

文章编号: 1001-6325(2023)01-0021-09

成体干细胞基础创新与临床转化

间充质干细胞治疗心肌梗死的研究进展

姜 侯, 钱海燕*

中国医学科学院 北京协和医学院 国家心血管病中心 阜外医院 冠心病中心, 北京 100037

摘要:急性心肌梗死(AMI)是由冠状动脉闭塞引起的缺血性心肌坏死,无法通过心肌细胞再生进行自我修复,坏死心肌被纤维瘢痕替代,引发心室重塑,最终导致心力衰竭。诸多临床前和临床研究证实间充质干细胞(MSCs)移植治疗AMI的安全性和有效性。MSCs由多向分化潜能、能够调节氧化应激、分泌多种细胞因子和生长因子的异质性细胞组成,在移植过程中通过转分化、细胞融合和旁分泌等途径发挥其免疫调节、血管生成、抗炎和抗凋亡等作用。迄今已有多种移植途径输注MSCs,包括心肌内注射、经冠状动脉内注射、经静脉注射等。此外,移植的细胞剂量、时机等均是影响MSCs治疗效果的重要因素。然而,MSCs移植后在梗死心肌中的滞留率和存活率均很低,进而限制其进一步发挥作用,也是导致其向临床转化应用的重要瓶颈和障碍。针对上述问题,近年来诸多研究提出新理念、新策略、新技术和新方法,如细胞预处理、优化梗死局部微环境、联合基因治疗或组织工程技术、外泌体输注、靶向移植干细胞及其外泌体等,显著提高了MSCs的移植效率和治疗效果,为干细胞修复梗死心肌的研究和转化揭开新的篇章。本文对近年来MSCs修复梗死心肌的进展做一综述。

关键词: 间充质干细胞;心肌梗死;外泌体

中图分类号:R541.4 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2023.01.0021

Progress in application of mesenchymal stem cells in treatment of acute myocardial infarction

JIANG Yu, QIAN Haiyan*

Coronary Heart Disease Center, Fuwai Hospital, National Cardiovascular Center, Peking Union Medical College,
Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China

Abstract: Acute myocardial infarction (AMI) is an ischemic myocardial necrosis caused by coronary artery occlusion, which can't be self-repaired through cardiomyocyte regeneration. The necrotic myocardium is replaced by fibrous scars during ventricular remodeling, ultimately leading to heart failure. The safety and efficacy of mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation after AMI have been demonstrated by numerous preclinical and clinical studies. MSCs are composed of heterogeneous cells with multi-directional differentiation potential, which can regulate oxidative stress, and secrete a variety of cytokines and growth factors. After being implanted *in vivo*, MSCs play their roles in immunomodulatory, angiogenesis, anti-inflammatory, and anti-apoptosis through trans-differentiation, cell fusion, and paracrine. Currently, there has been a variety of access to implant MSCs, including intramyocardial injection, intracoronary infusion, and intravenous injection. In addition, the dose and timing of transplantation are also important factors affecting the therapeutic effect of MSCs. However, the low retention and survival rates of MSCs in infarcted myocardium after being

收稿日期:2022-07-13 修回日期:2022-10-10

基金项目:北京市自然科学基金(7222139);中央级公益性科研院所基本科研业务费-临床与转化医学研究基金(2019XK320061)

*通信作者 (corresponding author): ahqhy712@163.com

transplanted limit their further effect and hinder their clinical translation. In recent years, new concepts, strategies, technologies, and methods for MSCs treatment have been proposed, including cell preconditioning, optimization of the infract local microenvironment, combined gene therapy or tissue engineering technology, exosome infusion, and targeted transplantation of stem cells and their exosomes, which significantly improve the transplantation efficiency and therapeutic effect of MSCs, and open a new chapter for the research and transformation of stem cells to repair the infarcted myocardium. This article reviews the progress of MSCs in repairing myocardial infarction in recent years.

Key words: mesenchymal stem cells; myocardial infarction; exosome

1 干细胞概述

1.1 干细胞定义

干细胞(stem cells, SCs)是体内可自我更新(self-renewal)并具有分化潜能(potency)的一类细胞。在个体发育的不同阶段和成体的不同组织中均存在干细胞,干细胞所处环境称为干细胞龛(stem cell niches),为干细胞维持其干性(stemness)提供了必要的微环境。但随着年龄增长和不同疾病状态的影响,微环境发生变化,使得干细胞的数量减少,增殖分化的潜能减弱^[1]。移植自体或异体干细胞再生修复衰老或病损组织器官,甚至延长寿命,是再生医学的初衷和最终目标。

