

间充质干细胞的生物学特性及心血管修复潜能的研究进展

李 琼^{1,2} 张 珉³ 郭志坤^{1*} 李 和²

(¹新乡医学院, 河南省高等学校组织再生重点开放实验室, 新乡 453003; ²华中科技大学同济医学院人体解剖学与组织胚胎学系, 武汉 430030; ³河南省肿瘤医院肝胆胰外科, 郑州 450008)

摘要 间充质干细胞存在于成体组织中, 来源于骨髓、脂肪组织等, 在体外易分离和培养, 是具有塑料粘附性的一群非均质细胞。它们具有分化的潜能, 在适当的条件下可分化为心肌和血管。临床前期研究显示, 在心脏损伤模型中移植间充质干细胞有利于心肌修复和心血管形成。其作用机制与间充质干细胞再生和旁分泌能力密切相关。在临床应用中, 间充质干细胞具有免疫抑制作用, 也可用于异体移植。总之, 虽然间充质干细胞的研究尚有许多问题亟待解决, 但是它在心脏疾病的细胞治疗和组织工程中已显示出广阔的前景。

关键词 心肌生成; 血管生成; 间充质干细胞; 心脏疾病

目前, 缺血性心脏病和心力衰竭在世界范围内有着较高的发病率, 其导致的死亡占心血管系统疾病死亡率的50%以上。这些疾病中针对缺血和非缺血性损伤, 心肌会出现病理性的重建, 该损伤过程的中心环节是心肌细胞的死亡以及心肌组织的功能丧失^[1]。尽管临床上针对缺血性心脏病和心力衰竭有多种治疗方法, 但是由于心肌再生能力十分有限, 常规疗法很难用新生的具有收缩功能的细胞来替代死亡的心肌细胞和心肌疤痕, 因而, 不能从根本上治愈该类疾病。目前, 随着细胞工程和心脏组织工程研究的发展, 新的治疗方法不断涌现, 如基因疗法、细胞疗法等, 给缺血性心脏病和心力衰竭的治疗带来了新的曙光。

近十年来, 随着干细胞技术的发展, 多种胚胎和成体来源的干细胞以及诱导多功能干细胞(iPS细胞)逐步应用于心脏疾病的治疗, 并且已经在体内外的基础研究以及临床试验中取得了很大进展。胚胎干细胞为全能干细胞, 但在实际应用中由于涉及伦理学等问题而受到限制。2001年, Beltrami等^[2]在成年大鼠心内分离出Lin⁻C-kit⁺细胞, 首次提出了心肌干细胞的概念。2003年, Oh等^[3]在成年小鼠心脏组织内发现另外一种Scal-1阳性干细胞。心肌组织内干细胞数量较少, 对心肌再生基本不起作用。Ieda等^[4]通过在成纤维细胞中植入特定的*Gata4*、*Mef2c*和*Tbx5*

基因, 成功培育出心肌细胞。与利用iPS细胞培育的心肌细胞相比, 这种方法更加安全、简捷。心肌干细胞、iPS细胞和成纤维细胞重编程的心肌细胞, 用于心肌疾病的治疗尚处于理论研究阶段。目前, 临床应用较多的是成体来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 其来源非常广泛, 骨髓来源的MSCs研究最早最多, 同时脂肪来源的MSCs由于其来源充足、获取简单、对患者损伤小等优点, 成为研究热点。本文主要对骨髓与脂肪来源的MSCs生物学特性和心血管修复潜能的研究现状及进展进行综述。

1 MSCs的发现

20世纪70年代, Friedenstein首次鉴定了多能前体基质细胞, 该细胞是从骨髓中分离取得, 并且其单层培养的克隆细胞呈纺锤形, 因此, 将该细胞定义为成纤维细胞样的集落形成单位(CFU-Fs)。其后期研究表明, 来源于基质细胞的CFU-Fs, 可作为造血干细胞(HSCs)的营养层, 在体外和体内转移后均可分化为脂肪细胞、软骨细胞和骨细胞。然而, 在骨髓中,

