

心外膜在心肌梗死后心肌修复中作用的研究进展

孙洋¹, 张岩^{2*}

(中国医学科学院北京协和医学院阜外医院国家心血管病中心 1. 病理科; 2. 心外科, 北京 100037)

摘要:心外膜具有高度再生能力和多向分化潜能,能分泌多种信号分子,为心肌再生和组织重塑提供细胞基础和调节信号,是心肌再生领域的研究热点。本文主要阐述激活成人心外膜、调控心外膜分化和制作心外膜生物工程补片。以期基于心外膜的治疗早日应用于临床。

关键词:心外膜;心脏;修复;再生

中图分类号:R364 文献标志码:A

Progress of the role of epicardium in myocardial repair after myocardial infarction

SUN Yang¹, ZHANG Yan^{2*}

(1. Department of Pathology; 2. Department of Cardiac Surgery, National Center for Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, CAMS & PUMC, Beijing 100037, China)

Abstract: The epicardium characterized by high regeneration ability and multidirectional differentiation potential, which can secrete a variety of signal molecules, and play a central role during myocardial infarction repair. Current research approaches aims to activate the adult epicardium, to regulate epicardial differentiation, and to make bio-engineered epicardial patch to promote heart regeneration. In this Review, we describe recent advances in the biology of the epicardium and attempts using the epicardium as therapeutic targets for heart repair and regeneration.

Key words: epicardium; heart; repairment; regeneration

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是致死率极高的常见病和多发病,严重威胁人们的生命及健康。心肌梗死后如何促进心肌再生为目前亟待解决的医学难题。心外膜是紧贴在心肌外面的一层疏松结缔组织,为一群具有异质性的细胞群,具有多向分化的潜能,不仅能够增殖、分化为多种间质细胞,还能够提供许多调节心肌组织修复的信号分子,因此近十年来,心外膜细胞已成为心肌再生领域的研究热点^[1]。随着对心外膜生物学特性认识的深入,越来越多的研究者尝试利用心外膜促进心脏修复。低

等脊椎动物心肌细胞具有较强的再生能力,如斑马鱼的心脏被部分切除或损伤后1~2 d,心外膜即可被广泛激活,表达胚胎期标记(如fn1a、raldh2、tbx18和wt1),促进心肌完全愈合。幼年哺乳动物的心肌细胞也具有再生能力,如切除新生小鼠心尖部组织后,创伤能够快速激活心外膜,促进心肌细胞增生、修复,恢复心室腔的体积^[2]。在成年小鼠中,已有研究发现心脏损伤同样能够激活心外膜,引起胚胎期标志物的重新表达,但心外膜在心肌修复中的作用,不同的研究者持不同观点。现就心外膜的特点,

收稿日期:2019-04-08 修回日期:2019-10-12

基金项目:北京市自然科学基金(7162161)

*通信作者(corresponding author):waikeshangyan@126.com

及其在心脏修复中的作用进行综述,并探讨如何利用心外膜的特性提高心脏修复能力。

1 心外膜细胞的起源、分化和再生

胚胎期心外膜细胞来源于一个叫做心外膜器官(proepicardial organ, PEO)的瞬时胚胎细胞簇。在受精后 60~72 h PEO 移位并贴附于心肌表面,在心室、心房和流出道(或球状动脉)表面扩展,相互融合形成心外膜。随着发育的进展,一部分心外膜细胞经历上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),并迁移到心外膜下空间内,分化产生各种类型的细胞,被统称为心外膜来源细胞(epicardium-derived cells, EPDCs)^[3]。使用单细胞转录组技术证明心外膜细胞是一群具有异质性的细胞亚群,每个亚群均有特定的表达特征以及特异的标记基因^[4]。

