

· 综述 ·

粒细胞集落刺激因子治疗终末期心脏病的研究进展

段俊斐 综述 顾翔 审校

随着干细胞生物工程的蓬勃开展,具有多向分化潜能和自我复制能力的干细胞给心血管疾病的治疗带来了新的曙光。其中,粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)不仅能有效地动员骨髓干细胞释放入外周血循环,还可以直接或间接地引起有益的心血管效应,如促进新生血管形成及减小心肌梗死后心肌损伤的程度等。本文综述 G-CSF 治疗终末期心脏病的研究进展。

1 G-CSF 概述

G-CSF 的单个基因编码位于 17 号染色体的 q21-22 区,是一类分子质量仅有 20kD 的糖蛋白,主要由造血细胞如单核/巨噬细胞、淋巴细胞等生成,其他如成纤维细胞、内皮细胞、星形胶质细胞及骨髓基质细胞等在受刺激时也可产生 G-CSF^[1]。诱导 G-CSF 生成的刺激物包括肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1, 17 (IL-1, 17)、干扰素- α 和脂多糖等^[2]。这些物质多伴随于极度的生理或病理应激(如败血症、急性心肌梗死)时出现。正常人体中,处于循环稳态的 G-CSF 浓度非常低($< 50\text{ng/L}$)^[3],此时外周的 G-CSF 浓度还不足以使中性粒细胞增生。但当 G-CSF 处于高浓度时就会引起中性粒细胞及其前体细胞广泛增殖。

G-CSF 一经分泌便专一地作用于效应细胞表面特异的粒细胞集落刺激因子受体(granulocyte colony-stimulating factor receptor, G-CSFR)。G-CSFR 具有 4 个联合的胞质非受体酪氨酸激酶,在与配体结合后被快速磷酸化,从而依次引起特定的下游效应^[1,4]。G-CSFR 主要表达于中性粒细胞及其前体细胞如骨髓干细胞、造血干细胞中,此外,在人脐静脉和冠状动脉内皮细胞、中枢神经系统神经元、心肌、胎盘细胞、有活性的 T 淋巴细胞以及一些

非血液系统肿瘤中也有少量表达^[4-6]。

2 G-CSF 间接和直接引起有益心血管效应的作用机制

2.1 G-CSF 介导的干细胞动员机制 G-CSF 能动员来自骨髓的红细胞、巨核细胞、淋巴细胞和内皮细胞等多种细胞的祖细胞^[4],这些细胞被动员后可释放入外周血,从而被方便地采集以用于疾病的治疗。由 G-CSF 介导的干细胞动员机制主要有两个方面:(1) G-CSF 可通过促进静息期干细胞进入细胞周期以增加骨髓干细胞数量。有实验^[7]证明,G-CSF 作用后所有的骨髓长期造血干细胞(long term haemopoietic stem cell, LT-HSC)都进入了细胞增殖周期,并且 LT-HSC 从骨髓动员入血发生于 M 期之后以及下一个 S 期之前,而不是 G₀ 期的 LT-HSC 被选择性地动员。(2) G-CSF 可有倾向性地打破干细胞动员出髓与其归巢入髓的平衡体系,使出髓的干细胞数量远大于入髓。对于 G-CSF 动员干细胞出髓机制的探讨目前主要集中于骨髓微环境中关键细胞锚定体的分裂,而 CXCR4/SDF-1 复合体是至关重要的锚定体之一^[8]。基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)是一个 CXC 趋化因子家族成员,其分子结构为 N 端两个半胱氨酸之间被另一个氨基酸残基所分隔,主要表达于骨髓基质细胞,另外在骨髓内皮细胞及 CD34⁺ CD38⁺ 造血干细胞中连续表达^[9]。趋化因子受体 CXCR4 是目前已知 SDF-1 唯一的受体,是一个由 352 个氨基酸构成的视紫红质样 G 蛋白耦联受体,特征性地表达于造血干细胞、内皮祖细胞和间充质细胞的一个亚群。CXCR4/SDF-1 的分裂使得干细胞离开骨髓并进入外周血循环,其机制可能如下:(1)中性粒细胞弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G、基质金属蛋白酶-9 等的释放。这些蛋白酶在释放后迅速降解并中断

