

## 造血细胞因子治疗缺血性心脏病 ——G-CSF的临床应用

荒井正純 等

**[摘要]** G-CSF是一种仅通过皮下注射,动员骨髓中的血管内皮祖细胞进入末梢血的造血细胞因子。在动物实验中,其通过介导血管新生减轻缺血,改善心肌梗死后的心功能。由于这种治疗简单易行,已经在临床应用,并已针对重度冠状动脉缺血和急性心肌梗死病例研究其有效性。但是,目前效果还不稳定。今后,期待通过基础实验明确其作用机制,并在此基础上制定高效和安全的治疗计划。

**[关键词]** 粒细胞集落刺激因子(G-CSF);血管内皮祖细胞;重症冠状动脉疾病;急性心肌梗死

1997年,A sahara等报告血管新生时,除以前已知的现存血管内皮细胞游走、增殖以外,很大程度上与骨髓细胞向局部动员及向血管内皮分化、增殖这一机制相关。2001年,Orlic等在《Nature》杂志上发表了将小鼠骨髓干细胞直接注射到梗死心肌后,注射的骨髓细胞旺盛地再生为心肌细胞,使心功能恢复。这两篇论文,使心血管领域中使用骨髓细胞的再生医疗受到广泛关注,在许多机构同时进行了其在临床应用中的研究。其中方法之一就是确定 G-CSF的治疗地位,并对其疗效进行研究。

本文就 G-CSF治疗缺血性心脏病,尤其是急性心肌梗死及一般方法治疗困难的心肌缺血的效果及问题,结合作者的数据加以介绍。

是存在于骨骼肌内的间质干细胞,与 Jiang等报道的 MAPC具有同源性。如果同时具有间胚叶干细胞的特点,即可以期待其具有近年报道的间质干细胞各种各样的营养作用(trophic effect),细胞移植时在移植细胞物理作用的基础上,通过体液因子发挥各种各样作用,从而改善心功能。

但是目前最大的问题与大多数体性干细胞相同,即其数量少,分化率低。如何将干细胞维持在未分化状态并大量增殖、提高特异性分化为心肌的效率,是在临床应用时需要考虑的大问题,各方面正在为解决这些障碍努力研究。

### 一、急性心肌梗死

#### 1. G-CSF治疗在动物实验中的效果

如上所述,已有报道指出将骨髓中的干细胞直接注射到梗死心肌中后,骨髓细胞再生为心肌和血管,使心功能恢复。但是,考虑到临床应用时,采集自体骨髓细胞,从中收集单核细胞后注射的方法(自体骨髓细胞移植),在采集骨髓细胞时,需要全身麻醉,因此,对心肌梗死的急性期患者具有危险,而且实施困难。因此,如果确立通过 G-CSF动员骨髓细胞的非侵袭性再生疗法的有效性和安全性,那么临床应用的意义重大。有报道指出,在小鼠急性心肌梗死模型同时皮下给予 G-CSF与干细胞因子(stem cell factor)后,在梗死组织中,动员的骨髓细胞

通过学者的不断努力,心肌再生疗法逐渐成为可能。骨髓细胞移植及骨骼肌母细胞移植的一些成果,使细胞移植疗法受到人们的关注,但同时也提出必须解决的问题。其中之一就是骨骼肌母细胞移植时具有导致致死性心律失常的危险,自临床试验开展 5年以来,由人骨骼肌母细胞移植发展带来的移植技术也有可能直接应用于骨骼肌源性干细胞移植。目前存在许多必须逾越的障碍,希望在不久的将来成为重度心力衰竭治疗的“世界标准”,给心力衰竭患者带来福音。

程云鹏 译 柯若仪 校

高效率转化为心肌细胞和血管内皮细胞,在使心肌梗死面积减少 40%的同时,死亡率下降 68%。但是,实验中并用大量的 G-CSF 与干细胞因子,且在心肌梗死形成前应用,这在临床上不切合实际。

但是最近,作者等人报道了在兔模型,仅使用与临床应用剂量相近的 G-CSF,并且是在心肌梗死形成后应用,也得到了治疗效果。在这个实验中,从心肌梗死后第 2 天,连续 5 天皮下注射 G-CSF  $10\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ,使慢性期心肌梗死面积缩小,心功能得以改善。

