

· 综述 ·

心脏干/祖细胞与心肌损伤修复

贾竹青, 周春燕*

(北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 教育部分子心血管重点实验室, 北京 100191)

摘要 细胞移植是一种有希望的组织再生的治疗手段。多种类型的细胞已经用于动物心肌损伤的修复中, 包括胚胎干细胞、胚胎和新生动物的心肌细胞、骨骼肌成肌细胞、骨髓干细胞、脂肪来源的干细胞、可诱导的多能干细胞等。但是, 这些用于移植的细胞存在成活率低、在心脏局部存留少、与宿主心肌细胞不能整合和免疫排斥等问题, 这些问题限制了它们的应用。心脏自身存在的干细胞因为没有其他来源细胞存在的种种问题, 因而成为备受关注的治疗心肌梗死的种子细胞。但是, 心脏干/祖细胞也有自身弊端, 包括干细胞群的细胞生物学或遗传学标志没有统一, 在心肌中数量极少, 体外扩增能力有限等, 因而限制了心脏干/祖细胞的有效应用。如何能有效动员和促进心脏干/祖细胞增殖, 依赖于人们对心脏干/祖细胞增殖、分化、归巢的调控机制, 包括心脏干/祖细胞修复损伤心肌的分子机制的深入了解。本文将就近年来在心脏再生领域中, 心脏干/祖细胞的研究新进展进行综述。

关键词 细胞移植; 心脏干/祖细胞; 心脏再生

中图分类号 Q291

Cardiac Stem/progenitor Cells and Repair of Heart Injury

JIA Zhu-Qing, ZHOU Chun-Yan*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Health Science Center, Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Sciences, Ministry of Education of China, Beijing 100191, China)

Abstract Cell-based therapy is the promising regeneration treatment for cardiac diseases. A variety of cell types had been utilized in cardiac repair, including embryonic stem cells, embryonic or neonatal cardiomyocytes, skeletal myoblasts, and bone marrow mesenchymal or adipose tissue-derived stem cells besides the pluripotent stem cells. Yet disadvantages have been discovered in their application, such as low survival rate, short retention in heart, insufficient integration with host cells and immunologic rejection. Adult resident stem or progenitor cells in the heart have been attractive, nevertheless, the disadvantages of lacking markers of cardiac stem/progenitor cells, scarce of available sources and their limited ability of mobilization and proliferation hindered their potential uses. The better understanding of molecular mechanisms on the proliferation, differentiation and homing regulation of cardiac stem/progenitor cells during the repair of heart injury is critical to effectively mobilize and expand the heart stem/progenitor cells for applications. This review discusses the potentials of resident cardiac stem and progenitor cells in heart injury and introduces the achievements in heart regeneration in recent years.

Key words cell therapy; cardiac stem/progenitor cell; heart regeneration

收稿日期: 2011-08-05; 接受日期: 2011-09-15

国家自然科学基金(No. 81070112, No. 30871253) 教育部及国家外国专家局高等学校学科创新引智计划(No. B07001)

* 联系人 Tel: 010-82802417; E-mail: chunyanzhou@bjmu.edu.cn

Received: August 5, 2011; Accepted: September 15, 2011

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81070112, No. 30871253); the 111 Project of China (No. B07001)

* Corresponding author Tel: 010-82802417; E-mail: chunyanzhou@bjmu.edu.cn

心血管疾病已经成为世界上致死性疾病的首要因素. 心肌梗死及充血性心力衰竭是心血管疾病导致死亡的主要原因, 而心肌梗死又是引起充血性心力衰竭的重要原因. 心肌梗死后, 心脏心肌细胞数量发生不同程度的减少, 导致心肌收缩功能减退, 进而引起心脏泵功能下降.

对于心肌梗死和心功能衰竭的治疗, 除了传统的内科药物、介入及外科搭桥或者心脏移植等方法外, 细胞移植有可能成为一种更有希望的治疗手段. 多种类型的细胞已经用于动物心肌损伤的修复中, 包括胚胎干细胞、胚胎和新生动物的心肌细胞、骨骼肌成肌细胞、骨髓干细胞、脂肪来源的干细胞、心脏干细胞、以及可诱导的多能干细胞等^[1]. 对损伤心脏的细胞移植治疗也已经进入临床试验^[2]. 但是, 细胞移植目前仍存在许多问题, 包括移植后细胞在局部存留量不足、存活率低、细胞分化效率低、与宿主细胞不能整合、宿主免疫排斥等, 这些问题极大地限制了它们的应用. 心脏自身存在的干细胞与其他来源的干细胞相比, 不存在上述的弊端, 但因其细胞数量有限, 使得心脏自身的再生能力非常弱, 因此与机体其他组织相比, 这种再生能力不足以弥补损伤的心肌细胞数量和心脏功能. 因而目前关注的焦点是如何有效控制心脏存在的少量干细胞的命运, 如何最大限度地促进它们的再生能力进行有效的心脏损伤修复.

