

·综述·

心脏干细胞移植与心脏康复

李咏雪¹ 励建安^{1,2}

心肌缺血和心肌细胞损害导致心力衰竭是各种晚期心脏病的共性问题^[1]。从临床与康复的角度,改善心肌缺血和修复心肌是治疗心脏疾病的重要目标。1994年,Soonpaa^[2]首次发现将小鼠胚胎干细胞移植到成年小鼠发生梗死的心肌中,能够存活并能限制瘢痕发展,预防梗死后心衰的发生。2001年,德国杜赛尔大学医学院^[3]首次对急性心肌梗死患者进行自体骨髓干细胞(bone marrow stem cells, BMSC)移植,10周后心功能得到明显改善。2003年,美国食品和药品管理局批准BMSC实验性治疗急性心肌梗死。国际上干细胞移植已经进入心肌梗死、扩张型心肌病等疾病的临床研究,给心脏疾病的治疗与康复带来了新的希望^[4-5]。本文综述目前干细胞移植研究的焦点问题。

1 心脏干细胞的移植途径

干细胞移植途径是临床应用的首要瓶颈。目前的途径包括静脉注射、冠状动脉注射、心内膜注射、心外膜直视注射和干细胞自体动员^[6]。

1.1 静脉注射

最简单的移植方法,缺点是细胞传递是非选择和非定向,必须经血液循环才能到达靶区,因此会使较多干细胞滞留于外周组织。Barbash等^[7]研究间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)移植治疗大鼠心肌梗死的可行性、细胞的迁移和体内分布情况,取鼠骨髓的MSC通过静脉注射植入39只心肌梗死鼠模型,4小时后进行伽玛相机成像和分离组织细胞计数,发现只有1%的MSC到达心肌缺血区。此外,干细胞经静脉注射早期主要滞留于肺内,并在肺循环中被大量破坏,即所谓的首过效应,故移植效率低下^[8]。

1.2 冠状动脉注射

通过冠状动脉导管注射细胞,由于炎性细胞的浸润和炎症介质的参与可导致梗死区毛细血管的通透性增加,使干细胞易于透过毛细血管壁进入心肌组织,从而为干细胞的归巢提供较好的条件^[9]。Wollert等^[10]进行心肌梗死患者的随机对照试验,细胞移植组30例(接受常规梗死治疗+冠状动脉注射BMSC)和对照组30例(接受常规梗死治疗),6个月后发现对

照组左室射血分数增加0.7%,而细胞移植组增加6.7%,同时左心室梗死区附近心肌收缩力增强。Freyman等^[11]从猪骨髓中抽取MSC进行培养,然后通过三种途径植入心肌梗死猪模型中,14天后发现经冠脉注射梗死区域干细胞有6%的储留率,而经心肌内注射和静脉注射组分别只有3%和0%。但对于晚期缺血性心脏病患者,干细胞无法通过增厚的冠状动脉壁,此途径可能不适用。此外注射所需的心导管价格昂贵,不利于反复注射。

1.3 心内膜注射

使用电机械导航系统将干细胞经冠状动脉系统直接由心内膜注入失活心肌组织^[6],可准确地将干细胞注射到缺血心肌,但可能损伤正常心肌及引起心律失常甚至心脏破裂。Strauer等^[12]对10例急性心肌梗死患者常规治疗后,在球囊扩张过程中经心内膜注射自体骨髓单个核细胞到梗死区;另10例患者采取单纯的常规疗法。3个月随访发现细胞移植组的梗死区比对照组显著减少,梗死室壁运动速度显著增加及心搏量指数显著改善;但是同时发现这种途径可导致岛样效应,限制移植细胞与宿主间电—机械偶联的形成。Fukushima等^[13]对左冠状动脉结扎3周后的野生雌性大鼠,通过心内膜注射和冠脉注射骨髓单个核细胞,发现心内膜注射比经冠脉注射心律失常的发生率高。