1999年12月美国科学家 Jackson 等^[2]发现小鼠肌肉组织干细胞可“转分化”(trans-differentiation)成血液细胞,进一步研究发现人多种组织或成体干细胞均可转分化为肝细胞、肌肉细胞等^[3];2007年底日本科学家 Yamanaka 等^[4]利用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 这4个转录因子实现成体细胞的重编程,获得诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),提示可利用患者自身的成体细胞或干细胞诱导分化成病损组织的功能细胞,为再生医学揭开新的篇章。这两位科学家因此重大发现而荣获2012年诺贝尔生理学或医学奖。

1.2 间充质干细胞定义

骨髓主要包括造血干细胞和非造血细胞。非造血细胞充当造血干细胞在骨髓腔中的生长微环境,包含内皮细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。MSCs在特定条件下可分化成多种中胚层来源的细胞,故又称之为“成纤维细胞样克隆形成细胞(clony-forming units-fibroblast, CFU-F)”。随后的研究发现在脐带血、外周血、胎肝、皮肤真皮层,甚至是软骨中也存在

MSCs。由于取材方便、可自体移植且不存在伦理争议,骨髓已经成为 MSCs 的最主要来源。骨髓 MSCs 大多处于静止期,只有约 10% 处于增殖期,提示 MSCs 有强大的分裂增殖潜能^[5]。

MSCs 还具有强大的免疫调节能力,基本无免疫排斥风险,因而适于异体移植。此外,其旁分泌能力强,移植后可向心肌梗死微环境释放数百种调节蛋白和 RNA 等,起到抑制氧化应激和炎症反应、改善心肌梗死微环境的作用^[6]。这是其相较于其他类型干细胞的突出优势。

2 间充质干细胞治疗心肌梗死的理论基础

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)以及其他各种心脏疾病通过坏死或凋亡等途径导致心肌细胞数量减少,由于心脏是一个终末分化的器官,心肌细胞仅具有极其微弱自我更新或再生能力^[7],因此心肌细胞缺失后往往被纤维化瘢痕替代,启动病理性修复和反应性修复过程,并伴随神经和内分泌机制的参与,即心肌重塑过程,最终导致心力衰竭或死亡。尽管新近有证据显示 AMI 后梗死周边部分心肌细胞可再次进入细胞周期,发生分裂现象,但是这种内源性自我修复机制极其微弱,根本不足以修复有临床意义的病变^[8]。由于传统的治疗方法不能有效修复或再生心肌细胞,AMI 后将引发心室重构、心力衰竭甚至死亡,因此亟需一种全新而有效的方法进行干预。应用于干细胞治疗 AMI 具备理论或实验基础,有望再生修复梗死心肌,其主要机制包括以下几个方面。

2.1 转分化

成体干细胞的“可塑性”(plasticity)或“转分化”潜力以及终末分化细胞“重编程”(reprogramming)为心肌的再生或修复带来光明的应用前景。本研究室早期的研究表明,将带有荧光标记的猪骨髓 MSCs

注射至猪 AMI 心肌,6 周后心肌中可见有移植干细胞存活并表达心肌特异性标志物肌钙蛋白,证明移植后的干细胞能够转分化为有功能的心肌细胞^[9]。

2.2 细胞融合

虽有研究发现经 5-氮胞苷(5-azacytidine)诱导后,各代 MSCs 均可分化为心肌样细胞,具备典型的心肌细胞结构,然而后续的研究表明这种转分化而来的心肌样细胞并不能持续维持表型和功能^[10]。近年来发现部分移植后的 MSCs 能够与受体心肌细胞融合而并非转分化为心肌细胞,以此起到一定的心肌保护作用^[11]。新近证据表明,在大鼠梗死心肌局部约有 9.39% 的心肌细胞能与循环中的干细胞进行融合,使得融合后的心肌细胞重新进入分裂周期,促进心肌细胞增殖,起到改善心功能的效果^[12]。

2.3 旁分泌作用

旁分泌(paracrine)是指细胞产生的激素或调节因子通过细胞间隙对邻近细胞起调节作用的现象。MSCs 具有强大的旁分泌活性,可分泌多种细胞因子、趋化因子、生长因子等促进心功能的恢复。其作用包括促进心肌细胞存活、增强其抗凋亡能力、促进血管新生、促进循环中干细胞归巢以及激活内源性干细胞进行修复等^[6, 13]。这些作用机制在一定程度上可解释干细胞移植后虽然滞留率和存活率低但疗效仍然显著的现象。

