

心肌细胞周期调控的研究进展*

曹磊, 王跃群, 吴秀山

(湖南师范大学 生命科学学院 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 尽管分子心脏学在很多方面已经取得了较大的进展,但是有关心脏形成细胞的起源、诱导心脏发生的机理、胚胎期和成人期心肌细胞增殖的调控途径仍然不是很清楚.在最近的研究中,人们对心肌细胞周期调控已有所了解.主要就心肌细胞周期活动和成人心肌细胞发生的研究进展进行了综述.

关键词: 心肌细胞增殖; 心脏再生; 基因打靶; 转基因鼠

中图分类号: Q253

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2002)S1-0054-04

Advances in Regulation of Cardiomyocyte Cell Cycle

CAO Lei, WANG Yue-qun, WU Xi-shan

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Although rapid progress is being made in many areas of molecular cardiology, the origins of heart-forming cells, the mechanisms responsible for cardiogenic induction, and the pathway that regulate cardiomyocyte proliferation during embryonic and adult life remain unanswered. A progress in recent research on cardiomyocyte cell cycle regulation has been made. A review of cardiomyocyte cell cycle activity and de novo cardiomyogenesis in adult is then presented.

Key words: cardiomyocyte proliferation; heart regeneration; gene targeting; transgenic mice

(Life Science Research, 2002, 6(Suppl): 54~ 57)

1 发育中的心肌细胞周期调控

通过放射性标记胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验发现细胞周期活动与心脏分化和形态发生有内在联系.在小鼠 E8 的早期心脏中胚层的心外膜肌盘中发现了极高程度的 DNA 合成(标记细胞接近 70%). E11 小鼠心肌分化(如:最先心肌表型的出现)伴随着胸腺嘧啶标记下降到近 45% 而发生.相同的细胞周期活动调控在鸡的早期心脏发育中也被发现. Moorman 等人的研究表明心肌分化早期阶段高比例的细胞周期活动无疑对管状心脏形

成心室肌有重要意义.在心室形态发生过程中,与内小梁相比,心肌致密层的心肌细胞的胸腺嘧啶标记将近高两倍,而在接下来的胚胎形成中心肌细胞增殖速率逐渐下降.

用表达 β -半乳糖苷酶病毒逆转录标记实验发现了心脏细胞周期和心脏形态发生之间的相互影响,有关这方面的研究表明在心肌细胞分化时,管状心脏中单一转染肌细胞的增殖导致了圆锥状生长点的产生.我们推断这些圆锥状生长点的组装有助于心室壁的三维卵形结构的形成.圆锥状生长点的形成取决于致密层和内小梁之间的心肌细

* 收稿日期: 2002-10-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170479); 湖南省特聘教授基金资助项目(25000613); 教育部重点课题项目

作者简介: 曹磊(1979-),男,湖南长沙人,硕士研究生,从事分子发育遗传学研究; 吴秀山(1952-),男,湖南衡阳人,湖南师范大学特聘教授,博士生导师,通讯作者,主要从事分子发育遗传学研究, E-mail: xiushanwu@yahoo.com

胞增殖比率的梯度.最近关于纯系的单一胚胎心肌细胞增殖能力的研究指出细胞周期调控也有助于圆锥状生长点的形成^[1].上述研究也证实了从小鼠 E15 分离出来的心肌细胞的增殖能力有很大波动.当观察不同心脏发育时期的紧凑层和小梁的细胞时,发现细胞增殖潜力的不同可以从体内不同细胞周期活动得到预测.研究中还发现从同一细胞而来的子代细胞在末端分化前和该细胞具有相近的增殖能力.而圆锥状生长点对称的结构就依赖于子代细胞相近的增殖能力.

