

骨髓干细胞向心肌细胞分化的研究现状

蒋小英, 高广道, 王新风

(西安交通大学医学院病理生理学教研室, 陕西省西安市 710061)

[关键词] 病理学与病理生理学; 骨髓干细胞向心肌细胞分化; 综述; 心肌细胞增殖; 骨髓干细胞

[摘要] 心肌细胞在生理和病理状况下存在细胞增殖现象。骨髓干细胞被认为是再生心肌细胞的来源之一。骨髓细胞不论是全髓细胞、造血干细胞, 还是间质干细胞, 体内移植都可向心肌细胞分化, 在一定程度上改善心功能。体外诱导不仅可出现心肌细胞表型, 还表达功能性受体。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

长期以来, 人们认为成年心肌细胞属终末分化细胞, 不能再分裂增殖, 且以往的检测方法未检测到心肌细胞有丝分裂。然而缺血性心脏病存在心肌广泛纤维化和伴随发生的心肌细胞数减少: 1 mm^3 胶原的沉积意味着 50×10^3 个细胞的丢失, 那么缺血性心脏病晚期的心肌纤维化则左室心肌数目减少应达到 90% 左右, 而实际上减少不足 30%。这种差异在原发性扩张型心脏病就更明显, 纤维化不伴有心肌数目的减少^[1]。这种现象促使我们思索成年心肌细胞的增殖能力。近来随着检测方法的日益先进, 有研究报道成年心肌细胞在生理状况和病理状况下都存在细胞增殖现象^[1,2]。

1 心肌再生的证据

Kajstura 等^[1]用嗜 DNA 的荧光染料 PI(propidium iodide) 显示核形态, 抗 α 肌动蛋白抗体标记心肌, 采用高分辨共聚焦显微镜检测心肌细胞有丝分裂。结果发现, 正常对照心脏每百万个心肌细胞有 14 个在进行有丝分裂, 而疾病组则增加近 10 倍; 缺血性心脏病晚期每百万个心肌细胞检出 152 个有丝分裂, 原发性扩张型心脏病检出率则为 131 个, 且有丝分裂时间不超过 1 h。在核有丝分裂的同时可检测到胞浆分裂, 给心肌细胞增殖提供了有力的证据。由于成年人心室含 5.8×10^9 个心肌细胞, 按 Kajstura 等^[1]的增殖比例, 1 h 在正常心脏、缺血性心脏病、扩张型心脏病将分别有 81.2×10^3 、 882×10^3 、 760×10^3 个心肌细胞生成。生理状况下一定数目的心肌增殖有助于补偿由于凋亡而引起的心肌数目减少, 维持心脏的稳态, 而疾病组显著的心肌增殖可能是机体对疾病的抗损伤反应。

Ki-67 是一种核抗原, 在除 G_0 期外的整个细胞周期中均表达, 且在 DNA 修复中不表达, 明显优于 H^3 -胸腺嘧啶掺入法反映细胞增殖。Beltrami 等^[2]用心肌肌动蛋白抗体显示心

肌细胞, 用 Ki-67 作为细胞增殖的标志, 发现心肌梗死区周围心肌高比例的心肌细胞再生。在心肌梗死边缘区和远距离区每百万个心肌细胞分别检出 800 个及 300 个 Ki-67 阳性细胞, 同时细胞分裂的特征如有丝分裂纺锤体、收缩环、胞核分裂和胞浆分裂均可检测到, 进一步证实心肌梗死后的心肌再生。

有研究者从细胞周期素及相关激酶和端粒酶的角度研究心肌再生^[4,8]。Setoguchi 等^[3]报道狗心衰时 cyclin D2 增加 7 倍, cyclin D2 协同激酶活性增加了 3 倍, cyclin A 和 cyclin B 增加 4 倍, cdc 2 增加 8 倍, 活性增加 5 倍, 同时发现正常对照组分裂指数为 $16/10^6$, 心衰组 $95/10^6$ 。Leri 等^[4]报道在狗中度、重度及明显心衰时 Ki-67 阳性的心肌细胞分别增加 5 倍、12 倍、17 倍, 且在维持端粒长度不变的情况下, 端粒酶活性增加 2.4 倍和 3.1 倍。而端粒酶的活性体内只出现于增殖细胞, 这说明心肌细胞中存在一有能力进入细胞周期、进行分裂增殖的细胞亚群。

