

成纤维细胞分化为肌成纤维细胞的调控机制

门素珍 马丽娟 石亚男 刘巍

【摘要】 心脏重塑的关键病理特征和主要形成原因是心肌细胞肥大和心肌纤维化。研究证明在心肌纤维化中成纤维细胞和肌成纤维细胞是主要作用细胞, 其中肌成纤维细胞的来源广泛, 它的形成通常需要经过两个阶段的转化。然而有很多传导途径及相关的调节因子参与了这一系列复杂的转化过程, 包括转化生长因子- β 细胞的信号转导, 血管紧张素 II 信号转导, 内皮素 1 信号转导, 瞬时受体电位通道及机械转录偶联等。

【关键词】 肌成纤维细胞; 成纤维细胞; 转化生长因子- β ; Smads 蛋白; 血管紧张素 II

Mechanism of regulating the differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts Men Suzhen, Ma Lijuan, Shi Yanan, Liu Wei. Department of Cardiovascular Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author, Liu Wei, E-mail: doctor_liuwei@126.com

【Abstract】 Cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis are the critical pathological features and major causes of cardiac remodeling. Previous studies have proven that fibroblasts and myofibroblasts play a major role during the process of cardiac remodeling. Myofibroblasts are extensively available and constantly experience two stages of transformation. However, multiple transduction pathways and relevant regulatory factors participate in the complex transformation process including TGF- β signaling transduction, angiotensin II signaling, endothelin 1 signaling, transient receptor potential channels and mechanical transcriptional coupling, etc.

【Key words】 Myofibroblast; Fibroblast; Transforming growth factor- β ; Smads protein; Angiotensin II

心脏重塑是慢性心力衰竭的基本机制, 细胞外基质过多积聚引起心肌顺应性减低, 从而影响心脏功能。然而心脏成纤维细胞的增殖、活化则是心肌纤维化的主要成因。成纤维细胞在心脏损伤后修复和重塑中起着重要作用, 参与其中多个环节, 调节细胞外基质 (ECM) 的代谢, 并能分化为肌成纤维细胞。肌成纤维细胞比成纤维细胞的表型更丰富, 能够更有效地对坏死细胞及间质进行修复和重构。人类心肌中的胶原主要是 I 型和 III 型胶原, 间质中胶原长期增生堆积, 促进了心肌重塑, 影响心脏功能, 而合成该类胶原的主要细胞是心肌中成纤维细胞和肌成纤维细胞。它们在慢性心力衰竭发生发展过程中亦发挥着至关重要作用。

一、成纤维细胞与肌成纤维细胞的概述

成纤维细胞是多种具有明显异质性和独特表型

的成纤维细胞亚群的总称, 不同的亚群具有不尽相同的生物学功能^[1]。成纤维细胞是维持胶原代谢平衡的主要细胞, 在器官纤维化、创伤愈合中发挥关键作用。在提供结构支持的心肌层细胞中, 成纤维细胞是主要细胞类型。而处于休眠状态的成纤维细胞被激活后能够分化为肌成纤维细胞。

健康心脏极少有肌成纤维细胞, 但在心肌细胞损伤后的最初几日, 该细胞可以大量出现^[2]。肌成纤维细胞的转化分为两个阶段。第一阶段, 肌成纤维细胞由成纤维细胞分化而来。细胞质中含有的肌动蛋白应力纤维和亲水复合物结构使成纤维细胞具有特征性。而 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达是肌成纤维细胞在结构上的特征性表现和重要标记, 也是肌成纤维细胞迁移行为的关键。不同分化阶段的肌成纤维细胞, 在不同时间点迁移的距离

不同,这与肌成纤维细胞在不同分化阶段的 α -SMA 表达量的不同有直接关系。心肌损伤后进入第二阶段,随着细胞因子浓度的增高和在损伤区域机械压力的积聚,这些细胞成为成熟的肌成纤维细胞。机械力能够促进肌成纤维细胞的分化,一定程度上说明了肌成纤维细胞的力学特性^[3]。