在出生后不久,心肌的生长从细胞增殖转向细胞体积增大.从形态学角度来说,这个过程标志是肌原纤维的显著增多、成熟闰盘的出现、双核心肌细胞的形成.在许多实验中,双核心肌细胞的出现伴有放射性标记的胸腺嘧啶的逐渐增高,这一结果表明双核是由于进行了基因组的复制和核分裂但是没有进行胞质分裂.研究进一步证明在小鼠中有两个短暂而明显的心肌细胞 DNA 合成阶段.第一个 DNA 合成阶段发生在胎儿时期,并且伴有特有的心肌细胞增殖,而第二个 DNA 合成阶段发生在刚出生时期,伴有大量的双核细胞.这说明在小鼠出生前心肌细胞增殖已经停止,并且在胎儿和新生儿中主基因产物调控的增殖(与核内复制相对)表现出差别.

迄今为止已发现许多调控哺乳动物细胞周期的调控分子,而且也有许多人研究了有关心脏起源的一些细胞周期调控基因.一般说来,细胞周期正调控因子 cyclin、Cdk 和 protooncogene 在心肌细胞周期活动较高的胚胎期心脏中表达较高,许多正调控因子在成人心脏中调控会降低.而细胞周期负调控因子 Cdk_i 经常在心肌细胞周期活动较低的成人心脏中调控加强.

2 心肌细胞周期活动和成人心肌细胞周期的重新启动

最近关于成人心肌细胞再进入细胞周期的能力受到了相当大的关注.一般认为成人心肌细胞仍然保留一些合成 DNA 的能力,然而对于这种能力发生的频率和 DNA 合成再起始是否一定导致细胞分裂这两个问题一直有争论.实际上,经典的实验表明 DNA 合成会提高严重的肥大性心脏细胞核的倍性.有关这些争论主要包括:1)用来检测细胞周期活动方法的可靠性;2)区分心肌细胞核和非心肌细胞核方法的有效性;3)怎么样程度

的心肌损伤能提高心肌细胞周期活动;4)这种损伤在各物种间有多少差别.尽管用相同的物种、类似的技术,但由于不同实验室主观估计心肌细胞周期进展的水平不同,还是导致了明显不同的结果^[2-5].然而当用相对不那么主观的放射性标记胸腺嘧啶掺入实验分析成年小鼠心肌细胞时,却发现了极低水平的 DNA 合成,平常时期 0.0005%,损伤后 0.008%.为了能适用于治疗目的,能准确的判断心肌细胞周期活动水平是非常重要的.

到目前为止,成人心脏的心肌细胞周期的重新启动以及接下来的心肌细胞增殖研究进展不大.但是,在某些组织中成人干细胞的多能性在某种程度上表明新心肌细胞周期发生的可能性.为了证明一点,Goodell 研究组用已经进行了遗传学标记骨髓细胞的小鼠做心脏梗塞模型^[6],在随后的实验中的确在梗塞心模型的心肌细胞中发现了有限的遗传学标记,尽管这些心肌细胞的增殖能力还没有确定.但是,能从受损心脏中分离出来干细胞导出的心肌细胞,这就说明细胞周期活动可能被限制了.

随后人们发现具有心肌细胞干细胞潜力的细胞能够从神经^[7]、肝^[8]、间叶细胞^[9]、内皮细胞^[10]等来源中得到.也有人认为移植骨髓导出的干细胞进入梗塞的小鼠心脏中能够得到真正的心肌细胞周期的重新启动^[11].然而,移植带有特定表达基因的相似干细胞没有能够证明心肌细胞分化^[12].最近在一例人类移植心脏中有了显著的以干细胞为基础的新心肌细胞周期的发生^[13].但是值得指出的是在这个研究中所用来确定心肌细胞干细胞的标记物 Sca 1 在人类中还没有任何相关免疫活性的例子.

虽然成人心脏中新心肌细胞周期发生的研究还没开始多久,已经有人质疑其能发生的频率,也有人象质疑心肌细胞 DNA 合成一样质疑评估新心肌细胞周期的发生.人们发现遗传学标记的骨髓干细胞和神经干细胞有与胚胎干细胞合并的能力,这样就能产生多能的杂交细胞,而这些细胞保持了表达报告基因的能力.这就更强调了在这种实验中严密的基因分析的必要性.