心外膜细胞具有多向分化潜能,能够分化为成纤维细胞^[5]、血管平滑肌细胞、周细胞和脂肪细胞,但是目前尚无充分的证据证明心外膜能够分化为血管内皮细胞或心肌细胞。使用谱系追踪技术研究小鼠心脏发育发现,心外膜细胞是成纤维细胞的主要来源^[6]。心脏损伤后,心外膜来源的成纤维细胞广泛增殖并参与瘢痕组织形成;心外膜细胞亦能够分化为梗死区内的血管平滑肌细胞和周细胞^[7],并协助冠脉系统重建;心外膜还能够分化为脂肪细胞,替代萎缩消失的心肌细胞。

心外膜有很强的再生能力。成年心脏损伤后,残余的心外膜细胞会发生增殖并向损伤部位迁移。使用基因烧蚀系统(tcf21: Nitroreductase, tcf21: NTR)将成年斑马鱼中 90%的心外膜细胞烧蚀,心外膜依然能快速再生^[8]。对斑马鱼心外膜再生过程进行高分辨率实时成像观察,发现在再生组织的前端出现了一个多倍体心外膜细胞亚群。这些多倍体细胞是在机械张力作用下,通过非细胞分裂的基因组复制而形成。

2 心外膜的信号功能

成年心脏发生 MI 后,能够激活心外膜,使其增殖、扩散、发生 EMT 以及迁移入心肌层。心外膜被激活后,还能够分泌很多影响心肌再生的信号分子^[9]。心外膜来源的细胞外基质成分(extracellular matrix, ECM)和生长因子在维持心脏组织结构和电

生理功能方面起重要作用。此外,激活的心外膜可增强炎症反应,减少调节性 T 细胞(Treg)数量、激活巨噬细胞并调节中性粒细胞浸润^[10]。

2.1 心外膜表达的重要信号分子

2.1.1 转化生长因子- β :转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)在心血管发育和疾病中发挥多重作用,斑马鱼心肌损伤后,心外膜细胞、纤维母细胞和心肌细胞均广泛表达 TGF β 1、TGF β 2、和 TGF β 3。药物阻断斑马鱼的 TGF β 信号通路能够抑制 ECM 沉积和心肌细胞增殖。

2.1.2 血小板源生长因子:血小板源生长因子(platelet-derived growth factors, PDGF)信号在体外能够诱导斑马鱼心外膜细胞增殖,在体内能够抑制心脏再生过程中冠状动脉血管形成。在斑马鱼切除损伤模型中,在伤口纤维蛋白凝块中表达 PDGF- β ,而在伤口部位的心外膜中表达血小板源性生长因子受体- β (PDGFR- β)。小鼠 MI 后,梗死区表达 PDGF- β 、PDGFR- β 和 PDGFR- α ,梗塞区血管周细胞中表达磷酸化活化的 PDGFR- β 。抗体阻断 PDGFR- α 和 PDGFR- β ,能够减少胶原蛋白沉积,造成 MI 区的修复能力受损。

2.1.3 胰岛素样生长因子:斑马鱼中,损伤后 7 d 内,成熟的心内膜和心外膜细胞中表达 IGF2b 配体,心肌细胞中表达 IGF1 受体。使用 IGF 信号激动剂 NBI-31772,可以促进心肌细胞增殖;而抑制 IGF 信号能够降低心肌细胞的增殖和受损的心脏再生。

2.1.4 趋化因子:斑马鱼心肌切除损伤模型中,心外膜组织中表达 CXC-趋化因子配体 12a(CXCL12a),心肌中表达 CXC-趋化因子受体 4b(CXCR4b)。阻断 CXCR4 后破坏了心脏的再生能力,原因可能为心肌细胞迁移受阻。另外,心肌 CXCL12b 信号和内皮 CXCR4a 信号在斑马鱼冠状动脉血管发育中起着重要作用,CXCR4a 突变者心脏再生缺陷。

2.1.5 WNT- β -catenin 信号通路:Wnt1 在胎儿心外膜中表达,正常成年心外膜不表达^[11]。MI 后,损伤区的心外膜和心肌成纤维细胞中能够诱导性表达 Wnt1。若在心外膜细胞中敲除其下游 β -catenin 将导致心外膜 EMT 的能力下降;在心脏成纤维细胞中敲除 β -catenin 导致急性心脏扩张,心脏功能紊乱。

