

· 综述 ·

心脏不同病理状态中心肌细胞再生的研究进展

谢泽锋¹ 肖大伟^{1,2}

传统观念认为,成体心脏所有的心肌细胞均是终末分化细胞,无法再次进入细胞周期;而且,心肌缺乏能产生新的肌细胞的干细胞亚群。心肌细胞无法再生更新,因此心脏内环境始终处于相对静止的状态。由于一直持续这个观点,因此很大程度限制了心血管研究的发展。

近年来,心肌细胞死亡和再生作为新的理论日趋受到关注。越来越多的学者一致认为,心肌细胞的坏死和再生是心脏正常内环境的重要组成部分,在心脏发育到成体及心肌梗大的过程中,新的肌细胞的再生作用超过了肌细胞的坏死,促成了器官的正常发育。相反,在心脏病态条件下或正常老化时,这个平衡被打破,细胞坏死比细胞形成更活跃,这时心室肌细胞数量减少,心肌代偿性肥大显著,继续发展就出现了慢性心力衰竭。现在,已经比较明确在心肌缺血和非缺血性损伤中,肌细胞的再生扮演着关键角色。超负荷和损伤对心脏的改变最常见为压力和容量超负荷引起的心肌肥大。在此,心肌细胞的再生、凋亡、坏死起着主要的决定作用。这种新观点无疑是为心血管领域的研究注入了新的血液,从而使得缺血性和非缺血性心脏疾病的治疗获得了迅速发展。在此理论上,通过干细胞重建死亡心肌细胞也成为心肌治疗与康复中最具前景的治疗手段。鉴此,本文就有关心肌细胞再生,及其在心血管领域中的进展做一综述。

1 缺血性心脏病中心肌细胞的死亡和生长

1.1 心肌细胞死亡的机制

一直以来,心脏被认为是一个终末分化器官,无法进行再生更新,这一观点否认了正常和病态心脏中有意义的细胞循环。随着分子探针技术的广泛应用,现今已经明确,心肌细胞死亡不管在人类或者实验动物模型上都是可以计量的^[1-2]。

研究证明,细胞死亡有如下三种机制^[3]:凋亡、坏死,或者两者共存。细胞凋亡或坏死均可对心脏产生不同的影响。心肌细胞坏死常导致炎症反应,血管增殖,巨细胞浸润,成纤维细胞激活,进而导致疤痕形成。然而,细胞凋亡发生后,在修复过程中并没有胶原积累,凋亡小体也被临近细胞移开,因此不会引起明显的组织形态学改变。但是,细胞凋亡能诱发急性心室壁重建以及导致心肌张力降低。早期研究认为坏死是心肌梗死后的唯一机制。实际上,大量资料显示,凋亡的发生常先于坏死并是心肌细胞死亡的主要形式。缺血事件发生的短时间内,缺血区域中凋亡影响了 80% 的肌细胞,而坏死只占 20%^[4]。随着时间推移,上述两种细胞死亡的形式互相交错,修复过程被激活,心肌疤痕形成。

1.2 心肌细胞死亡中相关的基因表达

事实上,以上心肌细胞死亡的过程受到一系列相关基因的严格调控。体外实验证明,p53 和 p53 依赖基因与细胞死亡的启动密切相关^[5]。急性应激状态下,由舒张期功能障碍引起

的肌细胞延伸促进了血管紧张素 II 的释放并且激活了其 AT1(血管紧张素 1 型)受体^[6]。受体被激活后进而促进 p38-MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)的磷酸化,从而使 p53 基因 C 末端 ser390 基因磷酸化^[7],基因被激活。由于 p53 DNA 结合位点位于血管紧张素原和 AT1 受体的启动子上游,p53 与位点结合后,促进了 RAS 系统(肾素-血管紧张素)和血管紧张素 II 的形成。而且,p53 可以使 Bcl-2 下调和 Bax 上调^[6-7],最终导致 Bcl-2/Bax 蛋白比例的减少,使心肌细胞对血管紧张素 II 传导的死亡信号的易感性增加^[7]。同时,高能磷酸键的缺失也抑制了 ATP 酶,加重细胞中电解质的不平衡,酸中毒出现共同促进心肌细胞的死亡。这不仅仅局限在缺血性心脏病,在非缺血性心脏病中 p53 和 p53 相关调节基因也扮演着重要的角色。

另外,AT1 在心肌中可以介导形成二酰甘油(DAG)和三磷酸肌醇(IP3),从而促进心肌细胞死亡途径的激活。一方面,IP3 可动员细胞内储存的 Ca^{2+} 。同时,DAG 又是蛋白激酶 C(PKC)的生理活化因子,PKC 被转运到胞浆,L 型钙离子通道发生磷酸化,游离 Ca^{2+} 浓度增加,进而 Ca^{2+} 依赖的胰脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)活化^[8],DNA 损伤。

