

心肌再生途径的研究

陈佩儿, 钟剑锋, 梁政, 陈灿

(广东医科大学附属第一医院心血管内科, 广东 湛江 524000)

摘要:急性心肌梗死(AMI)已成全球缺血性心血管疾病的主要死因之一。近年来,随着经皮冠状动脉介入治疗和再灌注时间的改善,急性心梗患者死亡率显著降低。但心肌梗死后导致心肌细胞数量减少,纤维瘢痕增生,引起心室结构重建、心肌弹性下降、脏壁扩张变薄和心功能下降等,逐渐形成慢性心力衰竭(CHF)。结合我国人口老龄化及冠心病发病的特点,意味着更多的人会逐渐发展形成 CHF,将严重影响患者的预后及生活质量。心肌再生是让受损心肌周围细胞和血管再次增殖分化,从而减轻心室结构重建,改善心功能。本文就促心肌再生方法,包括信号通路调节、干细胞移植治疗、心脏重编码、外泌体旁分泌刺激、新兴组织工程做一综述。

关键词:急性心肌梗死;心肌细胞;心肌再生

中图分类号:R54

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.19.016

文章编号:1006-1959(2019)19-0051-04

Study on Myocardial Regeneration Pathway

CHEN Pei-er,ZHONG Jian-feng,LIANG Zheng,CHEN Can

(Department of Cardiology,Affiliated Hospital of Guangdong Medical University,Zhanjiang 524000,Guangdong,China)

Abstract:Acute myocardial infarction (AMI) has become one of the leading causes of global ischemic cardiovascular disease. In recent years, with the improvement of percutaneous coronary intervention and reperfusion time, the mortality of patients with acute myocardial infarction has been significantly reduced. However, after myocardial infarction, the number of myocardial cells is reduced, fibrous scar hyperplasia, ventricular structural reconstruction, myocardial elasticity decline, dilated wall thinning and cardiac function decline, and chronic heart failure (CHF) is gradually formed. Combined with the characteristics of China's aging population and the incidence of coronary heart disease, it means that more people will gradually develop CHF, which will seriously affect the prognosis and quality of life of patients. Myocardial regeneration is the proliferation and differentiation of cells and blood vessels around the damaged myocardium, thereby reducing ventricular structural remodeling and improving cardiac function. This article summarizes the methods of promoting myocardial regeneration, including signal pathway regulation, stem cell transplantation therapy, cardiac re-encoding, exocrine paracrine stimulation, and emerging tissue engineering.

Key words:Acute myocardial infarction;Myocardial cells;Myocardial regeneration

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 导致心肌细胞死亡造成患者心功能衰竭和恶性心律失常发生的主要原因,为家庭及社会带来巨大的精神压力和沉重的经济负担。心肌再生的目标是心肌损伤或死亡后通过增加有活力的心肌细胞,恢复心脏收缩功能,减轻 AMI 后的心脏重构。本文简要对几种常见促心肌再生的方法,包括信号通路调节、干细胞移植治疗、心脏重编码、外泌体旁分泌刺激、新兴组织工程等作一综述,以为临床治疗提供参考依据。

1 Hippo-YAP 信号通路

Hippo 通路首次在果蝇身上发现,其可通过控制细胞的增殖、存活和分化来调节器官的大小,是一条典型、保守的信号通路。人类的 YAP 基因位于染色体 11q22 区,该基因存在 YAP1 和 YAP2 两种变位剪切形式,其中 YAP1 包含 1 个 WW 结构域,而 YAP2 则包含 2 个 WW 结构域。YAP 基因有多个特异氨基酸序列或结构域,包括 SH3 结合基序、C 端的转录激活域、PDZ 结合基序、2 个 WW 结构域、N 端富含脯氨酸的结构域以及转录因子 TEADs 结合

基金项目:广东省自然科学基金(编号:S2013010015074)

