

- (14): 10 413~10 420.
- [2] Konopleva M, Zhao S, Xie Z, *et al.* Apoptosis. Molecules and mechanisms[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 457: 217~236.
- [3] Sabapathy K, Hu Y, Kallunki T, *et al.* JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development[J]. *Curr Biol*, 1999, 9(3): 116~125.
- [4] Qian S, Lu L, Fu F, *et al.* Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts [J]. *J Immunol*, 1997, 158(10): 4 654~4 661.
- [5] Shintaku S, Ohdan H, Yamamoto H, *et al.* Expression of bcl-2 homologue mRNA in rat liver allograft; Rejection-induced cell apoptosis is associated with upregulation of bax and bcl-x_s expression[J]. *Transpl Int*, 1998, 11(Suppl 1): 284~288.
- [6] Tannapfel A, Kohlhaw K, Ebel J, *et al.* Apoptosis and the expression of Fas and Fas ligand(FasL) antigen in rejection and reinfection in liver allograft specimens[J]. *Transplantation*, 1999, 67(7): 1 079~1 083.
- [7] Ke B, Buehw R, Shen XD, *et al.* Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(10): 1 189~1 199.

- [8] 刘玉兰, 刘 峰, 孙君泓. Fas/FasL 表达和细胞凋亡在大鼠同种异体肝移植免疫中的作用[J]. *中华普通外科杂志*, 2003, 18(2): 99~101.
- [9] Li XK, Okuyama T, Tamura A, *et al.* Prolonged survival of recipient rats with Fas ligand-transfected liver allografts by using HVJ-liposome[J]. *Transplant Proc* 1998, 30(4): 943.
- [10] Griffith TS, Ferguson TA. The role of FasL induced apoptosis in immune privilege[J]. *Immunol Today*, 1997, 18(5): 240~244.
- [11] 王学浩, 孙倍成, 钱建民, 等. 转 FasL 基因的树突状细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受的实验研究[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2002, 8(5): 294~296.
- [12] 蔡世荣, 詹文华, 何裕隆, 等. 胰岛 FasL 基因转染对大鼠胰岛移植的影响[J]. *中华器官移植杂志*, 2002, 23(4): 222~224.
- [13] Muruve DA, Nicolson AG, Manfro RC, *et al.* Adenovirus mediated expression of Fas ligand induces hepatic apoptosis after systemic administration and apoptosis of ex vivo-infected pancreatic islet allografts and isografts[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(8): 955~963.
- [14] Li XK, Okuyama T, Tamura A, *et al.* Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing plasmid [J]. *Transplantation*, 1998, 66(11): 1 416~1 423.

[文章编号] 1000-2200(2004)02-0188-02

·综述·

骨髓间充质干细胞和心肌梗死

周德存¹ 综述, 严中亚¹, 翟志敏² 审校

[关键词] 心肌梗死; 骨髓间充质干细胞; 移植

[中国图书资料分类法分类号] R 542.22; R 329.24

[文献标识码] A

近年来冠心病的发病率和死亡率居高不下, 探求新的更为理想的治疗心肌梗死的方法, 也一直是研究的热门课题。虽然成果显著, 但现有的治疗方法, 如药物、溶栓、经皮冠脉内成形和支架植入术(PTCA+S)以及外科手术等, 都有一定的局限性和并发症。尤其对大面积严重的心肌梗死, 心脏移植存在供体严重不足、免疫排斥等问题。因此, 骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MMSC)移植无疑为人们带来了新的希望。

1 MMSC 生物学特性

MMSC 具有较强的自我复制能力和多向分化潜能。早期分离培养时, 发现其形状呈成纤维细胞样而称其为“成纤维细胞集落形成单位(colony-forming unit/fibroblastic, CFU-F)”或“骨髓基质成纤维细胞(marrow stromal fibroblasts, MSF)”。随着研究的深入, 人们发现其对骨髓血系细胞起支持诱导作用, 又因其来自于骨髓基质, 因而称其为“骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCS)”。近年来因发现在

不同的诱导条件下, 具有向中胚层组织细胞分化的能力, 如向成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞等分化能力, 又称其为“间充质干细胞(mesenchymal stem cells)”、“间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells)”或“骨源性干细胞(osteogenic stem cells)”^[1]。

MMSC 形态成纤维样, 可聚集成均匀集落, 细胞表面蛋白 SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD124 等呈阳性, 但 CD14、CD34 和 CD45 造血谱系标记则呈阴性^[2]。因此这些细胞明显不同于其它 CD34 表面抗原阳性的骨髓成纤维细胞。

目前获得 MMSC 的方法可分为三步: (1)初筛, 分离出可能含 MMSC 的细胞群体; (2)培养、扩增; (3)鉴定。一般将骨髓分离后在特定的条件下培养, 然后, 根据细胞形态学及表面标志物的检测进行判断。对 MMSC 的特征描述及其分离方法都是以一个细胞群体的形式进行的。对 CD14、CD34 和 CD45 的阴性反应在筛选时可作为一定的参考依据。

一般认为, MMSC 只存在于骨髓中, 但最近的研究发现, 从人的骨骼肌中也可以分离出 MMSC, 它同样可以分化为骨骼肌管、平滑肌、骨、软骨及脂肪。此外也有学者分别从骨外膜和骨小梁分离出 MMSC。目前用于初筛分离 MMSC 的方法主要有三种: (1)密度梯度离心法; 根据 MMSC 与其他细

[收稿日期] 2003-07-14

[作者单位] 安徽省立医院 1. 心脏外科, 2. 中心实验室, 安徽 合肥 230001

[作者简介] 周德存(1970—), 男, 安徽寿县人, 住院医师, 硕士。

胞的密度不同而采用 Percoll 将其分离出来; (2) 贴壁筛选法: 根据 MMSC 具有在塑料组织培养瓶中贴壁生长的特性对其进行筛选; (3) 流式细胞仪分选法: 根据 MMSC 细胞体积小、相对缺少颗粒的特性对它进行分选。