2 再生心肌的来源

近来不少研究揭示心肌细胞的增殖, 而增殖细胞的前体目前尚无定论。有研究报道正常成人心肌可检测到表达干细胞相关抗原(C-kit、MDR1、Scar 1)的原始细胞^[5], 这些细胞被认为是心肌细胞增殖的前体。它们是存在于心脏局部的心脏干细胞(cardiac stem cell, CSC), 还是心外循环中的干细胞迁移到心脏分化为心肌细胞, 有待进一步证实。关于心外干细胞的来源, 更多报道指向骨髓细胞。一些研究表明骨髓细胞(bone marrow cell, BMC)在心肌梗死后, 经局部注射^[6], 细胞因子动员^[7], 自发性移位^[8], 能再生为心肌细胞。如果心脏局部存在 CSC(生理条件下心肌细胞增殖的存在支持它), 研制促 CSC 分化的生长因子, 有重要实用意义。因为由 BMC 补充心肌细胞需迁移、定位、分化。而由 CSC 来补充心肌细胞要比 BMC 快得多, 目前在 CSC 方向的研究甚少。

近来系列研究围绕心肌嵌合体展开, 即把雌性心脏同种移植入雄性体内, 检测移植心脏心肌细胞 Y 染色体的阳性分布, 证实外源迁移表达 C-kit、MDR1、Scar 1 未分化干细胞的存在, 以区分来源于受体干细胞和供体心脏自身干细胞。

[收稿日期] 2003-06-03 [修回日期] 2003-12-19

[基金项目] 国家自然科学基金(30271435)资助

[作者简介] 蒋小英, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为心力衰竭与防治。E-mail: sohonest@163.com。高广道, 教授, 博士研究生导师。王新风, 助教, 在读博士, 研究方向为心肌 AT_2 受体在心肌重构中的作用。

Quaini 报道^[5]在对照组正常心脏检测到低数目的未分化干细胞,这些细胞表达干细胞标志且形态小而圆,核大质少,在移植组干细胞数目显著增加 4~6 倍,且其中 12%~16% 干细胞表达 Y 染色体,说明移植心脏中的心肌干细胞有 2 个来源,心脏固有的和外源迁移来的。在供体心脏的心肌细胞,冠状小动脉、毛细血管中 Y 染色体阳性细胞占到 7%~10%,且高度增殖。Glaser 报道血管平滑肌中 2.6% 为宿主起源,但未检测到宿主起源的心肌细胞。Laflamme 等^[10]报道了同种移植心脏中低至 0.02%~1% 的心肌嵌合体。Quaini 报道的高表达的再生心肌有很大的假阳性存在,主要是浸润了大量的炎症淋巴细胞和巨噬细胞。

系列研究表明干细胞之间可跨系分化,来源于神经细胞、肝细胞、骨髓间质细胞及内皮细胞的干细胞均可向心肌细胞分化^[9]。由于骨髓来源的方便性,由骨髓细胞向心肌细胞的分化得到深入的研究。

3 骨髓细胞的心肌细胞分化

3.1 骨髓细胞

3.1.1 异体移植 Bittner 等^[11]报道给雌性肌营养不良的小鼠注射同种雄性小鼠的骨髓细胞,70 天后骨骼肌和心肌都检测到 Y 染色体阳性细胞,说明心脏可通过征募骨髓源性细胞进行增殖。Goodell 等^[12]的研究把高度纯化的骨髓细胞移植入致死性放射处理的小鼠,通过冠状动脉闭塞造成心肌缺血,发现移植的骨髓细胞可分化为心肌细胞和内皮细胞,改善心肌缺血。Orlic 等^[6,13]把小鼠左前降支冠状动脉阻断诱发心肌梗死,5 h 后来源于转基因雄性小鼠表达 EGFP 的 Lin⁻ C-kit⁺ 的骨髓细胞被注射到梗死区,9 天后用 K^r67 和 Brdu 掺入检测到新生心肌细胞。这些细胞 EGFP 阳性, Y 染色体阳性,心肌特异蛋白如心肌肌球蛋白、心肌转录因子 GATA-4、MEF2、CSX/NKX 2.5 也阳性,同时检测到 Connexin 43 阳性,提示新生心肌已同周围心肌细胞建立连接,血液动力学参数也有改进。进而 Orlic 等^[7]又用干细胞因子和粒细胞因子动员骨髓细胞,小鼠急性梗死区的边缘 27 天后诱导了显著的心肌再生,死亡率减少 68%,梗死区缩小 40%,提示细胞因子可加速骨髓细胞向心肌的分化。