1 心脏干细胞/祖细胞的类型和细胞表面标志

心脏干细胞/心脏祖细胞 (cardiac stem/progenitor cells, CSC/CPCs) 在心肌中数量很少, 只占 1%; 目前报道心脏干/祖细胞有 6 个亚群^[1,3], 包括 SP 细胞 (side population cells)、c-KIT (tyrosine kinase receptor) 阳性祖细胞、SCA-1 (stem cell antigen-1) 阳性祖细胞、ISL-1 (islet 1) 阳性祖细胞、SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) 阳性祖细胞和心肌球来源的祖细胞 (cardiosphere derived progenitor cells, CS). 这些心脏干/祖细胞的划分取决于从不同角度描绘的 CPCs 的特征, 如细胞表面的标志, c-KIT 或者 SCA-1 表达; 能够将荧光染料通过 ABCG2 和 MDR1 转运蛋白泵出; 或者具有自我粘附可以形成细胞球的特性等. 从表面看, 不同细胞亚群间的表面标志和生物学特性没有重叠, 不过在亚群间仍有部分标志可以共享. 有研究^[4]表明, 心肌来源的 SP 细胞同时高表达 SCA-1、c-KIT, 中度表达 CD31, 不表达 CD45. SCA-1 阳性的心肌干/祖细胞

不具有 c-KIT, 而是表达心肌早期转录因子 GATA4 和 MEF2 等. 在 SCA-1 阳性的细胞群中有一类较特殊的亚亚群, 它们同时表达 c-KIT, 在催产素诱导下可以分化为心肌细胞. 在心肌球来源的祖细胞群体中, 位于细胞团核心部分的细胞表达 c-KIT, 位于周边的细胞表达 SCA-1、CD31 和 CD34. SSEA-1 阳性祖细胞同时表达 c-KIT、SCA-1、CD31 和 CD34, 它们被认为是存在于成体心脏中胚胎样原始的心肌干细胞, 可以转变为其他的心肌祖细胞亚群. 但是也有研究人员对这群细胞提出质疑, 认为人们分离的所谓心肌球源的干细胞其实是心脏的成纤维细胞^[5].

从上所述可以看出, 在心脏中存在的这 6 个祖细胞亚群其实都是混合的细胞群体, 现在并没有统一的特异的表面标志来明确心脏干/祖细胞, 因此可能在心脏中确实存在不同类型的祖细胞群, 也可能是由于不同实验室分离培养条件的不同, 使得心脏干细胞在体外环境中发生不同程度的定向性分化, 从而派生出多种多样的亚细胞群体.

2 不同心肌祖细胞群分化潜能及心脏损伤修复能力

对于在心脏中存在的多个细胞亚群的分化和再生能力, 以及对心脏损伤修复的能力, 各个实验室的研究结果不尽相同.

目前, 研究最多是 c-KIT 阳性的祖细胞亚群, Bearzi 等^[6]从人心肌组织中分离出 c-KIT 阳性细胞群, 在体外诱导主要分化为心肌细胞, 也可以分化成血管内皮细胞和血管平滑肌细胞. 将细胞局部注射进大面积心肌梗死的小鼠或大鼠的心脏后, 在体内可以检测到移植的细胞分化为心肌细胞、内皮细胞及平滑肌细胞, 动物心脏功能得到改善. Tang 等^[7]给陈旧性心肌梗死的大鼠通过冠脉注射经体外扩增的心脏干细胞/祖细胞 (CPCs) 后, 发现同样可以增加心肌梗死部位的心肌细胞数量, 减少纤维化, 提高心功能, 而且移植的 CPCs 可以募集内源性 CPCs 到损伤的心肌, 这种现象能持续 5 周. 但是也有实验室发现, 从胚胎鼠心肌中新鲜分离的 c-KIT 阳性的 CPCs 在体外与心肌细胞共培养后, 约 2.4% 细胞可以分化为心肌细胞; 而从成体心肌中分离得到 c-KIT 阳性的 CPCs 则不能分化, 如果将细胞移植到动物体内, 同样没有观察到分化现象^[8]. 究其原因可能是因为 c-KIT 不仅仅表达在心肌细胞, 在造血干细胞和肥大细胞及胸腺上皮细胞和端细胞中同样表达. 尤其是肥大细胞在心脏中广泛分布在血管周围,