收稿日期:2008-04-07

作者单位:225001 扬州市,扬州大学医学院

作者简介:段俊斐,男,1981年7月生,甘肃省庆阳市人,在读硕士研究生。E-mail:duanjunfei0037@163.com

通讯作者:顾翔, Tel:0514-87196589

CXCR4/ SDF-1 的相互作用,但也有研究发现,在缺乏几乎所有的中性粒细胞蛋白酶的小鼠体内,G-CSF 仍然能够动员干细胞^[10],提示这条途径并非 G-CSF 动员干细胞的主要途径。(2) 通过减少 SDF-1 和 CXCR4 的表达以动员干细胞^[9,11]。CXCR4 的减少可能是通过改变其合成和(或)改变了干细胞的膜表达。CXCR4 表达的降低,使其配体 SDF-1 诱导的跨内皮转运反应性降低,基质的黏附性降低,CD34⁺ 细胞进入活化周期的比例减少,从而在扩增祖细胞数目的同时,又抑制了细胞的归巢^[12]。SDF-1 的减少主要是由于骨髓中格根包尔氏细胞绝对数减少,而 G-CSF 可通过上调交感神经紧张性减少格根包尔氏细胞,这就部分地解释了为什么 G-CSF 疗法可降低骨髓中 SDF-1 的浓度并改变成骨细胞的活性^[13]。此外,通过动物实验证实,给予 α -肾上腺素能增效剂可增强 G-CSF 介导的干细胞动员效果,而受体阻滞剂则可降低其效果^[13]。(3) 缺氧。缺氧是另一个 CXCR4/ SDF-1 信号调节器,它可通过同时上调 CXCR4 在干细胞的表达及 SDF-1 在局部缺血组织的表达而增强两者的连接。表达上调的 SDF-1 直接导致了氧张力的减小^[14],并促使表达有 CXCR4 的干细胞向局部缺血组织归巢。在缺氧状态下局部 SDF-1 表达上调的组织包括心脏、大脑及四肢等。有报道显示,在给予 G-CSF 后缺血的心肌层中 SDF-1 的表达更为明显。且人为造成的心肌梗死后心脏特异性 SDF-1 过度表达可使经 G-CSF 动员的干细胞更容易地归巢到心脏,以减小心脏损害并改善左心室功能^[15]。

2.2 G-CSF 对心脏直接保护作用的机制

大量的研究表明,G-CSF 除与骨髓相关的动员效应之外,还具有多重有益的、直接作用于心血管的作用。Harada 等^[6]在 2005 年报道,G-CSF 在心肌梗死后直接作用于心肌细胞并使其存活下来,而这不依赖于 G-CSF 的骨髓干细胞动员效应。目前对 G-CSF 这种挽救濒死心肌的作用机制研究得还不透彻,报道最多的是 G-CSF 可通过促进血管生成作用改善心肌的局部缺血从而防止心肌的坏死。许多基于小动物^[6,15-17]及大动物^[18]心肌梗死模型的实验研究都证明,G-CSF 具有不依赖于骨髓动员效应的促血管生成作用,其机制可能如下:(1) G-CSF 直接刺激内皮细胞的迁移和增殖,修复机械损伤的内皮单层并形成毛细血管状结构^[19]。(2) G-CSF 能促进血管平滑肌细胞增殖^[20],这对于形成结构完整的成熟血管来说非常重要。(3) G-CSF 能够改变内皮细胞

钠/氢离子的交换及细胞内的 pH 值,从而有助于新生血管的生成^[21]。(4) G-CSF 可增加局部缺血组织中血管内皮生长因子的浓度^[22]。(5) 通过经 G-CSF 动员的干细胞的旁分泌作用促进新生血管的形成^[23]。除促血管生成作用外,G-CSF 可与表达于心肌细胞中的 G-CSFR 结合从而激活具有保护性的 Jak/ Stat 途径及内皮型一氧化氮合酶通路^[6,24]。该途径能减少心肌细胞的死亡、缩小梗死面积、增加有活力的心肌数量并限制左室舒张末压的增加^[6]。此外,G-CSF 还可通过增加心肌梗死早期巨噬细胞的浸润以及提高基质金属蛋白酶-1,9 的表达水平来减少心肌梗死后局部的炎症反应,从而挽救濒临死亡的心肌细胞、加速心肌梗死后坏死组织的吸收及减少梗死区疤痕形成^[25]。

