

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.02.038

心脏再生分子机制的研究进展*

周 桑,丁雪燕 综述,秦永文[△] 审校

(第二军医大学第一附属长海医院心内科,上海 200433)

[关键词] 肌细胞,心脏;心肌;心脏;心脏再生;心肌细胞再生;心脏重编码;移植

[中图分类号] R541.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)02-0256-03

通常来说,人的心肌细胞无法再生,心肌损伤范围过大时会出现难以逆转的心力衰竭。2009 年 Bergmann 依据大气层 C14 浓度的变化,证明了人的心肌细胞存在一定程度的再生能力,但再生的速率极低,成人心肌细胞的年再生速率约为 0.5%~1.0%^[1-2],并随年龄的增长逐步下降,无法弥补心脏损伤(如心肌梗死)后的大量心肌损失。有研究者报道,鼠正常发育过程中存在心肌细胞再生,来源于原有心肌细胞的增殖,而非来源于干细胞或心脏祖细胞的分化;在心肌梗死后,鼠的心肌细胞再生则同时来源于心脏祖细胞和原有的心肌细胞的增殖。成熟的心肌细胞究竟能不能再生,又是如何再生的,这不仅仅是一个有趣的科学问题,更有着重要的临床意义,一旦在人体内实现对心脏再生的促进,会打破目前心衰进展只能延缓而不能扭转的困境,带来心血管疾病治疗手段的巨大飞跃。目前针对心脏病终末期,仅有心脏移植术(Tx)和左心室辅助装置植入术(LVAD)两种治疗手段,均有较大的局限性。急性失代偿期心衰患者的 1 年内病死率高达 30%,而接受了 Tx 或 LVAD 的患者 1 年内病死率在 16%左右,患者的预后十分严峻。目前,全球范围内有多种方法可以促进心肌细胞再生,如心脏灌注或直接注射 microRNAs 等小分子、经外科手术植入经工程改造的心肌组织等。本文将重点综述心脏再生各途径及其中尚未解决的问题。

1 心脏再生途径

心脏再生要求有新的心肌细胞的产生。目前有 3 种策略可以增加心肌细胞的数量:(1)在体内将梗死区的成纤维细胞重编码为心肌细胞;(2)促进内源性心脏再生;(3)将体外培育的心肌细胞移植入体内。唯一能够确切增加心肌细胞数量的来源是人类多能干细胞(hPSC),包括人类胚胎干细胞(hESC)、人类诱导多能干细胞(hiPSC)、人类孤雌生殖干细胞(hPGSC)体外培育。

1.1 直接重编码 2008 年有报道称,过表达转录因子 Ngn3 等可使胰腺外分泌细胞直接重编码为 β 细胞。2012 年有报道称,在转录因子 GATA4、MEF2C 和 TBX5 的作用下,在体外可以直接将小鼠的成纤维细胞转化为可跳动的心肌样细胞^[3]。同年其他研究者向小鼠心肌内直接注射逆转录病毒转导 GATA4、MEF2C 和 TBX5,显著提高了成纤维细胞转化为心肌样细胞的比率,减少了心肌梗死面积。有研究者通过减毒细菌将 MyoD 蛋白转入小鼠体内,可促使成纤维细胞转化为心肌样细胞^[4]。转录因子 HAND2、ETS2、Oct4 和 MESP1、MicroRNAs 的研究也显示了类似的结果^[5]。目前来看,各个实验室的结果可重复性低,重编码的效率比较低,大部分再生的心肌细胞缺

乏正常心肌细胞的表型,只有少部分再生细胞可跳动,仍未有相关研究报道重编码因子的转导对非心肌组织有无较大影响,以及过度重编码是否会引起心律失常,对成纤维细胞如何转分化的机制也了解较少。存在的最大问题可能是,目前所有的已报道文献中再生心肌细胞均无法与邻近心肌细胞形成电偶连。心脏再生技术应用于心脏疾病治疗仍存在较大瓶颈,需要更多有突破性的研究成果。