综上,移植的干细胞通过多种机制,包括转分化、细胞融合、旁分泌等,达到再生修复心肌细胞、促进血管新生、最终改善心功能的目的(图 1)。

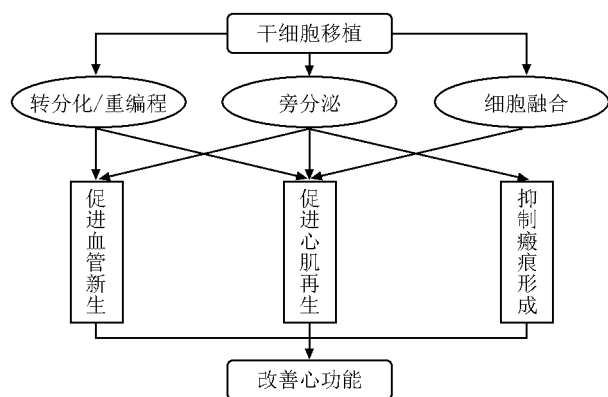


图 1 干细胞治疗心肌梗死的作用机制

Fig 1 Mechanism of stem cells in the treatment of myocardial infarction

3 MSCs 移植治疗心肌梗死的研究进展

3.1 概述

数十年来,干细胞移植治疗被认为是能够在真正意义上再生修复梗死心肌、逆转心功能的潜在治疗方式。其中最为关键的问题就是移植的干细胞在心肌微环境中可否分化为心肌细胞和血管结构,以及这些干细胞能否改善心功能甚至预后。

近 20 年来,大量临床前研究取得了令人鼓舞的成果,多项研究表明,移植 MSCs 具有改善心肌梗死后心功能的作用。Tomita 等^[14]证实骨髓来源 MSCs 体外经 5-azacytidine 诱导下分化成为有肌管样结构、表达肌钙蛋白 I 和心肌肌球蛋白重链的心肌样细胞,标记后直接注入冻伤的心肌坏死瘢痕中,8 周后左心室收缩功能改善,心肌瘢痕中有标记阳性的心肌细胞,并有大量新生血管网形成。不同组织来源的 MSCs 在 AMI 中的应用已有多项临床试验, MSC-HF 研究^[15]是第一个在缺血性心力衰竭中的随机对照临床试验,该研究表明自体骨髓 MSCs 输注可改善梗死后心功能,减少再住院时间。此外, TAC-HFT 随机研究^[16]也显示 MSCs 减小梗死面积并提高心肌局部功能。C-CURE 研究^[17]用细胞因子预处理 MSCs,旨在促 MSCs 向心肌分化,然后经心内膜注射至心肌梗死区及周边区,结果表明细胞移植组中左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)显著改善。

此外,异体 MSCs 移植的临床研究也展现令人振奋的结果^[18],经心内膜注射同种异体 MSCs 可行且安全,严重不良心血管事件减少,高剂量异基因 MSCs 也可能获益。另一项异体移植的 PROCHYMAL 研究^[19]入组 60 例 AMI 患者,结果表明 MSCs 可显著改善左心功能,室性心动过速发作减少, LVEF 增加。

越来越多的实验证明干细胞无论是在体外诱导还是在梗死心肌中,均能横向分化为心肌细胞和血管。这些体外试验和动物实验结果掀起了利用骨髓来源干细胞移植治疗心肌梗死的临床研究热潮。虽然这一疗法的安全性毋庸置疑,然而目前疗效仍不能令人满意^[20],需要更加深入的研究。

3.2 移植途径

干细胞移植途径包括心肌内注射、经冠状动脉内注射、经静脉注射,其中心肌内注射分为直视下心

肌内注射和经导管心肌内注射。

3.2.1 心肌内注射:早期的干细胞移植途径主要是开胸直视状态下直接心肌内注射,该法的优点是:①定位准确,可以准确地将细胞注入靶目标区;②便于检测,因细胞局限于注射点,因而便于分析和检测;③量化准确,进入心脏的实际细胞数明确。然而,直接心肌局部注射仍然会有少量细胞渗漏,且绝大部分的细胞在注射2周后丢失,滞留率不足5%^[21-22]。Zhang等^[23]研究发现,利用体外循环支持下心脏停跳时进行心肌内注射干细胞可提高心肌内滞留率。因开胸直视主要是在冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG)中,而CABG只适用于少数心肌梗死患者,所以开胸心肌内注射干细胞应用受限。

近年来陆续研发出经导管心肌内注射方法,无需开胸手术,具有微创、安全的优点。这些方法主要包括:①在心腔内电机械图指引下确定注射靶点^[24],应用特制的NOGA导管从心内膜面将干细胞注射到靶点,具有良好的可视性、稳定性和精确性^[25]。②MRI指引导管将铁纳米颗粒标记的干细胞精确注射至梗死区和边缘,可以动态清晰地显示梗死心肌和正常心肌,以及标记细胞在心脏中的位置^[26]。③在血管内超声导管指引下,穿刺导管透过冠状静脉壁将细胞注射入心肌内^[27]。