收稿日期: 2011-06-26 接受日期: 2011-10-17

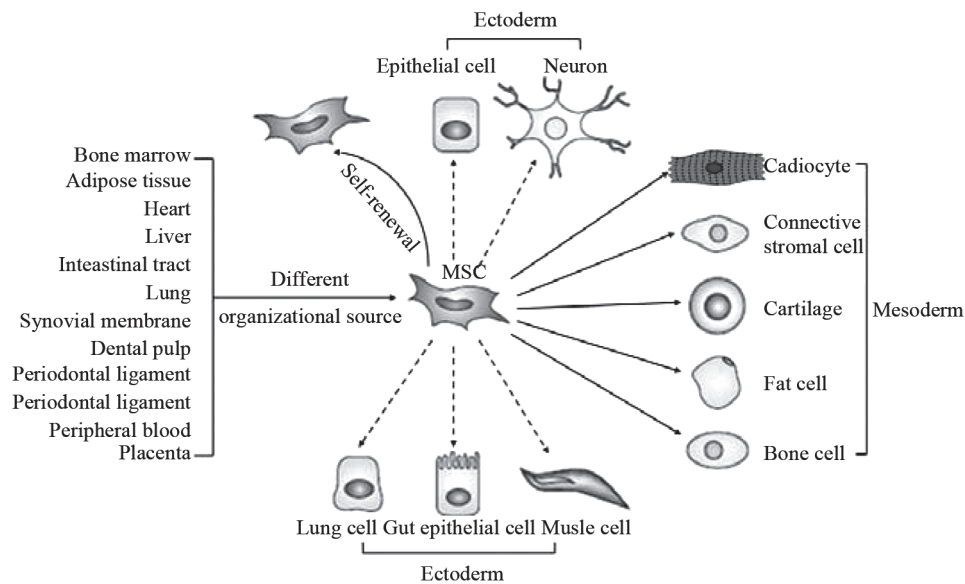
河南省杰出人才计划(No.084200510020)资助项目

*通讯作者。Tel: 0373-3831862, Fax: 0373-3831862, E-mail: gzk@

xxmu.edu.cn

基质细胞数量很少,而且呈现为不均质的细胞群,该细胞群由中胚层细胞系不同阶段的混合前体细胞和少部分具有自我更新能力的多能干细胞组成,实验证实这部分干细胞是表达CD146的内皮细胞亚群^[5]。1991年, Caplan发现骨髓来源的基质细胞具有自我更新和分化的能力,并且首次将其定义为间充质干细胞,命名为MSCs。此外, MSCs还被定义为多能间

充质基质细胞,在体外培养时呈现为一群具有粘附性的非均质细胞,呈成纤维细胞样,形成集落,在体外可以分化为脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞^[6](图1)。MSCs除存在于骨髓外,还可以从脂肪组织、肠道、肺、牙髓、牙周韧带、肝脏、滑膜、心脏和结缔组织中提取^[7-10],以及从外周血、胎盘和脐带血中也可分离获得^[11-13]。



图中显示了不同组织来源的MSCs具有自我更新(弧线箭头)和向中胚层细胞系分化的能力(实线箭头);此外,还有向外胚层和内胚层细胞系分化的能力(虚线箭头)。

This figure shows the ability of mesenchymal stem cells (MSCs) to self-renew (curved arrow) and to differentiate towards the mesodermal lineage (straight, solid arrows). The reported ability to transdifferentiate into cells of other lineages (ectoderm and endoderm) is shown by dashed arrows.

图1 MSCs的多能分化性示意图

Fig.1 The multipotentiality of MSCs

2 MSCs的表型

在体外培养的MSCs可以表达多种免疫表型(表1)^[14-15],但是缺乏特异的标记分子。多数研究认为MSCs不表达造血细胞的标记分子CD45、CD34和CD14或共刺激分子CD80、CD8和CD40,但是可以表达不同水平的CD105、CD73、CD44、CD90、CD71、GD2和CD271。此外,人源性MSCs还能被单克隆的STRO-1抗体识别。针对MSCs免疫表型的不同种类,2006年,细胞治疗国际协会(ICT)制定了判断MSCs免疫表型的基本标准^[16](表2)。在体内、外实验研究中,虽然种系、组织来源和培养条件不同,这些表面标记会有不同的表达水平,但是通过免疫分选的方法,仍可以排除血细胞、内皮细胞、成

纤维谱系的细胞和一些具有明确特性的幼稚干细胞,从而得到较为纯化的具有相似表型的MSCs。近期报道,免疫表型与治疗心血管疾病的疗效密切相关,心肌梗死模型中移植CD105⁺的MSCs更利于促进心肌功能恢复^[17]。

3 MSCs的生物学特性

MSCs除了具有自我更新和分化能力外,在不同的环境中还具有其它一些重要的生物学特性,如分泌功能以及与免疫调节系统细胞相互作用产生的调节功能。

3.1 MSCs的多能分化性

MSCs可以分化为中胚层细胞系的细胞,如骨

表1 MSCs的免疫表型^[14-15]