细胞死亡事件的激活在氧化应激和 DNA 损伤时表现活跃^[9]。研究发现,由于缺血区域缺乏收缩性,导致剩余的健康心肌负荷加重,引起双链和单链 DNA 断裂,随后出现不可逆的损伤和凋亡。这种细胞死亡形式使室壁细胞重新排列,心肌细胞通过室壁内面对面的滑脱,结果室壁变薄而容量增加^[9],从而促进心脏的解剖变形。疾病的最终演变结果,凋亡和坏死促进了细胞的死亡。

1.3 心肌细胞再生的相关研究

20 世纪 60 年代,Linzbach^[10]首先发现左室肥大心脏中的心肌细胞数量增加。随后,Rumyantsev^[11]报道:部分成体心室肌细胞能够克服由损伤导致的 DNA 合成障碍并且通过细胞周期的各个阶段。由于各种细胞学和生化指标如 PCNA、Ki67 和 BrdU 标记的应用,使得心肌细胞的复制频率已经可以被定量。

其中,Ki67 是整个细胞周期中细胞增殖的特异性标记物,其阳性即能较好提示细胞处于分裂期。而且,用 Ki67 作为细胞增殖的标记克服了胸苷、BrdU、PCNA 标记的缺陷^[12]。Ki67 是核仁外致密纤维间的成分,在结构上,Ki67 分子量为 395kDa,含有部分转录因子的功能区域^[13]。Ki67 与抑癌基因 p53 结合位点相似,可以与之竞争性结合 DNA 的腺苷及胸苷

1 汕头大学医学院第一附属医院胸心外科,广东汕头,515041

2 通讯作者:肖大伟(汕头大学医学院第一附属医院胸心外科,515041)

作者简介:谢泽锋,男,硕士

收稿日期:2005-08-26

基因^[13]。这种竞争结合合理解释了 Ki67 在细胞增殖中的作用。另外,除 G0 期外,该核蛋白在细胞周期的各个阶段均有表达,开始于 G1 期,在 S 期表达明显,G2 期进一步增加,并持续在细胞分裂的早、中期,最后于晚期及末期下降。通过检测 Ki67 及有丝分裂指数,现已证明人类心肌梗死后在活体心脏中可以出现高频率的心肌细胞复制。因此,这些有丝分裂中出现的大量有关心肌细胞及胞质分裂的资料无疑为心脏具有再生能力理论提供了强有力的依据^[14]。而且,体外实验也发现,在转基因小鼠中,突变型 p193 和 p53 基因的表达能够诱导缺血间隔心肌细胞 DNA 的合成,调节损伤的成体心肌细胞重新进入细胞周期^[15]。因此,心肌细胞的高频率复制指出了无论是生理或是病理状态下的心脏,再生对于维持心脏质量都是十分重要的。

现今,已经明确正常成人的左心室约含有 5.5×10^9 的心肌细胞,当有 30% 的区域发生梗死时左室中的心肌细胞将下降到 3.8×10^9 ^[14]。而完整心室和梗死心室的有丝分裂指数分别为 $11/10^6$ 和 $520/10^6$,也就是说正常和损伤心室各自有 60,500 和 1,976,000 的心肌细胞正处于有丝分裂期。假设在冠脉梗死后连续 7 天检测其增殖程度,按照计算,因梗死而丢失的 1.7×10^9 的心肌细胞在 3 周内可以完全被更新。即使在心力衰竭末期心肌细胞有丝分裂指数降低到 $150/10^6$ ^[16],整个左心室也可以在 6 个月内完全被更新。由此可见,梗死后活跃的细胞增殖能力表明新的心肌细胞再生是心室重建的主要决定因素。当然,在心室扩张和室壁重建过程中,心肌肥大和细胞体积延长也起到了一定程度的作用。

2 非缺血性心脏病中心肌细胞的再生

2.1 超负荷心脏中心肌细胞的再生

哺乳动物心肌细胞拥有可观的再生储备,能够在短时间内形成新的心肌细胞。心脏超负荷引起心肌细胞增殖可达 60% 或更多,这已经在动物和人类心衰模型中被证实^[17]。研究发现,在主动脉瓣狭窄和瓣膜置换术后患者中有高水平的心肌细胞再生^[18]。

正常心脏负荷过重引起心肌细胞增殖,血流动力学条件不同,心肌细胞则出现不同的适应形式。心脏血流动力学处于代偿期,心肌细胞以肥大为主要的适应形式,细胞复制并不明显。而在心力衰竭失代偿期,心肌细胞数量的增加则成为主要的适应形式^[18]。