1.4 心外膜直视注射

在冠状动脉搭桥术时直接将干细胞注射至梗死灶边缘,定位性最好。Stamm等^[14]给40例慢性缺血性心脏病患者进行两种治疗,细胞移植组(冠状动脉搭桥术的同时心外膜注射CD133+骨髓细胞)和对照组(单纯冠状动脉搭桥术),6个月后细胞移植组左心射血分数高于对照组,梗死心肌灌注的改善更明显。但这种途径所需的开胸手术创伤性较大,难以反复注射,远期疗效并未显示出优越性。

1.5 干细胞自体动员

通过某种刺激因子促进自身干细胞的动员,将干细胞“驱赶”到外周血中,利用干细胞自发地向损伤组织归巢,并在特定的组织微环境作用下落户于缺血心肌,分化为受损细胞的特性,达到心肌修复和侧支循环形成的作用^[15]。目前动

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.11.027

1 南京医科大学第一附属医院康复医学科,南京,210029; 2 通讯作者
作者简介:李咏雪,女,硕士研究生; 收稿日期:2011-02-15

物实验和小样本临床实验初步证实此方法的有效性,其治疗机制可能包括动员、归巢和分化三个核心环节。

干细胞自体动员最常用的动员剂是粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)^[16],临床上主要用于造血干细胞移植及粒细胞减少症的一种造血因子。G-CSF可以把造血干细胞和内皮祖细胞从骨髓中动员到外周血循环,因而具有治疗心肌梗死的潜力。Orlic等^[17]应用干细胞因子(stem cell factor, SCF)和G-CSF动员小鼠BMSC,观察到实验组小鼠心脏新生心肌细胞和新生血管多于对照组,且心功能改善明显,提示BMSC自体动员治疗可能达到BM-SC体外移植治疗的效果。但是近年有学者认为此方法有增高冠状动脉病变进展、再狭窄发生率及心律失常发生率的风险^[18]。Kang等^[19]把27例已经置入冠脉支架的心肌梗死患者分三组(干细胞输入组、G-CSF输入组和对照组)进行研究,6个月后发现G-CSF输入组左心收缩功能虽改善,但再狭窄的发生率增加。

Kentaro等^[20]通过对心肌梗死的小鼠持续输注AMD3100(CXCR4的小分子的拮抗剂),1—2周后检测到外周血CD38表达增加。结果显示可增强骨髓源性内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的动员,增加梗死后循环EPCs数量和心肌血管,减少纤维化,从而提高新生血管形成和心肌梗死后心脏功能恢复。研究结果提示AMD3100具有通过自体动员EPCs来治疗心肌梗死的潜力。有学者提出雌激素可以促进MSC的激素生成和动员EPCs进入缺血心肌,能有效加强心肌缺血边缘地带的血管新生,并限制心肌细胞的非正常生长^[21]。

2 移植细胞的存活与分化

干细胞移植后难以存活或存活率低,分化后细胞不一定达到满意的功能,这些问题都需要面对和解决。

2.1 移植细胞的存活

王业焕等^[22]选取10只雌性SD大鼠结扎前降支,心肌梗死3周后,随机分成细胞移植组和对照组。将含有由雄性大鼠培养出的MSC(3×10^6 个)的磷酸盐缓冲液50 μ l注入细胞移植组的梗死心肌,等体积的磷酸盐缓冲液注入对照组梗死心肌。24小时后通过实时定量PCR检测雄性大鼠Y染色体上特有的基因SRY,发现细胞移植组梗死心肌SRY基因数占移植总数的 $14.9\% \pm 8.3\%$,存活细胞的绝对数量为 447195 ± 248090 ,而对对照组未检测到SRY基因。

为了研究干细胞心脏移植后急性期在体内的分布和在心脏内的滞留数量,有学者从急性心肌梗死模型猪中抽取骨髓20ml,分离骨髓单个核细胞后用放射性核素¹⁸F-氟代脱氧葡萄糖(¹⁸F-FDG)体外标记,然后心肌内直接注射入梗死区。在不同时间进行全身平面显像和心肌断层显像,结果发