3.2.2 经冠状动脉注射:临床很多心肌梗死患者适合经皮冠状动脉介入术(percutaneous coronary intervention, PCI),在PCI过程中经开通后的梗死相关冠脉注入干细胞,干细胞可以经特异性信号受体识别透过毛细血管壁,进入心脏间质,使得干细胞均匀分布于梗死区和周边区。其最大优点是利用既有的介入通道,无需额外创伤,时间较短、技术简单。2002年Strauer等^[28]首次成功进行人冠脉内移植干细胞临床试验,此后经冠脉移植干细胞是心肌再生研究中最常用的一种途径。

3.2.3 经静脉注射:经外周静脉注射移植干细胞无疑所有细胞移植途径中最便于实施的,对患者来说创伤最小。然而,数项人体试验表明,通过静脉输注干细胞几乎未能检测到心肌内的干细胞滞留,而大部分移植细胞损失在肺循环^[29]。进一步研究发现,提高外周静脉注射移植细胞心肌内滞留的关键是提高移植干细胞的归巢能力。当发生心肌梗死

时,心脏内化学诱导分子的表达量会增加,促进细胞聚集在损伤区域。例如,通过提高心肌基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)的表达水平或上调移植MSCs表面SDF-1特异性受体(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)的水平,能够增加移植后细胞的归巢效率,并且进一步改善心功能^[30-31]。此外,一些促生长因子,如干细胞因子、血管内皮生长因子、粒细胞集落刺激因子、胰岛素样生长因子、肝细胞生长因子等均能促进移植细胞的归巢能力^[32]。今后需进一步探索更高效的促进细胞归巢的方法,以及对不同类型干细胞的作用。

另外也有研究尝试将干细胞经冠状静脉窦回输入冠脉系统,在动物实验和14例稳定心绞痛患者中,应用该法注入自体新鲜骨髓,未发生不良事件和并发症。随访时发现心肌灌注显著改善,冠脉造影显示侧支显著增加^[32-33]。

3.3 移植剂量

起初研究以为移植的干细胞数量可能与移植效果正相关,然而诸多临床前研究和后续临床试验却得出不一致甚至相反的结论,使得这一问题变得更加复杂。Halkos等^[34]比较了3个不同剂量(1×10^6 、 3×10^6 和 10×10^6 个MSCs)的异体MSCs静脉移植治疗AMI猪模型,发现效果与剂量成正相关。然而Hashemi等^[35]研究发现经心内膜注射低剂量MSCs组(24×10^6 个MSCs)能减小梗死面积,而高剂量组(440×10^6 个MSCs)则未见明显效果。近十余年来数项临床试验比较MSCs移植剂量与疗效之间的关系,2012年POSEIDON试验^[36]比较了 20×10^6 、 100×10^6 和 200×10^6 个MSCs的移植疗效,结果显示低剂量组 20×10^6 个MSCs疗效最佳。从这些临床前研究和临床研究结果可以看出,不同研究得出的最佳剂量并不一致,其剂量与疗效的关系也不统一,可能与不同个体不同疾病状态有关,因此是否存在一致的“最优剂量”仍有待进一步探究。

4 MSCs治疗心肌梗死的新策略

近年来越来越多临床研究显示,MSCs移植对心功能和心室重构的影响并不显著,疗效不尽如人意,其核心问题是移植细胞在靶器官(心脏)的滞留率和存活率低,导致治疗的长期疗效甚微^[37-38]。因此,近年来针对这一问题,国际研究进行了多种不同

方向的探索,包括细胞预处理、优化心肌梗死局部微环境、联合基因治疗或组织工程技术、外泌体移植治疗等,取得了可喜的成果。

4.1 预处理移植细胞

移植后干细胞存活率低的一个主要原因是梗死区的缺血、缺血/再灌注损伤引发强烈的炎症反应、氧化应激等,其微环境极其恶劣,导致干细胞移植后大量死亡。而在移植前对细胞进行预处理可增强其抗恶劣微环境的能力,从而提高移植细胞存活率。研究表明,在细胞移植前采用低能激光、热休克、低氧等方法预处理干细胞,可促进细胞增殖,对缺血缺氧、炎症反应、氧化应激等微环境耐受性增强,提高细胞的抗凋亡能力,从而显著提高干细胞的移植效果^[39-40]。此外,研究发现阿托伐他汀预处理可以提高 MSCs 表面 CXCR4 的表达,进而增强 MSCs 的抗凋亡、迁移和归巢能力,并通过改善梗死心肌中炎症因子的表达,进一步改善心肌梗死后心功能^[41]。