2.2 生理条件下心肌细胞的老化和更新

心肌细胞再生和死亡独立发生于组织器官的整个生命过程,两者处于相对稳定的动态平衡状态。研究发现,细胞死亡率随着机体年龄的增加而增加,在中年以后,平衡被打破,心肌细胞的过度死亡导致了心肌细胞绝对数量的减少^[19-20],剩余有活力的心肌细胞通过适应性肥大来维持心脏质量和功能,最终导致实质细胞增大,心脏老化。由此可见,心肌细胞死亡,心肌肥大和新的肌细胞形成是心脏老化的主要特征。

心肌细胞更新发生于成人期和衰老期的心肌中,在病态和非病态心脏的整个生命过程中存在不同年龄的细胞亚群,不同细胞亚群对于生长刺激的反应能力各不相同,这些细胞被激活后其形状、大小、以及对死亡、凋亡和坏死信号应答的

能力也各不相同。实验发现,把 4 个月月龄的小鼠心室肌细胞按其体积大小应用 Percoll 密度梯度离心法分离,体积大小范围约从 $4000 \mu\text{m}^3$ 到 $110,000 \mu\text{m}^3$ 。一般情况下,体积为 $90,000 \mu\text{m}^3$ 的心肌细胞大部分都表达 p16^{INK4a} (抑制再次进入细胞周期的蛋白);p16^{INK4a} 表达是细胞衰老的信号^[21],p16^{INK4a} (+) 细胞不再进入细胞周期,因此表达 p16^{INK4a} 的细胞其凋亡的发生率非常高。而体积为 $15,000 \mu\text{m}^3$ 的细胞中很少表达 p16^{INK4a},凋亡的发生率低。在诱导的心肌梗死动物模型中,老化心肌细胞明显缺乏肥大和复制的能力,用 BrdU 标记复制的心肌细胞,梗死 7 天后,DNA 复制局限于体积小的心肌细胞,并且随着细胞体积的增大而逐渐减少。由此可见,细胞体积的大小很大程度上影响细胞受刺激后的反应能力。细胞体积越大,活力越小,对生长的刺激反应能力差,容易激活细胞死亡途径。细胞体积越小,细胞越有活力,能适应性肥大和有限度的进入细胞周期,而且不容易死亡。体积大和损伤的心肌细胞比例随着年龄的增加而增加,进行性影响着老化心脏对病态刺激的反应能力。

理论的发展伴随着后续研究的深入。Kamihata^[22]等在以猪为模型的试验中将骨髓来源的干细胞注射到冠脉结扎后的心脏缺血区,3 周后发现局部血流量增加 4.6 倍,毛细血管密度增加 2.8 倍,血管造影显示侧支循环数量增加 5.7 倍,心功能得到改善。也有研究表明通过骨髓移植,干细胞动员进入小鼠梗死心脏中可以使心肌细胞周期重新启动^[23]。最近,更是在一例人类心脏移植病例中发现了以干细胞为基础的新心肌细胞周期的发生^[24]。除此,最新研究表明某些细胞因子如血小板生成素^[25] (thrombopoietin, TPO)、促红细胞生成素^[26-27] (erythropoietin, EPO) 等能动员骨髓干细胞分化,由此促进心肌细胞的修复和再生。基础研究的深入将进一步推动临床的应用。目前已有研究者将干细胞应用于心血管疾病的临床治疗。德国的 Strauer^[28]等将干细胞用于治疗心肌梗死,一位 46 岁的急性心肌梗死患者于发病后 6 天经导管将自体骨髓干细胞灌注移植入该患者阻塞血管远端,10 周后,经多巴胺负荷超声心动图和核素心室造影显示左室跨壁心肌梗死范围从 24.7% 减少至 15.7%,射血分数、心脏指数增加了 20%—30%,而运动时舒张末容积降低 30%,左室灌注压下降。

实际上,以上种种研究与发现对近代心血管疾病预防和治疗影响重大。一方面,其为开创与应用新治疗手段奠定了丰富的理论基础;另一方面也为心脏康复的同步实施提供了有利的条件。而心脏康复治疗是改善损伤心肌及提高患者生存质量中较有效的方法。由于在不同病理状态下,心肌细胞再生在心脏修复中具有决定地位。因此,探索心脏康复在心脏损伤中的干预机制及在心肌再生过程中可能发挥的作用,通过降低危险因素、改善生活方式和运动训练等制订合理综合方案,由此提高心肌细胞的再生能力,改善心脏功能,从而促进患者获得正常或是接近正常的生活状态。

