

心肌再生——从实质到间质

陈俊喆 赵 强

【摘要】 既往观点认为,心脏属于终末分化器官,无法再生。心肌受到损伤,往往通过疤痕愈合,这一愈合方式的最大优点是快速,并且能阻止相邻组织的进一步受损,但代价是失去结构和功能上的完整性。近十几年来,人们对心肌间质取得了更深的认识,随着“重编程”非心肌细胞使其成为心肌细胞,以及 Telocytes 的发现,均提示心肌间质对心肌再生的重要作用。

【关键词】 心肌再生;心肌间质;重编程;Telocytes

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.05.007

心肌梗死发生后,正常心肌组织被疤痕组织所替代,心脏功能受到损害。如何恢复正常的心肌数量及心脏功能,即心肌再生,始终是这一领域研究的热点。

近多年来,人类心肌细胞被发现也存在自我更新,为诱导自体心肌再生提供了有力的理论支持;“重编程”成纤维细胞使其成为心肌细胞也为心肌再生治疗提供了新的选择方向;间质内 Telocytes (TCs)网络的发现使人们重新认识心脏间质的结构和功能。

1 细胞外基质在心肌再生中的作用

心脏间质主要由间质细胞及细胞外基质(ECM)构成。其中主要为成纤维细胞,是各类蛋白的重要来源,同时也为心肌细胞提供附着的场所。ECM的3项主要功能:对心肌组织提供机械支持;细胞间信号传导功能;调节心肌细胞的增殖、黏附和迁移。

研究发现,ECM还参与细胞功能的调控。Hynes等^[1]发现,ECM可直接或释放生长因子调节细胞的功能。已发现,ECM中存在大量的细胞因子与生长因子,诸如层黏连蛋白、纤连蛋白、血小板反应蛋白、骨膜蛋白、骨调素、成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子等,均参与细胞生长调控。当急性心肌梗死时,心肌间质能够促使血小板、中性粒细胞及单核细胞的聚集,并且引起一系列细胞因子、趋化因子及生长因子的释放^[2],刺激成纤维细胞发生表型转换,向肌成纤维细胞分化,最终形成疤痕组织。ECM通过改变心肌组织的力学特性,也能

影响细胞的功能^[3]。在心肌重构时,I型胶原本身可降解为小的多肽片段,调节血管生成、炎症反应及成纤维反应^[4]。ECM还通过黏着斑与心肌细胞互相连接,黏着斑与细胞骨架的肌动蛋白偶联,感受心肌组织的弹力系数,通过Rho蛋白A/Rho蛋白激酶(RhoA/ROCK)信号通路^[5]、非心肌肌球蛋白^[6]、压力敏感的离子通道等信号传导方式,调控心肌增殖。

如何调控心肌间质的超微结构、力学强度和信号因子表达,营造有利于心肌修复的环境或是为组织工程心肌提供最适合种子细胞生长的支架,将是今后研究的重点。

2 心肌的再生能力

一些研究通过计算推断出重量在50~350 g左右的心脏,其心肌细胞细胞核数量稳定在20亿左右,当重量达到700~900 g时,细胞核数量呈现出线性增长,可达到40亿,这一结论提示心肌细胞存在增殖能力,而非不可再生。

在高等哺乳动物的心肌再生能力研究中,采用基因追踪技术,发现成年白鼠的心肌中存在能够再生的干细胞或前体细胞,但再生程度相当微弱,无法恢复心肌梗死引起的大量心肌丢失。

在人体研究中,有两个重要的试验:Bergmann等^[7]通过C14年代测定法证实人的心肌存在自我更新。这种更新是年龄依赖的,20岁时心肌更新速率在每年1%左右,75岁时每年仅有0.4%,通常人的一生有45%的心肌将被更新。Kajstura等^[8]对接受碘脱氧尿苷(IdU)化疗的肿瘤患者尸体心脏进行检验,以了解心脏DNA的合成情况。IdU会参与DNA的复制过程,进入新生DNA链中。用免疫

组化方法检测心肌中的 IdU, 发现有极高的表达率, 可以达到 2.5%~46%。计算后得出每年心肌的更新率在 22%。尽管该结果与 Bergmann 等^[7]的结果相差了几十倍, 但这两个结果都指向同一个事实, 人类心脏确实存在自我更新能力。

3 成纤维细胞的重编程

Murry 等^[9]首次研究将小鼠心肌冷冻损伤 1 周后, 向受损区域局部注射腺病毒, 把成肌分化抗原(Myod)导入肉芽组织内的成纤维细胞中, 希望通过诱导成纤维细胞向骨骼肌分化来替代疤痕形成。观察提示, 高剂量病毒组的心肌损伤区域内有肌调节因子和胚胎骨骼肌肌球蛋白重链表达。

