

心肌球源性细胞在心力衰竭中的应用

林嘉润¹ 廖联明²

【摘要】 冠状动脉或其分支阻塞而引起心肌缺血可导致急性心肌梗死, 梗死区域周围形成瘢痕组织后心脏收缩功能下降, 心室发生病理性重塑, 最终出现充血性心力衰竭。心肌球源性细胞(CDC)是来自心肌的干细胞, 在体外可以分化为心肌细胞和血管内皮细胞。在体内可以触发自身心肌细胞增殖和通过旁分泌募集祖细胞。旁分泌介质不但拥有干细胞的作用, 且没有细胞移植相关的并发症。临床实验证明了 CDC 可以促进心肌梗死后的心脏功能的恢复。长期疗效还有待大规模临床试验的验证。

【关键词】 心肌梗死; 心力衰竭; 干细胞; 心肌球源性细胞

Application of cardiosphere-derived cells in ischemic heart failure Lin Jiarun, Liao Lianming. Clinical Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; Center of Laboratory Medicine, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China
Corresponding author: Liao Lianming, Email: liao772002@aliyun.com

【Abstract】 Acute cardiac infarction is caused by acute cardiac ischemia due to stenosis of coronary artery and its branches. Serious cardiac ischemia may cause necrosis of heart cells and scar around the infarction area may cause heart dysfunction and remodeling, leading to heart failure. Stem cells derived from cardiac tissue itself, referred to as cardiosphere-derived cells (CDCs), may give rise to muscular cells and vascular endothelial cells *in vitro* and trigger native cardiomyocyte proliferation and recruitment of endogenous progenitor cells via paracrine effects. Mediators involved in paracrine signaling can be used as a stem cell-free therapy, with all the benefits and none of the associated complications of stem cells. Large-scale clinical trials are needed to confirm the long-term efficacy of CDC.

【Key words】 Myocardial infarction; Heart failure; Stem cells; Cardiosphere-derived cells

急性心肌梗死多发生在冠状动脉粥样硬化后狭窄, 由于某些诱因致使斑块破裂脱落或血小板聚集形成血栓阻塞冠状动脉, 或诱发冠状动脉痉挛, 导致心肌急性缺血坏死, 形成梗死。梗死区心肌收缩单位大量丧失, 形成纤维性瘢痕, 进而导致心力衰竭。

心肌梗死后心力衰竭目前尚无病因性有效治疗方法, 因此成为基础与临床医学研究多年来持续关注的热点。心肌球源性细胞(cardiosphere-derived cell, CDC)是心肌组织在体外培养后长出的球状细胞团中分离而来的细胞^[1], 具有干细胞的特征, 在体外可以分化为心肌细胞和血管内皮细胞, 为梗死后心肌再生提供一条可能途径。目前 CDC 治疗心力衰竭已经进入临床试验阶段。本文对 CDC 促进心肌细胞再生的机制和临床研究进展作一综述。

一、CDC 的分离和特征

2007年 Smith等^[1]首次报道了 CDC 的分离方法。首先采用经皮心肌组织活检的方法获得少量组织块。将组织块在优化的培养液中培养, 直到有细胞爬出。这些细胞在体外增殖后可形成球状细胞团, 因此命名为 CDC。将细胞团消化后获得的细胞接种在包被 fibronectin 的培养瓶上即可进行大量扩增。CDC 具有干细胞的特征, 如克隆性生长、分化成心肌细胞、平滑肌细胞和内皮细胞。CDC 表达 CD105 (转化生长因子-β 亚基), 但不表达 CD45 (造血细胞标记)。大约 25%~60% 的 CDC 表达 CD90 (间充质干细胞标记)。CDC 不表达成纤维细胞的表面标记蛋白, 也不表达肌小节蛋白。

刚刚死亡的机体心肌组织中也可以获取 CDC。Sun等^[2]报道, 无论人和小鼠, 死亡后 24 h 内可以从心肌组织培养得到 CDC。这些 CDC 移植到扩张型心脏病的小鼠心脏后能改善射血分数。心室肌细胞外基质能促进植入心肌梗死组织内的 CDC 向心肌细胞、血管内皮及血管平滑肌细胞分化, 改善心肌梗死后的心脏结构及功能^[3]。CDC 和骨髓干细胞

