唑嗪能完全抑制这种作用。异丙肾上腺素能升高细胞 cGMP 浓度,普萘洛尔可抑制这种作用,选择性 β1 受体阻滞剂能明显减弱异丙肾上腺素引起的自律性增加,而选择性 β2 阻滞剂仅轻微抑制该作用。卡巴胆碱(拟胆碱药)使 IP3 增加,选择性 M2 阻断剂明显阻滞这种作用。异丙肾上腺素也引起细胞运动(cell motion)、缩短百分率、收缩速率增加。上述实验说明间充质干细胞诱导分化为心肌细胞后能够表达带有下游信号通路的有功能的自主神经受体。这也从分子神经生物角度说明间充质干细胞可在体外诱导分化为有功能的心肌细胞,为进一步体内诱导实验奠定了基础。

2.2 MSCs 在正常心肌组织内分化

骨髓间充质细胞能被用作细胞心肌成形术的细胞供体。Wang 等[9]报道植入正常心肌组织的 MSCs 在受体的心肌环境内生长良好,组织学检查可见间充质细胞向心肌细胞转化,表达肌节肌球蛋白重链、组织收缩蛋白、结合素 43(connexin 43),与受体心肌细胞间形成了润盘。说明骨髓间充质细胞在体内不仅可分化心肌细胞,还能够与正常心肌细胞间建立通讯联系。Toma 等[10]报道注入裸鼠左室的人骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞,其成熟心肌细胞特异蛋白表达水平同正常心肌细胞相似。因骨髓间充质细胞能通过骨髓穿刺反复取材,可在移植前大量体外扩增,并能用于自体移植,具有其它供体细胞无可比拟的优点。

2.3 MSCs 在急性心肌梗死组织内分化

Orlic 等[11]建立转基因鼠的急性心肌梗死模型后,立即在梗死边缘区(即通常所谓的"危险区")注射同种异体骨髓中分离的 Lin^- $c\text{-}kit^+$ 细胞,9 d 后检查发现来源于供体的细胞占梗死心室面积 68% 的新生心肌组织,这些新形成的组织由增殖的心肌细胞和血管结构组成。治疗鼠 LVEDP 降低了 36%,LVDP、LV + dp/dt 和 LV - dp/dt 分别增加了 32%、40% 和 41%。组织学检查显示移植细胞形成了新生心肌细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞,构成了包含冠状动脉、微动脉和毛细血管的心肌组织。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270568)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270568)
作者简介:张 坡(1973-),男,河南省社旗县人,硕士,医师,主要从事冠心病防治方面的研究。电话:(023)65208651
通讯作者:黄 岚,电话:(023)68755614
收稿日期:2004-08-18;修回日期:2004-11-20

通过冠状动脉移植间充质干细胞也能参与梗死心肌的修复[12]。表明间充质干细胞可通过冠脉系统运送到受损心脏。新鲜分离的、培养 7 d 和培养 7 d 并经 5-氮杂胞苷诱导分化的自体骨髓单个核细胞均可参与坏死心肌的再生，但是只有 5-氮杂胞苷诱导分化的骨髓间充质细胞移植组瘢痕面积缩小、厚度增加，心功能改善[1]。这一结果暗示朝向靶组织诱导分化后的骨髓骨髓间充质细胞或许更有助于损伤心肌的修复。

骨髓间充质干细胞的转分化需要两个至关重要的条件：组织损伤和足够量的干细胞。将 SP 细胞（$CD34^-$/low，c-kit^+，$Sca\text{-}1^+$）注入致死剂量照射的小鼠体内建立骨髓移植模型，移植后大约 10 周，建立受体鼠的缺血再灌注模型，2～4 周后的观察表明，在梗死心肌的边缘区出现了源于 SP 细胞的成熟心肌细胞和血管内皮细胞，假手术组小鼠心脏血管中未见 SP 来源的细胞[13]。骨髓间充质干细胞可能是感应到梗死局部产生的迁移、增殖、分化指令后参与组织再生的，具体途径很可能是 c-kit/SCF(stem cell factor)通路。Orlic 等[14]建立急性心肌梗死模型，用 GSF(granulocyte-colony stimulating factor)和 SCF(stem cell factor)动员间充质干细胞归巢到心肌梗死区域，增殖分化，最终促进了心脏的修复。这预示有可能通过非侵入性方法修复缺血性心脏病中死亡心肌。

利用骨髓间充质干细胞重建梗死心肌的人体实验也取得了重大突破。德国临床医生 Strauer 等[15]给 1 例急性左前降支闭塞的透壁性心肌梗死患者行 PTCA 加支架治疗后即抽取病人骨髓分离单个核细胞体外培养扩增，在第 6 天通过经皮导管将细胞低压输入梗死相应动脉，输注后 10 周，SPECT(单光子放射计算机断层显像术)、右心导管术、多巴酚丁胺负荷超声心动图、放射性核素心室造影等多种检查证实梗死面积减小，心功能明显改善。未见不良反应和其它并发症。初步显示了骨髓间充质干细胞自体移植的临床可行性和安全性，为干细胞治疗迈向临床跨出了一大步。但该例是个案报道，未获取移植细胞在人体内分化为心肌细胞的组织学证据，也未明确疗效与细胞移植之间的关系。