## 2. G-CSF 治疗效果机制

在盛行使用成体干细胞进行再生医疗的今天,对这种细胞可塑性产生疑问的报告越来越多。2001 年首例报道骨髓细胞,尤其是造血干细胞旺盛地分化为心肌细胞以来,否定的报告越来越多。并且,至于当初观察到的骨髓细胞的转分化,仅仅是骨髓细胞与靶细胞融合后,表面上发生的现象。作者等在急性心肌梗死 G-CSF 治疗的动物实验中证实,给予 G-CSF 后,心肌梗死区域周围发现骨髓来源的细胞聚集,但几乎未发现其分化为心肌细胞。

那么,给予 G-CSF 后,为什么梗死面积和左室功能得到改善呢?对这一疑问,作者等认为是促进了治愈过程和重构。发生心肌梗死时,由于大量组织迅速发生坏死,其中部分形成了无收缩功能的疤痕,产生过度纤维化,这种过度纤维化是左室重构和心功能恶化的促进因子。另一方面,G-CSF 通过上调 MMP,参与过剩胶原的降解,通过减少胶原量抑制重构。因此,心肌梗死时使用 G-CSF 进行治疗,与其说是心肌再生,不如说是促进损伤组织迅速吸收,抑制过度纤维化这一重构过程。千叶大学研究小组的试验表明,G-CSF 通过直接作用于心肌细胞上的受体 Jak/Stat 系统,抑制心肌细胞凋亡,促进其生存,这也是在急性心肌梗塞中 G-CSF 改善心功能的重要机制。

## 3. 临床试验

根据上述基础实验的有效性,几个临床试验正在进行中。2005 年意大利的 Valgimigli 等

使用安慰剂的随机实验结果表明,通过 G-CSF 治疗,虽然与对照组相比,慢性期左室射血分数与舒张末期直径未得到统计学差异,但有改善倾向。同年,德国的 Kuehe 等报道通过 G-CSF 治疗,慢性期 sestamibi 的吸收,与对照组相比明显改善,但这一试验是非双盲非随机试验,且病例数少。可信性较高的试验是 2005 年由德国研究小组发表的 FIRSTLINE-AMI 试验,结果发表在《Circulation》杂志上,该实验以 50 名急性心肌梗死患者为研究对象,通过在急性期进行 G-CSF 治疗,防止了慢性期梗死区域室壁的变薄,从而改善心功能。但是,2006 年发表了更大规模的使用安慰剂的双盲试验 REVIVAL-2 及 STEMMI,分别以 114 例和 78 例患者为研究对象,其结果均否定了 G-CSF 治疗可以改善梗死后心功能、缩小梗死面积这一结论。目前,对急性心肌梗死患者的 G-CSF 治疗效果尚无定论。

以下是作者等所在机构进行的临床试验结果。作者等对急性心肌梗死患者进行临床试验得到了伦理委员会的认可。入选标准为左前降支为责任血管的初发透壁性心肌梗死,且 6 小时内再灌注成功的患者。在心肌梗死发病后 2~4 天开始给予 G-CSF,连续 10 天进行皮下注射。给药目标是维持末梢血白细胞数在  $30000/\mu\text{l}$  左右,在  $(2\sim6)\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  的范围内适当调整进行治疗。发病后 1 个月进行心电图 SPECT 以评价左室射血分数,G-CSF 治疗组为  $50\pm4\%$ ,而仅进行普通治疗组为  $42\pm3\%$ ,两组未发现统计学差异。但是,以 CPK 峰值为横轴,以慢性期左室射血分数为纵轴,观察两者的关系可以发现,G-CSF 组的回归曲线比普通治疗组明显上移,因此,可以看到 G-CSF 治疗的有效性。另外,在至今为止接受治疗的 15 例病例中,未合并严重并发症。

