评述

心肌干细胞与心脏再生的研究进展及展望

何灵娟, 周斌*

中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031

* 联系人, E-mail: zhoubin@sibs.ac.cn

收稿日期: 2020-03-13; 接受日期: 2020-07-09; 网络版发表日期: 2020-09-24

摘要 以心肌梗死为代表的心血管疾病是目前世界上的主要致死疾病, 它是由于心脏的主要功能细胞——心肌细胞的大量死亡造成的, 因此如何再生心肌细胞从而促进心脏再生是心脏领域急需解决的一个重要科学问题. 寻找能够分化形成心肌细胞的干细胞——心肌干细胞来再生心脏成为近20年来研究的热点问题. 近年来, 多种类型的干细胞, 如c-Kit⁺, Sca1⁺, Abcg2⁺, Bmi1⁺等干细胞被报道是内源性的成体心肌干细胞, 其中以“c-Kit⁺心肌干细胞”的相关研究最为广泛, 众多基础研究和临床试验纷纷展开. 然而近年来, 随着体内遗传谱系示踪技术的发展, 越来越多的实验结果表明, 成年哺乳动物心脏缺乏具有生物学意义的内源性心肌干细胞. 本文主要介绍了成体心肌干细胞的相关研究, 并展望了今后心脏再生策略的发展方向.

关键词 心力衰竭, 心脏再生, 心肌干细胞, c-Kit⁺细胞, 遗传谱系示踪

心肌梗死等心血管疾病是世界范围内影响最为广泛的疾病^[1], 在冠状动脉阻塞后, 心肌细胞的缺血性死亡在数小时内开始, 由于死亡心肌细胞基本不能再生, 心肌细胞大量死亡后最终会导致心脏严重受损甚至发生心力衰竭^[2,3]. 尽管目前在急性心肌梗死等疾病的治疗方面已经取得了长足的进步, 但目前心力衰竭仍然非常常见^[4,5], 由于目前用于预防或延迟心力衰竭进展的疗法非常有限, 因此找到新的疗法来治疗心血管疾病降低心力衰竭的发病率尤为迫切和重要. 通过诱导产生新的心肌细胞来再生心脏无疑是对抗心力衰竭的理想策略, 但是成体心脏是体内最难再生的器官之一, 所以促进心脏再生的研究无比艰难. 不过, 心脏再生在两栖类和鱼类中广泛存在^[6,7], 并且哺乳动物, 如小鼠在发育和新生时期也具有再生心脏的能力^[8,9], 此外,

成体哺乳动物中也存在器官再生现象, 如肝脏再生^[10]. 因此, 寻找促进成体哺乳动物心脏再生的方法一直是科学家们不断追寻的目标.

迄今为止, 针对心脏再生的基础研究和临床试验主要基于细胞疗法, 包括骨髓来源的细胞、间充质干细胞和内源性的心肌干细胞^[11,12], 其中最为著名且影响深远的就是Anversa团队^[13,14]于2001开始的c-Kit⁺骨髓干细胞和心肌干细胞的相关研究. c-Kit⁺干细胞被报道后即刻引起了领域内大量的追随研究, 并且相关临床试验也随即展开, 使患者、医生和科学家们对心脏再生的未来充满希望^[15-17]. 然而, 尽管多年来这些临床试验的安全性已经得到保证, 但是其对心脏功能的改善能力非常微弱甚至没有, 经过数十项临床研究或试验以及近20年的大部分无效工作后^[18-25], 公众对这

引用格式: 何灵娟, 周斌. 心肌干细胞与心脏再生的研究进展及展望. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 12-25

He L J, Zhou B. Progress and prospect of research on cardiac stem cells and heart regeneration (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 12-25, doi: 10.1360/SSV-2020-0087

一领域的信心逐渐下降,也使得全球数百万终末期心脏病患者的希望破灭. 尽管基于c-Kit⁺等干细胞的临床试验一直在如火如荼地进行,但是有关争议也一直存在,尤其是随着近些年来体内遗传谱系示踪技术的发展^[26,27],越来越多实验表明, c-Kit⁺细胞不具有再生心肌细胞的能力. 本文将主要对近20年来心肌干细胞相关研究进行回顾梳理,并探讨分析心脏再生领域的未来发展方向.

1 c-Kit⁺心肌干细胞研究进展

1.1 骨髓来源的c-Kit⁺细胞相关研究

一直以来,成年心脏被认为是哺乳动物体内最不易再生的器官之一,这一观点基于几个世纪的临床和实验观察. 在20世纪90年代后期, Anversa团队开始挑战这一传统观点,假定心脏是一个可以自我更新的器官. 2001年,他们发表了第一篇c-Kit⁺细胞再生心脏的文章^[13],并引起了巨大轰动. 该研究报道了来自骨髓的一群c-Kit⁺干细胞具有分化形成包括心肌细胞在内的多种心脏细胞谱系的能力,从而促进心脏再生. 当从小鼠骨髓中分离出这群c-Kit⁺干细胞,并将其移植到心梗后的小鼠心脏后,心脏梗死区域发生了明显的心肌再生,移植仅9天后,再生的心肌细胞就已经占据了梗死区域约68%. 为了研究这群c-Kit⁺干细胞是否通过直接分化的方式转变成成为心肌细胞,他们从全身表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的雄性小鼠骨髓中分离出c-Kit⁺干细胞,将其移植到不带荧光标记的雌性小鼠心梗后的心脏内,发现梗死区新形成的心肌细胞表达GFP,并且含有Y染色体,表明新形成的心肌细胞来源于骨髓移植的c-Kit⁺干细胞的分化. 此外,他们发现, c-Kit⁺干细胞同时也分化形成了心脏中另外两个非常重要的细胞谱系——血管内皮细胞和平滑肌细胞^[13]. 随后,他们发现,通过注射相关细胞因子动员骨髓细胞迁移到心脏梗死区域可以极大促进心肌细胞的再生,取得了与上述骨髓移植相似的效果^[28].