3 展望

心肌细胞再生理论的提出使心脏基础研究与临床治疗发生了突破性转变。虽然其研究目前尚处于起步阶段,但作为心血管疾病治疗的一种新方法,不论在理论上还是在实践

中均具有其他传统治疗方法所不可比拟的优势。其中,通过骨髓移植干细胞重建死亡心肌细胞^[9],或是寻找具有直接的心肌保护作用而且又能动员干细胞修复缺血心脏的体液因子,这些手段开辟了新的应用前景。同时,配合合理有效的心脏康复医疗方案,这对目前缺血或非缺血性心脏损伤的修复乃至终末期心脏病患者的康复治疗无疑是带来了新的曙光。

参考文献

- [1] Guerra S, Leri A, Wang X, et al. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent [J]. *Circ Res*, 1999, 85:856—866.
- [2] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 1998, 82:1111—1129.
- [3] Bernardo NG, Jan K, Annarosa L, et al. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure [J]. *Circ Res*, 2003, 92: 139—150.
- [4] Bardales RH, Hailey S, Xie SS, et al. In situ apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infarction [J]. *Am J Pathol*, 1996, 149:821—829.
- [5] Long X, Boluyt MO, Hipolito M, et al. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99:2635—2643.
- [6] Leri A, Claudio PP, Li Q, et al. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decrease the Bcl-2 to Bax protein ratio in the cell [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101:1326—1342.
- [7] Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, et al. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death[J]. *Diabetes*, 2001, 50:2363—2375.
- [8] Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, et al. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress[J]. *Diabetes*, 2001, 50:1414—1424.
- [9] Li Q, Li B, Wang X, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy[J]. *Clin Invest*, 1997, 100:1991—1999.
- [10] Linzbach AJ. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy[J]. *Am J Cardiol*, 1960, 5:370—382.
- [11] Rumyantsev PP. DNA synthesis and nuclear division in embryonic and postnatal histogenesis of myocardium [J]. *Arch Anat*, 1964, 47:59—65.
- [12] 蒋文慧, 董安平. 心肌再生研究进展[J]. *心血管病学研究进展*, 2004, 2:146—148.
- [13] Se msarian C. Stem cells in cardiovascular disease: from cell biology to clinical therapy[J]. *Intern Med J*, 2002, 32(5-6):259—265.
- [14] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after infarction [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344:1750—1757.
- [15] Hidehiro N, Hisako O, Nakajima, et al. Expression of mutant p193 and p53 permits cardiomyocyte cell cycle reentry after myocardial infarction in transgenic mice [J]. *Circ Res*, 2004, 94: 1606—1614.
- [16] Kajstura J, Leri A, Finato N, et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:8801—8805.
- [17] Olivetti G, Melissari M, Balbi T, et al. Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodeling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure [J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28:1199—1208.
- [18] Olivetti G, Cigola E, Maestri R, et al. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28:1463—1477.
- [19] Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart [J]. *Circ Res*, 1998, 83:1—14.
- [20] Anversa P, Olivetti G. Cellular basis of physiological and pathological myocardial growth [M]. In: Page E, Fozzard H, Solaro RJ, eds. *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System: The Heart*. New York, NY: Oxford University Press, 2002. 75—144.
- [21] Murphy N, Ring M, Killalea AG, et al. p16INK4A as a marker for cervical dysplasia: CIN and cCIN in cervical biopsies and ThinPrep™ smears[J]. *Clin Pathol*, 2003, 56:56—63.
- [22] Kamihata H, Matsubara H, Nishijue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic IL-1 ligands and cytokines[J]. *Circulation*, 2001, 104(9):1046—1052.
- [23] Sheng XG, Feng JZ, Wu S, et al. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into myogenic cells in vitro and expression of vascular endothelial growth factor gene after transfection [J]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2004, 24(3): 290—294.
- [24] Konrad U, Daniele T, Farooq S, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure[J]. *PNAS*, 2005, 102: 8692—8697.
- [25] Yang M, Xiao DW, Li K, et al. TPO has neural regeneration effect[J]. *Blood*, 2003, 102 (11) (Suppl): 5301.
- [26] Parsa CJ, Kim J, Riel RU. Cardioprotective Effects of Erythropoietin in the Reperfused Ischemic Heart: A potential role for cardiac fibroblasts [J]. *J Bio Chem*, 2004, 279(20):20655—20662.
- [27] Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(7):999—1007.
- [28] Straller BE, Brehm M, Zeus T, et al. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2001, 126(34-36):932.
- [29] Michael S, Lee R, Raj R, et al. Stem-Cell Transplantation in myocardial infarction: A Status Report [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140:729—737.