作者简介:陈佩儿(1991.6-),女,广东东莞人,硕士,住院医师,主要从事干细胞治疗以及心肌再生的研究工作

通讯作者:陈灿(1963.2-),男,广东湛江人,博士,主任医师,教授,主要从事冠心病基础研究工作

区。YAP 基因通过这些氨基酸序列或结构域,可与多种蛋白相互作用,参与调控细胞内的多条信号通路,行使多种生物学功能^[1]。YAP 基因主要位于细胞质中,被认为是转录共激活因子,其缺乏明显的 DNA 结合结构域,不能独立进行转录,需与转录因子结合,进入细胞核内共同激活与生长直接相关基因的转录。

在正常成年哺乳动物的心脏中大约有 30% 的细胞是心肌细胞,另外的 70% 为内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和免疫细胞^[2]。Wu S 等^[3]通过对脊椎动物研究发现,心肌细胞有低度的再生潜能,在切除斑马鱼心脏(<20%)后,其心脏能通过残余心肌细胞有丝分裂恢复原来的大小,主要与 Hippo-YAP 信号通路激活有关。Jones NC 等^[4]在小鼠的动物模型中对 Hippo-YAP 信号通路进行研究,结果发现 YAP 基因在胚胎和出生后 7 d 之内为高表达,而经过一过性再生窗口期后,其表达量迅速下降,心肌细胞也由此进入不可再生的阶段;心肌细胞的 YAP 基因一旦出现特异性失活,小鼠出生后可导致心肌细胞凋亡、纤维化、心腔扩大或过早的死亡,而 YAP 基因重新激活可刺激心肌细胞的再生,减轻心肌损伤、增加心肌的收缩力,进而改善心功能及心室重构。

2 干细胞移植治疗

近年来,干细胞疗法已成为一种治疗急性或慢

性缺血性心肌病最有前景的策略。干细胞类型包括胚胎干细胞、诱导多潜能干细胞、骨髓单核细胞、骨骼肌成肌细胞、内皮祖细胞,间充质干细胞,及心脏干细胞等^[6]。

胚胎干细胞是来源于囊胚内细胞团、具有全能性的细胞,其最大的优势体现为可以分化成不同类型的细胞,其中包括心肌细胞。在特定的培养条件下,胚胎干细胞可分化为心肌细胞,例如小鼠的内胚层样细胞与各种心脏分化所需生长因子共同培养下,可通过旁分泌作用促使胚胎干细胞分化为心肌细胞^[6]。Nakamura T 等^[7]研究证实了多能干干细胞的存在,其类似于胚胎干细胞,却源于成熟体细胞,利用反转录因子 Sox2、Oct3/4、Klf4 和 c-Myc 诱导的多潜能干细胞。多潜能干细胞是类似于胚胎干细胞的多能干细胞,其迅速成为干细胞疗法的一种新来源,并克服了胚胎干细胞带来的一些伦理问题。内皮祖细胞可分化为内皮细胞,其来源于骨髓的多能造血干细胞,参与血管内皮功能的维持、损伤的修复和血管的再生。临床研究显示^[8],内皮祖细胞可以作为预测 AMI 后心血管突发事件的再发生。动物实验研究同样发现,尾静脉注射内皮祖细胞后可以减轻心脏纤维化和促进心室重构。间充质干细胞是从骨髓、脂肪组织和脐带血等多种孤立的组织中获得,其可分化成心肌细胞,软骨细胞,骨骼肌成肌细胞和脂肪组织。间充质干细胞移植到体内后,通过旁分泌途径,释放多种细胞因子、生长因子来促进 MI 周边的细胞增殖和分化,这是间充质干细胞治疗最主要的作用^[9]。此外,间充质干细胞具有免疫抑制功能和免疫特权,在异体移植中,可作为基础干细胞治疗的重要来源。

3 心脏重编码

有研究表明^[10],胰腺外分泌细胞可以直接重新编程 β 细胞过表达的转录因子。同样,成纤维细胞可以利用体外 3 个转录因子 GATA4、MEF2C 和 Tbx5 直接重组成类似心肌样细胞。幼鼠心肌内病毒逆转录 GATA4、MEF2C 和 Tbx5 因子,可以比体外更高效率地把成纤维细胞转化成心肌样细胞,从而更好地改善心肌梗死后心肌细胞的功能^[11]。另外,其它转录因子,如 GATA4、HAND2、MEF2C、Tbx5、ETS2、MESP1 及 microRNA 等也表现出类似的作用^[12-15]。

