

心肌再生途径的研究进展

陈素华 李秋艳 李云龙

(1 山东师范大学生命科学学院 济南 250014; 2 莱阳农学院 青岛 266109)

摘要:心急梗塞等心脏疾病可造成心肌的损伤,相继会发生心室扩张、瘢痕、心脏功能紊乱。目前对心脏疾病的治疗主要通过药物和器官移植,因药物治标不治本和移植器官匮乏限制了治疗的效果,严重影响病人的身体健康。最近研究发现,相关细胞因子或基因、干细胞移植可使损伤区心肌细胞和血管再生及诱导内源性干细胞转移,从而修复损伤心肌并恢复心脏功能。以上研究成果及其临床的应用将成为损伤性心肌有效的治疗途径。本文着重阐明了相关细胞因子、基因和干细胞移植对心肌再生作用机制的研究现状。

关键词:基因治疗;细胞因子;心肌干细胞;心肌再生;干细胞移植

中图分类号:Q81 **文献标识码:**A

Progress of Studies on Myocardial Regeneration

CHEN Su-hua, LI Qiu-yan, LI Yun-long

(School of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong, China)

ABSTRACT: Heart diseases, such as myocardial infarction, result in myocardial trauma, following ventricular dilatation, scar formation and heart dysfunction, which are now treated by medication and transplant operation. However, both of them are limited. Researchers have recently discovered that relevant genes and cytokines inducement and stem cell transplant could result in cardiomyocytes and vessel regeneration, internal stem cell transfer and heart function resumption, which would become an effective therapy of myocardial infarction of heart disease. The paper has mainly expounded the researches on the effects of related cytokine, genes and stem cell transplant on myocardial regeneration.

Key words: Gene therapy; Cytokine; Cardiac stem cell; Myocardial regeneration; Stem cell transplant

1 前言

心肌梗塞(Myocardial Infarction, MI)等心脏疾病会导致心肌细胞数量减少,纤维瘢痕增生,相继会出现心肌结构重建、心肌弹性下降、脏壁扩张变薄、心功能降低和残存心肌失代偿等,甚至造成心衰竭,最终导致死亡或严重影响患者的生活质量^[1]。目前对心脏疾病的治疗分别通过药物、介入、外科手术等,但均存在缺陷,迫切需要探索新的治疗方法。心肌再生是指功能性心肌细胞的增殖和血管的再生等修复损伤的心肌并改善心功能。最近提出通过心肌再生的方法治疗心肌损伤性心脏疾病,主要包括细胞因子和基因的治疗,干细胞移植,本文综述了以上途径在心肌再生方面的研究进展。

2 细胞因子或基因的治疗

哺乳动物出生后的 6-7 周,心肌细胞停止增殖进入 G0 期,原因包括^[2]:细胞周期的正调控因子表达水平显著降低(如 c-myc、c-fos 和 cyclin 等)同时负调控因子显著升高(抗癌蛋白和 p16、p21、p27 等)和端粒酶活性降低。心肌损伤后其附近的心肌细胞不能重新进入细胞周期,修复损伤的心肌。在载体导入的基因或细胞因子的调控下,G0 期的心肌细胞可重新进入细胞周期完成心肌细胞的增殖,也可诱导成体干细胞转移和血

管的再生。生长因子 IGF-1 不但使 G0 细胞进入 S 期,完成心肌细胞的扩增,而且降低了心肌细胞的凋亡速度。人的 CDC5 (hCDC5)^[3] 是 pre-mRNA splicing complex 的组分,共表达 E1A/E1B 和 hCDC5 的重组腺病毒能使心肌细胞的 G2/M 转换,促进细胞增殖。ZouY 等^[4]发现 LIF 的 cDNA 显著提高 MI 中 LIF 蛋白的浓度,减弱心室重塑和心肌纤维化、抗心肌细胞的凋亡和诱导血管的生成和动员骨髓细胞(BMDC)归巢并分化为心肌细胞,使梗塞面积缩小 40%,改善心功能(左室舒张末压降低 70%)并降低死亡率达 68%。腺病毒载体导入的 SDF-1 α ^[5]与其受体 CXCR4 相互作用也可诱导 BMDC、内皮祖细胞和造血干细胞归巢,使梗塞区的 BMDC 的数量增加了两倍,并通过 VEGF/eNOS 途径诱导心血管的生成,间接促进心肌细胞增殖和干细胞的分化。