1.2 心肌细胞再生 鼠的基因系图结果提示,成年鼠的心肌细胞处于相对稳定状态,心肌梗死后,新的心肌细胞可从非心肌细胞(指没有 α 肌球蛋白重链)的祖细胞分化而来。另有研究者报道,在鼠的心肌梗死后模型中添加 c-kit 细胞可导致明显的新生血管形成和心肌细胞再生;而从人类心脏中分离出的表达 c-kit 的心脏祖细胞可引起体内心肌细胞的增多。干细胞曾被认为是心脏再生的种子细胞,被应用于骨髓干细胞移植治疗心肌梗死,但在多项研究中均未获得理想的临床疗效,提示心脏再生的种子细胞可能并非干细胞。最近的研究结果显示,祖细胞对于成年哺乳动物的心肌细胞再生率贡献极小^[6]。小鼠的基因系图分析显示,再生的心肌细胞主要来源于原有心肌细胞的增殖,这与成年斑马鱼心肌细胞能够重新返回细胞周期的实验结果相符。因此,目前普遍认为心脏再生的主要来源是原来已经存在的心肌细胞的脱分化,而促进原有的心肌细胞重返细胞周期可能是修复受损心脏的重要途径。

目前已报道的可以重启心肌细胞再生能力的策略有多种。体外实验中,cyclin B1-CDC2 的过表达和 p21/p27 的敲除可使更多的心肌细胞进入细胞周期^[7]。体内实验中,小鼠心肌梗死后,过表达 cyclinD2 和 cyclinA2 可使更多的心肌细胞重返细胞周期,疤痕区可见心肌再生迹象。过表达转录因子 E2F2 或敲除其调节基因 Rb 和 p110 也可实现心肌细胞再生的重启^[8]。另有研究者发现,梗死区心肌细胞表达的神经营养蛋白 1(Nrg1)急剧增加,而抑制 Nrg1 的协同受体 ErbB2 将破坏损伤心肌细胞的增殖反应,过表达 Nrg1 的鱼系的心肌再生能力则显著增强。研究者进一步在健康斑马鱼验证 Nrg1 的作用,发现 Nrg1 可促进心肌细胞去分化,壁层心肌细胞持续增加导致心脏肥大。在给予重组人 Nrg1 后,慢性收缩性心力衰竭的患者的左室收缩功能得到改善,心力衰竭的进程被逆转^[9];另有 Nrg1 的控制基因 Len 及 Nrg1 的受体 ErbB2 和 ErbB4 的激活也可刺激心肌细胞增殖的报道。但 Nrg1 是否能够促进心肌再生的作用尚存争议,有研究者重复了该实验,发现在正常成年鼠和心梗后成年鼠中,Nrg1 不能促进心肌细胞的 DNA 合成,心肌细胞的再生没有得到促进。另外有研究者报道,斑马

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81470407)。 作者简介:周桑(1993—),住院医师,硕士,主要从事心脏再生研究方面研究。

[△] 通信作者,E-mail:qinyongwenaxin@sina.com。

鱼心脏部分切除后,附近的心外膜细胞发生了形态改变,并大量表达维 A 酸(RA)及 RA 合成酶(raldh2),而阻断 RA 表达将使心肌细胞无法再生。骨膜蛋白和成纤维细胞生长因子也被证明与心肌细胞再生有关,也有研究者发现它们可引起心肌肥大^[10]。