2.1.6 Hedgehog:Hedgehog 参与多个器官、组织的发育过程,与心脏再生相关。斑马鱼局部心室切除

后 7 d, 损伤部位心外膜中 Hedgehog 配体激活, Hedgehog 的靶基因 PTCH 2 在再生区的心肌细胞内表达, 促进再生过程中心肌细胞的增殖。Hedgehog 还可调节心外膜细胞再生。在哺乳动物心脏发育和体内稳态过程中, Hedgehog 信号可能是缺血性心脏病的一个潜在治疗靶点。

2.1.7 Hippo-YAP 信号通路: Hippo-YAP 信号通路能够调节哺乳动物的心肌细胞增殖, 即使是在成年期 YAP1 的表达及其结合靶基因的能力也会对心肌细胞的增殖产生显著影响^[12]。在小鼠心脏发育过程中, Hippo-YAP 信号通路中的许多信号分子 (YAP、Taz、Tead1-Tead3、Lats1、Lats2) 在心外膜中表达, 心外膜中 YAP1、Taz 是冠状动脉血管发育所必需的。敲减胚胎期小鼠心外膜中 Lats1 和 Lats2, 能够减少心外膜-成纤维细胞分化。在小鼠心外膜中敲除 Yap 和 Taz 可引起深部心包炎、心肌纤维化、心肌病和 MI。

其他心外膜表达的信号分子, 如胸腺素 β 4、小窝蛋白 caveolin 1、神经调节因子 1 (neuregulin 1, Nrg1)、成纤维细胞生长因子、骨形成蛋白 (BMP)、视网膜醛脱氢酶 2 (Raldh2) 以及 Notch 等也参与心脏修复。他们功能多样, 在心脏修复中, 相同的信号分子在小鼠和斑马鱼之间的作用存在差异。如心肌损伤后, 在斑马鱼中抑制 BMP 信号, 心肌细胞增殖减少, 而在小鼠中抑制 BMP 信号, 心肌细胞凋亡减少。这些信号分子在人类心脏如何作用还有待研究。

2.2 心外膜在 ECM 形成中的作用

ECM 为其周围细胞提供化学信号和机械支撑, 越来越多的证据表明, 心外膜影响 ECM 重构, 同样 ECM 也影响心外膜细胞的功能^[13]。在心肌修复过程中, 心外膜来源的 ECM 除了为细胞提供支架外, 还促进细胞增殖和成熟。例如, 在斑马鱼中, 心脏损伤后心外膜细胞表达 ECM 中的重要成分 FN1 和 FN1b 基因, 若 FN1 基因突变或无表达会干扰心脏再生, 导致瘢痕形成。在蝾螈心脏切除-再生模型中, 心外膜细胞能够诱导 ECM (纤连蛋白、透明质酸和替那霉素 C) 在损伤部位沉积^[14]。在鼠心脏发育过程中, 抑制 ECM 中的重要成分 α 4-整合素信号能够刺激心外膜细胞发生 EMT 并分化。尽管这些过程背后的机制还需要进

一步澄清, 但可以肯定的是心外膜有助于建立支持心脏再生的 ECM 环境。

3 心外膜在 MI 后心肌修复治疗中可能的应用

3.1 调控心外膜

3.1.1 激活心外膜: 第一项针对心外膜的尝试性治疗是在小鼠中使用再生因子胸腺素 β 4 通过改变染色质激活心外膜^[15], 刺激 EPDCs 增生并多向分化为成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞, 从而促进毛细血管增生, 扩大血管床面积, 改善心肌组织血供。之后, 研究者们也不断尝试其他方法, 如使用前动力蛋白 1 (prokineticin 1, POK1)、VEGFA 或基因调控的方法增加修复因子分泌或刺激产生有益的 ECM 成分, 或者使用多种手段相结合, 辅以病毒载体使药物更容易地进入心外膜, 促进心肌再生^[16]。然而心肌细胞的再生能力有限, MI 后受损的心肌只能由瘢痕增生替代, 心脏功能降低迅速, 目前这些方法还并不是特别有效。