3 G-CSF 与终末期心脏病的治疗

各种病因所致的不可恢复的心脏失代偿阶段称为终末期心脏病,常规药物治疗无效,死亡率很高。心脏移植是目前公认的治疗终末期心脏病最有效的方法,但又存在供体来源少、排异反应、需长期服用免疫抑制剂与巨大的经济负担等问题。所以,探索更有效的治疗方法是人们关注的焦点。G-CSF 不仅能动员干细胞归巢至心肌损伤部位,还具有直接的心脏保护作用,因此有望成为一种新的治疗因原发性心肌损害导致心功能失代偿的方法。目前研究最多的是对心肌梗死及扩张型心肌病引起的心力衰竭的治疗。

3.1 G-CSF 治疗心肌梗死后心力衰竭

众多研究者通过小动物实验证实 G-CSF 可改善心肌梗死后左心室工作效能,减小梗死面积及梗死心壁的厚度,减小左室舒张末压及左室在收缩、舒张末期的内径和容积,增强左室的收缩和舒张功能,增加左室射血分数及心输出量^[15,16,26]。Li 等^[27]发现,在小鼠心肌梗死 12 周后给予 G-CSF 对心肌梗死后心力衰竭有一定治疗效果。研究者们以小剂量 G-CSF 连续给予 4 周,结果发现减少了心肌纤维化及残存心肌细胞肥大的发生,由此缩小了心肌梗死疤痕的面积并显著改善了心功能。同时他们发现,由于 G-CSF 的使用,表达于心肌细胞的 G-CSFR 也有所增加,提示在衰竭的心脏中存在调节 G-CSFR 表达的正反馈机制。G-CSF 还能激活信号转导途径,诱导肌源性转录因子 GATA-4、肌球蛋白重链、肌钙蛋白 I 及结蛋白的表达,同时还能增加基质金属蛋白酶-2,9 的表达,减少一些炎症介质的表达。在为数不多

的大动物实验中,G-CSF也同时被证实有益于心肌梗死后心功能的恢复。Iwanaga等^[18]以猪为模型,在其心肌梗死24h后连续使用G-CSF 7d,结果发现心肌梗死面积明显缩小,左心室舒张末内径及梗死心壁的厚度减少,降低了心脏离心性肥厚的发生率并有效改善了心功能。Norol等^[28]的实验通过组织病理学分析得出结论:在狒狒心肌梗死4h后联合给予G-CSF与干细胞因子可增加梗死心肌内的血管数量从而相对增加梗死区的血液灌注。Takahama等^[29]在闭塞犬的左冠状动脉前降支90min后给予连续6h的再灌注,实验组在再灌注开始的同时静脉给予G-CSF,而对照组在再灌注过程中不给任何药物。研究结果显示实验组的心肌梗死面积与对照组相比显著减少(从38.7%减少为15.7%, $P < 0.05$),且再灌注过程中室颤的发生率为0,与对照组的50%相比具有显著差异($P < 0.05$)。

3.2 G-CSF治疗扩张型心肌病 扩张型心肌病是原发性心肌病中最为常见的类型,严重地威胁人类健康。其根本原因是细胞缺失并为瘢痕组织所替代,功能性心肌细胞减少,最终导致心力衰竭。该病常规药物治疗效果差,并难从根本上恢复心肌细胞的数量。G-CSF除能动员骨髓干细胞以重建病损心脏丧失的心肌细胞外,还对扩张型心肌病具有直接的治疗作用。Miyata等^[30]将G-CSF作用于扩张型心肌病的大鼠模型,发现G-CSF可减少心肌细胞的死亡、抑制左室重构、改善左室功能并提高实验组动物的存活率。研究者们推测可能是G-CSF激活了Jak/Stat途径,从而抑制了自噬心肌细胞的变性,以此显著地减弱了大鼠心肌病在解剖结构及功能上的重构。在2006年公布的另一项研究中,Hou等^[31]制作了由阿霉素诱导的扩张型心肌病模型,并在阿霉素停用2周后开始给予G-CSF治疗共8d,其结果发现,心肌细胞的凋亡及诱导细胞凋亡的Fas蛋白的表达减少,一些反映心室效能的指标如缩短分数、左心室收缩末期压、左心室舒张末期压等都趋向正常。