另外一种策略是通过调整生长发育旁路来刺激心肌细胞增殖。研究者发现,GSK3 β 的敲除可激活 Wnt 通路,促进心脏再生;反过来,通过 Hippo 通路抑制 Wnt 通路可抑制心肌再生^[11]。Hippo/Yap 通路包括一个激酶级联反应,而 Mst1/2 (Hippo 的同源基因)、Lats1/2 (Wnt 的同源基因)、Salv1 和 YAP/TAZ(Yki 的同源基因)在哺乳动物中是该通路的核心蛋白^[12]。Mst1/2 的活化将使 Lats1/2 氧化磷酸化激活,Lats1/2 的活化将抑制转录共调控因子 YAP/TAZ。该通路可有效地调控胎儿心脏发育及心肌细胞再生,Yap 基因在心脏的特定敲除可使胚胎发育时期心脏再生减少,而在新生鼠中,Yap 基因的激活可使心肌细胞细胞周期活动增加;Lats1/2 (可抑制 YAP)和 Salv1(可激活 Mst1/2)的失活可促进心肌再生^[12]。Fang 等^[13]报道了斑马鱼心脏损伤后存在 JAK1/STAT3 通路的激活,并有分泌蛋白 Rln3a 表达增加,在 STAT3 沉默的斑马鱼,虽然心脏可发育正常,但成年期心脏损伤后的斑马鱼心脏再生被抑制,而这种抑制作用可被外源性 Rln3 解除。

microRNAs 的应用则是另一种有效的策略。Eulalio 等^[14]通过高通量筛选技术在全基因组 microRNAs 库中筛选出了能促进新生幼鼠心肌细胞增殖和损伤修复的 microRNAs。共有 40 种 microRNAs 能在不引起心肌肥大的前提下使乳鼠心肌细胞再生的速率增加 2 倍以上,研究者进一步实验发现 hsa-miR-590 和 hsa-miR-199a 可以促使体外培养的成人心肌细胞重返细胞周期,促进新生和成年动物的心肌细胞增殖。在小鼠心肌梗后模型中,这些 microRNAs 也能明显促进心肌细胞再生、改善心功能^[15-16]。值得一提的是,有几种 microRNAs 可抑制肌动蛋白基因的表达,并与 Hippo 通路有关,miR-302-367 短时增加可通过 Hippo 通路促进小鼠心脏再生^[17],该过程涉及肌小节的解聚和 Hippo 通路的激活。有趣的是,前文中提到的在心脏再生中起作用的 4 个转录因子 GATA4、HAND2、MEF2C 和 TBX5 也分别受几种 microRNAs 的调节。长链非编码 RNA 也可能参与心脏再生过程。另有研究者报道了一组不同的 microRNAs (miR-1、miR-133、miR-208、miR-499)能在体外及体内将小鼠成纤维细胞向心肌细胞转化,前文提到的 JAK 阻断剂可使 microRNA 介导成纤维细胞转化的效率提高。

有多项研究指出,心外膜细胞和心内膜细胞在斑马鱼心脏再生中发挥了重要作用。事实上,已有诸多报道提示,心外膜细胞是心脏再生的实际启动者,损伤后再生的心外膜细胞从心室底部向缺损部位迁移,补充损失的心肌细胞,而心外膜消融后的斑马鱼无法进行心脏再生。通过阻断球状动脉表达的 Hh 信号可以阻断心脏再生,而人工给予 Hh 信号可以使去除了球状动脉的心脏恢复再生能力^[18],提示控制心肌细胞再生的是球状动脉。除此之外,心外膜能够特异性表达对心脏再生必要的 cav1 蛋白及转录因子 tcf21,其中 tcf21 可作用于新生血管周围的细胞,促进其增生。研究发现心外膜细胞表达的 PDGF 信号是心脏再生必不可少的信号,通过 Rho 相关蛋白激酶介导诱导心肌纤维的产生和上皮细胞特征细胞-细胞接触的