有实验统计,从心肌中新鲜分离的 c-KIT 阳性的细胞 90% ~ 100% 为肥大细胞。但是令人回味的是,新分离的 c-KIT 阳性细胞经过体外培养之后,c-KIT 阳性同时 CD45 阴性的细胞比例由原来的 0.05% ± 0.02% 提高至 0.37% ± 0.07% (第一代),最后可以增加至 4.0% ± 0.6%,这些细胞未来可以向血管内皮细胞分化;而另一群 c-KIT 阳性 CD45 阳性细胞(大多同时表达 CD33,肥大细胞标志)则在培养以后,其比例从原来的 0.16% ± 0.09% 降低到 0.03% ± 0.01%^[9],人们推测有可能在体外培养过程中,具有增殖能力的 CPCs 细胞被逐渐筛选出来。

SCA-1 阳性的祖细胞群在 5-AZA 诱导下可以表达心肌特异的转录因子和收缩性蛋白,如肌钙蛋白、肌球蛋白和肌动蛋白,如果将细胞经静脉输入心肌梗死的小鼠,这些细胞可以归巢到梗死的心肌部位,并分化表达缝隙连接蛋白 43、肌钙蛋白 I、横纹肌 alpha-actin^[10],但是对心脏功能是否有改善还不清楚。

最近研究显示,在心脏中有两种类型的 ISL-1 阳性细胞,第一种同时表达神经纤维蛋白,在小鼠出生后 10 个月仍存在,可能参与心脏的神经节组成,第二种 ISL-1 阳性细胞具有明显的横纹肌结构,并且在小鼠出生后 4 个月时该细胞群消失^[11]。其他实验室研究证实,人胚胎期的 ISL-1 阳性的细胞在体外和体内都可以分化为心肌细胞、血管平滑肌细胞和血管内皮细胞 3 种类型细胞^[12,13]。

Chimenti 等^[14]应用人心肌球来源的祖细胞(cardiosphere derived progenitor cells,CS)注射给小鼠急性心肌梗死周边区后,发现局部心肌有再生现象,除此之外,这些祖细胞还可以通过分泌 VEGF、IGF1、HGF 因子促进局部血管新生,及促进 AKT 信号抑制细胞凋亡。同样,另一组研究者^[15]分离先天性心脏病病人的心房肌细胞获得心肌球样心脏祖细胞,经检测该群细胞同时高表达 c-KIT、NKX2.5。体外诱导可以向心脏 3 种类型细胞分化,分化效率约 1%,将细胞注射入心肌梗死大鼠的局部心肌,与注射心脏成纤维细胞组相比,左室射血分数和缩短分数较后者明显提高,检测移植的祖细胞可分化为心脏 3 种类型细胞,而移植的成纤维细胞则没有分化现象。

心脏 SP 细胞在诱导剂或者与心肌细胞共培养后可以表达心肌细胞特异的分子,如 NKX2.5、GATA4 和 MEF2C,以及心肌收缩蛋白 β 肌球蛋白重链和肌球蛋白轻链-2v。将 SP 细胞经静脉注入急

性心梗的大鼠后,SP 细胞可以归巢到心肌组织,在体内 SP 细胞主要分化成血管平滑肌细胞,少数分化成心肌细胞和血管内皮细胞^[16]。

Ott 等^[17]从新生大鼠和成年大鼠心脏中分离出未定向分化的 SSEA-1 和 OCT4 阳性的胚胎样心脏干/祖细胞,在体外与心肌细胞共培养后可以分化为 3 种类型的心脏细胞;大鼠心肌梗死后 2 周,梗死心肌局部注射 SSEA-1 和 OCT4 阳性的胚胎样心脏干/祖细胞,可以看到移植细胞表达肌球蛋白、缝隙连接蛋白 43 及 vWF,说明可以向心肌细胞和血管内皮细胞分化,移植细胞组心肌梗死面积缩小,心脏收缩功能提高。