此外,肌成纤维细胞在急性损伤愈合反应中对心脏具有一定的保护作用。正常心肌的损伤愈合过程,肌成纤维细胞有暂时性的表达,可引起损伤区域收缩,含有 α -SMA 的肌成纤维细胞因凋亡而消失。而病理性愈合这一结局则是肌成纤维细胞持续表达的后果^[4]。同时,神经内分泌失调、慢性心肌成纤维细胞和(或)增生性瘢痕引起异常增高的室壁应力,也促使肌成纤维细胞在损伤的心脏中长期存在。

二、肌成纤维细胞的来源

1. 间质固有纤维细胞

间质固有纤维细胞的活化是肌成纤维细胞的主要来源。其活化必须依赖以下条件:局部存在激活的转化生长因子- β 1 (TGF- β 1); ECM 成分发生相应修饰与变化;细胞重塑行为和 ECM 结构变化造成细胞外应力增强^[5]。TGF- β 是肌成纤维细胞转化的主要诱因,活化的 TGF- β 1 使 Smad2-3 蛋白磷酸化,并进入细胞核,调控相应基因表达,重组细胞骨架成分,诱导其向肌成纤维细胞转化。同时,ECM 成分在细胞重塑过程中发生相应修饰改变,一方面增加细胞的黏附能力;另一方面增加细胞外应力^[6]。此外,与 ECM 成分相连接的细胞骨架蛋白可以激活细胞内的多种信号系统,进一步放大纤维化级联反应,加速纤维化进展。

2. 骨髓来源的纤维细胞和骨髓前体细胞

骨髓来源的纤维细胞和骨髓前体细胞约占肌成纤维细胞来源的 15%。纤维细胞最初是从循环中源于骨髓的 CD34⁺ 细胞群中分离出的细胞亚群,形态接近成纤维细胞。一般认为这类细胞在组织纤维化中发挥重要作用。趋化因子及其受体系统可调控骨髓中纤维细胞的致纤维化作用^[7]。

3. 其他来源

血管内皮细胞可通过向间充质细胞转化,从而产生肌成纤维细胞,并参与 ECM 的合成;血管周围细胞和血管平滑肌细胞也可被激活产生肌成纤维细胞^[8]。血管平滑肌细胞本身含有 α -SMA,在病理条件下即可进一步分化成肌成纤维细胞。

三、调节肌成纤维细胞转化的信号途径

1. TGF- β 细胞的信号转导途径

TGF- β 可以通过促进胶原合成、其他致纤维化因子表达的上调以及抑制基质降解来增加细胞外基质的沉积^[9]。作为致纤维化的重要细胞因子,TGF- β 能够促进成纤维细胞向特异性表达 α -SMA 的肌成纤维细胞分化^[10]。TGF- β 可以激活多条信号转导通路,而 Smads 途径则是主要的细胞内信号转导途径。TGF- β /Smads 通路不但在心肌梗死后纤维化重塑中起重要作用而且与心肌细胞凋亡密切相关。此外,Smads 非依赖通路中 TGF- β 1/TGF- β 活化激酶-1 信号转导与心肌细胞肥大相关。在信号转导中,活化的 TGF- β 受体与细胞膜表面的 TGF- β II 型受体结合,形成异源二聚体复合物,TGF- β I 型受体识别并结合该二元复合物。活化的 TGF- β I 型受体进一步磷酸化 R-Smads 蛋白,后者再与 Co-Smads 结合成为转录复合物,移入细胞核内,通过与 DNA 上的 Smad 结合元件结合,激活特定的靶基因^[11]。Smad6 和 Smad7 通过阻止 Smad2 和 Smad3 的磷酸化及 Smads 转录复合物的形成从而抑制 TGF- β 的信号转导。由此可见,TGF- β /Smads 信号通路中各型 Smads 蛋白间的作用相互协调,共同完成生理及病理状态下信号的转导。

2. 血管紧张素 II 信号途径

肾素-血管紧张素系统(RAS)和 TGF- β 信号通路存在直接联系^[12]。血管紧张素 II 既可诱导成纤维细胞 TGF- β 1 的 mRNA 和蛋白质表达,又可增强 TGF- β 1 促纤维生成的作用^[13]。在心肌损伤的病理情况下,RAS 激活可以使血管紧张素 II 增多。增多的血管紧张素 II 特异性结合成纤维细胞表面 G 蛋白偶联的血管紧张素 II 受体 1,进而启动胞内多条信号通路,导致原癌基因的过度表达和丝裂酶原激酶的过度激活,促进成纤维细胞的分裂、增殖,合成分泌多种细胞活性因子,使细胞外基质增生,胶原沉积,引起心脏纤维化^[14]。