3 干细胞移植

根据干细胞的生物学特性,将某种来源的干细胞体外诱导分化为心肌细胞或直接移植到病变区提交分化为心肌细胞,修复损伤的心肌和改善心功能。成体心脏中存在着少量的心肌干细胞(Cardiac Stem Cell, CSC),维持着心脏细胞的动态平衡。胚胎干细胞(Embryonic Stem Cell, ESC),成体多能祖细胞(Multipotent Adult Progenitor Cell, MAPC)和多能成体干细胞(Adult Multipotent Stem Cell, aMSC)具有提交心肌谱系和终末分化的潜力^[6]。

3.1 CSC

CSC 是指存在于胚胎和成体心脏中提交心肌谱系的多能干细胞^[7]。CSC 表达数量依次递减的 c-kit, Sca-1 和 MDR1 三种

作者简介:陈素华,(1976-),女,硕士研究生,

主要研究方向:细胞生物学

通讯作者:李云龙,Email:liyulong@sdu.edu.cn

(收稿日期:2006-06-15 接受日期:2006-07-16)

抗原,不同 CSC 表面抗原的种类不同,65%的细胞表达三种抗原,20%的细胞表达两种表面抗原,15%的细胞只表达一种表面抗原,这为 CSC 的鉴定和应用造成了困难。最近提出 Isl1+ 细胞是真正的 CSC,在受损心肌的再生过程中发挥重要作用。Isl1 转录因子与心脏祖细胞共同作用于心脏形态的发生,缺失 Isl1 纯合子的右心室、心房等出现缺陷。GATA-4^[9]是心肌细胞转录因子 MEF2C 的转录活化子,Isl1 和 GATA-4 的表达启动了 CSC 的提交。

MI 后心肌细胞的数量减少,少量的 CSC 不能修复损伤的心肌。通过体外冠状循环或直接心肌注射的 CSC 穿过脉管壁进入梗塞的心脏间质中,提交心脏祖细胞系和分化为心血管。本实验室分离得到的小鼠 CSC 在对 MI 模型体外冠状循环治疗后,梗塞面积缩小 55%,改善心功能(左室舒张末压降低 78%),死亡率降低 60%。在生长因子作用下 CSC 可直接分化为心肌细胞,并与胚胎早期发育阶段的心肌细胞具有一致的结构和功能特征^[10]。它体积较小,呈圆形或杆状,多为单个细胞核,微丝束排列不规则或平行排列,呈现出肌微丝装配和闰盘形成的特征,并表达心肌特异基因 cTnl、心肌肌钙蛋白 T、心房肌球蛋白轻链 MLC-2A、心室肌球蛋白轻链(MLC-2V)和 α 肌球蛋白重链(α -MHC),也表达心肌转录因子 GATA4、Nkx2.5。CSC 的移植是干细胞移植的最好的选择,结合细胞因子(干细胞因子和粒细胞集落刺激因子等)可提高作用效果达 10%^[10]。

3.2 ESC

ESC 来自于胚胎的内细胞团,其具有无限增殖和分化成所有组织和器官细胞的潜能。体外培养的 ESC 诱导分化后聚集成自发性节律收缩的球状胚体,且表达心肌细胞特异的转录因子和蛋白质。单层培养的 ESC 可通过以下途径分化为心肌细胞:(1)与成熟的心肌细胞或内胚层细胞共培养;(2)使用 5- 氮杂胞苷、视黄酸和维生素 C 等刺激剂;(3)TGF- β 、FGF 和 IGF 等生长因子的诱导,但只有生长因子的诱导对心肌细胞发育是不充分的。几种信号途径与心肌细胞的分化有关,例如:Wnt 和 Notch 信号途径。Noggin 和 BMP-2 表达的时间和空间对心肌细胞体内外的分化也是非常重要的。