3.1.2 调控心外膜分化: 开发了一种从人诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 中产生功能性心外膜样细胞的方法, 通过控制 BMP 和 WNT 的剂量来调控人类 iPSCs 的心血管谱系分化。后续研究中, iPSCs 诱导分化的心外膜细胞能够发生 EMT, 并能分化为平滑肌细胞和成纤维细胞^[17]。用 BMP4 和 RA 促进人类胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 和人类 iPSCs 分化, 将其接种到小鸡胚胎宿主上时, 产生的心外膜样细胞具有黏附性, 并能在心肌表面扩散^[18]。这些研究为移植心外膜细胞和心外膜来源谱系用于治疗心脏病提供了可能性。虽然研究者们做了多种尝试, 但是诱导人类心外膜细胞增殖和分化的实验还存在技术上的挑战。

3.2 心外膜补片

心外膜补片移植是 MI 后心肌再生治疗良好的给药途径, 效率比直接肌肉注射或血管内灌注更好。一类补片直接在支架材料上结合种子细胞 (干细胞或间质细胞) 或药物, 如结合心肌基质细胞的微针孔补片^[19]、结合间质干细胞的补片^[20] 和离子交联透明水凝胶制成的黏弹性补片^[21]。另一类补片则尝试模拟心外膜成分或激活心外膜。在小鼠中应用生物工程技术设计制作的类似胚胎期心外膜的补片

能够刺激心肌细胞增殖、缩小梗死面积、改善心肌功能^[22]。该研究发现,将心外膜间皮细胞与小鼠胚胎干细胞来源的未成熟心肌细胞共培养,能够提高心肌细胞增殖能力,其主要活性因子为分泌糖蛋白 FSTL1。FSTL1 参与抑制炎症反应、降低心肌细胞凋亡、促进心肌纤维细胞活化和 MI 后的心肌保护。在一项小型猪研究中也观察到类似的效果。在损伤后应用心外膜补片,1 周后即可观察到修复效果,这对 MI 确诊后使用患者特异性补片的治疗具有指导性意义。作者在兔心肌梗死动物模型中,使用添加了 TGF- β 等药物的载药薄膜补片,使用缓释药物刺激心外膜反应,亦观察到实验组心肌梗死面积较对照组小,心肌内毛细血管密度增高。

参考文献:

- [1] Cao Y, Cao J. Covering and re-covering the heart: development and regeneration of the epicardium [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2018, 6, 3. doi: 10.3390/jcdd6010003.
- [2] Huang GN, Thatcher JE, Mcanally J, et al. C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury [J]. *Science*, 2012, 338: 1599-1603.
- [3] Blom JN, Feng Q. Cardiac repair by epicardial EMT: current targets and a potential role for the primary cilium [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 114-129.
- [4] Smits AM, Dronkers E, Goumans MJ. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: their origin, role and fate [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 127: 129-140.
- [5] Quijada P, Misra A, Velasquez LS, et al. Pre-existing fibroblasts of epicardial origin are the primary source of pathological fibrosis in cardiac ischemia and aging [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 129: 92-104.
- [6] Cai CL, Martin JC, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells [J]. *Nature*, 2008, 454: 104-108.
- [7] Dubé KN, Thomas TM, Munshaw S, et al. Recapitulation of developmental mechanisms to revascularize the ischemic heart [J]. *JCI Insight*, 2017, 2: e96800-96821.
- [8] Jingli C, Poss KD. The epicardium as a hub for heart regeneration [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15: 631-647.
- [9] Karra R, Poss KD. Redirecting cardiac growth mechanisms for therapeutic regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127: 427-436.
- [10] Ramjee V, Li D, Manderfield LJ, et al. Epicardial YAP/TAZ orchestrate an immunosuppressive response following myocardial infarction. [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127: 899-911.
- [11] Vieira JM, Howard S, Villa Del Campo C, et al. BRG1-SWI/SNF-dependent regulation of the Wt1 transcriptional landscape mediates epicardial activity during heart development and disease [J]. *Nat Commun*, 2017, 24: 16034-16046.
- [12] Ramjee V, Li D, Manderfield LJ, et al. Epicardial YAP/TAZ orchestrate an immunosuppressive response following myocardial infarction [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127: 899-911.
- [13] Bax NAM, Duim SN, Kruithof BPT, et al. *In vivo* and *in vitro* approaches reveal novel insight into the ability of epicardium-derived cells to create their own extracellular environment [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2019. doi: 10.3389/fcvm.2019.00081.
- [14] Mercer SE, Odelberg SJ, Simon HG. A dynamic spatiotemporal extracellular matrix facilitates epicardial-mediated vertebrate heart regeneration [J]. *Dev Biol*, 2013, 382: 457-469.
- [15] Smart N, Bollini S, Dubé KN, et al. De novo cardiomyo-