3.1.2 自体移植 Tomita 等进一步研究骨髓细胞的自体移植,来自成年小鼠的骨髓细胞在体外分别经 5-氮胞苷、TGF- β 、胰岛素诱导,结果发现只有 5-氮胞苷组形成肌钙蛋白 iv 和肌球蛋白重链阳性的、具有肌管样结构的心肌细胞。5-氮胞苷诱导的骨髓细胞移植于冷冻损伤的心肌,可检测到增殖的心肌,心脏动力学参数也有改善^[14]。骨髓细胞的自体移植用来再生心肌无排斥反应,为临床应用提供了一个很好的方向。其对急性心肌梗死患者,用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员自体骨髓干细胞来修复坏死心肌组织的“干细胞原位移植”疗法,能减小心肌梗死的范围,改善心功能^[25]。

3.2 造血干细胞异体移植

Jackson 等从全骨髓中分离出高富集的造血干细胞,即 SP 细胞,他们标志是: CD34⁻/low、G-kit⁺ 和 Scar1⁺。SP 细胞在整个骨髓中仅占 0.05%,经富集后纯度可达 91%,SP 细

胞来源于转基因小鼠 Rosa 26,其广泛表达 lac Z 基因。经致死放射线照射的小鼠注射来自 Rosa 26 的富集 SP 细胞,骨髓移植 10 周后左前降支被阻塞 60 min,2~4 周后检测心脏,同时表达 lac Z 和心肌肌动蛋白的细胞为 SP 分化来的新生心肌细胞,主要分布于梗死区的外周,占整个细胞的 0.02%。SP 分化来的内皮细胞表达 lac Z 和 flt-1,占整个内皮细胞的 3%,SP 引起的心肌再生为 0.02%,类似于用全骨髓细胞进行移植的比率^[15]。说明骨髓造血干细胞可向心肌细胞分化,能作为心肌细胞移植的来源。

3.3 骨髓间质干细胞

骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是骨髓细胞培养时的贴壁细胞,具有多能性,体内外均可向多种组织细胞分化。间质干细胞移植给人体或动物时具有很好的免疫耐受性,在组织中的分化与局部微环境有关^[16]。

3.3.1 异体移植 Wang 等^[17]报道,来自小鼠的间质干细胞经体外扩增用 4,6-diamidino-2-phenylindole 标记,注射入同种小鼠心脏,4 周后来自供体的间质干细胞显示了心肌分化,表达肌球蛋白重链蛋白和收缩蛋白。Connexin 43 阳性说明新生心肌已形成细胞间连接—闰盘^[17]。

3.3.2 自体移植 Shake 等^[18]把 D^r-F-labeled 标记的自体 MSC 植入冠状动脉阻塞诱导的心肌梗死区,2 周后发现 MSC 来源的心肌增生,以及心功能的明显改善。表明 MSC 自体移植在心肌梗死中的作用。

3.3.3 体外诱导分化 Fukuda 等^[19]研究小组从骨髓间质细胞中分离一个成心肌细胞系(cardiomyogenic, CMG)。骨髓基质细胞经 5-氮胞苷体外诱导后,形态由成纤维细胞向心肌细胞过渡,出现肌管样结构,与邻近细胞有连接形成,2 周后出现自发性搏动,3 周后形成同步搏动。这些细胞表达 ANP 和 BNP。电镜观察可见心肌细胞样的超微结构包括典型的肌原纤维和心房颗粒。这些细胞的动作电位包括窦房结样动作电位和心室肌动作电位。分析收缩蛋白基因的同工体,他们的表型类似于胎儿心室肌细胞。这些细胞在 5-氮胞苷诱导前表达 NKX2.5、CATA4、TEF-1 和 MEF-2C,在诱导后表达 MEF-2A 和 MEF-2D。这一细胞系的发现为心肌细胞移植提供一个很好的模型。

Fukuda 等研究组进一步检测 CMG 细胞分化前后受体的表达状况:5-氮胞苷诱导前 CMG 细胞表达 α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D} 肾上腺能受体,诱导后 1 天即可检测到 β_1 、 β_2 和 M₁、M₂ 受体的表达, α_{1A} 表达显著增加。用新福林处理可检测到 ERK 1/2 磷酸化,这一作用可被哌啶啉完全抑制。异丙肾上腺素可诱导 cAMP 上升 38 倍,这一作用可被心得安完全抑制。诱导心率上升 48%,可被心得安和 β_1 阻滞剂 CGP20712A 阻断 79% 和 71%,而 β_2 阻滞剂 ICI118551 作用不明显。卡巴诱导 IP₃ 上升 32 倍,可被 M₂ 阻断剂 AFDX116 阻断^[20,21]。说明 5-氮胞苷诱导的 CMG 细胞不仅具有心肌细胞表型,且功能性地表达 β_1 、 β_2 、M₁、M₂ 受体,活化下游的信号传导通路,说明 CMG 细胞是心肌细胞移植的良好供体。