人们正寻求解决 ESC 移植中存在的问题。例如异源 ESC 的移植导致宿主免疫排斥、ESC 的分离和纯化、伦理方面的问题,未分化 ESC 具有致癌的能力等。Heng BC 等提出利用 ESC 移植作为再生组织和器官的催化剂,例如共导入 ESC 和自体干细胞到心肌损伤区,自体干细胞的作用避免了免疫排斥,ESC 的旁分泌诱导附近的心肌细胞和自体干细胞增殖来修复损伤的心肌。Robert Lanza 等^[11]利用干细胞核移植克隆的胚胎可获得 ESC,也可避免免疫排斥的发生。移植前将 ESC 分化成心肌细胞或灭活的方法避免未分化 ESC 的致癌作用。通过单性生殖或体细胞核移植的手段可以获得胚体,从中获得的 ESC 有望解决 hESC 所带来的伦理问题。

3.3 MAPC

MAPC 存在于许多组织和器官中。Jiang 等^[12]从人和啮齿类动物的骨髓中分离到 MAPC。最近研究发现,具有 MAPC 特征的细胞也可从脑和肌肉等组织中获得,这是否说明所有的器官都具备 MAPC 特征的干细胞或 MAPC 处于循环状态,还有待探索。MAPC 具有 ESC 相似的特征,体外培养可分化形成大

多数的脏壁中胚层、神经外胚层和内胚层细胞;移植给非照射的宿主后,可直接向造血系统、肝脏、心肌等分化。MAPC 体外扩增能力极强,体外扩增 80 代后仍可维持其细胞表型和多向分化潜能。在 mMI 中,通过冠状循环或直接注射 MAPC 到损伤心肌中,MAPC 通过提交心肌干细胞或直接分化为心肌细胞而减小了心肌损伤的面积和降低了心室重塑^[14]。

3.4 aMSC

aMSC 广泛存在于成体组织中,但主要分布在骨髓中。例如骨髓单核细胞群、骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cell,MMSC)、AC133 阳性细胞群和内皮祖细胞(EPC)可直接分化为心肌细胞。Kou-Gi Shyu 等将 mMSC 移植到 MI 后提交分化为心肌细胞和血管,梗塞面积缩小 50%,改善心功能(左室舒张末压降低 75%)。骨髓源祖细胞可直接分化成心肌细胞、内皮细胞或平滑肌细胞。成体干细胞与胚胎干细胞相比,成体干细胞容易从自体采集,避免了胚胎干细胞移植所面临的伦理纠纷,而且避免了免疫排斥反应,适合于临床应用。因而成体干细胞成为近几年干细胞移植领域的主要研究对象。但并非所有的成体干细胞都可分化成心肌细胞,Deten A 等^[13]研究了表达造血系统标志 CD45 和髓样标志 Gr-1 的 c-kit-enriched、Lin-c-kit+ 和 c-kit+ Thy1.1lo Lin- Sca-1+ 骨髓细胞再生心肌的潜能,结果发现它们并未通过分化或细胞融合的方式修复心肌,心肌细胞的数量上没有明显增加,所以以上细胞没有分化为心肌细胞的潜能。因此对不同成体干细胞的横向分化的潜能及分化后细胞的结构和功能还需要进一步研究。

4 心肌再生的机制

不管采取何种心肌再生的手段,目的都是为了增加功能性心肌细胞的数量,改善心功能。成功的心肌再生要求新生的细胞能够对附近细胞的生理和病理刺激做出正确应答。日前认为改善心功能的可能机制有(1)新生细胞具有肌纤维的收缩性,增加了心肌的弹性,并与宿主心肌细胞形成偶联,参与心脏的同步收缩。(2)新生细胞维持了受损心肌的完整性。(3)新生细胞分泌多种细胞因子、血管生长因子,促进细胞增殖和血管再生(4)血管再生利于侧枝循环建立和新生细胞的生存,限制了损伤区的扩大。