4 G-CSF的副作用

G-CSF较常见的副作用有以下几个:(1)骨痛:在G-CSF应用期间骨痛的发生率约为80%^[32],以腰骶部疼痛最为明显,大多可以耐受,个别需要镇痛剂。其发生机制与G-CSF影响成骨细胞的活性有关,且呈剂量依赖性,即G-CSF使用剂量越大骨痛发生率越高。(2)引起或加重心绞痛:对存在发生冠

心病危险因素的患者,G-CSF应用后可引起或加重心绞痛^[33],其原因可能是高白细胞血症致血液黏滞度增高或G-CSF使血小板第二相聚集功能增强及凝血酶增多^[34]。(3)脾脏增大:徐娟等^[35]报道,在使用G-CSF后患者会出现脾脏增大,这可能与白细胞数增多导致脾脏储存和处理白细胞的负荷增加有关。其他副作用还有疲乏、头痛、失眠、食欲减退、恶心、呕吐、便秘、发热,偶见皮疹、严重化脓性感染、体液潴留、盗汗、高凝状态及自身免疫性疾病等。这些副作用大部分与剂量相关,一般在停用G-CSF后几天内缓解。

5 结语

虽然在大量动物实验中采用G-CSF治疗心血管病取得了显著疗效,但在临床上通过G-CSF介导的直接或间接效应治疗心血管病还处于初始阶段,尚有许多问题未得到完全解决,如G-CSF使用的时机、经动员的干细胞归巢的机制及干细胞环境诱导分化机制等一些实际问题还需研究解决。相信随着研究的进一步深入,G-CSF治疗心血管病将有很好的应用前景。

参考文献

- [1] Kang HJ, Kim HS. G-CSF and erythropoietin-based cell therapy: a promising strategy for angiomyogenesis in myocardial infarction. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008, 6: 703-713.
- [2] Leone AM, Rutella S, Bonanno G, et al. Endogenous G-CSF and CD34(+) cell mobilization after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2006, 111: 202-208.
- [3] Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, et al. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood*, 1990, 76: 1962-1964.
- [4] Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*, 2005, 23: 33-41.
- [5] Kendrick TS, Bogoyevitch MA. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by the granulocyte colony-stimulating factor receptor: mechanisms and functional consequences. *Front Biosci*, 2007, 12: 591-607.
- [6] Harada M, Qin Y, Takano H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med*, 2005, 11: 305-311.
- [7] Wright DE, Cheshier SH, Wagers AJ, et al. Cyclo-