血管紧张素 II 是神经内分泌因子,在血管平滑肌细胞中,通过直接和持续作用可激活 TGF- β 细胞内信号转导的 Smads 依赖通路。在血管紧张素 II 长期作用的心肌组织中,已经鉴别出表达 I 型胶原的 CD34/CD35 阳性的成纤维细胞,并且这些成纤维细胞在一定程度上增加了血管紧张素 II 依赖的 TGF- β 1 和 I、III 型胶原。其中,Smad2 作用和纤维化基因转录使 P38 活性长期维持。而 P38 的药物拮抗剂能够阻断非依赖信号通路的心肌成纤维细胞

向血管紧张素 II 介导的肌成纤维细胞的转化。总之,血管紧张素 II 信号主要通过两条不同路径触发成纤维细胞活化: TGF- β 1 基因表达的增强和 Smads 依赖及 Smads 非依赖信号通路的激活;直接激活丝裂酶原激酶-血清反应因子信号通路^[15]。

3. 内皮素 1 信号途径

内皮素 1 是一种潜在的生物活性肽,在不同的心脏损伤过程中产生。它影响伤口的愈合和纤维化反应,在其他组织中也可以观察到。内皮素 1 是成纤维细胞收缩、创伤愈合、皮肤和肺的疤痕结构的必要介质。在体外,内皮素 1 能够促进大部分心肌成纤维细胞中肌成纤维细胞的形成。用内皮素受体拮抗剂——波生坦预处理肺成纤维细胞,在一定程度上可以阻断 TGF- β 介导的肌成纤维细胞基因表达和收缩胶原凝胶基质的性能。这提示内皮素 1 能够与 TGF- β 起作用进而引起肌成纤维细胞转化^[16]。

4. 血清反应因子(SRF)-转录活性蛋白因子-Rho 蛋白-三磷酸鸟苷激酶途径

SRF 是包含 MADS 盒的转录因子家族成员之一,可以与称作 CArG 盒子 [CC (AT6) GG] 的 DNA 连接。SRF 必须与辅助因子结合以增强转录效力。基质中肌成纤维细胞或平滑肌细胞的分化以及效能基因的催化剂增加了 SRF 结合位点,例如, α -SMA 基因的催化剂含有多种与 CArG 保持连接的成分。一部分基因主要与平滑肌分化有关,其中包括在调控区域的 SRF 连接点;另一部分则是促成肌成纤维细胞收缩表型的基础。在体实验中,将 SRF 从成纤维细胞中去除,可以增强损伤组织中肌成纤维细胞 SRF 基因的表达;而 SRF 的过度表达,则促进肌成纤维细胞形成^[14]。而在鼠溃疡模型中,反义 SRF 核苷酸阻断肌成纤维细胞形成。体外实验中这些结论已被证实,因为仅 SRF 过度表达就可使心肌、食道和肺部的成纤维细胞转化为肌成纤维细胞。研究显示,腺病毒的一个短发夹 RNA 的过度表达导致 SRF 完全被 TGF- β 和血管紧张素介导的肌成纤维细胞所限制。因此,SRF 已成为肌成纤维细胞基因表达过程中的重要介质。

SRF 的转录作用主要通过转录活性蛋白因子家族调控。首先,细胞质中的肌动蛋白聚合导致 G-肌动蛋白水平下降以及转录活性蛋白因子被释放并转移到细胞核,之后在细胞核内连接 SRF 引起目标基因的转录。腺病毒介导的转录活性蛋白因子-A 过度表达使心肌成纤维细胞转化为肌成纤维细

胞^[17]。此外,转录活性蛋白因子-SRF 信号模型提供了成纤维细胞的细胞骨架系统各方面的重要反馈,而且在张力测量中起作用,对触发和维持肌成纤维细胞的转化必不可少。肌成纤维细胞可以形成肌动蛋白细胞骨架,分泌大量的细胞外基质成分。肌动蛋白细胞骨架参与细胞的收缩、细胞外基质的重构以及相关基因转录与翻译的调控,促进肌成纤维细胞的分化及组织的纤维化过程^[18]。