为了研究人类心脏是否也具有再生潜能,他们在进行动物实验的同时也进行着人类心脏再生能力的相关研究. 他们选取了13个死于心肌梗死病人的心脏组织,检测到梗死边缘区组织约4%的心肌细胞表达有

丝分裂的标记基因*Ki67*, 梗死组织远端区域也检测到了约1%增殖的心肌细胞,证明人类心脏中存在着高水平的增殖心肌细胞^[29]. 随后,他们在人心脏移植的组织中检测到了供体与受体的嵌合组织^[30],该研究检测了多个经过心脏移植手术的心脏组织,这些移植的心脏受体均为男性,供体为女性. 在这些移植的心脏内,7%~10%的心肌细胞和血管含有Y染色体,并且具有高增殖能力,并且c-Kit, MDR1和Sca-1等干细胞标记基因的细胞在移植的心脏内显著增加,其中很多含有Y染色体. 上述实验结果提示了在人类移植心脏中,干细胞可以从受体迁移到来自供体的移植心脏并引起高水平的嵌合状态,即干细胞再生心脏在人类心脏中同样存在.

Anversa团队的发现在当时无疑具有划时代的意义,如果骨髓中c-Kit⁺干细胞确实具有强大的再生心脏的能力,那么将极大地推动心梗疾病的临床治疗. 因此,骨髓移植来源的c-Kit⁺心肌干细胞研究一经报道,众多科学家纷纷开始追随并进行相关研究,并且这一领域研究迅速转移到临床,并且进行了一系列的临床试验^[31-34]. 然而,随后其他实验室的研究却很难重复出Anversa团队的几项原始实验结果.

2004年, *Nature*杂志同时发表了来自Field和Robbins两个团队^[18,19]有关c-Kit⁺干细胞的论文,两个实验室的研究结果均表明,来自骨髓的c-Kit⁺干细胞根本无法分化形成心肌细胞促进心脏再生. 上述两项研究也均采用了带有荧光标记的小鼠作为骨髓移植c-Kit⁺干细胞的供体,采用了与Anversa团队同样的移植策略,然而他们并没有发现心梗后的心脏经过骨髓移植后能够发生心肌再生,更没有发现c-Kit⁺干细胞能够分化形成心肌细胞,移植后c-Kit⁺细胞在心脏中主要分化形成了各种血细胞谱系. 这两项研究结果直接否定了骨髓中c-Kit⁺干细胞促进心脏再生的观点. 同年,其他实验室也报道了骨髓来源的造血细胞不是通过转分化形成心肌细胞,而是通过与心肌细胞融合形成少量心肌细胞^[20,35]. 随后的研究进一步证实,骨髓来源的造血细胞通过分泌促血管新生因子修复心脏,而不是形成心肌细胞^[36,37].

综上,多个实验室的研究表明,骨髓来源的c-Kit⁺细胞并不具有分化形成心肌细胞的能力,不能促进心脏再生. 骨髓来源的c-Kit⁺干细胞的相关研究如图1所示.

图 1 c-Kit⁺和Sca-1⁺心肌干细胞相关研究进展。图中总结了骨髓来源的c-Kit⁺干细胞、心脏内源性的c-Kit⁺心肌干细胞和Sca-1⁺心肌干细胞的相关研究进展。浅色背景部分代表支持相关干细胞是心肌干细胞，深色背景部分代表反对相关干细胞是心肌干细胞

Figure 1 Research progress of c-Kit⁺ and Sca-1⁺ cardiac stem cells (CSCs). This figure illustrates the research progress c-Kit⁺ bone marrow cells, c-Kit⁺ CSCs, and Sca-1⁺ CSCs. Light colored background indicates those studies supporting CSCs, while dark colored background indicates those studies refuting CSCs

1.2 心脏内源性c-Kit⁺心肌干细胞的相关研究

尽管骨髓中c-Kit⁺干细胞促进心脏再生的这一观点已经被否定，Anversa团队并没有停止对c-Kit⁺干细胞促进心脏再生的相关研究。在大家纷纷追随他们研究骨髓中c-Kit⁺干细胞的同时，他们又开启了另外一项相关研究：成体心脏中的c-Kit⁺干细胞促进心脏再生，相关研究成果于2003年发表在*Cell*杂志上^[14]。在该项研究中，他们利用大鼠为实验动物模型，发现成体心脏本身存在一群c-Kit⁺干细胞，并且这些细胞在体外是可以无限扩增的，并具有向多个细胞谱系分化的潜能。他们将这群心脏c-Kit⁺干细胞分离富集后，在体外通过

逆转录病毒载体使其标记上GFP，然后将其注射到心肌梗后的大鼠心肌梗死边缘区，10天后就检测到了新生成的心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞，20天后，新生成的心肌细胞已经覆盖了整个梗死区。绝大部分新生成的细胞均带有绿色荧光标记，证明其来自于注射的c-Kit⁺干细胞的分化^[14]，另外，通过主动脉注入c-Kit⁺干细胞同样证明其可以分化形成心肌细胞修复心肌梗损伤的心脏^[38]。Anversa团队^[39-41]随后又证明小鼠、狗和人的成体心脏c-Kit⁺干细胞具有分化成为心肌细胞促进心脏再生的能力。

心脏内c-Kit⁺心肌干细胞研究被报道后，相关研究和临床试验也迅速开展起来，其中非常著名的一项临

床试验由Bolli团队与Anversa团队^[42]合作完成,他们向慢性缺血性心力衰竭患者心脏输送心脏c-Kit⁺干细胞,并报道称治疗组具有良好的安全性,且心脏功能得到了显著改善,不过这些结果的准确性现在已经受到了质疑.在接下来的多年里,多个研究组的研究难以证实心脏c-Kit⁺细胞的干性. Menasché团队^[43]报道,心力衰竭病人的心脏内的c-Kit⁺细胞实际上是肥大细胞,并非干细胞.