4.2 优化心肌梗死微环境

如前所述,由于梗死区域微环境极其恶劣,严重影响移植细胞的存活率,因此通过改善心肌梗死局部微环境有望提高移植细胞的存活率,并促其更好发挥各种效应。

4.2.1 抗氧化剂:AMI 后受损心肌释放大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),形成氧化应激反应剧烈的微环境,无论对梗死区的残留心肌还是移植干细胞均有极大危害^[42]。研究表明,增加移植局部的抗氧化剂水平,能改善移植干细胞的存活和增殖^[43]。Drowley 等^[44]研究也发现提前在梗死区域注射 n-乙酰半胱氨酸可明显改善移植成肌细胞的存活。此外,由于 ROS 主要来自于线粒体,因此通过调节线粒体释放过氧化物过程中的关键调控因子硫氧化蛋白还原酶-2(thioredoxin reductase-2),也显著降低梗死局部氧化应激水平^[45]。

4.2.2 促血管生成因子:AMI 后梗死区局部缺血缺氧,不利于移植细胞存活,因此通过加入外源性促血管生成因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)等可改善心肌缺血缺氧状态。Retuerto 等^[46]发现利用腺病毒携带的 VEGF 基因预处理梗死区可明显提高移植细胞存活率。然而,促血管生成因子的过度表达可能增加肿瘤形成

的风险^[47],因此需要进一步研究促血管生成因子的合适剂量,达到兼顾获益和风险的可控目标。

4.2.3 药物的保护作用:近年来越来越多的证据显示药物治疗也能改善心肌微环境,调节移植干细胞功能,并且具有更好的临床可行性。本团队前期系列研究在建立 AMI 猪模型前预先给予通心络和辛伐他汀口服,再移植骨髓 MSCs,结果发现,在未行药物预处理的单纯 MSCs 移植组移植细胞存活少,而经药物改良能显著提高 MSCs 在梗死区心肌中的存活和分化效率,并显著改善心功能和减小灌注缺损面积^[9, 48]。本团队的上述研究首次揭示改善“土壤”(损伤的心肌微环境)更利于“种子”(移植细胞)的存活和发挥作用,从而为扩展适合干细胞移植的患者群、提高干细胞移植效果提供了实验证据。此外,中药如冠心丹参和 MSCs 移植联合使用可改善心肌梗死后不利的微环境、促进血管生成、显著减少梗死面积、抗凋亡,并促进 MSCs 的迁移和存活来增强干细胞治疗的效果^[49]。

4.3 干细胞联合基因治疗

上述措施尽管可显著提高移植细胞存活,但效果均仅能维持较短时间(1~2周)。近年来,为解决这一难题,国际研究采用基因工程的方法改造修饰干细胞或利用 microRNAs 提高移植细胞的耐缺氧和抗凋亡能力,不影响移植物的大小,从而可应用于多种移植途径。研究发现,含有 miR-21、miR-24、miR-221 的混合物能增强心肌前体细胞(cardiac precursor cells, CPCs)的抗凋亡能力,显著改善移植效果^[50]。Ong 等^[51]将 CPCs 与携带 HIF-1 基因的微环质粒(MC-HIF1)联合移植,发现移植干细胞存活率明显提高,且心梗后 6 周 LVEF 最优,梗死面积显著缩小。这些结果提示基因联合细胞共移植有望成为一种维持移植细胞存活和治疗效果的新策略。

4.4 干细胞联合组织工程技术

细胞外基质是心肌细胞微环境的重要成分,包括层黏连蛋白、胶原蛋白、纤连蛋白等,这些组分为细胞的生长、修复、纤维化提供重要支撑^[52]。因此诸多研究尝试通过联合胞外基质与干细胞共移植的方法改善移植细胞的滞留率和存活率。合成的水凝胶具有与心肌细胞外基质相似的物理和生物特性,将移植细胞包裹后进行移植,细胞的存活率明显提高^[29, 53]。而胶原蛋白是细胞外基质的天然组分,具有低免疫原

性和高组织亲和性,因此其与干细胞共同注射到大鼠心肌梗死边缘可明显提高细胞存活^[54]。这些研究表明,通过共同输注胞外基质成分是提高细胞滞留率和存活率的有效方法,然而由于基质成分随着时间的延长而降解和丢失,并不能维持较长时间^[29]。

近年来组织工程技术的迅猛发展使得心肌细胞或干细胞组织片的构建与应用可能成为代替细胞注射的新型移植方法,并且利用组织工程技术构建的三维细胞支架系统或心肌组织片能为移植细胞提供良好的生存环境,发挥其改善整体心功能的作用。研究表明,将 MSCs 与组织工程移植物共培养进行梗死局部的修补能显著改善心功能^[55]。然而,组织工程心肌移植也有许多问题亟待解决,如因无血管供血供氧从而限制心肌组织块的体积(目前最厚仅为数百 μm),以及如何改善其组织亲和力和心肌整合能力。

4.5 干细胞来源外泌体(MSC-Exo)