Table 1 Phenotypic profile of MSCs ^[14-15]	
MSCs的免疫表型	表达情况
Phenotypic profile of MSCs	Detection
Haematopoietic receptors	
CD1a(T6)	(-)
CD14	(-)
CD34	(-)
CD45	(-)
CD133(AC133)	(-)
Adhesion molecules	
CD31	(-)
CD44	(+)
CD50	(+)
CD54	(+)
CD56	(+)
CD58	(+)
CD62E	(-)
CD62L	(+)
CD62P	(-)
CD102	(+)
CD106	(+)
CD144(Calherin 5)	(-)
CD166	(+)
Integrins	
CD11a	(-)
CD11b	(-)
CD11c	(-)
CD18	(-)
CD29	(+)
CD49a	(+)
CD49b	(+)
CD49c	(+)
CD49d	(-)
CD49e	(+)
CD49f	(+)
CD51	(-)
CD61	(+)
CD104	(+)
Growth factors and cytokines	
CD25	(-)
CD71	(+)
CD114	(-)
CD117	(-)
CDw119	(+)
CD120 a&b	(+)
CD121 a&b	(+)
CD123	(+)
CD124	(+)
CD126	(+)
CD127	(+)
CD140a	(+)
FGFR	(+)
CD271	(+)

(续表1)

Other markers	
CD3	(-)
CD9(Tetraspannin)	(+)
CD13	(+)
CD19	(-)
CD73	(+)
CD80(B7-1)	(-)
CD83(HB15a)	(-)
CD86(B7-2)	(-)
CD90	(+)
CD105	(+)
CD146(MUC18, Mel-CAM, S-endo)	(+)
CD157	(+)
SH3	(+)
D7-FIB	(+)
STRO-1	(+)
HLA-A, B, C	(+)
SSEA-3,4	(+)

表2 ICT推荐的MSC免疫表型的基本标准^[16]

Table 2 Minimal criteria for phenotypes of MSCs recommended by ICT ^[16]	
阳性	阴性
Positive	Negative
CD105	CD34
CD90	CD45
CD73	CD14 or CD11b
	HLA-DR
	CD79 or CD19

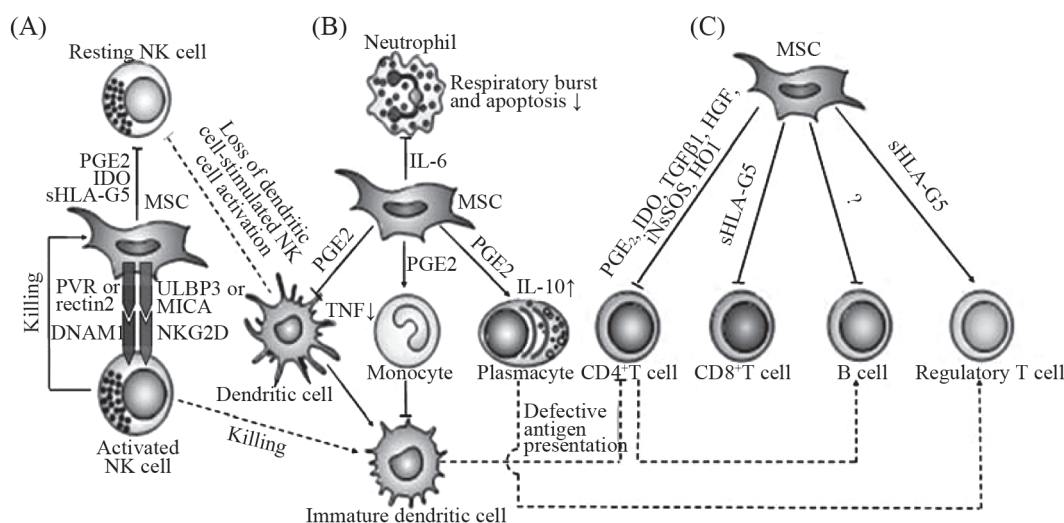
细胞、脂肪细胞和软骨细胞, 此外, 它还具有向内胚层和神经内胚层细胞系分化的潜能^[6,18](图1)。这种能力可能与间充质组织的发育起源相关, 即间充质组织起源于中胚层和小范围的颅神经脊。目前的研究认为成体间充质干细胞起源于中胚层, 而胚胎间充质干细胞则起源于神经上皮和神经脊^[19]。实际上, 骨髓来源的基质细胞是非均质的细胞群, 它们的转录组非常复杂, 可以编码众多参与不同发育途径和生理过程的蛋白质^[20]。MSCs移植后主要分化为3种细胞类型: 组织特异性细胞: 可以修复受损伤组织, 如移植后的MSCs可以分化成心肌细胞、平滑肌细胞、血管内皮细胞, 这些细胞都是心肌组织的重要组成部分; 功能性相关细胞: 此类细胞可能参与构成组织修复所需的特殊微环境或壁龛^[21]; 调整类细胞: 此类型细胞通过分泌具有营养或免疫调整功能的细胞活素类物质来达到促进组织修复和再生的目的^[22]。