5 问题与展望

目前心肌再生的研究结果主要来自动物试验。对心脏疾病的临床治疗,还存许多问题:(1)安全和有效的转移载体和方法、导入基因的安全性和稳定高效表达;(2)移植细胞的选择、分离和纯化理想的移植细胞应能在体内或体外分化为成熟的心肌细胞,能在损伤处长期存活并与宿主细胞建立电偶联,形成同步收缩,恢复心功能。日前发现全、多能干细胞可以在体内微环境或体外处理下分化为心肌细胞并与宿主细胞之间形成闰盘;(3)免疫排斥 现发现比较持久和可靠的方法是自体移植、体细胞核移植、消除或掩盖移植细胞表面的 HLA 抗原的方法,免疫抑制剂不能持久解决异体移植的排斥作用;(4)移植细胞分化的机制;(5)移植细胞与宿主细胞的作用机制;(6)干细胞移植途径和移植时期 选择合适移植时期利于移植细胞的存活和最大程度减少和消除瘢痕是临床应用迫切需要解决的问题。

心肌再生途径的研究尚处于初期阶段,仍有很多问题有待解决,但作为心肌损伤性心脏疾病的一种的新治疗方法,其在理论或实验中均具有传统治疗方法不可比拟的优势。随着心肌再生途径和机制的不断探索,心肌再生将会成为治疗心肌损伤性心脏疾病的有效方法。