2009年, Bergmann等人^[44,45]将冷战时期核弹试验释放到大气中的¹⁴C整合到人类DNA中来计算人类心肌细胞的更新速率. 研究表明,成体心脏每年都在发生心肌细胞的更新,更新速率随着年龄的增长逐渐降低,由25岁时每年更新约1%降低到75岁时每年更新约0.45%. 上述结果说明,人类成体心脏是能够产生新的心肌细胞的,只是这种新形成的心肌细胞究竟来源于心肌细胞的自我增殖还是干细胞的分化仍不清楚. 2013年, Lee团队^[46]通过¹⁵N同位素标记,证明成体小鼠心肌细胞在生理稳态状态下存在着较低的更新速率,约1%每年,并且随着年龄的增长更新速率逐渐降低,这一结果与20年前Field团队^[47,48]的研究结果一致. 通过进一步的体内遗传示踪实验,他们发现,在生理稳态和心梗后新形成的心肌细胞主要源于原来已经存在的心肌细胞的自我增殖,而非干细胞的分化^[46],该研究与Anversa团队的研究结果相矛盾. 该研究所采用的方法是将心肌细胞标记上荧光蛋白,通过损伤前后心肌细胞的标记百分比变化来判断是否有其他细胞转分化形成心肌细胞. 如果损伤前后心肌细胞的标记百分比没有发生变化,证明新形成的心肌细胞来源于原来已经存在的心肌细胞的自我增殖;如果心肌细胞的标记百分比降低,则说明存在没有被荧光标记的其他类型的细胞转分化形成了新的心肌细胞^[46]. 不过如果存在非常少量的其他类型细胞转分化形成心肌细胞,用这种方法可能无法检测到.

随着技术的发展,遗传谱系示踪技术逐渐成为研究体内细胞命运转变的有力工具^[26,27]. 遗传谱系示踪技术主要基于Cre-loxP同源重组酶系统,该技术主要包含两个部分,一部分是在组织或细胞特异性启动子的控制下表达的Cre重组酶,另一部分是含有荧光蛋白(如GFP)的报告基因,报告基因前面含有loxP-STOP-loxP序列. Cre能够特异性识别loxP位点,并将其中间的STOP序列切除,从而激活后面报告基因的表达,由

于这个切除是在基因组水平上的,因而是永久性的且不可逆的,这样表达Cre的细胞及其所有后代都将被报告基因标记上. 目前常用的遗传谱系示踪技术是可诱导性的遗传谱系示踪,在这个系统中, Cre与人类雌激素受体(estrogen receptor, ER)融合形成CreER融合蛋白. 一般情况下, CreER与热休克蛋白HSP90结合停留在细胞质中无法入核,只有在他莫昔芬存在的情况下, CreER才能从HSP90上释放下来进入细胞核,发生Cre-loxP同源重组系统反应,激活报告基因的表达,标记细胞. 由于可诱导性的遗传谱系示踪技术受他莫昔芬的控制,因而具有一定的时空可控性^[26,27].

基于心脏内源性c-Kit⁺细胞的研究存在的争议, Nadal-Ginard(曾是Anversa研究团队成员,参与了骨髓来源以及心脏内源性的c-Kit⁺干细胞的相关工作)和 Torella团队^[49]利用遗传谱系示踪技术再次评估了心脏内源性c-Kit⁺细胞是否为心肌干细胞. 在该研究中他们使用了去甲肾上腺素损伤心脏的模型,发现在心脏损伤后,心脏中大量c-Kit⁺干细胞被激活并发生增殖. 同样利用与Lee团队类似的标记心肌细胞的实验,他们却发现心肌细胞的标记百分比在损伤后降低了,说明有其他类型的细胞转分化形成了心肌细胞. 随后,他们将带有c-Kit-Cre(利用一部分c-Kit启动子驱动Cre)载体的慢病毒打入带有黄色荧光蛋白YFP的报告基因小鼠心脏中,将心脏中的c-Kit⁺干细胞标记上YFP,在心脏损伤后观察这群被YFP标记的c-Kit⁺干细胞的细胞命运,他们发现,损伤后新形成的心肌细胞有约9.5%的心肌细胞为YFP阳性,这些YFP阳性的心肌细胞来源于c-Kit⁺心脏干细胞. 此外,他们发现,如果将c-Kit⁺心脏干细胞清除掉,将会严重阻碍心肌细胞的再生.

上述研究结果再次将心脏c-Kit⁺干细胞的研究置于争议之中^[50-52],需要更为直接的体内遗传证据用来证明心脏c-Kit⁺干细胞是否能够再生心肌细胞. 随后, Molkenin团队^[21]于2014年在*Nature*杂志上发表了在该领域内具有极大影响的一篇文章,他们利用直接的体内遗传工具证明了内源性的成体心脏c-Kit⁺细胞极少地贡献了心肌细胞的再生(<0.008%),对于心脏再生基本没有实质上的意义. 该研究利用c-Kit-Cre和c-Kit-MerCreMer的基因敲入小鼠对c-Kit⁺干细胞进行了直接的遗传谱系示踪分析,在成体心脏生理稳态和心脏损伤后追踪了c-Kit⁺细胞的命运,该研究方法首次为成体心脏c-Kit⁺干细胞是否具有心肌再生的能力提供了

直接的体内遗传证据。随后另外两个独立的实验室分别利用体内的遗传示踪工具得到了与Molkentin实验室类似的结果^[22,23]。

此外, c-Kit还被发现本身会表达在少量的心肌细胞中^[22,23], 上述体内遗传示踪实验所标记的c-Kit⁺细胞既包括非心肌细胞中的c-Kit⁺细胞(里面包含所谓c-Kit⁺心肌干细胞), 也包括心肌细胞中的c-Kit⁺细胞。因此, 上述实验结果看到的<0.008% c-Kit⁺细胞贡献的心肌细胞, 既有可能来源于非心肌细胞中c-Kit⁺细胞, 也有可能来源于心肌细胞中的c-Kit⁺细胞。为了解决这一问题, 基于Cre-loxP和Dre-rox双同源重组系统的一种新的遗传谱系示踪技术——DeaLT被开发出来, 实现了对非心肌细胞中c-Kit⁺细胞的特异性示踪。通过在成体心脏生理稳态和损伤后追踪非心肌细胞中的c-Kit⁺细胞的命运, 研究人员发现, 成体心脏中非心肌细胞中的c-Kit⁺细胞并不会贡献到心脏心肌细胞的形成, 不能促进心脏再生^[53,54]。