2010年Lai等^[56]从MSCs培养液中提取外泌体(exosome),为直径30-100nm、包含多种细胞因子和RNA的囊泡小体,可介导细胞信号传递、免疫调节等作用,在血管生成、组织修复方面起关键作用^[57]。间充质干细胞来源外泌体(mesenchymal stem cell derived exosomes, MSC-Exo)不仅表达外泌体普遍存在的表面标记物,如四跨膜蛋白(CD9、CD63和CD81)、Alix和Tsg101,还表达一些黏附分子的MSC膜蛋白,包括CD29、CD44和CD73^[58]。

越来越多的研究证实,外泌体显著抑制细胞凋亡、纤维化和炎症反应,并促进血管生成。在离体实验中,将MSC-Exo注射到大鼠心肌梗死区边缘,产生对肌管形成的刺激作用和对T淋巴细胞增殖的抑制作用。体内动物实验进一步证实了MSC-Exo增加左心室射血分数、缩小梗死面积、保持心脏收缩和舒张功能,并增加新生毛细血管的密度,改善心功能^[59]。MSC-Exo可促进细胞增殖和抑制细胞凋亡,并阻止转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)诱导的成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,miRNA测序结果表明MSC-Exo和MSCs具有相似的miRNA表达谱,这可能是MSC-Exo可以替代MSCs用于心脏修复的原因之一。此外,MSC-Exo中几种miRNA的表达与MSCs存在显著差异,这可部分解释MSC-Exo的治疗效果优于MSCs^[60]。MSC-Exo中的miR-132既可以通过靶向Ras p21蛋白活化子(ras

p21 protein activator 1, RASA1)增加内皮细胞形成,又可以显著提高其体内血管生成能力,并保护心肌梗死小鼠的心脏功能^[61]。miR-181a在MSC-Exo中的过表达显著下调促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),增加抗炎细胞因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的表达,抑制炎症反应,通过靶向c-Fos促进Treg细胞极化,并对心肌梗死区域发挥更强的治疗作用^[62]。此外,将MSC-Exo用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)预处理,可通过抑制LPS依赖的NF- κ B信号通路和激活AKT1/AKT2信号通路,在小鼠心肌梗死模型中增加巨噬细胞M2型极化,减弱梗死后的炎症反应^[63]。研究还发现阿托伐他汀通过上调长链非编码RNA H19增强MSC-Exo治疗AMI的效果。与MSC-Exo相比,经阿托伐他汀预处理的MSC-Exo可进一步改善心功能,缩小梗死面积,减少心肌细胞凋亡,促进梗死周围区域的血管生成,并抑制IL-6和TNF- α 的升高^[64]。

由此可见,MSC-Exo是MSCs发挥旁分泌作用的主要载体,在心肌修复中具有良好的应用前景。相较于MSCs移植的致癌风险,MSC-Exo的实验未观察到肿瘤形成。目前也没有MSC-Exo引发免疫排斥反应的相关报道。总而言之,MSC-Exo具有性质稳定、易于运输、便于保存、不易栓塞毛细血管等优点,有望成为治疗AMI极具转化前景的新型生物制剂^[65]。

综上,干细胞移植与组织工程、基因治疗、药物治疗、物理治疗等联合应用可能会有更好的效果和更广阔的应用前景。鉴于临床患者的疾病状态千差万别,疾病过程也动态变化,因此采取综合多项措施的“鸡尾酒”疗法,对每个病例选择最优化的个体化治疗方案将是最佳选择。

5 存在的问题和展望

干细胞尤其是MSCs移植治疗AMI的初步疗效已明确,为心肌修复开创了一个崭新的生物治疗方法,但尚存在一些亟待解决的问题:第一,移植后干细胞心肌定向分化是否真的存在?如果存在,则其发生、发展和调控机制如何?这些都有待深入研究;第二,移植细胞的最优类型、剂量、途径和时机仍不清楚;第三,开展多能干细胞如胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和iPSCs的临床试验有

待进一步扫清障碍;第四,新型干细胞的治疗效果有待更高质量的大规模临床试验进行验证;第五,如何进一步提高移植后干细胞的滞留率和存活率,最终提高疗效?第六,干细胞治疗后长期的不良反应是什么?因目前大部分临床试验和基础研究所观察的时间较短,其最终的转归还不清楚;第七,移植后干细胞与内源性干细胞是如何相互作用的?如何促进内源性再生修复机制的激活?