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2019.01.011

作者单位: 550004 贵阳, 贵州医科大学临床医学院 2015 级¹; 350001 福州, 福建医科大学附属协和医院中心实验室²

通信作者: 廖联明, Email: liao772002@aliyun.com

以及脂肪干细胞的平行对照试验表明, CDC 对改善心肌功能和减少细胞凋亡更有效^[4]。c-kit⁺/flk-1⁺/islet-1⁺ CDC 的数量以及 CDC 的总数量在新生儿和婴儿中最高,然后在成年期下降。此外,新生儿心脏来源的 CDC 相比成年心脏来源的 CDC 拥有更好的促进心肌功能康复和血管生成的功能,向心肌细胞分化的能力也更强^[5]。

二、细胞给予途径

经何途径给予 CDC 最为安全和有效,临床一直存在不同意见。选择最佳给予途径的时候需要综合考虑不良反应风险、移植细胞在心脏的停留时间以及疗效。冠状动脉内注射 CDC 可以和经皮冠状动脉介入治疗同时进行。冠状动脉和外周血管注入心球细胞都可以减小瘢痕、促进血管新生和改善心功能^[6-7]。通过使用含有无钙磷酸盐缓冲盐、肝素和硝酸甘油改良的 CDC 注射液可以降低微栓塞的风险^[8]。

有两种不同的技术用于冠状动脉注射 CDC,分别为停顿注射(stop flow)和连续注射。注射途径也分为单血管途径和多血管途径。与常规的停顿注射和心肌内注射相比,持续小剂量冠状动脉内输注可以减少 CDC 结团,降低微栓塞的风险^[9]。

CADUCEUS 临床试验和早期的猪模型中,使用停顿注射方法可以使 CDC 更多地停留在梗死组织周边,减少瘢痕形成,但心脏射血分数没有明显改善。然而,采用 3 个主要冠状动脉连续输注后心肌收缩力显著改善,心肌细胞增殖增加。此外,和单个冠状动脉输注相比,3 个冠状动脉同时输注产生的炎症反应较轻微,纤维化减小程度、血管密度增加程度以及心脏功能和结构改善程度都更加理想^[10]。DYNAMIC 临床试验的同种异体心脏细胞治疗扩张型心肌病的临床研究也采用 3 个主要冠状动脉连续输注的方法^[11]。比起冠状动脉内注射,将 CDC 直接注射到梗死区周围,左心射血分数有显著的提高^[12],但要注意的是注射细胞存活率与注射细胞剂量成反比。心肌内注射需要开胸,手术成本高,风险大是其局限性,而通过冠状动脉内导管注射或经心内膜注射则可避免这两个缺点。此外心肌内注射的作用部位主要在注射周围的组织,而缺血性心肌病可能累及广泛的心肌组织损伤。心包注射也可以将 CDC 广泛分布到心脏,但需要患者体征足够稳定后才能实施^[13]。为了增强 CDC 治疗的靶向性,可将 CDC 进行磁珠标记后输注^[14]。

在急诊手术下,冠状动脉内输注可以在搭桥手术过程中进行。然而冠状动脉内输注的 CDC 很快会随血流流走,而且可能造成微血管闭塞。心肌注射的 CDC 则具有较高的组织内停留率,但因为缺乏有效的血液供应生存率较低。

三、提高相比在组织内的停留率

CDC 给以后在心脏的低停留率是影响疗效的重要因素。大多数细胞在 24 h 内离开心脏。由透明质酸和猪明胶组成的可聚合水凝胶制成的 CDC 细胞薄片是一种可能的解决方案,可使移植细胞的保留率增加 10 倍^[15]。和直接的

心肌内注射相比,当 CDC 通过细胞片的方式进行治疗时 LVEF 的改善也显著增加。

把 CDC 在低氧环境下预处理后再移植也可增强疗效。低氧诱导的 CDC 细胞片与在正常条件下的 CDC 的细胞片相比可以显著改善左心室功能,增加血管内皮生长因子的产生,并减少纤维化。低氧环境可能通过激活 PI3/Akt 信号通路来增强 CDC 的抗纤维化和促血管生成潜能,进而增强细胞血管内皮生长因子的表达^[16]。