Rho 蛋白、三磷酸鸟苷激酶在细胞骨架重组调控方面也具有重要作用。Rho 蛋白 A 信号通路由一些细胞配体激活,产生的 Rho 蛋白 A 链接酶或 mDia 直接影响肌动蛋白活性和细胞骨架的重组,进而引起细胞移动粘附和细胞收缩。成纤维细胞 TGF- β 被催化的同时,激活 Rho 蛋白信号通道以及其他途径。TGF- β 介导的成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,Smads 依赖和非依赖的 TGF- β 信号的多阶段/多途径激活,以及早期引起 ECM 和平滑肌收缩基因的转录,Rho 蛋白-转录活性蛋白因子-途径是终末阶段的一部分,能够协助这种收缩并改变肌成纤维细胞的表型。

5. 瞬时受体电位通道途径

目前,瞬时受体电位通道是肌成纤维细胞分化的重要催化剂。当增强肌成纤维细胞的基因表达和功能,进而收缩胶原蛋白基质并限制肌成纤维细胞分化的时候,各种成纤维细胞中腺病毒瞬时受体电位阳离子通道 6 的过度表达可使肌成纤维细胞分化。说明肌成纤维细胞分化过程中瞬时受体电位阳离子通道 6 的功能与 Smads 非依赖的 TGF- β -P38-SRF 信号通路相关,而且 SRF 直接与瞬时受体电位阳离子通道 6 激动剂连接能够引起伴有 TGF- β 活化的 SRF 表达。与瞬时受体电位阳离子通道 6 感应相联系的直接效应是加强钙离子内流。多数瞬时受体电位通道允许钙离子和钠离子内流,并通过各种配体和机械牵拉被激活。钙离子可能是调控肌成纤维细胞分化和功能的另一个要点。此外,即使 SRF 缺失 ACnA 和瞬时受体电位阳离子通道 6 也能引起肌成纤维细胞的分化。这样,一个新的信号组件加到了我们所了解的瞬时受体电位阳离子通道-Ca⁺-钙调磷酸酶-NTAT 途径和以肌成纤维细胞分化和功能为基础的环形网络中。

6. 机械转录偶联途径

纤维化重塑使组织硬度增加,这种组织硬度的增加对心脏功能有负面影响。降低组织顺应性可以增强组织的纤维化反应。成纤维细胞和肌成纤维细

胞对其所处的机械微环境具有高度敏感性, 基质张力越高肌成纤维细胞越易于分化。成纤维细胞和肌成纤维细胞本身可以合成和分泌 TGF- β 1。当 TGF- β 1 在含有相关延迟肽的 ECM 中时, 有活性的 TGF- β 可以通过蛋白裂解被释放, 也可以通过降低 TGF- β 张力被释放。增加 ECM 的硬度和 α -SMA 的收缩可以提供足够张力去激活 TGF- β 介导的纤维化重塑, 张力介导的活化的 TGF- β 作用可以解释肌成纤维细胞表型阳性的 TGF- β 非依赖机械活性的现象, 即围绕肌钙蛋白细胞骨架物理连接而粘附, 然后感应机械牵拉激活 Rho 蛋白-转录活性蛋白因子-SRF^[19]。细胞骨架和它的收缩性在调节肌成纤维细胞基因程序中起关键作用。

四、小 结

肌成纤维细胞在损伤愈合和稳定组织的重构中发挥重要作用。通过自我增强的分子信号途径使肌成纤维细胞持续存在, 进而形成组织纤维化。一旦肌成纤维细胞的调节失控形成恶性循环, 即通过持续反复基质硬化和神经内分泌信号激活, 将难以使这些细胞去分化回静态成纤维细胞。肌成纤维细胞的来源广泛, 分化、作用及调节机制等都十分复杂, 需要进行更多研究和实验去发现和证实。