- phosphamide/granulocyte colony-stimulating factor causes selective mobilization of bone marrow hematopoietic stem cells into the blood after M phase of the cell cycle. *Blood*, 2001, 97: 2278-2285.
- [8] Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 2002, 3: 687-694.
- [9] Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*, 2005, 106: 3020-3027.
- [10] Levesque JP, Liu F, Simmons PJ, et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*, 2004, 104: 65-72.
- [11] Dlubek D, Drabczak-Skrzypek D, Lange A. Low CXCR4 membrane expression on CD34 (+) cells characterizes cells mobilized to blood. *Bone Marrow Transplant*, 2006, 37:19-23.
- [12] Fu S, Liesveld J. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev*, 2000, 14: 205-218.
- [13] Katayama Y, Battista M, Kao WM, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 2006, 124: 407-421.
- [14] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 2004, 10: 858-864.
- [15] Misao Y, Takemura G, Arai M, et al. Importance of recruitment of bone marrow-derived CXCR4 (+) cells in post-infarct cardiac repair mediated by G-CSF. *Cardiovasc Res*, 2006, 71: 455-465.
- [16] Kuhlmann MT, Kirchhof P, Klocke R, et al. G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med*, 2006, 203: 87-97.
- [17] Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, et al. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J*, 2006, 20: 956-958.
- [18] Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325: 1353-1359.
- [19] Pelletier L, Regnard J, Fellmann D, et al. An *in vitro* model for the study of human bone marrow angiogenesis: role of hematopoietic cytokines. *Lab Invest*, 2000, 80: 501-511.
- [20] Chen X, Kelemen SE, Autieri MV. AIF-1 expression modulates proliferation of human vascular smooth muscle cells by autocrine expression of G-CSF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 1217-1222.
- [21] Bussolino F, Wang JM, Turrini F, et al. Stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in human endothelial cells activated by granulocyte and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. Evidence for a role in proliferation and migration. *J Biol Chem*, 1989, 264: 18284-18287.
- [22] Ohki Y, Heissig B, Sato Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J*, 2005, 19: 2005-2007.
- [23] O'Neill TJ 4th, Wamhoff BR, Owens GK, et al. Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells. *Circ Res*, 2005, 97: 1027-1035.
- [24] Ueda K, Takano H, Hasegawa H, et al. Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-endothelial NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: e108-e113.
- [25] Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation*, 2004, 109: 2572-2580.
- [26] Hasegawa H, Takano H, Shiraishi H, et al. Intracoronary injection of granulocyte colony-stimulating factor ameliorates the progression of left ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. *Circ J*, 2006, 70: 942-944.
- [27] Li Y, Takemura G, Okada H, et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab Invest*, 2006, 86: 32-44.
- [28] Norol F, Merlet P, Isnard R, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood*, 2003, 102: 4361-4368.

(下转第 192 页)

- airway infection. Comparison with noninfected patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162 (3 Pt 1): 947-952.
- [12] White AJ, Gompertz S, Bayley DL, et al. Resolution of bronchial inflammation is related to bacterial eradication following treatment of exacerbations of chronic bronchitis. *Thorax*, 2003, 58: 680-685.
- [13] Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD. *Eur Respir J*, 2004, 23: 685-691.
- [14] Soler N, Ewig S, Torres A, et al. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 1999, 14: 1015-1022.
- [15] Moller LV, Timens W, Van-der-Bij W, et al. Haemophilus influenzae in lung explants of patients with end-stage pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157 (3 Pt 1): 950-956.
- [16] Hiltke TJ, Schiffmacher AT, Dagonese AJ, et al. Horizontal transfer of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable Haemophilus influenzae, in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis*, 2003, 188: 114-117.
- [17] Murphy TF, Kirkham C. Biofilm formation by nontypeable Haemophilus influenzae: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol*, 2002, 2:7.
- [18] Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope*, 2001, 111:2083-2094.
- [19] Hall-Stoodley L, Hu FZ, Geseke A, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*, 2006, 296:202-211.
- [20] Leroy M, Cabral H, Figueira M, et al. Multiple consecutive lavage samplings reveal greater burden of disease and provide direct access to the nontypeable Haemophilus influenzae biofilm in experimental otitis media. *Infect Immun*, 2007, 75:4158-4172.
- [21] Starner TD, Zhang N, Kim G, et al. Haemophilus influenzae forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174:213-220.

(上接第 188 页)

- [29] Takahama H, Minamino T, Hirata A, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006, 20: 159-165.
- [30] Miyata S, Takemura G, Kawase Y, et al. Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Pathol*, 2006, 168: 386-397.
- [31] Hou XW, Son J, Wang Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor reduces cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006, 20: 85-91.
- [32] Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, et al. Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25: 85-89.
- [33] Vij R, Adkins DR, Brown RA, et al. Unstable angina in a peripheral blood stem and progenitor cell donor given granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion*, 1999, 39: 542-543.
- [34] Shimoda K, Okawura S, Inaba S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor and platelet aggregation. *Lancet*, 1993, 341: 633.
- [35] 徐娟, 宋伟, 金辉, 等. 重组人粒细胞集落刺激因子对健康供者免疫细胞的影响及其应用安全性. *药物不良反应杂志*, 2007, 9: 311-315.