目前,重编程效率仍然很低。重编程的外显率,即心肌细胞表型并不完整,其转分化机制仍未明确。此外,由于尚未深入研究,暂未明确其在体内转录重编码是否会影响相邻非心脏组织,以及重新编程后是否会导致心律失常等不良事件。但重编程在体外能将成纤维细胞转化成心肌细胞而获得心肌组织的再生,生成数量充足的心肌细胞,在诱导分化心肌细

胞的治疗应用上是可行的,技术上较为简单,能避免免疫抑制的情况发生^[16]。

早期研究报道^[17],在小鼠正常衰老过程中心肌细胞基本保持稳定,而心肌梗死后可从非心肌祖细胞群(重链非 α -肌球蛋白)形成新的心肌细胞。此外,临床病例报告结果指出,使用人类胚胎干细胞来源的心脏祖细胞嵌入纤维蛋白基质治疗心力衰竭,在改善左室射血功能的同时,并没有观察到心律失常、肿瘤形成和免疫抑制等相关不良事件的发生。FoxOs 转录因子属于叉头框蛋白家族中的一个亚类,其最大的特点是拥有一个被称为叉头盒的翼状螺旋 DNA 结合域,细胞可通过该结构域对抗氧化损伤^[18]。

4 外泌体旁分泌刺激

外泌体是细胞分泌的一种在细胞与细胞之间传递信息(包括 miRNA、蛋白、分子伴侣、信号分子)的磷脂双分子层囊泡。越来越多的研究证实,外泌体在心肌再生机制中是一个潜在的重要媒介,心肌祖细胞和干细胞来源的外泌体可以促进心脏内源性修复和改善心梗后的心功能。来源于心肌祖细胞的外泌体,可通过 ERK/Akt 信号刺激内皮细胞迁移和血管形成,不仅增加毛细血管的密度,还刺激血管形成进入基质胶塞。Vrijssen KR 等^[19]通过对促血管生成因子的研究,结果发现细胞外基质金属蛋白酶诱导因子的表达水平很高,同时心肌祖细胞自身释放出生长因子、细胞因子以及趋化因子发挥血管再生和抗凋亡的效应,介导细胞内源性修复作用。Ibrahim AG 等^[20]通过在心梗模型的老鼠心梗周边区分点注射心肌祖细胞来源的外泌体,结果发现其可抑制心肌细胞程序性死亡、增强血管再生能力和提高心功能。通过对外泌体成分的研究,发现 miRNAs 起着关键性作用,miRNAs 是一类约为 22~25 bp 的内源性、非编码的小 RNA 分子,大约调节着人类 1/3 的基因,其中 miR-210 和 miR-132 能够抑制心肌细胞凋亡和促进血管内皮再生;miR-146a 协同 miR-22 和 miR-24 可以干扰 TOLL 样受体和 TGF- β 纤维化信号转导通路,从而减少心肌纤维化以及瘢痕形成^[21,22]。

5 新兴组织工程

近年来,组织工程学是一门新兴的生物高技术,指在体外利用细胞和生物材料模拟三维结构进行组织重建,最常见的是,在细胞层面上注入多孔的、可降解的生物支架。合成材料在制造上具有很大的优势,操作简单、成本较低、可再生合成,但缺点是其生物相容性较差,会引起局部炎症反应,甚至释放有毒降解物^[23]。

用于组织工程的心肌细胞一般来源于未成熟的

胚胎细胞和干细胞,为达到成熟心肌细胞的能力,这些细胞需要组织成索样心肌结构以及 10 倍以上的心肌厚度。Zimmermann WH 等^[24]利用新生儿的心肌细胞来制备组织工程的心脏组织,并运用循环拉伸系统将这些心脏组织进行拉伸(时间为 7 d),再将这些心脏组织移植到梗死后的老鼠心脏表面,1 个月后发现心肌细胞呈现较好的收缩功能。同时,梗死区域的心肌传导速度也有所改善,可能是移植的心脏组织与梗死周边区建立了电生理联系。Pascual-Gil S 等^[25]研究表明,应用人工合成水凝胶、纤维纳米、微米和脂质体等生物材料,并结合辅助生长因子可增加细胞的存活,将长期有效替代心脏组织并恢复其结构与功能。