- cytes from within the activated adult heart after injury[J]. Nature, 2011, 474:640-644.
- [16] Goldman JA, Kuzu G, Lee N, *et al.* Resolving heart regeneration by replacement histone profiling[J]. Dev Cell, 2017, 40:392-404.
- [17] Iyer D, Gambardella L, Bernard WG, *et al.* Robust derivation of epicardium and its differentiated smooth muscle cell progeny from human pluripotent stem cells[J]. Development, 2015, 142:1528-1541.
- [18] Guadix JA, Orlova VV, Giacomelli E, *et al.* Human pluripotent stem cell differentiation into functional epicardial progenitor cells[J]. Stem Cell Rep, 2017, 9:1754-1764.
- [19] Tang J, Wang J, Huang K, *et al.* Cardiac cell-integrated microneedle patch for treating myocardial infarction [J]. Sci Adv, 2018,4. doi: 10.1126/sciadv.aat9365.
- [20] Wang QL, Wang HJ, Li ZH, *et al.* Mesenchymal stem cell-loaded cardiac patch promotes epicardial activation and repair of the infarcted myocardium [J]. J Cell Mol Med, 2017,21:1751-1766.
- [21] Lin X, Liu Y, Bai A, *et al.* A viscoelastic adhesive epicardial patch for treating myocardial infarction [J]. Nat Biomed Eng, 2019, 15. doi: 10.1038/s41551-019-0380-9.
- [22] Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, *et al.* Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart[J]. Nature,2015,525, 479-485.

新闻点击

学龄前儿童睡觉时间晚可能增加体质量

研究人员发现,通常在晚上9点以后入睡的幼儿在2至6岁倾向于增加身体脂肪。与早睡的儿童相比,他们的腰围和体质指数(BMI)都有较大的增加。研究还发现,睡眠不足或入睡困难的儿童肥胖率更高。

调查结果基于107个参与预防肥胖项目的幼儿。64个父母超重或肥胖,因此被认为有体质量增加过多的高风险。在2至6岁,借助监测活动的腕部设备,每年记录1周孩子的睡眠习惯。该研究发现,这些年来,通常晚上9点以后上床睡觉的孩子的BMI和腰围增加了一些。这种联系与总的睡眠时间无关,即使研究人员考虑了孩子的运动习惯和“屏幕时间”以及父母的受教育程度等因素,这种联系仍然存在。

父母肥胖与孩子之间的联系更紧密。研究结果显示,肥胖的父母与上床时间较早的父母和体质量较轻的父母相比,他们的腰围平均增加了3.5 cm。研究人员说,这可能意味着上床时间晚了,使高危儿童更有可能增加体质量。或者晚睡可能只是促进肥胖生活方式的一部分。

研究人员建议幼儿每天睡眠11~14 h(包括小睡),而3至5岁的儿童每天应该睡10~13 h。

该研究刊登于《儿科学》杂志。

刘晓荻 译

薛惠文 编