另一种增强细胞植入和功能的方法是用碱性成纤维细胞生长因子进行预处理。碱性成纤维细胞生长因子可提高 CDC 的移植率和促进 CDC 向心肌细胞分化,进一步改善心室功能,减少瘢痕大小,增强局部室壁运动^[17]。同样,表皮生长因子预处理也能增强 CDC 的伤口愈合功能和心肌细胞的增值^[18]。

四、异体 CDC

同种异体 CDC 可以从不适合移植的供体心脏中获得,并大批量生产储存,以备临床随时中使用,某些情况可以避免心肌活检的风险^[19]。同种异体 CDC 表达 MHC I 分子,但不表达 MHC II 分子和共刺激分子;当和淋巴细胞共培养时,淋巴细胞没有增殖和产生细胞因子。动物实验表明移植 CDC 时不需要免疫抑制。由于同种异体 CDC 通过旁分泌机制间接发挥其对心脏再生的作用,而那些很轻微的排斥反应也是在这些修复机制启动后才发生的,因此 CDC 有足够的时间发挥作用。多个临床前研究表明,同种异体 CDC 移植到梗死动物后心肌瘢痕减少、心功能增加、血管生成增加^[20-21]。Kanazawa 等^[22]表明 CDC 在大动物急性心肌梗死再灌注 30 min 后移植也有效。与安慰剂相比, CDC 治疗后肌钙蛋白 I 水平降低,心肌细胞凋亡减少,梗死面积减小。不过没有研究对异体和自体 CDC 的疗效差异进行比较。

为了保证大批量生产出来异体 CDC 的质量,有必要确定用于检测同种异体干细胞效价的可靠指标。目前建议的指标包括基质细胞衍生因子 -1 (在再生和募集内源心肌细胞方面起主要作用), CD90 (和 CDC 效价成反比关系), 外泌体(在心肌保护、血管生成和再生起到作用), 或 PD-L1 (涉及 CDC 发挥免疫抑制作用)。其次,必须证明体外批量生产过程和存储是否会改变它们的再生潜能、免疫抑制作用或分泌旁分泌因子的能力。现已有两项 II 期临床研究在评估异体 CDC 的疗效,分别是 ALLSTAR 研究和 DYNAMIC 研究,前者针对急性心肌梗死,后者针对扩张型心肌病。

五、临床试验

1. 自体 CDC 逆转心室功能障碍: CADUCEUS 临床试验已经显示出了自体 CDC 治疗心力衰竭的美好前景。这项研究募集了 31 例心肌梗死 2 到 4 周后左室功能不全的患者。该 I 期临床试验的目的是观察冠状动脉内输注自体 CDC 的安全性和有效性。首先对治疗组患者进行心内膜心肌活检。85 % 的患者活检组织培养后能够获得目标数量的 CDC (平

均培养 36 d)。CDC 的质量标准是 CD105⁺ 细胞超过 95 %，CD45⁺ 细胞少于 5 %。CDC 通过导管输注到梗死组织相关的冠状动脉。注射 CDC 后瘢痕组织减少，心脏收缩力增加，局部心肌壁增厚。治疗后 1 年心脏磁共振成像发现心脏组织有生理意义的再生^[10]。

尽管自体 CDC 治疗有许多益处，但仍存在诸多局限性：(1) 自体移植需要心内膜心肌活检。这种侵入性活检的风险虽然较小，但无法避免。CDC 的分离培养可能失败。在 CADUCEUS 试验中有 3 个患者(15 %) CDC 受到细菌污染、有细胞遗传学异常和细胞总量不足。在 TICAP 试验中，10 % 的患者组织没有培养出 CDC。(2) 在 CADUCEUS 试验中，研究人员需要 4 ~ 6 周才能从心内膜心肌活检组织培养出足够的 CDC，因此这个方法不能用于急性心肌梗死的患者的治疗。

2. 自体 CDC 治疗左心发育不全综合征：TICAPI 期临床研究选择左冠状动脉 3 支主要分支为注射途径，为左心发育不全综合征患儿输注自体 CDC，结果心脏 MRI 检查显示右心室 EF、心脏组织再生和心力衰竭均有显著临床改善^[23]。