至此, 上述几个独立实验室的研究成果已经充分证明Anversa实验室提出的c-Kit⁺心肌干细胞根本不具有分化形成心肌细胞促进心脏再生的能力。然而, 最近, Nadal-Ginard和Torella团队^[55]又在*Nature*杂志上针对Molkentin团队2014年的*Nature*文章发表了一篇反驳性文章, 该文章反驳的点主要有两点: (i) 他们认为, 上述有关c-Kit的体内示踪实验所用的体内遗传示踪工具c-Kit-MerCreMer或c-Kit-CreER存在标记效率问题, 即这些体内示踪工具根本没有充分标记上c-Kit⁺心肌干细胞, 因此才很难得到阳性结果; (ii) 上述遗传工具均是将外源的MerCreMer或CreER敲入到了内源性c-Kit基因位点的启动子后面, 因此c-Kit有一个等位基因相当于被敲除, 只剩下一个有功能的c-Kit等位基因, 这样可能会损害c-Kit⁺细胞向心肌细胞分化的能力。随后, Sussman团队^[56]报道了c-Kit调控心脏干细胞及心肌细胞的存活及功能, 认为以前用于研究c-Kit⁺干细胞的基因敲入小鼠存在缺陷^[57]。

近期, 用于追踪c-Kit⁺细胞的新示踪工具被开发出来^[58], 该工具利用组成性的Cre代替诱导性的CreER或MerCreMer, 并将其插在了c-Kit基因最后一个外显子后面, 这样既达到了高效率的标记, 又保留了c-Kit基因功能的完整性。由于c-Kit除了表达在非心肌中的干细胞中, 还表达在少量的心肌细胞中, 为了特异性地追踪非心肌细胞中c-Kit⁺细胞的命运, 该研究引入了基

于Cre-loxP和Dre-rox的双同源重组遗传谱系示踪新技术, 将心肌细胞和非心肌细胞中的c-Kit⁺细胞分别做了不同的遗传标记, 成功地实现了对非心肌细胞中c-Kit⁺细胞进行特异性标记。利用该新建立的工具进行的遗传谱系示踪实验表明, c-Kit⁺细胞在心脏损伤修复过程中并不会分化形成心肌细胞促进心脏再生^[58]。

综上, 经过多年的研究与争论, 心脏内源性的c-Kit⁺细胞并不是心肌干细胞, 不具有促进损伤后成体心脏再生的能力。心脏内源性的c-Kit⁺心肌干细胞的相关研究如图1所示。

2 Sca-1⁺心肌干细胞研究进展

除了c-Kit之外, Sca-1(stem cell antigen-1)是另外一个被广泛研究并被认为是心肌干细胞的一个标记基因。Sca-1是Ly-6基因家族的一个成员, 基因名称是Ly6a^[59], 广泛存在于骨髓中, Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺细胞被认为是原始的造血干细胞^[60], 因此Sca-1也是一个被广泛认知的成体干细胞的标记基因。除了在骨髓中, Sca-1已经被报道标记多个成体器官中的干细胞或祖细胞^[61-65]。在成体心脏中, Sca-1标记的细胞很早就被报道具有分化形成心肌细胞的能力^[66], 并且多年来, 有关Sca-1细胞心肌分化潜能的研究一直在进行。

2003年, Oh等人^[66]首先报道成体心脏中存在Sca-1⁺干细胞^[66]。他们从心脏非心肌细胞组分中分离出Sca-1⁺细胞并对其鉴定, 发现大部分Sca-1⁺细胞都表达CD31或其受体CD38, 并且发现心脏中的侧群细胞大部分(>93%)都表达Sca-1。侧群细胞被认为是成体组织中的一群干细胞, 主要基于其可以排出Hoechst 33342染料的能力鉴定^[67,68]。成体心脏中分离的Sca-1⁺细胞在体外通过分化诱导可以形成具有肌节结构的心肌细胞, 该过程依赖Bmpr1a^[66]。当将分离的心脏Sca-1⁺细胞通过尾静脉注射到心脏受损的小鼠体内时, 移植的Sca-1⁺细胞能够迁移到心脏损伤区^[66]。为了进一步鉴定Sca-1⁺阳性的细胞是否能够贡献心肌细胞的形成, Cre-loxP同源重组实验被引入, Sca-1⁺细胞从供体小鼠aMHC-Cre分离出, 移植到受体小鼠R26R(R26R-loxP-Neo-loxP-LacZ)中, 由于只有成熟的心肌细胞才会表达aMHC并激活其后面Cre的表达, 因此只有来源于供体Sca-1⁺细胞才能够检测到Cre的表达。如果Sca-1⁺细胞与受体细胞通过发生细胞融合作用形成心肌细胞,

来自供体的Cre将会切除来自受体报告基因*R26R*的*loxP*位点及其中间的Neo序列从而激活后面LacZ的表达; 如果Sca-1⁺细胞通过直接转分化作用形成心肌细胞, 新形成的心肌细胞中将只能检测到Cre的表达而检测不到*R26R*报告基因(通过检测Neo和lacZ). 该实验结果表明, 移植的Sca-1⁺细胞形成的心肌细胞中, 约有50%通过直接转分化形成, 其余50%通过与受体细胞发生细胞融合形成^[66]. 该项研究第一次鉴定出成体心脏中存在Sca-1⁺干细胞, 并发现其具有分化形成心肌细胞的能力. 随后, Komuro团队^[69]也在成体心脏中分离出了Sca-1⁺细胞, 并在体外将其分化诱导成为成熟的心肌细胞、骨细胞和脂肪细胞, 证明了其具有多能性.

Pfister等人^[70]证明成体心脏中的Sca-1⁺细胞具有异质性, 在他们的研究中, Sca-1⁺细胞主要分为Sca-1⁺/CD31⁺和Sca-1⁺/CD31⁻两群, Sca-1⁺/CD31⁻的那群细胞才是具有心肌分化潜能的干细胞, 在体外与心肌细胞一起培养能够分化形成成熟的心肌细胞. 随后, 有研究证明, 心梗后心脏中Sca-1⁺/CD31⁻的细胞明显增加, 将Sca-1⁺/CD31⁻的细胞移植到心梗小鼠心脏后, 可显著改善受损后的心脏功能, 促进血管新生^[71,72]. 最近, 有研究发现, 基于侧群细胞的特性以及PDGFRα和CD31的表达, 心脏Sca-1⁺细胞可以分为四个亚群, 其中PDGFRα⁺/CD31⁻/Sca-1⁺是具有多能细胞的干细胞群, 在体外可以诱导分化形成多个心脏细胞谱系, 包括心肌细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞, 移植到损伤心脏后可以显著改善心脏的结构和功能, 这群细胞在发育上主要起源于心脏心外膜细胞^[73]. 此外, 还有研究将心脏Sca-1⁺细胞分为CSH1和CSH2两群, CSH2那群Sca-1⁺细胞具有分化形成心肌细胞和改善心脏功能的能力^[74].