3 心肌细胞周期活动的实验手段

早先通过酶消化胚胎、新生儿、成人心脏的心肌细胞培养技术已经广泛的被应用于细胞周期研

究,在培养细胞时这些技术的应用需要检测外生因子的影响.近来有人报道在初级的单层培养基里如果缺少三维基体会导致心肌细胞对外生因子的应答的降低^[14].基因转染的出现提供了直接的方法引起细胞周期活动.早期的实验利用传统的磷酸钙和脂质体转染法,但是过低的效力限制了它们的应用.随后出现了病毒转染的方法,并结合腺病毒成为体外转染心肌细胞基因有效的方法.

尽管在许多研究的早期心肌细胞培养中利用了基因转染,但是这种方法还是有它的局限性,如培养经常出现暂时的强烈抑制而导致非心肌细胞的快速增殖.而且由于末端分化的成人心肌细胞在生理和分子方面与胚胎和新生儿的心肌细胞有显著的不同,所以早期的培养方法并不适合用于成人心肌细胞的细胞周期研究.这些局限性能够通过用从胚胎干细胞中提出的末端分化心肌细胞培养物而稍微克服,但此方法也容易共转染多倍表达体.

基因转染包含直接将病毒载体转入心肌细胞.进一步精练这种方法,例如调节基因的发展能有条件的表达特定基因^[15],或者用 *cre/lox* 技术二者选一的排除一个基因^[16],这样就有了一个强有力的工具进一步确定心肌细胞周期调控.一些实验的结合为我们提供了更多的选择,如将病毒基因转染进已经遗传修饰过的动物心脏中.在基因修饰中,遗传背景也有可能影响到已知遗传修饰的细胞周期活动^[17,18].总的来说,上面的这些方法为进行心肌细胞周期调控的研究提供了许多手段.

在进行心肌细胞周期活动实验时能发现一些有趣的现象.例如,一些实验表明基本细胞周期调控因子的强迫表达,如 Cyclin、E2F-1 和 *c-myc* 能导致心肌细胞 DNA 合成,在一些实例中甚至导致了成人心脏细胞的基因组复制和核分裂.但是,这些实验(尤其是利用有条件活性的 *myc* 转基因)中的 DNA 合成和核分裂不足以引起成人心肌细胞进行细胞分裂.随后有人证明额外的细胞周期检验点(如 G₂/M)可能阻止胞质分裂的发生^[19,20].另一种解释是有内在的限制数目的细胞周期能通过这个点.也有人认为高浓度的肌原纤维允许核分裂但是不允许胞质分裂.但是成人心肌细胞保持了经过胞质分裂的能力^[3]的观点显然和肌原纤维充当了不能通过的细胞周期检验点的这个说法不一致.

4 小结

今后在心肌细胞周期调控方面的新发现将很有可能促成心肌细胞增殖的再次开始.关于内在的增殖和心肌细胞周期的重新开始,准确的确定这些发生的范围是一件很重要的事.如果心肌细胞增殖和细胞周期的重新开始内在的比率很低,那么将这些成果用于临床方面时也必然更低.

当考虑到成人心肌细胞内在的增殖能力的时候,必须重申的是 DNA 合成并不意味着基因组复制,基因组复制并不意味着一定核分裂,核分裂并不意味着胞质分裂.虽然这些已经是十分明显的了,当比较不同实验室尤其是用不同方法的结果的时候一定要注意这些.在成人心肌细胞重新进入细胞周期的研究中,最新进展显示的干细胞的融合倾向显示先前一些研究者所认为的干细胞的可塑性和分化转换都明显地被错误理解了.基于此,当研究这个问题的时候,要严格的确认没有含糊不清的遗传标记物.利用心肌细胞的损伤这种方法来增强心脏再生能力显然是一种新的方法,但是却不能分辨是真正引起了心肌细胞的再生还是仅仅只是所有伤口愈合过程的一种表现.