3.2 MSCs的分泌功能

MSCs可以通过细胞-细胞间相互作用以及释

放大量可溶性生长因子和细胞活素的方式来影响与其毗邻的其它细胞。这些可溶性因子可以受到以下两种因素的影响,即MSCs自身的状态与局部环境的变化。目前,这些相关的信号和生长因子已经由体外和体内实验得到验证,它们包括间质细胞衍生因子-1(SDF-1/CXCL12)、肝细胞生长因子(HGF)、胰

岛素样生长因子-1(IGF-1)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素-1、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)、胎盘生长因子(PLGF)、纤溶酶原活化因子、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等^[23-24]。



PGE2: 前列腺素E2; IDO: 吲哚胺2,3-二氧化酶; sHLA-G5: 可溶性HLA-G5; NKG2D: 自然杀伤组2, 成员D; ULBP3: UL16-结合蛋白3; MICA: MHC I型多肽相关序列A; DNAM1: DNAX附属分子1; PVR: 脊髓灰质炎病毒受体; renectin2: 连接素2; TNF: 肿瘤坏死因子; IL-10: 白介素-10; IL-6: 白介素-6; TGF- β 1: 转化生长因子- β 1; HGF: 肝细胞生长因子; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; HO1: 血红素加氧酶1。

PGE2: prostaglandin E2; IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase; sHLA-G5: soluble HLA-G5; NKG2D: natural-killer group 2, member D; ULBP3: UL16-binding protein 3; MICA: MHC class I polypeptide-related sequence A; DNAM1: DNAX accessory molecule 1; PVR: poliovirus receptor; TNF: tumour-necrosis factor; IL-10: interleukin-10; IL-6: interleukin-6; TGF- β 1: transforming growth factor- β 1; HGF: hepatocyte growth factor; iNOS: inducible nitric-oxide synthase; HO1: haem oxygenase 1.

图2 MSCs与固有免疫和获得性免疫系统细胞之间相互作用的机制示意图(根据参考文献[29]修改)

Fig.2 Possible mechanisms of the interactions between MSCs and cells of the innate and adaptive immune systems(modified from reference[29])

3.3 MSCs的免疫调节功能

MSCs除了具有多能分化性和分泌功能之外,还可以与固有免疫和获得性免疫系统细胞之间相互作用,从而产生以下不同的免疫调节作用。

MSCs和自然杀伤细胞(NK细胞)的相互作用(图2A)。NK细胞在抗病毒和抗肿瘤免疫反应中起着重要作用, MSCs在体外能够抑制静息状态的NK细胞增殖以及其细胞毒性作用,这种效应的产生来源于MSCs释放的前列腺素E2(PGE2)等因子的调节;另一方面,细胞因子激活的NK细胞则可以通过一些配体和受体的结合从而杀伤MSCs^[25]。目前,还不十分清楚MSCs与NK细胞相互作用产生的最终生理反

应,但在移植治疗中必需充分考虑活化的NK细胞对MSCs的杀伤作用。

MSCs和树突状细胞(dendritic cells, DCs)、单核细胞、浆细胞、中性粒细胞的相互作用(图2B)。DCs能捕获加工提成抗原, DCs与MSC相互作用, DCs停滞于G₀/G₁期,增殖减少,并且DCs处于半成熟状态,下调DCs表面CD1a、CD40等的表达,逃避T细胞的识别,从而诱导免疫耐受的产生。MSCs通过分泌PGE2不仅可以抑制单核细胞向未成熟DCs的分化,以及抑制成熟的DCs产生肿瘤坏死因子(TNF),而且还可以促进浆细胞产生白介素-10(IL-10)。同时,不成熟DCs易于被细胞因子激活的NK细胞杀伤。

此外, MSCs通过对成熟DCs的抑制, 减弱了后者对静息NK细胞的刺激效应; 而MSCs对单核细胞向未成熟DCs分化的抑制, 也同时减弱了T细胞抗原呈递作用, 使得T细胞不能繁殖和扩增^[26]。而MSCs对于中性粒细胞的作用则表现在: MSCs可以通过释放白介素-6(IL-6)延迟静息和激活的中性粒细胞的自发性凋亡。

MSCs和T细胞、B细胞之间存在相互作用(图2C)。MSCs通过释放PGE2等可溶性分子, 直接抑制CD4⁺T细胞功能。CD4⁺T细胞功能受限导致B细胞增殖和抗体产生的辅助功能受到损害。MSCs通过释放sHLA-G5可以抑制CD8⁺T细胞的细胞毒性, 而对于调节性T细胞的分化则起到了促进作用^[27]。此外, 由浆细胞产生的IL-10也可以直接导致调节性T细胞的增殖。MSCs抑制B细胞的功能, 可能依赖于可溶性分子和细胞-细胞间的联系, 但具体因子尚不明确^[28]。