尽管移植Sca-1⁺细胞具有改善心脏功能的作用, 但其精确的机制还有待进一步研究. 有研究表明, 移植的Sca-1⁺细胞能够直接分化形成心肌细胞并分泌各种细胞因子包括sVCAM-1, sVCAM-1, 通过诱导内皮细胞和心脏祖细胞的迁移, 并通过激活Akt, ERK和p38 MAPK防止心肌细胞因氧化应激死亡. Sca-1⁺细胞可通过sVCAM-1/VLA-4信号通路介导心肌细胞的分化和旁分泌机制改善心肌梗塞后心脏功能^[75]. 另外, SDF-1α/CXCR4信号通路对于Sca-1⁺干细胞迁移到心脏受损区可能发挥着重要的作用^[72]. 不过, 尽管移植

的Sca-1⁺干细胞细胞能直接分化形成血管内皮细胞和心肌细胞, 但其改善心脏功能的作用似乎主要依赖于移植细胞对新血管形成和内心肌细胞功能的旁分泌效应^[71]. 另外, Sca-1本身对于维持心脏结构和功能具有重要的作用, Sca-1基因缺失可导致心肌结构和功能的异常^[76,77].

上述有关Sca-1⁺细胞具有心肌分化潜能研究主要基于体外细胞诱导分化和体内细胞移植实验, 缺乏体内直接的遗传证据. 2013年, Uchida等人^[78]首次利用体内遗传示踪技术研究了Sca-1细胞的命运, 该项研究利用了基于tet-off系统的遗传示踪技术将Sca-1⁺细胞进行遗传标记, 并在其生理稳态和不同心脏损伤后追踪其细胞命运, 发现Sca-1⁺细胞能够贡献形成心肌细胞和血管内皮细胞, 不过由于Sca-1本身就表达在大量血管内皮细胞中, 很难确定Sca-1⁺干细胞是否能够分化形成内皮细胞. 另外, 该研究发现, 尽管心脏中存在大量的Sca-1⁺细胞, 但只有一小部分Sca-1⁺细胞分化形成心肌细胞^[78].

不过, 最近来自5个独立实验室的研究否定了成体心脏内源性Sca-1⁺细胞的心肌分化潜能^[79-83]. 其中, 一项研究移植实验将心脏内源性的Sca-1⁺细胞移植到心梗损伤的心脏中, 并没有发现移植的Sca-1⁺细胞能够分化形成心肌细胞促进心脏再生^[83]. 另外4项研究分别利用各自实验室独立构建的基于Sca-1启动子驱动的条件性Cre小鼠(*Sca-1-2A-Cre*或者*Sca-1-MerCreMer*)进行了严格的遗传谱系示踪实验, 证明成体心脏内源性的Sca-1⁺细胞在成体心脏生理稳态和损伤修复过程中都基本不具有分化形成心肌细胞的能力, 而主要标记血管内皮细胞^[79-82]. 不过, 相比于一般的血管内皮细胞, Sca-1标记的血管内皮细胞在衰老和心脏损伤后具有更强的增殖能力^[79].

综上, 从目前的研究来看, 尽管Sca-1⁺细胞移植对受损心脏功能具有一定的改善能力, 其作用可能主要来自于其促进血管新生及心肌细胞功能的旁分泌效应, 心脏内源性的Sca-1⁺细胞不太可能具有直接分化形成心肌细胞的能力, 并非成体心肌干细胞. Sca-1⁺干细胞的相关研究如图1所示.

3 其他类型心肌干细胞研究进展

除了c-Kit和Sca-1阳性干细胞, 成体心脏中被报道

还存在其他类型的内源性干细胞/祖细胞, 如Abcg2, Isl1, Bmi1等阳性细胞以及心肌球样细胞团的干细胞等。

3.1 Abcg2⁺侧群细胞

如前所述, 成体组织中具有外排Hoechst 33342染料能力的侧群细胞(side population cell, SP cells)被认为是一群干细胞^[67,68]。2001年, Abcg2(又称为Bcrp1)首先被鉴定为是侧群细胞的分子标记, 是侧群细胞表型的重要决定因素, 可以作为各种来源的干细胞的标志物^[84]。随后, 成体心脏中被确定含有表达Abcg2的侧群细胞, Abcg2⁺侧群细胞在体外可以被诱导增殖并分化形成心肌细胞^[85]。将成体心脏中分离出的侧群细胞通过尾静脉注入心肌梗后的大鼠体内时, 这群细胞能够自主迁移至损伤区, 并且能够分化形成心肌细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞, 提示Abcg2⁺侧群细胞是成体心脏内的固有干细胞^[86]。不过, 基于Abcg2-CreER的遗传谱系示踪实验表明, Abcg2标记的细胞在胚胎时期具有多能性, 能够贡献形成心脏中的心肌细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞, 但是在成体心脏损伤后, Abcg2⁺细胞并不会贡献形成心肌细胞, 主要形成血管内皮细胞^[87,88]。因此, 体内遗传示踪的结果质疑了Abcg2⁺侧群细胞作为心脏内源性干细胞的特性。

综上, Abcg2⁺侧群细胞在成体心脏损伤后并不具有分化形成心肌细胞的能力, 主要贡献形成血管内皮细胞, 因此, 并不是成体心肌干细胞。

3.2 Isl1⁺心肌干细胞

Isl1标记发育过程中心脏第二心场的祖细胞, 在心脏发育过程中具有重要的作用, Isl1基因缺失导致心脏发育出现严重缺陷^[89]。在胚胎时期, Isl1标记的心脏祖细胞具有多能性, 能够贡献形成心肌细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞^[90,91]。有研究表明, 在出生后一周内, 小鼠心脏内仍能检测到少量的Isl1⁺细胞, 主要分布在心房和右心室, 这群细胞并不表达Sca-1和c-Kit, 也不具有侧群细胞的特性, 是一群独立的祖细胞群。当把这群Isl1⁺细胞分离出来以后, 与心肌细胞共培养, 可以分化形成成熟的心肌细胞, 提示Isl1⁺细胞群代表了出生后心脏内的一群心脏内源性的祖细胞^[92]。不过最近有报道指出, 在成体心脏中, Isl1主要分布在三个区域: 房间隔及肺静脉周围、大血管壁内侧以及右心房与上