现骨髓单个核细胞在即刻、1h、2h和3h在梗死区的滞留比例分别为 $83\% \pm 6\%$ 、 $49\% \pm 8\%$ 、 $32\% \pm 6\%$ 和 $24\% \pm 5\%$ ^[23]。

2.2 移植细胞的分化

移植的干细胞需要通过合理的分化诱导,才能成为我们需要的功能细胞,包括心肌细胞、血管内皮细胞等。但是目前尚不清楚特定的诱导因子。有研究^[24]提示胰岛素样生长因子-1、肝细胞生长因子、骨形态发生蛋白-2等细胞因子可通过与其受体结合,激活PI3-K/Akt信号转导途径,从而介导干细胞在移植微环境中的存活,有利于移植干细胞向心肌分化。

虽然干细胞可以诱导分化为心肌细胞,但分化效率有待提高。Xu等^[25]在胚胎干细胞诱导培养体系中加入5-氮胞苷,可以增加心肌细胞的分化效率,percoll梯度离心纯化的心肌细胞也具有旺盛的增殖能力。袁岩等^[26]通过向MSC培养体系中添加心肌细胞裂解液,体外模拟心肌微环境,发现心肌细胞裂解液是体外诱导干细胞分化为心肌样细胞的理想条件,优于传统的5-氮胞苷,可用于体外模拟心肌细胞微环境。Xaymardan等^[27]对心肌梗死模型鼠进行骨髓干细胞移植,对照组单纯注射干细胞,实验组还同时注入血小板衍生生长因子-AB(PDGF-AB),结果实验组的心功能改善更明显,证明PDGF-AB可以促进成体骨髓干细胞向心肌细胞分化。有学者提示转化生长因子 β (TGF- β)、骨形态发生蛋白(BMP)、Wnt家族蛋白(Wnt families)、成纤维细胞生长因子(FGF)以及全反式维甲酸(RA)、维生素C、二甲基亚砜(DMSO)和垂体内叶素等相关因子可以促进胚胎干细胞分化为心肌细胞,提高心肌细胞的分化效率^[28]。

3 安全性问题

随着干细胞移植治疗心脏疾病研究的不断深入,其安全性成为该研究领域的新问题。

3.1 诱发心律失常

Menasche等^[29]对10例梗死后严重左心功能不全的患者进行自体骨骼肌干细胞移植,其中4例发现延迟的持续性室性心动过速发作并需植入除颤器。Siminiak等^[30]对心肌梗死患者移植骨骼肌干细胞,术后早期和随访2周后各有2例患者出现持续性室性心动过速。恶性心律失常见于骨骼肌成肌细胞的移植,可能是由缺乏有效的电—机械偶联,产生异位兴奋点导致。Zhang等^[31]实验发现源于小鼠多能胚胎干细胞和胚胎瘤的心肌细胞分化成至少3种动作电位表型的心肌细胞,具有自发电活动,动作电位时程延长,易诱发早期后除极和延迟后除极等触发性心律失常,提示应用多能胚胎干细胞移植有致心律失常危险。

3.2 血管再狭窄

Steinwender等^[32]对冠状动脉支架植入后的急性心肌梗死患者经冠状动脉移植外周血干细胞,随访6个月发现支架

内再狭窄和再梗死的发生率明显增加。陈晓春等^[33]用经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)导管扩张大鼠胸腹主动脉创建动脉损伤模型,经主动脉移植MSC,发现MSC可归巢到严重受损的主动脉内膜上,并分化为平滑肌样细胞,参与新生内膜的形成,加重大鼠血管成形术后再狭窄的程度。

4 运动刺激干细胞动员

由于干细胞外源性移植的不良反应及内源性移植的动员剂存在一定安全问题,那么一种不使用动员剂也能达到干细胞自体动员效果的治疗方法是极具潜力的。运动训练是康复治疗的基本方法,也是心血管病治疗的有机组成部分。