4 MSCs的心肌修复潜能

心脏疾病细胞疗法的目标主要依赖于心脏疾病的发展过程、心肌缺血的程度和心脏功能的状况。就心肌缺血而言, 细胞移植治疗能否取得良好的效果需要满足以下条件: (1)能够提供具有自我更新和增殖能力的功能性心肌细胞; (2)能够促进新生血管形成, 从而营养新生的心肌细胞和缺血、梗死周边的心肌组织。近年来, 研究者对MSCs用于心脏疾病的治疗进行了大量的基础研究、临床前期研究和临床试验。在心力衰竭和心肌病的动物模型中, 采用MSCs移植可以使得心肌瘢痕和梗死面积缩小、心室功能改善、心肌的机械收缩偶联得到恢复, 而且还可以增加血管密度和血液灌注^[30]。在裸大鼠的心衰模型中, 使用基质前体细胞治疗后, 结果显示血管密度呈现剂量依赖性增加、新生血管形成增多射血分数得到了提高^[31]。MSCs之所以在心血管修复方面取得良好的效果, 主要归因于其突出的优点: (1) MSCs容易获得, 在体外可以培养大量用于移植的细胞; (2)具有心肌与血管修复的潜能; (3)具有免疫调节能力, 低免疫原性, 可用于同种异体移植。

4.1 MSCs心肌修复的相关机制

4.1.1 MSCs向心肌转分化, 促使心肌再生 在缺血性心脏病和心力衰竭的发展过程中, 缺血和非缺血损伤造成心肌细胞死亡, 而心肌的自我更新能力非常有限, 死亡心肌被瘢痕组织取代, 从而逐渐丧失

了心脏的原有功能。心脏疾病干细胞治疗的目的是将供体的干细胞移植到受体的损伤心肌组织中, 进一步分化为新的功能性心肌细胞和血管, 从而取代损伤心肌发挥作用。

在体外实验中, MSCs可以分化为心肌样细胞。通常使用的方法是化学诱导法, 即DNA脱甲基化的化学药品5-氮杂胞苷诱导MSCs向心肌细胞分化。不同种系和不同来源的MSCs均能分化为心肌样细胞, 这些细胞能够表达心肌细胞表型, 显示肌原纤维的形态, 表达心肌特异性的基因和蛋白, 如肌细胞增强因子2(MEF2)、心肌转录因子4(GATA4)、肌球蛋白、肌动蛋白和心钠素等, 并能检测到初级的动作电位^[32-34]。此后的研究还发现, 用5-氮杂胞苷诱导MSCs 2~4周后, 分化的细胞可以依靠细胞间的闰盘进行连接并出现同步收缩。由于5-氮杂胞苷具有化学毒性, 目前, 在体外研究中多采用其它种类诱导剂, 如在培养基中加入地塞米松和维生素C^[35]、骨形成蛋白和成纤维因子^[36]等, 以及与心肌细胞共培养^[37], 从而促使MSCs分化。然而, 部分研究表明分化的心肌样细胞可表达心肌的特异性标记, 但不能成为功能性的心肌细胞, 不具有心肌的特异性电活动^[38]。

在相关体内试验中, 研究者通过小动物的异基因MSCs移植、大动物的自体MSCs移植和同种异体移植, 来检测MSCs向心肌组织细胞分化的能力。一些研究者使用免疫组织化学的方法可以检测到MSCs的分化, 然而, 这些研究对分化细胞的鉴定并不确切, 这是因为移植的MSCs虽然能够表达一些心肌或血管的标记, 但是不能表达全部的表型。如果使用免疫荧光和免疫组织化学检测细胞分化, 则可能会造成假阳性或检测到细胞融合的结果, 从而高估了移植细胞的分化能力。其它研究结果显示, 骨髓来源的MSCs移植后, 产生上述结果的原因是MSCs与内源性的心肌细胞发生了融合, 而不是移植的MSCs发生真正的分化^[39]。而与此相反, 另一些研究则显示, 在移植MSCs后, 通过检测二倍体可以判断确实有新生的心肌生成^[40]。同时, 一些新的细胞标记技术得到使用, 如量子点免疫荧光法, 该方法就可以评价体内移植MSCs的分化情况。目前, 这种方法已经在动物实验研究中用于检测c-kit阳性的骨髓细胞向心肌分化的能力^[41]。近年来, 为了优化移植细胞的生物学功能特性, 在研究中对MSCs在体外进行预处理, 例如可以将MSCs种植到特殊的生物胶原