腔静脉之间的区域, 这三个区域的Isl1⁺细胞分别表达副交感神经节、平滑肌细胞和窦房结起搏器的细胞标记, 代表了心脏中三种不同的已分化细胞群, 并非是干细胞群。在心肌梗损伤后, 梗死区检测不到Isl1⁺细胞, 提示在心脏损伤后Isl1⁺细胞不太可能发挥作用促进心脏损伤修复, 因此, Isl1⁺细胞并非成体心脏中内源性的祖细胞^[93]。

3.3 Bmi1⁺心肌干细胞

最近有研究报道Bmi1⁺细胞是成体心脏中内源性祖细胞^[94,95], 相关研究基于Bmi1-CreER;R26-YFP的遗传谱系示踪实验, 经他莫昔芬诱导后, Bmi1表达的细胞被YFP标记, 广泛地分布在心室和心房。YFP阳性的细胞被分离后, 可以在体外诱导分化形成血管内皮细胞和平滑肌细胞, 与新生大鼠心肌细胞共培养可以分化形成心肌细胞。另外, 成体小鼠在他莫昔芬诱导1年后, 出现了YFP⁺心肌细胞, 提示Bmi1⁺细胞贡献心脏生理稳态过程中心肌细胞的更新^[94]。另外, 在成体心脏发生心肌梗损伤后, YFP⁺细胞明显增多, 且发生了向心肌细胞的转分化^[95]。尽管上述研究结果表明Bmi1⁺细胞是心脏内源性的一群干细胞, 不过上述研究结果发现, 成体心脏中Bmi1⁺细胞是Sca-1⁺细胞的一个子细胞群, 然而目前有关Sca-1的体内遗传谱系示踪实验已经表明, 成体心脏Sca-1⁺细胞不会贡献心肌细胞的形成^[79-81], 因此, 有关Bmi1的体内遗传示踪实验可能需要重新验证, Bmi1是否是成体心脏中心肌祖细胞的标记基因还有待确认。

3.4 心肌球和心肌球源性干细胞

2004年, Messina等人^[96]报道从人的心脏活检标本以及小鼠心脏组织中分离出一种称之为心肌球(cardiospheres, CSs)的心脏干细胞, 心肌球是将人或小鼠等哺乳动物心脏组织经消化培养后获得的悬浮混合细胞团, 具有克隆性和长期自我更新的能力。心肌球中心表达c-Kit等干细胞标记, 外层是分化细胞层, 表达包括心肌细胞的特异性标记蛋白cTNT等在内的分化细胞标记。将心肌球细胞团异位(背侧皮下结缔组织)或原位(心肌梗死区)移植到小鼠体内后, 心肌球细胞团可以在小鼠体内分化形成心肌细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞。由于心肌球可从人心脏活检组织中获得, 利于发展同种自体或异体的干细胞移植, 因此具有重要

的临床应用前景.

心肌球来源的细胞(cardiosphere-derived cells, CDCs)是由心肌球细胞团在体外铺板扩增获得, 其特性与心肌球类似, 在体外与新生大鼠心肌细胞共培养时, 可分化形成心肌细胞, 当将其注射到小鼠、大鼠或猪的梗死心脏中时, 可分化形成心肌细胞、血管内皮细胞, 并改善心脏功能^[97~100]. 不过CSs或CDCs对受损心脏的改善功能可能很大程度上取决于其旁分泌作用^[98,101], 成年CSs和CDCs的培养基中含有很多生长因子, 在体外, CDCs的条件培养基对大鼠心肌细胞具有抗凋亡作用, 对人类脐静脉内皮细胞具有促血管生成的作用. 在体内, 人类CDCs移植到心肌梗小鼠中, 会分泌可以改善组织功能和促进组织再生的生长因子, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和类胰岛素生长因子(insulin-like growth factor 1, IGF1), CDCs移植到梗死组织周围, 可明显降低梗死区细胞凋亡率, 并增加毛细血管密度. CDCs移植对于心梗组织的改善作用, 其旁分泌作用可能大于其直接分化再生心肌的作用^[101]. 此外, CDCs移植已经进入一期临床试验, 结果显示, CDCs治疗的患者心脏损伤疤痕减少、存活心肌质量增加、心肌局部收缩力和局部收缩期壁增厚, 舒张末期和收缩末期容积以及左心室射血分数都没有改善^[102,103]. 不过该研究中每个组样本量都很小, 并且存在特殊的统计问题, 因此该临床试验的结果可能存在一定的问题^[104]. 尽管已经有多个研究证明CDCs移植对于心脏功能具有改善作用, 最近的一项研究却挑战了这个观点, 该研究发现, CDCs移植到梗死心脏后, 心脏疤痕组织没有减少, 心脏功能也没有任何改善^[105].

最近, 有研究报道, 将从新生大鼠中分离的CDCs移植到老年大鼠中具有抗衰老作用, 移植CDCs的老年大鼠心脏细胞中端粒更长, 心肌肥大和心肌纤维化程度都明显降低, 并且心脏功能得到了明显改善^[106]. 不过, 随后的一项研究却表明, 将年轻小鼠的CDCs移植到老年小鼠中, 并没有发现其心脏或全身系统功能改善^[107].

综上, CSs和CDCs似乎不太可能是心肌干细胞, 移植CDCs是否对心脏功能有所改善也都存在争议, 即便有所改善, 也可能是通过其旁分泌的作用而非作为心肌干细胞发挥功能.