3　MSCs 诱导分化为血管内皮细胞

Shintani 等[16]报道采用密度梯度离心分离兔骨髓细胞体外诱导分化后，贴壁细胞形成了条索样和网状结构，表达内皮细胞特异抗原 vWF(von willebrand factor)和 ulex europaeus lectin binding，能摄取 acLDL(acetylated low density lipoprotein)和释放 NO(nitric oxide)，能够促进体内缺血部位新生血管生成。Orlic 等[11]报道了植入小鼠梗死心肌边缘区 MSCs 表达因子Ⅷ或平滑肌肌动蛋白，发育成了血管内皮细胞和血管平滑肌细胞，参与毛细血管和小动脉的形成。Jackson 等[17]报道了从骨髓分离的 $CD34^-$ c-kit^+ $Sca\text{-}1^+$ 细胞有助于血管再生。Reyes 等[18]报道骨髓中 $CD34^-$ VE-$cadherin^-$ $AC133^+$ $Flk1^+$ 的细胞用 VEGF 培养后可分化成 $CD34^+$ VE-$cadherin^+$ $Flk1^+$ 细胞，并继续向有功能的成熟内皮细胞分化，在体内有助于伤口愈合过程中新生血管形成，在体内有助于伤口愈合过程中新血管生成，在超过 80 倍的群体倍增后没有明显的细胞衰老，使它们在促进缺血部位新血管生成中具有易于大量获取的优点。

4　干细胞移植治疗缺血性心脏病面临的问题

干细胞技术的飞速发展为缺血性心脏疾病的治疗开辟了新的道路，但目前的研究成果尚不能满足建立一种完整治疗方法的需要。

首先，骨髓间充质细胞虽然提取方便且可通过自体移植避免排斥反应，但骨髓干细胞成分复杂，目前仍未明确哪类干细胞具有专项分化心肌的能力，细胞培养扩增技术、移植成活率及分化情况仍不能令人满意。

其次，尚未明确应用干细胞治疗缺血性心脏病的具体适应证。现有动物实验模型为急性心肌缺血或心肌冻伤模型，但干细胞移植治疗需要相对较长的准备时期，与临床上急性心肌缺血病患的实际情况存在矛盾。而慢性缺血模型目前尚无满意的研究结论。

第三，导入干细胞途径尚需进一步探索。心肌内直接注射、体循环注射或冠脉内注射均为可供选择的途径，目前仍没有表明哪种途径更适合损伤心肌的修复、存在更少的并发症。

最后，干细胞移植后对机体的远期影响尚未明确。移植后是否产生无法控制的细胞分化增殖，导致肥厚性心肌病、心律失常甚至引起肿瘤等问题需进一步研究解决。

5　前景展望

干细胞移植治疗缺血性心脏疾病已成为心血管领域研究的热点。应用骨髓间充质干细胞移植缩小心肌梗死的范围，限制梗死灶的扩大，增加瘢痕强度，替代梗死心肌，阻止梗死后心肌重构，改善心脏功能，结合组织工程技术开发人造血管、瓣膜、心脏及更适合人体生理特点的房室间隔缺损修补物，从而为人类征服心肌梗死、终末期心功能不全、心脏瓣膜病及先天性心脏病提供强有力的工具。

关键词：骨髓基质细胞；移植；缺血性；心脏疾病
中图法分类号：R542.205　　**文献标识码**：A

参考文献：

[1] Prockoop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue [J]. Science, 1997, 276(5309): 71－74.

[2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143－147.

[3] Gao J, Dennis J E, Muzic R F, *et al*. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion[J]. Cells Tissues Organs, 2001, 169(1): 12－20.

[4] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, *et al*. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. Neurosci Res, 2000, 61(4): 364－370.

[5] Colter D C, Sekiya I, Prockop D J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(14): 7841－7845.

[6] Murry C E, Wiseman R W, Schwartz S M, *et al*. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis[J]. J Clin Invest, 1996, 98

(11): 2512-2523.

[7] Wakitani S, Saito T, Caplan A I, *et al*. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1417-1426.

[8] Hakuno D, Fukuda K, Makino S, *et al*. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes(CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors[J]. Circulation, 2002, 105(3): 380-386.

[9] Wang J S, Shum-Tim P, Galipeau J, *et al*. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 120(5): 999-1005.

[10] 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.

[11] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al*. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. Nature, 2001, 410(6829): 701-705 .