诱导多能干细胞(iPSCs)促进了对诱导心脏成纤维细胞向心肌分化的研究^[10]。Ieda 等^[11]对小鼠的 14 个心脏转录因子进行系统扫描, 发现 MEF2C, GATA4 和 TBX5 这 3 个转录因子可以激活大约 20% 的成纤维细胞向心肌细胞分化, 其中 4% 表达肌钙蛋白 T(cTnT)等心肌细胞标志, 大约 1% 的细胞出现自发搏动, 整个过程只需 3 d 左右。而重编程 iPSCs 通常需要 10~20 d, 且转换效率非常低(<0.1%)。Efe 等^[12]在研究中促使 OCT4、SOX2、KLF4 和 c-MYC 过表达, 诱导小鼠胚胎成纤维细胞直接向心肌分化。为减少成纤维细胞向多能干细胞分化, 使用小分子 Janus 激酶(JAK)抑制剂 JI1 阻断了 Janus 激酶-信号转导子和转录激活子(JAK-STAT)信号通路, 同时追加骨形成蛋白 4 进一步加强成心肌作用。这一重编程策略取得非常好的效果, 通过 18 d 的诱导, 大约 40% 的细胞表达 cTnT, 其中 80% 出现自发电活动。值得注意的是, Efe 等使用小鼠胚胎成纤维细胞, 而 Ieda 等则使用了出生后的小鼠作为实验对象, 这可能是两个实验细胞转换率间差异的原因。Song 等^[13]以 GATA4、HAND2、MEF2C、MESP1、NKX2-5 和 TBX5 等 6 种转录因子, 经过各种相互组合, 诱导小鼠心脏成纤维细胞分化为心肌样细胞, 且发现, GATA4、HAND2、MEF2C 和 TBX5 4 种转录因子的组合方式(以 GHMT 缩写)诱导成纤维细胞分化的效率最高, 大约 15% 的心脏成纤维细胞表达 α 肌球蛋白重链, 其中 30% 转化为心肌样细胞, 有更高的心脏成纤维细胞转化率。成纤维细胞的重编程意味着摆脱对于“种子细胞”依赖的可能性, 为心肌再生治疗提供了新的空间。

然而, 在临床应用之前仍然存在几个问题:(1)

该技术出现时间较短, 这些诱导形成的心肌细胞到底能在多大程度上维持正常形态及功能仍是一个未知数;(2)诱导效率不高, 且仍然没有摆脱转基因的技术手段, 使用于临床治疗存在一定风险。为了更好地研究诱导形成的心肌细胞特性, 借助寿命更长、与人类心率更为相近的大动物作为实验对象是重编程方法走向临床之前的重要一步。

4 Telocytes 的发现及其作用

Popescu 等^[14]在人体发现一种新的细胞类型, 因其与胃肠道 Cajal 细胞相似, 而被命名为 Cajal 细胞样间质细胞, 但两者在超微结构, 细胞间连接方式、免疫表型方面完全不同, 因而重新被定名为 Telocytes(TCs)。

TCs 主要依据其超微结构定义, 即拥有名为 Telopode(Tp)的细丝状突起。平均每个 TCs 有 1~3 个 Tp, 其长度可达到几十甚至上百微米, Tp 呈串珠样外观, 较细的部分称为 Podomer, 串珠状膨大结构称为 Podom, 内含线粒体、粗面内质网及细胞小窝(又称为钙离子摄取/释放单位)。

通过透射电镜观察, Tp 延伸范围很广, 使得 TCs 不仅形成大量的同种细胞间相互连接, 构成复杂的立体网络, 还与心肌细胞、心肌祖细胞、成纤维细胞、肥大细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、血管周细胞、神经鞘细胞等各类细胞存在广泛的连接, 而很多连接方式不属于 4 种细胞间连接(缝隙连接、紧密连接、黏着连接和桥粒)中的任何一种。

TCs 网络的发现提示人类心脏细胞间连接的复杂程度远超想象, 其在结构和功能上的特殊性非常适合远距离信号传输, 这对于心肌的自我更新起到重要的作用。Barile 等^[15]指出, 细胞外间质是细胞再生真正开始的地方, 但是对于它们如何协同实质细胞工作所知甚少。Ausoni 等^[16]提出“心血管单元”概念, 重建心肌组织应当包括心肌细胞、与之相邻的毛细血管和成纤维细胞等细胞成分, 各种细胞成分作为一个整体协同工作。Zhou 等^[17]采用新生小鼠原代心肌构建三维组织工程心肌, 通过免疫组化染色及电镜观察, 发现组织工程心肌中存在 TCs, 通过 Tp 与心肌细胞产生大量连接。Popescu 和 Gherghiceanu 等^[18, 19]发现, TCs 对心外膜心肌祖细胞的成熟具有“护理作用”, 它能提供一条超长 Tp, 供心肌祖细胞沿其从心外膜“滑动”到心肌中, 并在此过程中发育成熟。Manole 等^[20]在小鼠心肌梗死模型上发现, 梗死区周围的 TCs 会与毛细血管