4 新技术研究心脏中是否存在任何类型心肌干细胞

从目前的研究来看, 在心脏干细胞领域, 经报道的上述心肌干细胞研究都存在争议, 但是心脏中是否存在心肌干细胞仍然无法确定. 由于目前研究心肌干细胞的方法大都基于某一个干细胞标记, 如c-Kit, 一种标记的心肌干细胞被否定, 不代表不存在其他标记的心肌干细胞, 即便上述c-Kit, Sca-1和Abcg2等心肌干细胞已经全部被否定, 也无法确定心脏中是否还存在其他细胞标记的心肌干细胞, 而这是用传统的移植或示踪技术无法解决的问题. 为了研究心脏中是否存在其他类型的心肌干细胞, 一种标记所有非心肌细胞的技术被开发出来^[108], 该技术基于Cre-loxP和Dre-rox双同源重组系统^[53,54], 实现了不依赖于某一特定干细胞标记基因来标记所有非心肌细胞, 并对其进行体内的遗传示踪^[108]. 该研究发现, 在成体心脏生理稳态和损伤后, 所有被标记的非心肌细胞均不会贡献形成心肌细胞, 提示成体心脏中不存在心肌干细胞^[108,109]. 由于该项工作标记的非心肌细胞效率约为80%~90%, 没有达到100%, 因此, 也有可能心脏干细胞存在于那些未被标记的非心肌细胞中, 不过这种可能性是极小的, 因为用于驱动标记非心肌细胞工具的启动子是在所有细胞中广泛无差别表达的, 上述非心肌细胞标记不全是由于该遗传工具标记各种细胞的标记效率问题导致, 而且不太可能是刚好所有干细胞无法被标记上. 即便心肌干细胞存在于那些未被标记的细胞中, 它们对于心脏功能的改善也是极其有限的.

5 总结与展望

综上所述, 目前所有报道的有关成体心脏内源性的干细胞已经基本都被否定具有在体内直接分化形成心肌细胞的能力, 成体心脏中基本不存在内源性的心肌干细胞. 相关干细胞移植对于损伤后心脏的改善功能可能更多来源于移植细胞的旁分泌作用, 并且这种细胞移植所起的功效也并不显著. 所以, 有关促进心脏损伤再生的研究不应再集中于研究内源性的心肌干细胞, 而是应该寻找新的方向, 比如诱导胚胎干细胞或重编程iPS细胞分化形成心肌细胞, 或者寻找促进成体

心脏心肌细胞增殖的方法来促进心脏再生。

目前, 有关寻找促进成体心肌细胞增殖的方法促进心脏再生似乎是一个重要的研究方向。成年斑马鱼和新生期小鼠主要通过心肌细胞的增殖来保持心脏再生的能力^[9,110~113], 成年人和小鼠的心脏每年都在发生心肌细胞的更新, 尽管更新速率较低^[44~46], 成年小鼠中心肌细胞的更新已经被证实来源于心肌细胞的增殖^[46], 说明成体心肌细胞本身具有一定的增殖潜能。目前有研究表明, 通过过表达某些microRNA(如microRNA-199a)可以诱导成体心肌细胞的增殖^[114~118], 并且已在小鼠和猪体内证实了该方法对心梗损伤修复具有

一定的功效^[114,118], 不过过表达microRNA最终会导致大多数测试对象心源性猝死^[118], 所以目前该方法仍需进一步研究改进。此外, 有研究报道, 调控Hippo信号通路可以使心肌细胞重新进入细胞周期, 促进小鼠心脏再生^[119,120]。最近, 还有研究报道, 通过组合性过表达调控细胞周期的相关因子实现了诱导成体心肌细胞增殖, 使其重新进入细胞周期, 改善心肌梗死后心脏的功能^[121]。不过, 有关促进成体心肌细胞增殖的研究仍有漫长的路要走, 但不可否认, 成体心肌细胞仍然具有可被诱导增殖的潜能, 这或许也是今后有关促进心脏再生研究的一个努力方向。

参考文献

- Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet*, 2015, 385: 812–824
- Roger V L. Epidemiology of heart failure. *Circ Res*, 2013, 113: 646–659
- Cahill T J, Choudhury R P, Riley P R. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 699–717
- Velagaleti R S, Pencina M J, Murabito J M, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*, 2008, 118: 2057–2062
- Ezekowitz J A, Kaul P, Bakal J A, et al. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53: 13–20
- Poss K D, Wilson L G, Keating M T. Heart regeneration in zebrafish. *Science*, 2002, 298: 2188–2190
- Oberpriller J O, Oberpriller J C. Response of the adult newt ventricle to injury. *J Exp Zool*, 1974, 187: 249–259
- Sturzu A C, Rajarajan K, Passer D, et al. Fetal mammalian heart generates a robust compensatory response to cell loss. *Circulation*, 2015, 132: 109–121
- Porrello E R, Mahmoud A I, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, 2011, 331: 1078–1080
- Stanger B Z. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annu Rev Physiol*, 2015, 77: 179–200
- Kloner R A. Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction. *Circ Res*, 2013, 113: 451–463
- Nguyen P K, Rhee J W, Wu J C. Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016: A systematic review. *JAMA Cardiol*, 2016, 1: 831
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410: 701–705
- Beltrami A P, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003, 114: 763–776
- Cai C L, Molkentin J D. The elusive progenitor cell in cardiac regeneration: Slip Slidin' away. *Circ Res*, 2017, 120: 400–406
- Chien K R, Frisén J, Fritsche-Danielson R, et al. Regenerating the field of cardiovascular cell therapy. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 232–237
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 2006, 367: 113–121
- Murry C E, Soonpaa M H, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 2004, 428: 664–668
- Balsam L B, Wagers A J, Christensen J L, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 2004, 428: 668–673
- Nygren J M, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*, 2004, 10: 494–501
- van Berlo J H, Kanisicak O, Maillet M, et al. c-Kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*, 2014, 509: 337–341