3 心脏干细胞/祖细胞增殖和分化、归巢及损伤修复的分子机制

人心脏干细胞自我更新的速率与年龄相关。据文献报道,在 20 岁时,每年约 1% 心肌细胞得到更新,到 75 岁时每年只有 0.4% 心肌细胞能更新^[3]。人一生中大约 45% 心肌细胞被更新。然而这个过程过于缓慢,如果我们期望将心脏干细胞应用于临床的话,就必须认识这个过程,找到重新塑造这个过程的途径。心脏存在的少量干/祖细胞基本处于静止状态,使它们重新进入细胞循环进行增殖、分化、归巢的调控机制,包括心脏干/祖细胞修复损伤心肌的分子机制,目前都知之甚少。许多实验室在不同层次和方面对这些问题进行了探讨,如转录因子作用、信号通路作用及小 RNA 调节等等。Caprioli 等^[18]在小鼠胚胎干细胞中发现,NKX2.5 可以直接结合在 GATA1 基因的增强子上抑制该基因表达,从而抑制干细胞向造血细胞分化,促使 ES 细胞向心肌细胞分化,同时不影响 ES 向内皮细胞分化。Fischer 等^[19]将 Akt 转入小鼠心脏的干/祖细胞(CPC)后,将该细胞注入心肌梗死的小鼠心肌,可以观察到移植的细胞在体内的增殖,并募集自体的 c-KIT 阳性细胞到损伤的心肌组织。在体外培养转入 Akt 的 CPC 细胞可以分泌更多的细胞因子,如 FGF2、FSTL1、SDF1 和 VEGF 等,但是移植转入 Akt 的 CPC 细胞的小鼠心脏功能和结构与对照组相比没有改善,在体内也没有找到移植细胞分化的证据,因而作者认为,移植的细胞仅仅具备较强的增殖能力及招募能力还不够,这些细胞能够定向分化是心脏再生必须的条件。

Tang 等^[20]在大鼠心肌梗死后 1 周,在梗死心肌局部先注射 VEGF 然后在房室沟处移植 c-KIT 阳性

的心脏干/祖细胞,证明 VEGF 可以促进心脏干/祖细胞富集在心梗局部,这种迁移与激活 Akt 信号通路有关,同时 VEGF 促进心梗部位血管再生. Li 等^[21]发现,载脂蛋白 J 可以增加 CXCR4 表达,而 CXCR4 是 SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) 的受体. SDF-1 是目前已知的强有力的促使干细胞迁移归巢到损伤组织的细胞因子,在犬 CPC 中过表达载脂蛋白 J,体外实验证明转染的细胞在 SDF-1 诱导下更容易迁移,这种迁移作用与细胞内 PI3K-AKT 通路被激活有关. 但是载脂蛋白 J 对细胞的周期和增殖没有影响.

Wang 等^[22]研究发现,在心脏祖细胞分化过程中, BMP2 和 BMP4 能促进 miR-17-92 簇表达,后者作用于靶基因 ISL-1 和 TBX-11 从而促进祖细胞的分化. Hosoda 等^[23]研究发现, miR-499 对心脏干/祖细胞的分化及心肌再生也有影响. miR-499 通过下游靶基因 SOX6 和 ROD1 来促进心肌转录因子 NKX2.5 和 GATA4 表达,在急性心肌梗死的大鼠心肌注射过表达 miR-499 的心脏干/祖细胞后 14 d,局部心肌有细胞增殖现象,移植细胞具有明显肥大现象和横纹肌的条纹,左心室功能改善以移植过表达 miR-499 心肌干/祖细胞组为最好.

Kwon 等^[24]证实, Wnt/ β -catenin 可以促进心脏祖细胞增殖; Notch1 可以促进 β -catenin 磷酸化降解途径而促进下游 ISL-1, Myocd 和 Smyd1 表达,使心脏祖细胞分化为心肌细胞和平滑肌细胞,但是不能分化为血管内皮细胞.

4 结语

从现有的研究成果可以看出,我们对心脏干/祖细胞的认识还远远不能满足现实的需求,突出的矛盾依然是心脏自体存在的少量干细胞,在现有的手段下不能被充分动员,因而修复心肌损伤的能力有限;如果采用体外分离培养扩增后再移植的手段,那么自体心脏干/祖细胞移植不适用于心肌梗死急性期的治疗,异体心脏干/祖细胞移植则需要考虑免疫排斥问题;并且体外分离心脏干细胞群的细胞生物学或遗传性的标准也没有统一等等;但是,在这些问题上仅仅是犹豫和争论已不合时宜. 任重道远,我们依然要在促进心脏再生的道路上继续前寻,最终找到行之有效的办法.