上、对MSCs预培养和转染基因等^[42-44],更好地提高治疗效果。

4.1.2 旁分泌机制促使心脏修复 关于细胞分化的研究提示我们需要重新审视MSCs心脏修复的相关机制。越来越多的研究者认为,目前心脏疾病细胞治疗主要通过旁分泌作用,促进内源性修复来协助心脏功能的恢复,而不是依赖受损的心肌和血管再生这条途径。旁分泌作用可以解释许多与修复相关的潜能,这些潜能包括细胞移植促进新生血管形成、减少梗塞面积和瘢痕形成、改善心肌的收缩功能等^[25-26]。在旁分泌作用中, MSCs可以通过细胞-细胞间相互作用以及释放大量的可溶性生长因子和细胞活素的方式来影响与其毗邻的其它细胞^[25]。MSCs治疗急性心肌梗死,梗死区VEGF和bFGF表达明显升高^[45]。在这些因子中,转录因子HIF-1 α 与VEGF的表达密切相关, HIF-1 α 还可以在缺氧条件下被活化并保持稳定状态。近期研究显示, HIF-1 α 除了在血管形成中发挥作用外,还可以协助间充质干细胞对体外缺氧环境培养的心肌细胞起到保护作用^[46]。

虽然这些旁分泌作用的靶细胞尚不清楚,但是有关研究推测它们可能包括受体心脏中的成熟细胞和祖细胞。在MSCs移植术后,心肌的注射部位出现了Ki67阳性的心肌细胞。尽管这些增殖细胞的出现可以被认为是MSCs分化生长的结果,但是它们同样也能被看作是内源性的心肌细胞或者心肌前体细胞再生的结果^[47]。这种观点得到了一些研究结果的证实,即在不同种类哺乳动物的成年心脏中发现了心肌干/祖细胞的存在^[48-49]。研究显示,心肌干/祖细胞也许受到一些生长因子信号(如IGF-1和HGF)的影响,这些因子可以促使心肌干/祖细胞迁移至心肌受损部位,从而进一步分化和增殖^[50]。按照现有理论,这些结果的出现是由于外源性MSCs治疗的旁分泌作用促进而产生的。此外,间充质干细胞还可以保护成熟的心肌细胞对抗缺氧和缺血性损伤,从而使得损伤部位的内皮细胞和内皮祖细胞进一步参与血管生成。

4.1.3 MSCs低免疫原性,利于异体移植 MSCs表达MHC-I类分子,不表达MHC-II、CD40、CD80、CD86,也缺乏诱导T细胞的共刺激分子CD40L、B7,有利于形成MSCs的低免疫原性^[51]。此外, MSCs还可以下调淋巴细胞增殖,并且抑制其他免疫细胞的

成熟和活性,甚至当MSCs分化为骨细胞、脂肪细胞和成骨细胞时也能产生相同效应^[52]。MSCs的免疫抑制特性,有利于用其进行异体细胞治疗^[29]。但也有学者挑战这一观点,认为自体MSCs移植依然是临床治疗的最佳选择^[53]。

4.2 MSCs修复心肌的临床研究

2004年,Chen等^[54]首先开始将MSCs应用于临床的随机对照研究,随访6个月显示室壁运动及LVEF改善,心肌灌注缺损缩小,两组患者心律失常发生率及病死率无差别,后续分析显示患者心脏功能的改善主要源于移植MSCs的血管生成作用及旁分泌功能,而非MSCs向心肌细胞的分化。此后, Schachinger等^[55]进行了REPAIR-AMI(reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodeling in acute myocardial infarction)试验,随访4个月后移植组的LVEF增加明显高于安慰剂组,其中, LVEF<49%的患者受益更多,继续至随访1年,移植组不仅LVEF增加,而且临床终点事件的发生率降低。然而, Lunde等^[56]进行的ASTAMI(autologous stem-cell transplantation in acute myocardial infarction)试验却并未发现给予急性心肌梗死患者移植自体MSCs能提高患者LVEF,且移植组与对照组左室舒张末期容积以及梗死面积均无明显差异。由此可见, MSCs移植治疗心脏病的临床应用尚属起步阶段,其临床治疗效果尚未十分明确。

在MSCs修复心肌的临床应用中,最为关键的问题是如何将MSCs安全有效地移植到心脏的受损区域。针对该问题,国外已经进行了大量的临床研究。目前,心脏疾病MSCs移植疗法有3种基本方式:(1)通过外周静脉注入的全身疗法;(2)通过冠状动脉和心静脉系统注入的局部疗法;(3)通过心肌直接注射疗法。这3种方法在临床前期实验中得到了相应的研究。其中,针对外周静脉注入MSCs的全身疗法, Hare研究团队^[57]在美国进行了一项为期6个月的I期临床研究。在该项研究中,研究者选取美国10所医疗中心的53例10天内发病的心肌梗塞患者,进行外周静脉注入异体骨髓来源的MSCs,并于6个月后使用心脏超声对心功能恢复情况进行评价。研究结果显示,外周静脉注入MSCs的治疗可以使患者的射血分数提高7%~8%,明显增强了患者的心肌功能。更为重要的是,该疗法不会造成全身的异位组织形成。而与全身疗法相比较,冠状动脉和心静脉系统注入MSCs的局部疗法可以较为准确地将MSCs移植到心