## 二、重度心肌缺血

### 1. G-CSF 的血管再生疗法

针对心肌缺血,山口大学小组从骨髓中收集单核细胞,并且在冠状动脉搭桥术时由心外膜直接注入缺血部位心肌,成功减轻了该部位

的缺血。此后,为避免开胸手术的损伤,也尝试了从心内膜向缺血部位心肌直接注射骨髓来源细胞,这种方法也成功减轻了缺血。但是,这些自体骨髓细胞移植方法与前述的急性心肌梗死时的情况相同,在采集骨髓细胞时仍然需要全身麻醉,为确立侵袭性更低的使用 G-CSF 血管再生医疗的治疗方案,多个机构正在不断尝试。G-CSF 在临床上可以增加末梢血中表型为 CD34、CD133 的血管内皮祖细胞,或者同时表达 CD133 与 VEGFR-2 的细胞以及同时表达向 CD133 与缺血组织定植时所必需的趋化因子受体 CXCR4 的细胞。因此,有人提出假设,即通过注射 G-CSF,动员骨髓至末梢血中的血管内皮祖细胞定位于缺血部位,在局部分化为血管内皮,使血流得到改善。

## 2. 临床试验

如前所述,在临床病例中已经明确直接移植骨髓细胞至缺血心肌,可以改善缺血心肌的血流,减轻缺血。但是,直接向心肌移植骨髓细胞,无论是经导管还是开胸手术,不仅手术本身有危险,而且还要考虑到心肌组织损伤及心律失常等危险的发生。即使如此,对慢性心肌缺血的 G-CSF 治疗也很受关注,在包括作者在内的多个机构已经开始尝试其临床应用的可能性。

作者等以通过负荷心肌血流核素显像确诊的、既往冠状动脉内成形术及冠状动脉搭桥术治疗困难的冠状动脉疾病患者为研究对象,进行 G-CSF 治疗。但是,除外患有重度颈动脉、脑动脉狭窄的病例及冠状动脉成形术后 3 个月内或者怀疑患有癌症或有恶性肿瘤病史、增殖性视网膜病、合并有活动性胶原病或间质性肺炎的病例。G-CSF 给药量与急性心肌梗死相同,维持末梢血白细胞数在 30000/μl 左右,在 (2~6) μg/(kg·d) 的范围内适当调整。以仅使用既往药物治疗的患者为对照,一个月后通过负荷心肌血流显像检查,以缺血改善为一级终点进行评价。如图 1 所示,可以发现治疗前负荷时的心肌缺血(重分布)。在 TI-201 的片断显像中,可以看到 G-CSF 治疗一个月后,应激与安静状态时,血流比治疗前明显增加。显

示左室整体缺血扩大与强度负荷时各自的 extent score 与 severity score 在 G-CSF 治疗后明显降低,提示缺血减轻。

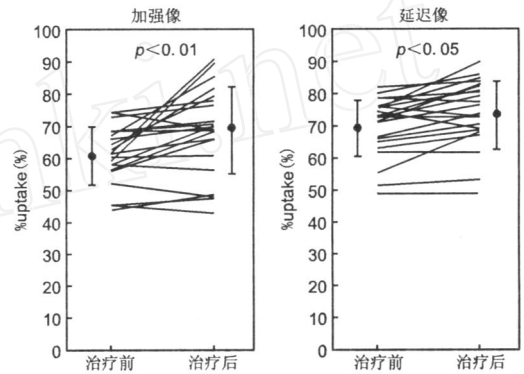


图 1 G-CSF 治疗前后缺血部位的 TI-201 的上调百分比变化

其它多个单位也对重度冠状动脉疾病进行了同样的 G-CSF 治疗试验,但结果不一致。丹麦小组以评价有效性和安全性为一期试验,对 29 例缺血性心脏病患者进行 G-CSF 治疗,通过心肌血流显像和 MRI 评价心肌缺血程度并未发现改善,但心绞痛发作频率明显改善。美国 NH 的 Hill 等人,以 16 名缺血性心脏病患者为研究对象,观察 G-CSF 治疗效果,在他们的报告中,通过多巴酚丁胺负荷 MRI 的室壁运动、心肌灌注和运动耐量也未发现改善。不仅如此,16 名患者中的 2 名分别在 G-CSF 治疗开始后和第 17 天发生急性心肌梗死,其中 1 名死亡。

## 三、G-CSF 治疗的问题

### 1. 有效性

动物实验中,G-CSF 注射对急性心肌梗死及心肌缺血的心脏有保护作用。但 G-CSF 治疗的临床试验结果却存在明显差异,其治疗效果尚未明确。今后,为确定 G-CSF 的治疗地位,需在保证安全性的同时,提高其有效性。在这一点上,名古屋大学小组的最新动物实验结果意义深远。他们使用 G-CSF 直接刺激存在于血管内皮细胞上的 G-CSF 受体,促进游走与管腔形成,并且通过对这种血管内皮的直接作用,将仅轻度增加白细胞量的 G-CSF 直接注射至缺血局部,促进血管新生,减轻缺血。另外,