6 其它心肌再生的策略研究

6.1 内源性因子刺激心肌再生 内源性刺激心脏祖细胞的蛋白因子或生长因子,如 T β 4、VEGF、MCP3、PGF、SCDF1 等,通过细胞增殖、血管生成和血管新生进行心脏修复^[26,27]。

6.2 心外膜来源细胞刺激心肌再生 在胚胎发育过程中,来源于中胚层心脏系祖细胞的 Wt1⁺心外膜前体细胞可分化为心肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞等^[28]。早期切去斑马鱼的心尖部,发现心外膜细胞可以向心内膜迁移而参与心肌再生。同时也发现,心梗模型小鼠的 Wt1⁺基因表达上调,可分化为血管内皮细胞和平滑肌细胞参与冠状动脉的血管重建^[29]。

6.3 细胞周期调控蛋白 成年哺乳动物的心肌细胞,几乎不再增殖与分裂,心肌细胞从此退出了细胞周期^[30]。但有研究发现^[31],胚胎时期心脏中的细胞周期蛋白激酶复合物(CyclinB-CDK1、CyclinA-CDK1/2、CyclinE-CDK2 和 CyclinD-CDK4/6)的表达水平较高,出生后明显下降。细胞周期调控蛋白可能与心肌内源性再生密切相关,调控蛋白种类和发挥途径可能影响着心肌细胞的分裂与增殖。

7 总结

心肌细胞具有自律、兴奋、传导、收缩等功能,心肌梗死后心肌细胞数目减少,引起心室重构,严重影响心功能。因此,心肌细胞再生及转化无疑是将来治疗心血管疾病的重要手段。目前心肌细胞再生及转化的研究仍局限于临床前实验阶段,对于临床心血管疾病的应用,尚存在一些问题亟待解决:①如何保持基因高表达及基因特异性从而刺激心肌细胞再生;②如何安全、有效地将干细胞转入机体并稳定高效表达;③如何避免外源性细胞与宿主细胞的免疫排斥反应;④如何解决体内生物材料带来的不相容性。尽管多种研究策略为心肌再生提供了广阔的应用前景,但迄今尚未成功。随着心肌再生机制的继

续探索与研究,相信心肌再生技术会给心衰患者带来新的治疗策略。

参考文献:

- [1]Heallen T,Morikawa Y,Leach J,et al.Hippo signaling impedes adult heart regeneration[J].Development,2013,140(23):4683-4690.
- [2]位庚,郭勇英,贾振华.发育成熟心脏中血管内皮细胞和心肌细胞的关系[J].中国老年学杂志,2015,35(19):5647-5649.
- [3]Wu S,Huang J,Dong J,et al.Hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with Salvador and Warts [J].Cell,2003(114):445-456.
- [4]Jones NC,Fedorov YV,Rosenthal RS,et al.ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion [J].J Cell Physiol,2001,186(1):104-115.
- [5]曾建银,韩燊,李亚雄,等.诱导多能干细胞在心血管疾病中的应用:效率及安全性[J].中国组织工程研究,2019,23(9):1448-1454.
- [6]高静韬,Ahmed Hegab,黑田葵,等.小鼠肺上皮干细胞体外增殖和分化特性及其影响因素的初步研究[J].国际呼吸杂志,2018,38(8):573-583.
- [7]Nakamura T,Schneider MD.The way to a human's heart is through the stomach:Visceral endoderm-like cells drive human embryonic stem cells to a cardiac fate [J].Circulation,2003,107(21):2638-2639.
- [8]Cuadrado -Godia E,Regueiro A,Nunez J,et al.Endothelial Progenitor Cells Predict Cardiovascular Events after Atherothrombotic Stroke and Acute Myocardial Infarction.A PROCELL Substudy[J].PLoS One,2015,10(9):e132415.
- [9]张磊,陈正,马俊杰,等.间充质干细胞通过旁分泌 HGF 减轻大鼠肾小管上皮细胞缺氧复氧损伤的作用[J].中华器官移植杂志,2014,35(12):741-746.
- [10]Riching AS,Zhao Y,Cao Y,et al.Suppression of Pro-fibrotic Signaling Potentiates Factor-mediated Reprogramming of Mouse Embryonic Fibroblasts into Induced Cardiomyocytes[J].Vis Exp,2018:136.
- [11]李晓红,吴岳恒,杨翔宇,等.成纤维细胞向心脏祖细胞重编程过程中能量代谢变化研究[J].中国病理生理杂志,2015(10):1800.
- [12]杨翔宇.AF9 在高效蛋白质转导技术重编程 BM-MSCs 为心脏祖细胞中的作用[D].南方医科大学,2017.
- [13]Wang L,Liu Z,Yin C,et al.Stoichiometry of Gata4, Mef2c, and Tbx5 influences the efficiency and quality of induced cardiac myocyte reprogramming[J].Circ Res,2015,116(2):237-244.
- [14]麦丽萍,杨翔宇,吴岳恒,等. Myocardin 重组蛋白表达及其在人骨髓间充质干细胞重编程为血管平滑肌细胞中的作用[J].中国病理生理杂志,2018,34(8):1409-1414.
- [15]Abad M,Hashimoto H,Zhou H,et al.Notch Inhibition Enhances Cardiac Reprogramming by Increasing MEF2C Transcriptional Activity[J].Stem Cell Reports,2017,8(3):548-560.
- [16]哈尔滨医科大学.一种低氧促进小鼠成纤维细胞重编程为心肌细胞的方法:CN201610031919.6[P].2016-06-01.