脏的受损区域。此外, 临床研究表明, 该疗法针对急性心肌梗塞和慢性心肌缺血患者可以安全有效地将骨髓来源的MSCs和外周血来源的细胞注入治疗受损心脏。临床前期实验表明, 由于MSCs直径(18~20 μm)要大于毛细血管管径(8~10 μm), 并且其变形能力弱于单核细胞, 所以移植的细胞会在微血管内聚集, 影响血液流向心脏, 从而导致在临床应用中无法保证该局部疗法的安全性^[58]。与前两种方法不同, 心肌直接注射MSCs的局部疗法可以直接定位于心肌受损区域, 同时也不用依赖炎症信号介导经血管向目标部位的细胞迁移和组织浸润。相关临床前期研究显示, 该方法可以在受损部位保留更多分化后的心肌细胞, 同时减少非心肌细胞的数量, 从而更好地恢复心脏功能^[59]。目前, 临床上该疗法的实施有2种方式, 即通过开胸手术经心外膜注入和通过心腔内导管经心内膜注入。然而, 这两种实施方式都属于有创性和侵入性的方法, 所以就限制了该疗法在临床上的应用。由于3种方式各有优缺点, 目前的临床研究尚不能确定哪种疗法是最佳方式。

5 存在的问题和展望

目前, 关于MSCs心血管修复潜能的研究以及其在心脏疾病治疗中的作用等方面仍然存在着许多问题亟待解决, 如优化MSCs的分离、培养和预处理技术、明确MSCs向心肌细胞分化的鉴定方法、选用低毒或无毒的诱导剂; 进一步明确MSCs向心肌细胞分化的机制; 选择最佳的移植细胞数量、移植时机和移植方式、明确患者的合适年龄、提高长期治疗的安全性和有效性等。虽然MSCs在基础研究和临床应用中还存在着诸多问题, 但是需要看到的是, 由于MSCs具有修复心肌和血管的能力, 同时其免疫抑制的特性有利于异体移植, 因而将其用于治疗心血管疾病具有广阔的前景。

参考文献 (References)

- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK. Cardiac remodeling and failure: From molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol* 2005; 14(3): 109-19.
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344(23): 1750-7.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, *et al.* Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(21): 12313-8.
- Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007; 131(2): 324-36.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 3(4): 314-9.
- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18(4): 696-704.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364(9429): 149-55.
- Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, *et al.* Multipotential human adiposederived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Physiol* 2008; 214(2): 413-21.
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001; 153(5): 1133-40.
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, *et al.* A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004; 200(2): 123-35.
- Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wnendt S, *et al.* Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: A preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 2005; 112(S9): 196-104.
- Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 2007; 38(S4): S23-33.
- Tárnok A, Ulrich H, Bócsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A* 2010; 77(1): 6-10.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- Gaebel R, Furlani D, Sorg H, Polchow B, Frank J, Bieback K, *et al.* Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PLoS One* 2011; 6(2): e15652.