3. 同种异体 CDC 治疗心肌梗死：ALLSTAR 试验是 1 项多中心、双盲、安慰剂对照的 I/II 期试验，目的是评估冠状动脉内注射同种异体 CDC 对一年内发生前壁心肌梗死患者的疗效。在 I 期试验中纳入了 14 例患者，是一个剂量递增安全试验。这一阶段的结果非常令人鼓舞，没有发生免疫反应。治疗组 1 年后心脏 MRI 显示梗死面积相对减少了 15 %。但在 2017 年 11 月 15 日美国心脏病学会(AHA 2017) 上发布的 6 个月结果显示，在减少心肌梗死疤痕组织上，治疗组与安慰剂组差异无统计学意义。

4. 同种异体 CDC 治疗扩张型心肌病：DYNAMIC 试验观察冠状动脉内输注异体 CDC 对扩张型心肌病(缺血性和非缺血性)的安全性。14 例心脏衰竭患者通过 3 个主要冠状动脉接受 CDC 注射。1 年后的随访显示 LVEF 明显改善^[11]。

六、作用机制

目前认为 CDC 通过激活心肌细胞增殖和保护心肌细胞两条途径诱导心脏组织再生。然而，其中哪一个更重要仍是一个有争论的研究课题。

心肌梗死后心肌细胞增殖的速率会增加，新细胞形成率在 CDC 移植后进一步加快，可达正常的 3 倍^[24]。CDC 移植后虽然可以观察到祖细胞直接分化为心肌细胞，但与心肌细胞直接复制的效果相比，新分化的心肌细胞占比很小，不是心肌再生的主要机制。新生成的心肌细胞比较小，主要位于梗死区周围(约 90 %)，有缝隙连接，分布均匀。除了刺激心肌细胞复制和内源祖细胞分化外，CDC 也有保护心脏的作用，包括减少细胞凋亡和抗炎作用。

CDC 释放的旁分泌因子可促进心肌细胞分裂。CDC 分泌的因子包括肝细胞生长因子和胰岛素样生长因子 -1。此外 CDC 并没有分化为内皮细胞，但通过促进血管内皮生长

因子的生成，可导致血管生成增加，血管密度增加。

输注 CDC 来源的外泌体可发挥 CDC 的心脏保护作用，包括抑制细胞凋亡^[25]。CDC 来源的外泌体富含 microRNA。其中 miR-146a 有心脏保护和再生作用，而 miR-210 具有抗凋亡作用。miR-132 则促进凋亡。

七、展望

CDC 条件培养液也有抗凋亡、促血管生成和保护心脏的作用。这些可溶性介质称为干细胞释放分子，拥有干细胞约 80 % 的治疗潜力。涉及保护心脏的干细胞释放分子包括血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子 -1、白介素 -1B、白介素 -10 和基质细胞衍生因子 -1，其中基质细胞衍生因子 -1 的量和 CDC 在体内的效力相关性最大。SRM 可以促进血管生成，通过激活 bcl-2/bax 通路抑制心肌细胞凋亡，促进循环祖细胞募集到受损心肌(参与的因子包括基质细胞衍生因子 -1，胰岛素样生长因子 -1，肝细胞生长因子和色素上皮衍生因子)；改善心脏传导和减少瘢痕形成(参与的因子包括转化生长因子 -β、基质金属蛋白酶组织抑制剂、金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶抑制剂)^[26-27]。

同 CDC 移植相比，无细胞疗法有许多优点。自体 CDC 在短时间内快速分离和获取是不可能的，而 SRM 不但在实验室条件下可以大量生产。此外，冠状动脉内注射异体和自体 CDC 植入率低，直接心肌内注射的并发症风险较大，而无细胞疗法 SRM 能避免许多与 CDC 移植过程相关的风险。理论上 SRM 可在急性心肌梗死后立即使用，从而避免了自体干细胞治疗的局限性。能否将 SRM 靶向传送到心肌可能是未来重点研究的方向之一。