减少,而在体内抑制 PDGF 信号则将削弱心肌再生和新生血管的形成。Kikuchi 等^[19]报道在心室损伤后 3 h,心外膜细胞发生了显著的形态改变,RA 合成酶 2(raldh2)表达增加。1 d 后,raldh2 的表达开始集中于心室损伤部位周围的心外膜,而通过转基因阻断 RA 受体或者增加 RA 裂解酶的表达可以抑制心脏再生。另有研究者报道,在斑马鱼心脏损伤后,心外膜细胞表达纤连蛋白的同源物 fn1 和 fn1b,而 fn1 基因突变的斑马鱼心脏再生能力极低。心肌细胞还可表达 fgf17b,引起心外膜细胞 fgfr2 和 fgfr4 上调,而阻断 fgfr 的表达后心脏无法再生,损伤区仅由疤痕组织修复。而心内膜细胞同样也在斑马鱼心肌再生中发挥作用。有研究者报道,心内膜细胞在斑马鱼心脏切除后数小时内发生急剧的形态改变,并迅速迁移到心室各层,上调心室细胞 raldh2 等发育基因的表达。

1.3 基于人类多能干细胞的细胞治疗 hESC 有无限分化为心肌细胞的潜力,关键在于如何使 hESC 稳定、持续地分化为成熟的、有功能的心肌细胞。早期的研究中 hESC 自发性分化为心肌细胞的效率极低(小于 3%),而后的研究中生长因子的给予和技术上的进步将心肌细胞的产量提升到 80%以上,使胚胎干细胞应用于心脏疾病治疗成为可能^[20]。然而,目前由 hESC 分化出的心肌细胞与普通心肌细胞在表达谱和功能上仍有较大差别。目前,hESC 仍是人类多能干细胞中最接近自然原态的,然而大多数 hESC 系已经使用了超过 10 年,长时间的细胞培养可能使它的基因型和表型发生了累积性的改变。为了减少移植排斥反应,目前 hESC 的使用仅限于基本没有免疫反应的器官,如眼和中枢神经系统。在梗死后动物模型(如小鼠、大鼠、豚鼠、灵长类动物等)中,hESC 能够有效改善心功能。然而在免疫抑制的恒河猴中植入由 hESC 分化的心脏祖细胞后,研究者观察到了畸胎瘤的形成^[21]。遗憾的是,目前其他大部分实验的周期较短、尚不足以正确评估畸胎瘤的形成风险。

hPGSC 依旧是较为理想的细胞来源之一,它来自于未受精的卵母细胞,避免了伦理问题;同时,它在免疫方面的优势使其避免了激活自然杀伤细胞。在动物心肌梗后模型中植入由 hPGSC 分化来的心肌细胞后,心脏再生得到了促进,且未发现肿瘤形成。

1997 年 Wilmut 等^[21]发现可通过体细胞核转移技术(SCNT)可将体细胞重编码为多能 ESCs。此后研究者们陆续实现了多种哺乳动物体细胞的克隆,但人体细胞多能干细胞(hNT-ESC)的实现依旧有较大挑战性。2013 年有研究者报道了 hNT-ESC 系的成功培育,其核基因组来自于体细胞,是正常的双倍体细胞。与之前的研究采用的是胚胎或者婴儿体细胞不同,Chung 等^[22]成功地从成人细胞培育出人 NT-ESC。考虑到需要进行心肌细胞移植的疾患大多数发生在高龄人群,Chung 的实验具有重要的意义。另外,年龄增长带来的更多的基因突变是 hNT-ESC 和 iPSCs 的共同缺点,在应用于临床前筛查有无编码区基因突变具有必要性。过去曾认为 SCNT 可应用于遗传性线粒体疾病的患者,然而最近的实验数据表明,NT-ESC 与宿主线粒体不匹配时会引发免疫排斥反应,而解决这一问题尚有待更多的研究。

2006 年 Takahashi 等^[23]报道了鼠成纤维细胞能在 4 种转录因子 c-MYC、OCT3/4、SOX2 和 KLF4 作用下脱分化为 iPSC。2007 年研究者以类似的方法获得了人 iPSC,人 iPSC 在体内和体外均可以像 hESC 一样分化成三胚层结构。然而目

前人 iPSC 的应用仍面临众多障碍。首先目前重编码的效率低至 0.001%~4.400%, 培育稳定的人 iPSC 系并获得足够数量的心肌细胞需要长达 6 个月的时间。另外, 有证据表明小鼠的自体 iPSC 同样可引起较为轻微的免疫反应, 也有研究报道到小鼠肿瘤的发生。但对于终末期心衰的患者来说, 细胞疗法可能带来的肿瘤的风险及预后依然优于终末期心衰本身。