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,属于骨髓干细胞的一种,参与出生后的血管新生过程^[34]。成人EPCs主要存在于骨髓,生理状态下外周血液EPCs的数量很少。在组织缺血状态下,EPCs可从骨髓释放进入外周血循环,通过归巢机制至靶器官,产生促进血管新生的作用^[35]。Adams等^[36]对16例冠心病患者和11名健康人进行诱发心肌缺血的运动训练,12例患者不接受训练;发现运动训练可以诱发心肌缺血,并通过流式细胞技术检测到运动的患者外周血EPCs数量显著增加,24—48h达到高峰;而健康人和不运动的患者EPCs不增加。提示适宜的运动训练可以促进内源性EPCs释放和刺激其动员,促进血管新生,这对心脏疾病患者将是一条全新安全有效的治疗和康复途径,因此运动训练在刺激干细胞动员方面值得关注和深入研究。

参考文献

- [1] Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data[J]. Lancet, 2006, 367(9524):1747—1757.
- [2] Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium[J]. Science, 1994, 264(5155):98—10.
- [3] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Stem cell therapy in acute myocardial infarction[J]. Med Klin(Munich), 2003, 98(2):14—18.
- [4] Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines[J]. Circulation, 2001, 104(9):1046—1052.
- [5] Ishida M, Tomita S, Nakatani T, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy[J]. J Heart Lung Transplant, 2004, 23(4):436—445.
- [6] LaPar DJ, Kron IL, Yang Z. Stem cell therapy for ischemic heart disease: where are we[J]? Curr Opin Organ Transplant, 2009, 14(1):79—84.
- [7] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the in-

- fected myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution[J]. Circulation, 2003, 108(7):863—868.
- [8] Davani S, Deschaseaux F, Chalmers D, et al. Can stem cells mend a broken heart?[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(2):305—316.
- [9] Assmus B, Honold J, Schächinger V, et al. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2006, 355(12):1222—1232.
- [10] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial[J]. Lancet, 2004, 364(9429):141—148.
- [11] Freyman T, Polin G, Osman H, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2006, 27(9):1114—1122.
- [12] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans[J]. Circulation, 2002, 106(15):1913—1918.
- [13] Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model[J]. Circulation, 2007, 115(17):2254—2261.
- [14] Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 133(3):717—725.
- [15] 蒋文慧, 马爱群. 骨髓干细胞动员治疗缺血性心脏病研究进展[J]. 中国循环杂志, 2003, 18(3):237—239.
- [16] 李占全, 张明, 金元哲, 等. 粒细胞集落刺激因子动员自体外周血干细胞移植治疗急性心肌梗死的临床研究[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(2):99—102.
- [17] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(18):10344—10349.
- [18] Kang HJ, Kim YS, Koo BK, et al. Effects of stem cell therapy with G-CSF on coronary artery after drug-eluting stent implantation in patients with acute myocardial infarction[J]. Heart, 2008, 94(5):604—609.
- [19] Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial[J]. Lancet, 2004, 363(9411):751—756.
- [20] Jujo K, Hamada H, Iwakura A, et al. CXCR4 blockade augments bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(24):11008—11013.
- [21] Sun H, Wang H, Hu S. Effects of estrogen on diverse stem cells and relevant intracellular mechanisms[J]. Sci China Life Sci, 2010, 53(5):542—547.
- [22] 王业焕, 张浩, 袁昕, 等. 实时定量PCR法检测骨髓间充质干细胞移植到梗死心肌后的存活数量[J]. 温州医学院学报, 2009, 39(4):358—360.
- [23] 沈悦, 钱盛, 刘海燕, 等. 核素标记自体骨髓单个核细胞监测心脏干细胞移植后存活情况[J]. 中华心血管病杂志, 2010, 38(6):545—548.