参考文献

- [1] Weisa SM, Zimmermann SD, Shaha M, et al. A role for decorin in the remodeling of myocardial infarction [J]. Matrix Biol, 2005, 24 (4): 312-324
- [2] McMullen NM, Gaspard GJ, Pasumarthi KBS. Reactivation of cardiomyocyte cell cycle: a potential approach for myocardial regeneration[J]. Signal Transduction, 2005, 5(3): 126-141
- [3] Williams SD, Zhu H, Zhang L, et al. Adenoviral delivery of human CDC5 promotes G2/M progression and cell division in neonatal ventricular cardiomyocytes[J]. Gene Ther, 2006, 13(10): 837-843
- [4] Zou Y, Takano H, Mizukami M, et al. Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction[J]. Circulation, 2003, 108(6): 748-753
- [5] Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, et al. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 α enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization[J]. Circulation, 2004, 109(20): 2454-2461
- [6] Smits AM, van Vliet P, Hassink RJ, et al. The role of stem cells in cardiac regeneration [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 25-36
- [7] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration [J]. Cell, 2003, 114, 763-776
- [8] Sepulveda JL, Vlahopoulos S, Lyer D, et al. Combinatorial expression of GATA4, Nkx2.5 and serum response factor directs early cardiac gene activity[J]. J Biol Chem, 2002, 277(28): 25775-25782
- [9] Messina E, Angelis LD, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cell from human and murine heart [J]. Circ Res, 2002, 95: 911-921
- [10] Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart [J]. FASEB, 2002, 16: 1558-1566
- [11] Lanza R, Moore MAS, Wokayama T, et al. Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation [J]. Circ Res, 2004, 94: 820-827
- [12] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotent of mesenchymal stem cell derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49
- [13] Deten A, Volz HC, Clamors S, et al. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(1): 52-63
- [14] Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update [J]. Novartis found symp, 2005, 265: 55-61 discussion 61-65, 92-97
- [37] 潘扬, 王天山. 植物山茱萸化学成分研究概况[J]. 南京中医药大学学报, 1998, 14(1): 61-62
- [38] 王天山, 潘扬, 殷飞, 等. 马钱素与辛弗林对家兔重症失血性休克模型的作用[J]. 南京中医药大学学报, 1999, 15(6): 345-346
- [39] 尚遂存, 刘亚克, 萧学风, 等. 山茱萸果核抗氧化作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 1990, 2(4): 217-225
- [40] 呼世斌, 冯贵颖, 曹社会. 山茱萸的营养成分及保健作用[J]. 西北农业大学学报, 1996, 24(6): 108-110
- [41] 刘德军, 路涛. 山茱萸 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 1-12, 35-51
- [42] 刘宝林, 朱丹妮, 禹志领, 等. 山茱萸醇提物对实验动物血糖、血脂和血小板聚集的影响[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(1): 19-21
- [43] 藏连碧, 郑怡建. 山茱萸抗衰老实验研究[J]. 浙江中医学院学报, 1993, 17(5): 34
- [44] Hatano T, Yasyhara T, Okuda T. Tannins of cornaceous plants II. Cornusins D.E and F, new dimeric and trimeric hydrolysable tannins from Cornus officinalis [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37 (10): 2655
- [45] 王竹天, 杨大进. 保健食品功效成分测定方法现状及发展趋势[J]. 行业资讯, 2004, (2): 12
- [46] 张江涛, 刘沛乐. 山茱萸总有机酸含量的变化及测定[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(4): 25-27
- [47] 莫志江. 中药材干燥方法概述 [J]. 中国中药杂志, 2000, 14 (5): 42-43
- [48] 祝美云, 黄忠民, 杨天保, 等. 山茱萸保健饮料的研制[J]. 郑州轻工业学院学报, 1998, 13(2): 66-70
- [49] 尚遂存. 山茱萸果核药用价值研究简报 [J]. 中药通报, 1987, 12 (11): 38
- [50] 顾观光. 神农本草经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1955: 68
- [51] 王文祥, 顾振纶. 比色法测定山楂总三萜酸的含量[J]. 中国野生植物资源, 2003, 20(5): 47-48
- [52] 张锡纯. 医学衷中参西录(中册)[M]. 河北: 河北科学技术出版社, 1985: 36
- [53] 闫雅岚. 不同酵母对山茱萸发酵酒质量影响研究初探 [J]. 陕西食品工业, 1999, 4
- [54] 徐怀德, 沈冠清, 刘兴华, 等. 澄清山茱萸汁制作技术研究. 食品工业[J]. 1994, (5): 40-41
- [55] 祝美云, 艾志录, 孔黎黎, 等. 山茱萸饮料的加工工艺研究[J]. 中国畜产与食品, 1997, 4(5): 208-210
- [56] 张德权, 陈锦屏. 澄清方法对山茱萸肉澄清汁品质影响[J]. 食品科学, 1999, 20(3): 28-31
- [57] 应剑锋. 山茱萸的营养价值功能及其保健食品的开发与利用[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(6): 116-119
- [58] 张永斌. 山茱萸保健食品的开发与利用 [J]. 农牧产品开发, 2001, (1): 25-26
- [59] 呼世斌. 山茱萸的营养成分及保健作用 [J]. 西北农业大学学报, 1996, 24 (6): 108
- [60] 张云峰, 张蕊芳. 试论大力发展特色经济林 - 山茱萸产业[J]. 科技情报开发与经济, 2002, 12(6): 53-54
- [61] 李天培. 山茱萸[J]. 大自然, 1991, (4): 35
- [62] 鹿振凌, 朱清晓. 山茱萸产业开发现状与思考[J]. 南阳师范学院学报(自然科学版), 2003, 2(9): 55-56, 68
- [63] 彭勃, 李玉荣. 山茱萸果核与果肉化学成份的对比分析[J]. 河南中医药学刊, 1999, 14(2): 13-14
- [64] 祝之友. 山茱萸最好合核入药. 中国中医药报, 2006, 3: 1
- [65] 张振凌, 赵建颖, 李娟, 等. 山茱萸去核的作用和方法研究[J]. 中药材, 2006, 29(1): 60-63