2 结语与展望

从目前的研究结果看, 心脏再生的过程与胚胎时期心脏的发育有相似的过程和调控点, 但并不完全相同。心脏再生的机制复杂, 涉及细胞、DNA、RNA 和细胞因子相互作用, 对心脏再生的研究可能需要从单一因素到多因素, 以及从细胞因子到整体细胞水平进行, 任重而道远。多能干细胞移植方面的研究成果丰硕, 然而如何尽量减少移植排斥反应、提高干细胞分化为心肌细胞的效率仍面临较大瓶颈, 使用哪种细胞类型及采取何种方法进行移植尚未达成共识。有理由相信, 一旦成功克服心脏再生领域的研究应用于临床的困难和障碍, 将改变目前终末期心衰治疗手段局限、患者预后差的困境, 极大地改善患者预后。

参考文献

- [1] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans[J]. *Science*, 2009, 324(5923):98-102.
- [2] Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart[J]. *Cell*, 2015, 161(7):1566-1575.
- [3] Buganim Y, Itskovich E, Hu YC, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(3):373-386.
- [4] Bichsel C, Neeld D, Hamazaki T, et al. Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein[J]. *Cell Reprogram*, 2013, 15(2):117-125.
- [5] Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, et al. microRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2012, 110(11):1465-1473.
- [6] Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes[J]. *Nature*, 2013, 493(7432):433-436.
- [7] Di Stefano V, Giacca M, Capogrossi MC, et al. Knock-down of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(10):8644-8654.
- [8] Sdek P, Zhao P, Wang Y, et al. Rb and p130 control cell cycle gene silencing to maintain the postmitotic phenotype in cardiac myocytes[J]. *J Cell Biol*, 2011, 194(3):407-423.
- [9] Polizzotti BD, Ganapathy B, Walsh S, et al. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window[J]. *Sci*

Transl Med, 2015, 7(281):281ra45.

- [10] Kühn B, del Monte F, Hajjar RJ, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair[J]. *Nat Med*, 2007, 13(8):962-969.
- [11] Reuter S, Soonpaa MH, Firulli AB, et al. Recombinant neuregulin 1 does not activate cardiomyocyte DNA synthesis in normal or infarcted adult mice[J]. *PloS One*, 2014, 9(12):e115871.
- [12] Heallen T, Zhang M, Wang J, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size[J]. *Science*, 2011, 332(6028):458-461.
- [13] Fang Y, Gupta V, Karra R, et al. Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(33):13416-13421.
- [14] Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration[J]. *Nature*, 2012, 492(7429):376-381.
- [15] Ounzain S, Micheletti R, Arnan C, et al. CARMEN, a human super enhancer-associated long noncoding RNA controlling cardiac specification, differentiation and homeostasis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt A):98-112.
- [16] Ounzain S, Pedrazzini T. The promise of enhancer-associated long noncoding RNAs in cardiac regeneration[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(7):592-602.
- [17] Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation[J]. *Nature*, 2010, 464(7288):606-909.
- [18] Wang J, Cao J, Dickson AL, et al. Epicardial regeneration is guided by cardiac outflow tract and Hedgehog signaling[J]. *Nature*, 2015, 522(7555):226-230.
- [19] Kikuchi K, Holdway JE, Major RJ, et al. Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration[J]. *Dev Cell*, 2011, 20(3):397-404.
- [20] Kempf H, Kropp C, Olmer R, et al. Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture[J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(9):1345-1361.
- [21] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(1):3-7.
- [22] Chung YG, Eum JH, Lee JE, et al. Human somatic cell nuclear transfer using adult cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(6):777-780.
- [23] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4):663-676.

(收稿日期:2016-07-25 修回日期:2016-10-12)