3.3.4 人骨髓间质干细胞 Liechty 等^[22]把人的 MSC 植入妊娠中的胎羊,发现人的 BMC 出现位点特异性分化,如心

肌、软骨等,无异种排斥反应。Toma 等^[23]把正常成人 MSC 用 lac Z 基因标记,注入成年小鼠心脏,观察人 MSC 细胞的心肌分化能力,1 周后人 MSC 逐渐在形态上与周围心肌开始类似,免疫组织化学提示这些细胞表达心肌细胞标志结合蛋白、 β 肌球蛋白重链蛋白、 α 肌动蛋白、心肌肌钙蛋白 T、受磷蛋白,表达水平与宿主小鼠心肌差别不大,提示人 MSC 在体内可向心肌细胞分化。

4 结语

骨髓细胞不论是全骨髓细胞、造血干细胞,还是间质干细胞体内移植都可向心肌细胞分化,在一定程度上改善心脏功能,体外诱导不仅可出现心肌细胞表型,还表达功能性受体。由于它的自体来源及取材的方便性,骨髓细胞为临床研究心肌细胞移植提供一个很好的细胞来源。近年来,慢性心力衰竭的发病率呈明显上升趋势,而其主要的病理生理机制是心肌细胞肥大^[26,27]。骨髓细胞是否可分化为心肌细胞,阻抑心肌肥大的进程,改善心功能,国内外尚未见报道。

最近 Terada 等^[24]报道骨髓细胞可通过与其它细胞自发融合,而呈现后者的细胞表型。这将给骨髓源性的心肌再生研究带来很大冲击,但这需要大量的实验来支持。骨髓细胞分化为心肌细胞首先表现为胚胎 MC 表型,是否可向成熟 MC 分化,或如何诱导这一分化,尚待研究。关于 BMC 向心肌细胞分化仍有大量工作需要进行。

[参考文献]

- [1] Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 8 801-805
- [2] 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**: 1 750-757
- [3] Setoguchi M, Leri A, Wang S, Liu Y, Luca AD, Giordano A, et al. Activation of cyclins and cyclin dependent kinases, DNA synthesis, and myocyte mitotic division in pacing-induced heart failure in dogs. *Lab Invest*, 1999, **79**: 1 545-558
- [4] Leri A, Barlucchi L, Limana F, Deplata A, Hintze TH. Telomerase expression and activity are coupled with myocyte proliferation and preservation of telomeric length in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 8 626-631
- [5] Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, 2002, **346**: 5-15
- [6] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, **410**: 701-705
- [7] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 10 344-349
- [8] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang S, et al.

Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001, **7**: 430-436

- [9] Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature*, 2002, **415**: 240-243
- [10] Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res*, 2002, **90**: 634-640
- [11] Bittner RE, Schofer C, Weipolshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, et al. Recruitment of bone marrow derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol Berl*, 1999, **199**: 391-396
- [12] Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Majka SM, Mi T, Wang H, et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **938**: 208-218
- [13] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci*, 2001, **938**: 221-229
- [14] Tomita S, Li PK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improve damaged heart function. *Circulation*, 1999, **100**: II 247-256
- [15] Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartly CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, **107**: 1 395-401
- [16] Le Blanc K. Mesenchymal stem cells. Basic science and future clinical use. *Lakartidningen*, 2002, **99**: 1 318-321
- [17] Wang JS, Shun-Tim D, Calipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, **120**: 999-1 005
- [18] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal stem cells implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*, 2002, **73**: 1 919-925
- [19] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs*, 2001, **25**: 187-193
- [20] Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*, 2002, **105**: 380-386
- [21] Fukuda K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. *Congenit Anom Kyoto*, 2002, **42**: 1-9
- [22] Liechty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation sheep. *Nat Med*, 2000, **6**: 1 282-286
- [23] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 2002, **105**: 93-98
- [24] Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002, **416**: 542-545
- [25] 陈运贤, 欧瑞明, 钟雪云, 徐新, 赵洪云, 管慧红, 等. 自体骨髓干细胞原位移植治疗急性心肌梗死的临床研究. *中国病理生理杂志*, 2003, **19**: 452-454
- [26] 方明, 彭健. 血管紧张素 II 型受体与高血压左心室重构. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 457-460
- [27] 陈卫兵, 蒲红, 秦永文, 殷明. 自发性高血压大鼠左心室重构中的细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **9**: 289-293

(此文编辑 文玉珊)