目前的基础研究和临床试验结果显示干细胞移植治疗心肌梗死的机制复杂多样,短期的心功能改善与远期心脏结构、功能改变的机制可能是不同的,这些均需深入研究。目前动物实验多采用冷冻心

肌、结扎冠状动脉的方法制备AMI模型,在一定程度上模仿了心肌缺血损伤,但毕竟与临床AMI患者的病理状态和过程不同,细胞移植后的微环境也不尽相同,因此还需要更接近真实而可靠的疾病模型。

总之,干细胞移植治疗心肌梗死的研究已经取得了举世瞩目的进展,随着生物学技术的飞速发展,干细胞移植将被赋予更活跃的生命力。目前干细胞心肌再生研究需要更加严谨、科学、周密的实验设计,以及多中心、大规模、随机、对照双盲的临床试验来进一步论证干细胞治疗的近远期效果和伴随风险。如果上述问题通过进一步基础研究与临床研究得到解决,则心肌梗死的治疗将出现革命性的飞跃。

参考文献:

- [1] Rojas-Rios P, Gonzalez-Reyes A. Concise review: The plasticity of stem cell niches: a general property behind tissue homeostasis and repair[J]. *Stem Cells*, 2014, 32: 852-859.
- [2] Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 14482-14486.
- [3] Krause DS, Theise ND, Collector MI, *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell[J]. *Cell*, 2001, 105: 369-377.
- [4] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676.
- [5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- [6] Hodgkinson CP, Bareja A, Gomez JA, *et al.* Emerging concepts in paracrine mechanisms in regenerative cardiovascular medicine and biology[J]. *Circ Res*, 2016, 118: 95-107.
- [7] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans[J]. *Science*, 2009, 324: 98-102.
- [8] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344: 1750-1757.
- [9] Yang YJ, Qian HY, Huang J, *et al.* Atorvastatin treatment improves survival and effects of implanted mesenchymal stem cells in post-infarct swine hearts[J]. *Eur Heart J*, 2008, 29: 1578-1590.
- [10] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, *et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts[J]. *Nature*, 2004, 428: 664-668.
- [11] Nygren JM, Jovinge S, Breitbart M, *et al.* Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation[J]. *Nat Med*, 2004, 10: 494-501.
- [12] Wu JM, Hsueh YC, Ch'ang HJ, *et al.* Circulating cells contribute to cardiomyocyte regeneration after injury[J]. *Circ Res*, 2015, 116: 633-641.
- [13] Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, *et al.* Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy[J]. *Circ Res*, 2008, 103: 1204-1219.
- [14] Tomita S, Li RK, Weisel RD, *et al.* Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function[J]. *Circulation*, 1999, 100: II247-256.
- [15] Mathiasen AB, Qayyum AA, Jorgensen E, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial)[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36: 1744-1753.
- [16] Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, *et al.* Transcatheter mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial[J]. *JAMA*, 2014, 311: 62-73.
- [17] Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, *et al.* Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (cardiopoietic stem cell therapy in heart failure) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61: 2329-2338.
- [18] Perin EC, Borow KM, Silva GV, *et al.* A phase II dose-

- escalation study of allogeneic mesenchymal precursor cells in patients with ischemic or nonischemic heart failure[J]. *Circ Res*, 2015, 117: 576-584.
- [19] Hare JM, Traverse JH, Henry TD, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54: 2277-2286.
- [20] Pompilio G, Nigro P, Bassetti B, *et al.* Bone marrow cell therapy for ischemic heart disease: the never ending story [J]. *Circ Res*, 2015, 117: 490-493.
- [21] Teng CJ, Luo J, Chiu RC, *et al.* Massive mechanical loss of microspheres with direct intramyocardial injection in the beating heart: implications for cellular cardiomyoplasty [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006, 132: 628-632.
- [22] Zhang H, Chen H, Wang W, *et al.* Cell survival and redistribution after transplantation into damaged myocardium [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14: 1078-1082.
- [23] Zhang H, Song P, Tang Y, *et al.* Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 134: 1234-1240.
- [24] Kehat I, Khimovich L, Caspi O, *et al.* Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1282-1289.
- [25] Garot J, Unterseh T, Teiger E, *et al.* Magnetic resonance imaging of targeted catheter-based implantation of myogenic precursor cells into infarcted left ventricular myocardium[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41: 1841-1846.
- [26] Dick AJ, Guttman MA, Raman VK, *et al.* Magnetic resonance fluoroscopy allows targeted delivery of mesenchymal stem cells to infarct borders in Swine [J]. *Circulation*, 2003, 108: 2899-2904.
- [27] Thompson CA, Nasser BA, Makower J, *et al.* Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41: 1964-1971.
- [28] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, *et al.* Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction[J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2001, 126: 932-938.
- [29] Mayfield AE, Tilokee EL, Latham N, *et al.* The effect of encapsulation of cardiac stem cells within matrix-enriched hydrogel capsules on cell survival, post-ischemic cell retention and cardiac function[J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 133-142.
- [30] Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, *et al.* Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy[J]. *Lancet*, 2003, 362: 697-703.
- [31] Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, *et al.* SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction [J]. *FASEB J*, 2007, 21: 3197-3207.
- [32] Taghavi S, George JC. Homing of stem cells to ischemic myocardium[J]. *Am J Transl Res*, 2013, 5: 404-411.
- [33] Vicario J, Campos C, Piva J, *et al.* Transcoronary sinus administration of autologous bone marrow in patients with chronic refractory stable angina Phase 1 [J]. *Cardiovasc Radiat Med*, 2004, 5: 71-76.
- [34] Halkos ME, Zhao ZQ, Kerendi F, *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2008, 103: 525-536.
- [35] Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, *et al.* A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogeneic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29: 251-259.
- [36] Lee ST, White AJ, Matsushita S, *et al.* Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57: 455-465.
- [37] Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, *et al.* Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial [J]. *JAMA*, 2012, 308: 2380-2389.
- [38] Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, *et al.* Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial [J]. *JAMA*, 2011, 306: 2110-2119.
- [39] Hou JF, Zhang H, Yuan X, *et al.* *In vitro* effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation[J]. *Lasers Surg Med*, 2008, 40: 726-733.
- [40] Mosser DD, Caron AW, Bourget L, *et al.* Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 5317-5327.
- [41] Li N, Zhang Q, Qian H, *et al.* Atorvastatin induces autophagy of mesenchymal stem cells under hypoxia and serum