参考文献 (References)

[1] Bollini S, Smart N, Riley P R. Resident cardiac progenitor

cells: at the heart of regeneration [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, **50**(2): 296-303

[2] Laflamme M A, Murry C E. Heart regeneration [J]. *Nature*, 2011, **473**(7347): 326-335

[3] Jezierska-Woźniak K, Mystkowska D, Tutas A, *et al.* Stem cells as therapy for cardiac disease—a review [J]. *Folia Histochem Cytobiol* 2011, **49**(1): 13-25

[4] Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, *et al.* Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(12): 11384-11391

[5] Andersen D C, Andersen P, Schneider M, *et al.* Murine “cardiospheres” are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential [J]. *Stem Cells*, **27**(7): 1571-1581

[6] Bearzi C, Rota M, Hosoda T, *et al.* Human cardiac stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**(35): 14068-14073

[7] Tang X L, Rokosh G, Sanganalmath S K, *et al.* Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction [J]. *Circulation*, 2010 **121**(2): 293-305

[8] Zaruba M M, Soonpaa M, Reuter S, *et al.* Cardiomyogenic potential of C-kit(+) -expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts [J]. *Circulation*, 2010 **121**(18): 1992-2000

[9] Sandstedt J, Jonsson M, Lindahl A, *et al.* C-kit + CD45-cells found in the adult human heart represent a population of endothelial progenitor cells [J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, **105**(4): 545-556

[10] Oh H, Bradfute S B, Gallardo T D, *et al.* Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(21): 12313-12318

[11] Khattar P, Friedrich F W, Bonne G, *et al.* Distinction between two populations of islet-1-positive cells in hearts of different murine strains [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, **20**(6): 1043-1052

[12] Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, *et al.* Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages [J]. *Nature*, 2009, **460**(7251): 113-117

[13] Laugwitz K L, Moretti A, Lam J, *et al.* Postnatal islet-1 + cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages [J]. *Nature*, 2005, **433**(7026): 647-653

[14] Chimenti I, Smith R R, Li T S, *et al.* Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice [J]. *Circ Res*, 2010, **106**(5): 971-980

[15] Mishra R, Vijayan K, Colletti E J, *et al.* Characterization and functionality of cardiac progenitor cells in congenital heart patients [J]. *Circulation*, 2011, **123**(4): 364-373

[16] Oyama T, Nagai T, Wada H, *et al.* Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Cell Biol* 2007, **176**(3): 329-341

[17] Ott H C, Matthiesen T S, Brechtken J, *et al.* The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007,

- 4(Suppl 1) : S27-39
- [18] Caprioli A , Koyano-Nakagawa N , Iacovino M , *et al.* Nkx2-5 represses Gata1 gene expression and modulates the cellular fate of cardiac progenitors during embryogenesis [J]. *Circulation* ,2011 , **123**(15) : 1633-1641
- [19] Fischer K M , Din S , Gude N , *et al.* Cardiac progenitor cell commitment is inhibited by nuclear Akt expression [J]. *Circ Res* ,2011 , **108**(8) : 960-970
- [20] Tang J , Wang J , Kong X , *et al.* Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway [J]. *Exp Cell Res* ,2009 , **315**(20) : 3521-3531
- [21] Li Y , Qu J , Shelat H , *et al.* Clusterin induces CXCR4 expression and migration of cardiac progenitor cells [J]. *Exp Cell Res* ,2010 , **316**(20) : 3435-3442
- [22] Wang J , Greene S B , Bonilla-Claudio M , *et al.* Bmp signaling regulates myocardial differentiation from cardiac progenitors through a MicroRNA-mediated mechanism [J]. *Dev Cell* ,2010 , **19**(6) : 903-912
- [23] Hosoda T , Zheng H , Cabral-da-Silva M , *et al.* Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism [J]. *Circulation* ,2011 , **123**(12) : 1287-1296
- [24] Kwon C , Qian L , Cheng P , *et al.* A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Isl1 determines cardiac progenitor cell fate [J]. *Nat Cell Biol* ,2009 , **11**(8) : 951-957