- [24] 国海东,谭玉珍,王海杰.细胞因子在干细胞移植存活与分化中的作用[J].国际心血管病杂志,2007,34(1):23—26.
- [25] Xu C, Police S, Rao N, et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells[J]. Circ Res, 2002, 91(6):501—508.
- [26] 袁岩,陈连凤,张抒扬,等.心肌细胞裂解液对骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化诱导作用的研究[J].中华心血管病杂志,2005,33(2):170—173.
- [27] Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, et al. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes[J]. Circ Res, 2004, 94(5):E39—45.
- [28] Singla DK, Sobel BE. Enhancement by growth factors of cardiac myocyte differentiation from embryonic stem cells: a promising foundation for cardiac regeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(3):637—642.
- [29] Menasché P, Hagège AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(7):1078—1083.
- [30] Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up[J]. Am Heart J, 2004, 148(3):531—537.
- [31] Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, et al. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential[J]. Circulation, 2002, 106(10):1294—1299.
- [32] Steinwender C, Hofmann R, Kammler J, et al. Effects of peripheral blood stem cell mobilization with granulocyte-colony stimulating factor and their transcatheter transplantation after primary stent implantation for acute myocardial infarction[J]. Am Heart J, 2006, 151(6):1296.e7—13.
- [33] 陈晓春,单鸿伟,瞿海龙,等.骨髓间充质干细胞移植加重大鼠主动脉血管成形术后狭窄程度[J].中华心血管病杂志,2007,35(9):802—806.
- [34] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk[J]. N Engl J Med, 2003, 348(7):593—600.
- [35] Möbius-Winkler S, Höllriegel R, Schuler G, et al. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease[J]. Cytometry A, 2009, 75(1):25—37.
- [36] Adams V, Lenk K, Linka A, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(4):684—690.

·综述·

脑缺血大鼠康复干预方法的研究进展

唐 强¹ 朱路文²

脑缺血是发病率、致残率和致死率高的常见神经系统疾病,存活下来的患者大都存在肢体功能障碍,严重影响了日常生活能力。随着人们对康复认识不断提高,越来越多康复方法应用到临床,有关各种康复方法的疗效及机制的动物实验研究逐渐增多。本文对当前动物实验中所采用的康复方法进行了综述和分析,以期对脑缺血动物实验的康复干预方法的选择和制定提供参考。

1 传统康复方法

传统康复方法主要包括针灸、推拿等,研究最多的是电针、头针等。在观察电针对急性局灶性脑缺血(MCAO)模型大鼠的影响中,张爱武等^[1]以1寸毫针(直径0.3mm,长25.0mm)斜刺外关、三阴交,直刺内关、后三里,针刺后连接G6805.2B型低频电子脉冲刺激仪(上海产),疏密波(疏波30Hz,密波100Hz),强度为1—2mA,以实验大鼠肢体轻轻抖动及耐受为度,留针时间30min,每天1次,连续治疗6d为1

个疗程,每疗程中间休息1d。发现是电针刺激能调节Ephrin-A5表达,从而促进神经树突棘可塑性,加快受损神经功能恢复。

在观察头针促进脑缺血后神经功能恢复方面,倪金霞等^[2]采用头穴丛刺法,取百会穴及百会左、右侧各旁开4mm处针刺,快速捻转1min后留针30min,每日2次。结果显示:急性脑梗死大鼠经头穴丛刺治疗后,皮质、海马部位梗死周边区可见多个神经元呈棕黄色染色,皮质及海马NGF的数目与造模组皮质及海马比较,差异有显著性意义,表明头穴丛刺治疗能诱导急性脑梗死大鼠神经生长因子(nerve growth factor, NGF)表达,从而减轻缺血对神经元的损害,保护和修复神经细胞。

2 运动功能训练

目前运动功能训练在探讨康复作用机制实验中应用最为广泛,主要包括可量化型和非量化型。通过这些训练可明

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.11.028

1 黑龙江中医药大学附属二院,哈尔滨,150001; 2 黑龙江中医药大学

作者简介:唐强,男,教授,博士生导师; 收稿日期:2011-01-24