(上接第 53 页)

- [17]Hsieh PC,Segers VF,Davis ME,et al.Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury[J].*Nat Med*,2007,13(8):970-974.
- [18]Kuscu N,Gungor-Ordueri NE,Sozen B,et al.FoxO transcription factors 1 regulate mouse preimplantation embryo development[J].*J Assist Reprod Genet*,2019.
- [19]Vrijnsen KR,Sluijter JP,Schuchardt MW,et al.Doevendans: Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells[J].*J Cell Mol Med*,2010,14(5):1064-1070.
- [20]Ibrahim AG,Cheng K,Marbán E.Marbán:Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy [J].*Stem Cell Reports*,2014,2(5):606-619.
- [21]张国威,胡国文,牛鑫,等.人胚胎干细胞源性间充质干细胞来源的外泌体生物学特性的研究[J].*实验与检验医学*,2017,35(2):143-147.
- [22]刘璐.牵张力诱导大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 miRNA 表达谱分析及 mir-503-5p 的功能验证 [D]. 山东大学,2016.
- [23]陈焱.基于 iPS 细胞和纳米纤维支架的组织工程心肌构建研究[D].第四军医大学,2017.
- [24]Zimmermann WH,Melnichenko I,Wasmeier G,et al.Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts[J].*Nat Med*,2006,12(4):452-458.
- [25]Pascual-Gil S,Garbayo E,Díaz-Herráez P,et al.Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials[J].*J Control Release*,2015(203):23-38.
- [26]Pacelli S,Basu S,Whitlow J,et al.Strategies to develop endogenous stem cell-recruiting bioactive materials for tissue repair and regeneration[J].*Adv Drug Deliv Rev*,2017(120):50-70.
- [27]张蕊,张同存.整合素 integrin β 4 调控 VEGF 诱导的骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化 [J]. *天津科技大学学报*,2017,32(1):13-17.
- [28]Zhou B,Honor LB,He H,et al.Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors [J].*Journal of Clinical Investigation*,2011,121(5):1894-1904.
- [29]刘锐.心外膜在新生小鼠心肌再生过程中作用机制的实验研究[D].北京协和医学院,2014.
- [30]童洋飞.雷公藤甲素对心肌细胞周期抑制因子 CDKN1a 表达及心肌肥大的影响[D].第三军医大学,2015.
- [31]Ikenishi A,Okayama H,Iwamoto N,et al.Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages [J].*Dev Growth Differ*,2012,54(8):731-738.

收稿日期:2019-7-8;修回日期:2019-7-16

编辑/杜帆