参 考 文 献

- 1 Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens[J]. *Circulation*, 2007, 115(7):896-908.
- 2 Sun Y, Chi D, Tan M, et al. Cadaveric cardiosphere-derived cells can maintain regenerative capacity and improve the heart function of cardiomyopathy[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(9):1248-1256.
- 3 姜大庆, 谷天祥, 徐兆发, 等. 心肌球源性心肌干细胞联合心室肌细胞外基质治疗大鼠急性心肌梗死效果[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(10):1316-1321.
- 4 Li TS, Cheng K, Malliaras K, et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(10):942-953.
- 5 Simpson DL, Mishra R, Sharma S, et al. A strong regenerative ability of cardiac stem cells derived from neonatal hearts[J]. *Circulation*, 2012, 126(11 Suppl 1):S46-53.
- 6 Gallet R, Tseliou E, Dawkins J, et al. Intracoronary delivery of Self-Assembling Heart-Derived microtissues (cardiospheres) for prevention of adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial

- infarction[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2015, 8(5):e002391.
- 7 Grigorian-Shamagian L, Liu W, Fereydooni S, et al. Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats[J]. *Eur Heart*, 2017, 38(39):2957-2967.
 - 8 Johnston PV, Sasano T, Mills K, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2009, 120(12):1075-1083.
 - 9 Tseliou E, Kanazawa H, Dawkins J, et al. Widespread myocardial delivery of Heart-Derived stem cells by nonocclusive Triple-Vessel intracoronary infusion in porcine ischemic cardiomyopathy: superior attenuation of adverse remodeling documented by magnetic resonance imaging and histology[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0144523.
 - 10 Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial[J]. *Lancet*, 2012, 379(9819):895-904.
 - 11 Chakravarty T, Makkar R, Henry T, et al. TCT-820 multivessel intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere derived cells in dilated cardiomyopathy: long term outcomes of the dilated cardiomyopathy intervention with allogeneic myocardially-regenerative cells (DYNAMIC Trial)[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(18):332.
 - 12 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(4):455-465.
 - 13 Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, et al. Intrapericardial delivery of cardiosphere-derived cells: an immunological study in a clinically relevant large animal model[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0149001.
 - 14 Cheng K, Li TS, Malliaras K, et al. Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2010, 106(10):1570-1581.
 - 15 Cheng K, Blusztajn A, Shen DL, et al. Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(21):5317-5324.
 - 16 Hosoyama T, Samura M, Kudo T, et al. ICardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12):2738-2751.
 - 17 Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, et al. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(23):1858-1865.
 - 18 Aghila Rani KG, Kartha CC. Effects of epidermal growth factor on proliferation and migration of cardiosphere-derived cells expanded from adult human heart[J]. *Growth Factors*, 2010, 28(3):157-165.
 - 19 Dutton LC, Church SAV, Hodgkiss-Geere H, et al. Cryopreservation of canine cardiosphere-derived cells: Implications for clinical application[J]. *Cytometry A*, 2018, 93(1):115-124.
 - 20 Malliaras K, Li TS, Luthringer D, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells[J]. *Circulation*, 2012, 125(1):100-112.
 - 21 Weil BR, Suzuki G, Leiker MM, et al. Comparative efficacy of intracoronary allogeneic mesenchymal stem cells and Cardiosphere-Derived cells in swine with hibernating myocardium[J]. *Circ Res*, 2015, 117(7):634-644.
 - 22 Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras KA, et al. Cellular postconditioning allogeneic Cardiosphere-Derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in Pigs with acute myocardial infarction[J]. *Circ Heart Fail*, 2015, 8(2):322-332.
 - 23 Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, et al. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase 1 controlled trial[J]. *Circ Res*, 2015, 116(4):653-664.
 - 24 Malliaras K, Marbán E. Cardiac regeneration validated[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(6):587.
 - 25 Namazi H, Mohit E, Namazi I, et al. Exosomes secreted by hypoxic cardiosphere-derived cells enhance tube formation and increase pro-angiogenic miRNA [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5):4150-4160.
 - 26 Zhang WB, Liu YQ, Zhang X, et al. The role of β -adrenergic receptors and p38MAPK signaling pathways in physiological processes of cardiosphere-derived cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1):1204-1214.
 - 27 Emani SM, Del Nido PJ. Cell-Based therapy with cardiosphere-derived cardiocytes: a new hope for pediatric patients with single ventricle congenital heart disease?[J]. *Circ Res*, 2018, 122(7):916-917.

(收稿日期:2018-10-10)

(本文编辑:陈媛媛)

林嘉润, 廖联明. 心肌球源性细胞在心力衰竭中的应用 [J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2019, 9 (1) :54-57.