遗传干涉能够促进心肌细胞 DNA 合成、核分裂,甚至某些情况下的胞质分裂,增加基因也可以增强心肌细胞增殖.转基因调节方式的提高和病毒转染系统的发展将使这些研究变得更容易.

如前所述,对心肌细胞周期调控的机理和能增强心肌细胞周期活性的基因已经取得了一些进展,而人们在这一领域极大的热情将使其进一步发展.真正确定能促进心肌细胞周期活动的基因或者方法还只是应用于临床的第一步.

参考文献 (References):

- [1] BURTON P B J, RAFF M C, KERR P, *et al.* An intrinsic timer that controls cell cycle withdrawal in cultured cardiac myocytes[J]. *Dev Biol*, 1999, 216: 659-670.
- [2] BELTRAMI A P, URBANEK K, KAJSTURA J, *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344: 1759-1757.
- [3] HUTTENBACH Y, OSTROWSKI M L, THALLER D, *et al.* Cell proliferation in the growing human heart: MIB-1 immunostaining in preterm and term infants at autopsy[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2001, 10: 119-123.
- [4] SOONPAA M H, FIELD L J. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis[J]. *Circ Res*, 1998, 3: 5-26.
- [5] ANVERSA P, KAJSTURA J. Ventricular myocytes are not termi-

- nally differentiated in the adult mammalian heart[J]. *Circ Res*, 1998, 83: 1-14.
- [6] JACKSON K A, MAJKA S M, WANG H, *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 395-402.
- [7] CLARKE D L, JOHANSSON C B, WILBERTZ J, *et al.* Generalized potential of adult neural stem cells[J]. *Science*, 2000, 288: 1669-1673.
- [8] MALOUF N N, COLEMAN W B, GRISHAM J W, *et al.* Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart *in vivo*[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158: 1929-1935.
- [9] TOMA C, PITTENGER M F, CAHILL K S, *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart[J]. *Circulation*, 2002, 105: 93-98.
- [10] CONDORELLI G, BORELLO U, De ANGELIS L, *et al.* Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 10733-10738.
- [11] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. *Nature*, 2001, 410: 701-705.
- [12] MURRY C E, RUBART M J, SOONPAA M H, *et al.* Absence of cardiac differentiation in hematopoietic stem cells transplanted into normal and injured hearts[J]. *Circulation*, 2001, 104: 51-59.
- [13] QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI A P, *et al.* Chimerism of the transplanted heart[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346: 5-15.
- [14] ARMSTRONG M T, LEE D Y, ARMSTRONG P B. Regulation of proliferation of the fetal myocardium[J]. *Dev Dyn*, 2000, 219: 226-236.
- [15] XIAO G, MAO S, BAUMGARTEN G, *et al.* Inducible activation of *c-myc* in adult myocardium *in vivo* provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis[J]. *Circ Res*, 2001, 89: 1122-1129.
- [16] MINAMINO T, GAUSSIN V, DEMAYO F J, *et al.* Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein[J]. *Circ Res*, 2001, 88: 587-592.
- [17] TAKEUCHI T, KOJIMA M, NAKAJIMA K, *et al.* *Jumonji* gene is essential for the neurulation and cardiac development of mouse embryos with a C3H/He background[J]. *Mech Dev*, 1999, 86: 29-39.
- [18] LECOATER J E, KABLAR B, WHYTE P F, *et al.* Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene[J]. *Development*, 1998, 125: 4669-4679.
- [19] AKLI S, ZHAN S, ABDELLATIF M, *et al.* E1A can provoke G1 exit that is refractory to p21 and independent of activating *cdk2*[J]. *Circ Res*, 1999, 85: 319-328.
- [20] VON HARS DORF R, HAUCK L, MEHHOF F, *et al.* E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21^{CIP1} and p27^{KIP1} and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of insulin-like growth factor I[J]. *Circ Res*, 1999, 85: 128-136.