参 考 文 献

- [1] Fraccarollo D, Galuppo P, Neuser J, Bauersachs J, Widder JD. Pentaerythritol tetranitrate targeting myocardial reactive oxygen species production improves left ventricular remodeling and function in rats with ischemic heart failure. *Hypertension*, 2015, 66 (5): 978-987.
- [2] Frangogiannis NG. Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts. *Discoveries (Craiova)*, 2015, 3 (1): e41.
- [3] Zhang Y, Wang J, Li H, Yuan L, Wang L, Wu B, Ge J. Hydrogen sulfide suppresses transforming growth factor- β 1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Sci China Life Sci*, 2015, 58 (11): 1126-1134.
- [4] Yong KW, Li Y, Huang G, Lu TJ, Safwani WK, Pingguan-Murphy B, Xu F. Mechanoregulation of cardiac myofibroblast differentiation: implications for cardiac fibrosis and therapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309 (4): H532-H542.
- [5] Syvstonyuk DA, Ngu JM, Mewhort HE, Lipon BD, Teng G, Guzzardi DG, Malik G, Belke DD, Fedak PW. Fibroblast growth factor-2 regulates human cardiac myofibroblast-mediated extracellular matrix remodeling. *J Transl Med*, 2015, 13: 147.
- [6] Schroer AK, Merryman WD. Mechanobiology of myofibroblast adhesion in fibrotic cardiac disease. *J Cell Sci*, 2015, 128 (10): 1865-1875.

- [7] Roche PL, Filomeno KL, Bagchi RA, Czubryt MP. Intracellular signaling of cardiac fibroblasts. *Compr Physiol*, 2015, 5 (2): 721-760.
- [8] MacLean J, Pasumarthi KB. Signaling mechanisms regulating fibroblast activation, phenocconversion and fibrosis in the heart. *Indian J Biochem Biophys*, 2014, 51 (6): 476-482.
- [9] 王晖, 但自力. 转化生长因子- β 、结缔组织生长因子、基质金属蛋白酶及其抑制物与肝纤维化. *新医学*, 2009, 40 (3): 203-205.
- [10] Hundae A, McCullough PA. Cardiac and renal fibrosis in chronic cardiorenal syndromes. *Nephron Clin Pract*, 2014, 127 (1-4): 106-112.
- [11] Daskalopoulos EP, Janssen BJ, Blankesteyn WM. Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. *Microsc Microanal*, 2012, 18 (1): 35-49.
- [12] 蒋洪强, 张金国. 黄芩甲苷抑制慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化和转化生长因子 β 1 的表达. *新医学*, 2016, 47 (1): 27-33.
- [13] Morissette R, Merke DP, McDonnell NB. Transforming growth factor- β (TGF- β) pathway abnormalities in tenascin-X deficiency associated with CAH-X syndrome. *Eur J Med Genet*, 2014, 57 (2-3): 95-102.
- [14] Crawford JR, Haudek SB, Cieslik KA, Trial J, Entman ML. Origin of developmental precursors dictates the pathophysiologic role of cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012, 5 (6): 749-759.
- [15] Liu JJ, Huang N, Lu Y, Zhao M, Yu XJ, Yang Y, Yang YH, Zang WJ. Improving vagal activity ameliorates cardiac fibrosis induced by angiotensin II: in vivo and in vitro. *Sci Rep*, 2015, 5: 17108.
- [16] Mayyas F, Niebauer M, Zurick A, Barnard J, Gillinov AM, Chung MK, Van Wagoner DR. Association of left atrial endothelin-1 with atrial rhythm, size, and fibrosis in patients with structural heart disease. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2010, 3 (4): 369-379.
- [17] Angelini A, Li Z, Mericskay M, Decaux JF. Regulation of connective tissue growth factor and cardiac fibrosis by an SRF/MicroRNA-133a axis. *PLoS One*, 2015, 10 (10): e0139858.
- [18] Suzuki T, Akasaka Y, Namiki A, Ito K, Ishikawa Y, Yamazaki J, Ishii T. Basic fibroblast growth factor inhibits ventricular remodeling in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *J Hypertens*, 2008, 26 (12): 2436-2444.
- [19] Blyszczuk P, Müller-Edenborn B, Valenta T, Osto E, Stellato M, Behnke S, Glatz K, Basler K, Lüscher TF, Distler O, Eriksson U, Kania G. Transforming growth factor- β -dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis. *Eur Heart J*, 2016 Apr 20. pii: ehw116. [Epub ahead of print]

(收稿日期: 2016-10-06)

(本文编辑: 杨江瑜)