- 18 Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(19): 10711-6.
- 19 Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 2002; 20(3): 205-14.
- 20 Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, *et al.* Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007; 129(7): 1377-88.
- 21 Petrie Aronin CE, Tuan RS. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2010; 90(1): 67-74.
- 22 Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med* 2010; 16(5): 203-9.
- 23 Kinnaid T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, *et al.* Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; 94(5): 678-85.
- 24 Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z, Ashraf M. *In vitro* and *in vivo* effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(2): 441-8.
- 25 Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006; 107(4): 1484-90.
- 26 Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: A model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008; 26(1): 151-62.
- 27 Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106(5): 1755-61.
- 28 Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107(1): 367-72.
- 29 Uccelli A, Moretti L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature* 2008; 8: 726-36.
- 30 Valina C, Pinkernell K, Song YH, Bai XW, Sadat S, Campeau RJ, *et al.* Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; 28(21): 2667-77.
- 31 Martens TP, See F, Schuster MD, Sondermeijer HP, Hefti MM, Zannettino A, *et al.* Mesenchymal lineage precursor cells induce vascular network formation in ischemic myocardium. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3(S1): S18-22.
- 32 Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, *et al.* Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*. *Exp Biol Med* (Maywood) 2004; 229(7): 623-31.
- 33 Moscoso I, Centeno A, López E, Rodríguez-Barbosa JI, Santamarina I, Filgueira P, *et al.* Differentiation “*in vitro*” of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(1): 481-2.
- 34 Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M. *In vitro* cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340(2): 639-47.
- 35 Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, *et al.* *Ex vivo* differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(2): 481-8.
- 36 Yoon J, Min BG, Kim YH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol* 2005; 60(3): 277-84.
- 37 Perán M, Marchal JA, López E, Jiménez-Navarro M, Boulaiz H, Rodríguez-Serrano F, *et al.* Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes. *Cytotherapy* 2010; 12(3): 332-7.
- 38 Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes *in vitro*. *Stem Cells* 2008; 26(11): 2884-92.
- 39 Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sävén P, Röhl W, Hescheler J, *et al.* Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; 10(5): 494-501.
- 40 Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, *et al.* Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 2005; 96(1): 127-37.
- 41 Rota M, Kajstura J, Hosoda T, Bearzi C, Vitale S, Esposito G, *et al.* Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(45): 17783-8.
- 42 Tang J, Wang J, Zheng F, Kong X, Guo L, Yang J, *et al.* Combination of chemokine and angiogenic factor genes and mesenchymal stem cells could enhance angiogenesis and improve cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 2010; 339(1/2): 107-18.
- 43 Lian WS, Cheng WT, Cheng CC, Hsiao FS, Chen JJ, Cheng CF, *et al.* *In vivo* therapy of myocardial infarction with mesenchymal stem cells modified with prostaglandin I synthase gene improves cardiac performance in mice. *Life Sci* 2011; 88(9/10): 455-64.
- 44 Huang J, Zhang ZP, Guo J, Ni A, Deb A, Zhang L, *et al.* Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary

- density in the injured myocardium. *Circ Res* 2010; 106: 1753-62.
- 45 Li Z, Guo J, Chang Q, Zhang A. Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32(8): 1343-6.
- 46 Dai Y, Xu M, Wang Y, Pasha Z, Li T, Ashraf M. HIF-1 α induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(6): 1036-44.
- 47 Amado LC, Schuleri KH, Saliaris AP, Boyle AJ, Helm R, Oskoue B, *et al.* Multimodality noninvasive imaging demonstrates *in vivo* cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(10): 2116-24.
- 48 Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 14(6): 763-76.
- 49 Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, *et al.* Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433(7026): 647-53.
- 50 Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, de Angelis A, *et al.* Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 2005; 97(7): 663-73.
- 51 Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31(10): 890-6.
- 52 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815-22.
- 53 Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006; 108(6): 2114-20.
- 54 Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, *et al.* Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117(10): 1443-8.
- 55 Schachinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, *et al.* Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1210-21.
- 56 Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, *et al.* Intracoronary injection of mononuclear bonemarrow cells in acutemyocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1199-209.
- 57 Schuleri KH, Boyle AJ, Hare JM. Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 180: 195-218.
- 58 Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu MM, Cheng L, *et al.* A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27(9): 1114-22.
- 59 Perin EC, Silva GV, Assad JA, Vela D, Buja LM, Sousa AL, *et al.* Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44(3): 486-95.

Biological Characters of Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Functions for Cardiovascular Repair

Li Qiong^{1,2}, Zhang Min³, Guo Zhikun^{1*}, Li He²

(¹Key Open Laboratory for Tissue Regeneration of Henan University, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; ²Department of Human Anatomy and Embryology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; ³Hepatobiliar and Pancreatic Surgery, Henan Anti-cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China)

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in adult tissues including bone marrow, adipose tissues and so on. They can be easily isolated and cultured *in vitro*, which are heterogeneous cells of plastic adherence. MSCs possess plasticity of differentiation and can be modified to adopt cardiomyocyte and vascular cell phenotypic characteristics under appropriate *in vitro* culture conditions. Some preclinical studies have demonstrated their capacity to facilitate both myocardial repair and neovascularization in cardiac injury models. The mechanisms underlying these effects appear to be mediated predominantly through indirect paracrine actions, and direct regeneration of endogenous cells by transdifferentiation. Clinical application of MSCs has showed that MSCs have immunosuppressive action and can be used for allogeneic transplantation. Overall, MSCs are an attractive cell population for cardiovascular repair and cardiac engineering; however, basic and clinical researches are still required.

Key words myogenesis; angiogenesis; mesenchymal stem cells (MSCs); cardiac diseases

Received: June 26, 2011 Accepted: October 17, 2011

This work was supported by Brilliancy Person Project of Henan Province (No.084200510020)

*Corresponding author. Tel: 86-373-3831862, Fax: 86-373-3831862, E-mail: gzk@xxmu.edu.cn