- deprivation conditions by activating the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127: 1046-1051.
- [42] Chandra M, Surendra K, Kapoor R K, *et al.* Oxidant stress mechanisms in heart failure [J]. *Boll Chim Farm*, 2000, 139: 149-152.
- [43] Gurusamy N, Ray D, Lekli I, *et al.* Red wine antioxidant resveratrol-modified cardiac stem cells regenerate infarcted myocardium [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14: 2235-2239.
- [44] Drowley L, Okada M, Beckman S, *et al.* Cellular antioxidant levels influence muscle stem cell therapy [J]. *Mol Ther*, 2010, 18: 1865-1873.
- [45] Stanley BA, Sivakumaran V, Shi S, *et al.* Thioredoxin reductase-2 is essential for keeping low levels of H₂O₂ emission from isolated heart mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 33669-33677.
- [46] Retuerto MA, Schalch P, Patejunas G, *et al.* Angiogenic pretreatment improves the efficacy of cellular cardiomyoplasty performed with fetal cardiomyocyte implantation [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 127: 1041-1049; discussion 1049-1051.
- [47] Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 592-603.
- [48] Yang YJ, Qian HY, Huang J, *et al.* Combined therapy with simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells increases benefits in infarcted swine hearts [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 2076-2082.
- [49] Han XJ, Li H, Liu CB, *et al.* Guanxin Danshen Formulation improved the effect of mesenchymal stem cells transplantation for the treatment of myocardial infarction probably via enhancing the engraftment [J]. *Life Sci*, 2019, 233: 116740.
- [50] Hu S, Huang M, Nguyen PK, *et al.* Novel microRNA pro-survival cocktail for improving engraftment and function of cardiac progenitor cell transplantation [J]. *Circulation*, 2011, 124: S27-34.
- [51] Ong SG, Lee WH, Huang M, *et al.* Cross talk of combined gene and cell therapy in ischemic heart disease: role of exosomal microRNA transfer [J]. *Circulation*, 2014, 130: S60-69.
- [52] Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine [J]. *Nature*, 2004, 428: 487-492.
- [53] Geckil H, Xu F, Zhang X, *et al.* Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2010, 5: 469-484.
- [54] Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, *et al.* Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts [J]. *Circulation*, 2006, 114: I167-173.
- [55] Sekine H, Shimizu T, Hobo K, *et al.* Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts [J]. *Circulation*, 2008, 118: S145-152.
- [56] Lai RC, Arslan F, Lee MM, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4: 214-222.
- [57] Sluijter JP, Verhage V, Deddens J C, *et al.* Microvesicles and exosomes for intracardiac communication [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102: 302-311.
- [58] Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 4142-4157.
- [59] Teng X, Chen L, Chen W, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37: 2415-2424.
- [60] Shao L, Zhang Y, Lan B, *et al.* miRNA-sequence indicates that mesenchymal stem cells and exosomes have similar mechanism to enhance cardiac repair [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 4150705.
- [61] Ma T, Chen Y, Chen Y, *et al.* microRNA-132, delivered by mesenchymal stem cell-derived exosomes, promote angiogenesis in myocardial infarction [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3290372.
- [62] Wei Z, Qiao S, Zhao J, *et al.* miRNA-181a over-expression in mesenchymal stem cell-derived exosomes influenced inflammatory response after myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116632.
- [63] Xu R, Zhang F, Chai R, *et al.* Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 7617-7631.
- [64] Huang P, Wang L, Li Q, *et al.* Atorvastatin enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells-derived exosomes in acute myocardial infarction via up-regulating long non-coding RNA H19 [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116: 353-367.
- [65] Sun SJ, Wei R, Li F, *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived exosomes in cardiac regeneration and repair [J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16: 1662-1673.