2 MMSC 向心肌细胞分化

Makino 等^[3] 在小鼠骨髓细胞中加入 5-azacytidine 培养 24 h, 然后显微镜下可见且能分离出来的自发跳动的细胞克隆。分离的细胞再加入 5-azacytidine 培养 24 h, 筛选出自发跳动频率最高的细胞约占细胞总数的 30%。电子显微镜下细胞类似于心肌细胞, 包括典型的肌小节, 位于细胞中央的细胞核, 而且这些细胞能分泌心房利钠肽和脑利钠肽。应用单克隆抗体免疫组化的方法分析细胞的肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、肌动蛋白后发现这些细胞类似于胚胎心肌细胞。有关 MMSC 向心肌细胞转化的调控机制, 目前还不清楚。5-azacytidine 是胞苷类似物, 能引起细胞 DNA 中某些胞嘧啶去甲基化。

3 MMSC 移植治疗心肌梗死的可能性

传统的观点认为心肌细胞是终分化组织, 没有再生能力, 心肌内没有干细胞, 与骨骼肌不同, 不具有本身能够分裂使细胞增殖的干细胞, 心肌受到损伤后只能形成瘢痕组织来修复^[4]。虽然最近的研究显示心肌梗死后有很少量的心肌细胞发生分裂增殖, 但不能完整修复心肌组织^[5]。目前诱导各种干细胞成为心肌细胞进行细胞移植来修复受损的心肌成为研究的热点^[6]。鉴于胚胎干细胞和脐血干细胞来源有限, 还涉及到伦理、道德及免疫排斥反应等问题, 实际运行程序复杂, 所以利用自身 MMSC 进行实验研究成为更为理想的切实可行的选择。近年来有大量的报道, 利用 MMSC 多能性体外向成骨细胞、软骨细胞等细胞转化, 进行相应的组织修复^[7], 有关的实验也表明, MMSC 可在一定的条件下向心肌细胞转化, 移植于梗死心肌后与宿主细胞之间形成缝隙连接, 成为有功能的心肌细胞, 从而修复了心肌损伤^[2, 8~10]。由于 MMSC 可自体采集, 简单骨穿刺即可获得, 患者痛苦少, 细胞培养要求相对不高, 不存在免疫排斥问题, 从而为临床上治疗心肌梗死提供了一条切实可行的途径。

Tomita 等^[10] 分离出大鼠的骨髓细胞, 培养到第 3 天时加入 5-azacytidine, 处理 24 h, 培养到第 7 天的细胞(主要为 MMSC) 注射到低温损伤造成的心肌梗死的动物模型的心肌瘢痕组织中。5 周后取出大鼠的心脏, 瘢痕组织中的移植细胞分化出肌管, 并且表达了肌球蛋白重链和肌钙蛋白, 大鼠左室收缩压和左室收缩压上升速率较对照组高, 心功能明显改善。

Wang 等^[11] 将 MMSC 移植到鼠的心脏后, 干细胞有肌球蛋白重链的表达, 形成收缩蛋白, 表明已向心肌细胞分化。更为重要的是在移植细胞和宿主细胞间有 connexin-43 存在, 提示两者间形成了缝隙连接^[3]。这些缝隙连接是 connexin-43 的六聚物, 允许细胞间交换离子和小分子。同时也证明了 MMSC 有依赖环境的定向分化能力。

4 存在的问题与展望

完美地修复或替代因疾病、外伤等原因所造成的组织、

肢体或器官的伤残, 一直是人类的“梦想”及难以攻克的医学高峰, 而以干细胞工程为代表的现代组织工程学无疑为人类提供了新的希望。目前世界各国都投入了大量的人力、物力和财力进行了广泛而深入的研究。人口老龄化, 心血管疾病的发病率和死亡率居高不下, 迫切要求寻找治疗心肌梗死的更为理想的方法。而利用 MMSC 移植的方法, 具有简单、实用、费用低和不存在免疫排斥等优点, 应用前景十分广阔。

当然, 该领域的研究尚处于探索阶段, 实际进入临床, 作为常规手段治疗心肌梗死, 还需要进行大量而扎实的基础与临床研究, 目前还存在很多问题有待解决: (1) 对 MMSC 的真正起源还不清楚, 但实验证明体外的 MMSC 均为各种细胞的混杂, 如何才能获得纯的 MMSC, 尚需进一步研究; (2) 具体的途径和调控机制, 如何使既控制增殖, 避免发生肿瘤, 又能在适当的时候启动所需要的途径进行分化, 有待于进一步探索; (3) MMSC 移植治疗心肌梗死, 仅有少量动物实验模型报道, 对其移植方式、修复机制、远期效果和副作用等均有待于研究。

[参 考 文 献]

- [1] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. *Exp Biol Med*, 2001, 226(6): 507~520.
- [2] Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells; Heading into the clinic[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27(3): 235~239.
- [3] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(5): 697~705.
- [4] Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis[J]. *Circ Res*, 1998, 83(1): 15~26.
- [5] Beltrami AP, Urbank K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(23): 1750~1757.
- [6] Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury[J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68(6): 2074~2081.
- [7] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143~147.
- [8] Ferrari G, Cusella DE, Angelis G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors[J]. *Science*, 1998, 279(5356): 1528~1530.
- [9] Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120(5): 999~1006.
- [10] Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function[J]. *Circ*, 1999, 100(19 Suppl): II 247~II 256.
- [11] Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 122(4): 699~705.