[12] Wang J S, Shun-Tim D, Chedrawy E, *et al*. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 122(4): 699-705.

[13] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[14] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al*. Mobilized bone marrow cells repair the infaracted heart, improving function and survival[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(18): 10344-10349.

[15] Strauer B E, Brehm M, Zeus T, *et al*. Intracoronary human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2001, 126(34-35): 932-938.

[16] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, *et al*. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation[J]. Circulation, 2001, 103(6): 897-903.

[17] Jackson K A, Majka S M, Wang H, *et al*. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells[J]. J Clin Invest, 2001, 107(11): 1395-1402.

[18] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, *et al*. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow[J]. J Clin Invest, 2002, 109(3): 337-346.

(编辑 陈聪连)

(上接360页)

植入性胎盘根据植入子宫肌层的深度分为侵入性胎盘和穿透性胎盘，其发病多与子宫蜕膜缺损、创伤、发育不良等有关。由于胎盘植入处子宫肌层薄弱，当宫内压力增加时，变薄的宫壁承受不了不断增加的压力而破裂，破口位于胎盘附着部最薄弱处。本例患者术中，行胎盘人工剥离时发现植入，且子宫破口正好在植入部中央，属穿透性胎盘。穿透性胎盘未发生腹腔内出血前均无明显临床表现，难于诊断，其体征不同于完全性子宫破裂。通常子宫轮廓清楚，羊膜囊完整，胎体仍在子宫腔内，仅子宫浆膜穿透部位活动性出血，引起腹膜刺激征，临床上易误诊为隐性胎盘早剥及肝脾破裂、急性阑尾炎等外科急腹症。因此在鉴别诊断上要加以重视，特别是妊娠期子宫增大，阑尾位置改变，给妊娠是否合并急性阑尾炎诊断带来了困难，穿透性胎盘发生胎盘后血肿的可能性非常小，即使有，血肿也在反复少量出血过程中缩小甚至消失。本例患者首诊于泌尿外科，以输尿管结石收入院，且曾用杜冷丁止痛抑制了宫缩，是以其合并症掩盖了病情。

在母儿预后方面，无创伤性子宫破裂母亲死亡率为13.5%，胎儿的死亡率为76%[2]。因此，能否早期诊断对母儿的预后有极大的影响，尤其对妊娠晚期的胎儿，能减少其失血量，提高成活率。一旦发现孕妇有低血压、腹痛和胎儿宫内窘迫，无论其产次和孕次如何，均应考虑有自发性子宫破裂的可能；迅速明确诊断，补充血容量和紧急剖腹探查是救治成功的关键。本例孕妇术前在12 h之内两次血常规有明显变化，WBC升高、RBC、Hb下降，并不能完全用阑尾炎解释，若能及时考虑到有子宫破裂，就可能减少患者的失血量，改善其病情和预后。近年来，在英文文献中介绍了几种早期辅助诊断穿透性胎盘的方法，包括经阴道和腹部彩色多普勒超声检查、MRI以及孕妇血清甲胎蛋白和肌酐激酶；特别提出血清中异常增高的甲胎蛋白和肌酐激酶可能作为妊娠期提示穿透性胎盘的生化指标，值得我们进一步探讨[3,4]。

处理方式上，穿透性胎盘因病情隐匿，破裂后暴露时间长，出血较多，感染的机会较大，多以子宫切除告终[5]。本例胎盘植入部位位于右侧宫角处，面积小，发现早，考虑合并感染的机会不大，仅予右侧宫角切除，保留了子宫，从而保留了生育能力，防止切除子宫后的绝经等症状，从生理和心理上减轻了患者的痛苦。

另外值得一提的是，逐年增加的剖宫产率已成为再次妊娠胎盘植入的首要高危因素，不能不引起产科医师的重视。

关键词：子宫破裂；穿透性胎盘植入；晚孕

中图法分类号：R711.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] deRoux S J, Prendergast N C, Adsay N V. Spontaneous uterine rupture with fatal hemoperitoneum due to placenta accreta percreta: a case report and review of the literature[J]. Int J Gynecol Pathol, 1999, 18(1): 82-86.

[2] John E. Turrentine, Clinical Protocols in Obstetrics and Gynecology: Uterine Rupture[M]. 2th ed. New York: CRC Press-Parthenon Publishers, 2003. 389.

[3] Morken N H, Henriksen H. Placenta percreta-two cases and review of the literature[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001, 100(1): 112-115.

[4] LeMaire W J, Louisy C, Dalessandri K, *et al*. Placenta percreta with spontaneous rupture of an unscarred uterus in the second trimester[J]. Obstet Gynecol, 2001, 98(5 Pt 2): 927-929.

[5] 黄开秀. 1例中期妊娠引产致子宫破裂患者的抢救和护理[J]. 局解手术学杂志, 2004, 13(2): 129.

(编辑 薛国文)