内皮产生很多纳米尺度的直接接触,并且通过旁分泌作用如血管内皮生长因子、一氧化氮合酶 2 促进新生毛细血管形成。此外,TCs 表达诸多促毛细血管生成的 miRNA,如 let-7e、10a、21、27b、100、126-3p、130a、143、155、503 等。还发现 TCs 能够分泌小囊泡,或是释放胞吐小体,而 miRNA 便是其中蕴含的信息载体之一^[21]。在急性心肌梗死区域存在 TCs 的缺失,而全心的 TCs 密度却相应上升,更是有 TCs 自发移植到梗死区和梗死边缘区,限制梗死范围的进一步扩大,并且维持心脏功能^[21]。

5 结语

TCs 的发现及其结构功能的研究,加深了人们对心肌间质成分的认识。在未被发现前,这一细胞被归入成纤维细胞的行列,目前既已证实其为独特的一类细胞,那么势必需要我们重新审视既往对于心脏间质的研究成果,各类细胞因子或生长因子是真的来源于成纤维细胞还是 TCs。此外,虽然 TCs 其通过 Tp 构建广泛的连接网络,并且与其他心脏细胞成分产生连接,但 TCs 所传递的信号及其传递方式仍不明朗,TCs 在信号传递过程中是担任发起者还是传递者的角色也尚不可知。TCs 是否存在分化潜能,能否成为心脏疾病的新治疗靶点,能否成为构建组织工程心肌的有力工具,将是今后的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils [J]. Science, 2009, 326(5957): 1216-1219.
- [2] Jourdan-Lesaux C, Zhang J, Lindsey ML. Extracellular matrix roles during cardiac repair [J]. Life Sci, 2010, 87 (13-14): 391-400.
- [3] Tulloch NL, Muskheli V, Razumova MV, et al. Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture[J]. Circ Res, 2011, 109(1): 47-59.
- [4] Davis GE. Matricryptic sites control tissue injury responses in the cardiovascular system: relationships to pattern recognition receptor regulated events[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(3): 454-460.
- [5] Jacot JG, McCulloch AD, Omens JH. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes[J]. Biophys J, 2008, 95(7): 3479-3487.
- [6] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. Cell, 2006, 126(4): 677-689.
- [7] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans[J]. Science, 2009, 324 (5923): 98-102.
- [8] Kajstura J, Urbanek K, Perl S, et al. Cardiomyogenesis in the adult human heart [J]. Circ Res, 2010, 107 (2): 305-315.
- [9] Murry CE, Kay MA, Bartosek T, et al. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD [J]. J Clin Invest, 1996, 98(10): 2209-2217.
- [10] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 861-872.
- [11] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors [J]. Cell, 2010, 142(3): 375-386.
- [12] Efe JA, Hilcove S, Kim J, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3): 215-222.
- [13] Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors[J]. Nature, 2012, 485(7400): 599-604.
- [14] Popescu LM, Faussone-Pellegrini MS. TELOCYTES—a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(4): 729-740.
- [15] Barile L, Lionetti V. Prometheus's heart: what lies beneath [J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(2): 228-236.
- [16] Ausoni S, Sartore S. The cardiovascular unit as a dynamic player in disease and regeneration [J]. Trends Mol Med, 2009, 15(12): 543-552.
- [17] Zhou J, Zhang Y, Wen X, et al. Telocytes accompanying cardiomyocyte in primary culture: two- and three-dimensional culture environment [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(11): 2641-2645.
- [18] Popescu LM, Gherghiceanu M, Manole CG, et al. Cardiac renewing: interstitial Cajal-like cells nurse cardiomyocyte progenitors in epicardial stem cell niches [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(5): 866-886.
- [19] Gherghiceanu M, Popescu LM. Cardiomyocyte precursors and telocytes in epicardial stem cell niche: electron microscope images [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(4): 871-817.
- [20] Manole CG, Cismasiu V, Gherghiceanu M, et al. Experimental acute myocardial infarction: telocytes involvement in neo-angiogenesis [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15 (11): 2284-2296.
- [21] Lee TH, D' Asti E, Magnus N, et al. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer—the emerging science of cellular ‘debris’ [J]. Semin Immunopathol, 2011, 33(5): 455-467.

(收稿:2013-04-08 修回:2013-05-20)

(本文编辑:金谷英)