## 骨髓细胞移植的血管新生疗法

李桃生 等

**[摘要]** 约 50%的心力衰竭是由缺血性心脏病引起。血管新生疗法作为难治性缺血性心脏病的一种新疗法而受到关注。血管新生疗法中,有给予血管生长因子等方法,但在双盲临床试验中的有效性尚未得到充分证实。另外,根据近年的研究,已经明确骨髓细胞可以产生各种各样的体液因子(VEGF、bFGF、PDGF等),并已知骨髓细胞中的未成熟干细胞会向血管内皮细胞等分化。而且,已经证明对缺血性心力衰竭模型进行骨髓细胞移植治疗后,可以增加血流,改善心功能。到目前为止,基于自体骨髓细胞移植的血管新生疗法正在世界各地进行尝试,并取得了良好的结果。但是,由于各个实验规模较小,且为短期观察,为确定该种治疗的有效性与安全性,仍需要大规模双盲临床试验来证实。期待今后自体骨髓移植的血管新生疗法有望成为缺血性心力衰竭的有效治疗方法。

**[关键词]** 骨髓细胞;血管新生疗法;血流;心功能

### 一、缺血性心力衰竭与血管新生治疗

缺血性心脏病的预后,由于药物治疗、介入治疗(PCI)及外科搭桥术(CABG)行血运重建等治疗方法的进步,已经明显改善。但是,随着缺血性心脏病的增加,重症患者逐渐增多。其中一部分尽管进行积极治疗,但仍然陷入心力衰竭。目前,心力衰竭的原因疾病中,缺血性心脏病约占 50%。因此,需要寻求新的治疗方法。近年新兴的再生医疗中,心血管再生医疗

作为心力衰竭的有效治疗方法备受期待。

缺血性心脏病中,成为心力衰竭病因的是心肌梗死后心肌丧失与残存心肌的供血不足而导致的心功能低下。因此,有必要将心血管再生治疗分为血管再生与心肌再生。使丢失的心肌得以再生是心肌再生治疗的终极目标,其基础研究正在进行。另外,血管再生治疗(therapeutic angiogenesis)是以促进缺血心肌中新生血管再生和促进侧枝循环形成、以增加血流为

已经证明前述的 G-CSF 不仅直接作用于心肌细胞有助于心肌生存,同时作用于心肌间质,具有抑制心脏重构的作用。通过这种不动员骨髓细胞的 G-CSF 细胞因子的直接作用将 G-CSF 进行局部注射,减轻了给药量,减少全身影响的基础上,大幅度提高治疗效果,值得今后进行尝试。

### 2. 安全性

正如上面所记载的那样, Hill 等报道了在 16 例重度心肌缺血病例中, 2 例发生了急性心肌梗死,此外,韩国研究小组也指出,在给予了 G-CSF 的急性心肌梗死患者,冠状动脉责任病变部位再狭窄的发生率非常高,达 70%。其原因有人认为是由于 G-CSF 动员血管内皮祖细胞,使血管壁自身的营养血管新生,从而促进了内膜增生。千叶大学研究小组动物实验报告指出, G-CSF 在促进受损血管内皮新生的同时,抑

制内膜增生,预防动脉硬化。并且, Hill 等报道的 G-CSF 应用后发生的心肌梗死,发生得非常早,其血管斑块大小或者性质的变化,更容易让人想到血液方面的因素。G-CSF 有可能促进血液凝固亢进,并且,由 G-CSF 刺激而增加的白细胞堵塞微小血管,使冠状动脉血流减少,容易引起急性冠脉综合征。因此,与其它机构一般使用的  $10\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、连续给药 5 天不同,笔者使用  $2\sim 6\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  的较小剂量,连续给药 10 天。另外,全部患者给予抗血小板药,如果可能,在治疗中给与抗凝剂。虽然不清楚是不是此种原因,到目前为止,尚未有发生急性冠脉综合征及脑梗死等并发症的患者。今后,有必要在充分考虑有效性和安全性的基础上,制定治疗方案。

程云鹏 译 柯若仪 校