- 22 Sultana N, Zhang L, Yan J, et al. Resident c-kit⁺ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun*, 2015, 6: 8701
- 23 Liu Q, Yang R, Huang X, et al. Genetic lineage tracing identifies in situ Kit-expressing cardiomyocytes. *Cell Res*, 2016, 26: 119–130
- 24 Nowbar A N, Mielewicz M, Karavassilis M, et al. Discrepancies in autologous bone marrow stem cell trials and enhancement of ejection fraction (DAMASCENE): weighted regression and meta-analysis. *BMJ*, 2014, 348: g2688
- 25 Wollert K C, Meyer G P, Müller-Ehmsen J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST-2 randomised placebo-controlled clinical trial. *Eur Heart J*, 2017, 38: 2936–2943
- 26 Kretzschmar K, Watt F M. Lineage tracing. *Cell*, 2012, 148: 33–45
- 27 Tian X, Pu W T, Zhou B. Cellular origin and developmental program of coronary angiogenesis. *Circ Res*, 2015, 116: 515–530
- 28 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10344–10349
- 29 Beltrami A P, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2001, 344: 1750–1757
- 30 Quaini F, Urbanek K, Beltrami A P, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, 2002, 346: 5–15
- 31 Strauer B E, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, 106: 1913–1918
- 32 Strauer B E, Brehm M, Zeus T, et al. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch med Wochenschr*, 2001, 126: 932–938
- 33 Wollert K C, Meyer G P, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 2004, 364: 141–148
- 34 Assmus B, Honold J, Schächinger V, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, 355: 1222–1232
- 35 Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo J M, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 2003, 425: 968–973
- 36 Fazel S, Cimini M, Chen L, et al. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest*, 2006, 116: 1865–1877
- 37 Chien K R. Lost and found: cardiac stem cell therapy revisited. *J Clin Invest*, 2006, 116: 1838–1840
- 38 Dawn B, Stein A B, Urbanek K, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3766–3771
- 39 Linke A, Müller P, Nurzynska D, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8966–8971
- 40 Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 14068–14073
- 41 Hosoda T, D'Amario D, Cabral-Da-Silva M C, et al. Clonality of mouse and human cardiomyogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 17169–17174
- 42 Bolli R, Chugh A R, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*, 2011, 378: 1847–1857
- 43 Pouly J, Bruneval P, Mandet C, et al. Cardiac stem cells in the real world. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135: 673–678
- 44 Bergmann O, Bhardwaj R D, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 2009, 324: 98–102
- 45 Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell*, 2015, 161: 1566–1575
- 46 Senyo S E, Steinhauser M L, Pizzimenti C L, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 2013, 493: 433–436
- 47 Soonpaa M H, Kim K K, Pajak L, et al. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol*, 1996, 271: H2183–H2189
- 48 Soonpaa M H, Field L J. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am J Physiol*, 1997, 272: H220–H226
- 49 Ellison G M, Vicinanza C, Smith A J, et al. Adult c-Kit^{pos} cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*, 2013, 154: 827–842
- 50 Molken J D, Houser S R. Are resident c-Kit⁺ cardiac stem cells really all that are needed to mend a broken heart? *Circ Res*, 2013, 113: 1037–

- 51 Nadal-Ginard B, Ellison G M, Torella D. Response to Molkentin's letter to the editor regarding article, "the absence of evidence is not evidence of absence: the pitfalls of Cre knock-ins in the c-kit locus". *Circ Res*, 2014, 115: e38–e39
- 52 Molkentin J D. Letter by Molkentin regarding article, "The absence of evidence is not evidence of absence: the pitfalls of Cre knock-ins in the c-Kit locus". *Circ Res*, 2014, 115: e21–3
- 53 He L, Li Y, Li Y, et al. Enhancing the precision of genetic lineage tracing using dual recombinases. *Nat Med*, 2017, 23: 1488–1498
- 54 He L, Li Y, Huang X, et al. Genetic lineage tracing of resident stem cells by DeaLT. *Nat Protoc*, 2018, 13: 2217–2246
- 55 Vicinanza C, Aquila I, Cianflone E, et al. Kitcre knock-in mice fail to fate-map cardiac stem cells. *Nature*, 2018, 555: E1–E5
- 56 Gude N A, Firouzi F, Broughton K M, et al. Cardiac c-Kit biology revealed by inducible transgenesis. *Circ Res*, 2018, 123: 57–72
- 57 Zhou B, Wu S M. Reassessment of c-Kit in cardiac cells. *Circ Res*, 2018, 123: 9–11
- 58 He L, Han M, Zhang Z, et al. Reassessment of c-Kit⁺ cells for cardiomyocyte contribution in adult heart. *Circulation*, 2019, 140: 164–166
- 59 van de Rijn M, Heimfeld S, Spangrude G J, et al. Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 4634–4638
- 60 Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, et al. *In vivo* and *in vitro* stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood*, 1992, 80: 3044–3050
- 61 Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, et al. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*, 2002, 159: 123–134
- 62 Welm B E, Tepera S B, Venezia T, et al. Sca-1^{pos} cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol*, 2002, 245: 42–56
- 63 Xin L, Lawson D A, Witte O N. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 6942–6947
- 64 McQualter J L, Brouard N, Williams B, et al. Endogenous fibroblastic progenitor cells in the adult mouse lung are highly enriched in the Sca-1 positive cell fraction. *Stem Cells*, 2009, 27: 623–633
- 65 Clayton E, Forbes S J. The isolation and *in vitro* expansion of hepatic Sca-1 progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381: 549–553
- 66 Oh H, Bradfute S B, Gallardo T D, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 12313–12318
- 67 Goodell M A, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med*, 1996, 183: 1797–1806
- 68 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland C D, et al. Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 1999, 401: 390–394
- 69 Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 2004, 279: 11384–11391
- 70 Pfister O, Mouquet F, Jain M, et al. CD31[−] but not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res*, 2005, 97: 52–61
- 71 Wang X, Hu Q, Nakamura Y, et al. The role of the Sca-1⁺/CD31[−] cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*, 2006, 24: 1779–1788
- 72 Liang S X, Tan T Y L, Gaudry L, et al. Differentiation and migration of Sca1⁺/CD31[−] cardiac side population cells in a murine myocardial ischemic model. *Int J Cardiol*, 2010, 138: 40–49
- 73 Nosedá M, Harada M, McSweeney S, et al. PDGFR α demarcates the cardiogenic clonogenic Sca1⁺ stem/progenitor cell in adult murine myocardium. *Nat Commun*, 2015, 6: 6930
- 74 Takamiya M, Haider K H, Ashraf M. Identification and characterization of a novel multipotent sub-population of Sca-1⁺ cardiac progenitor cells for myocardial regeneration. *PLoS ONE*, 2011, 6: e25265
- 75 Matsuura K, Honda A, Nagai T, et al. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119: 2204–2217
- 76 Tateishi K, Ashihara E, Takehara N, et al. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. *J Cell Sci*, 2007, 120: 1791–1800

- 77 Bailey B, Fransioli J, Gude N A, et al. Sca-1 knockout impairs myocardial and cardiac progenitor cell function. *Circ Res*, 2012, 111: 750–760
- 78 Uchida S, De Gaspari P, Kostin S, et al. Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Rep*, 2013, 1: 397–410
- 79 Vagnozzi R J, Sargent M A, Lin S C J, et al. Genetic lineage tracing of Sca-1⁺ cells reveals endothelial but not myogenic contribution to the murine heart. *Circulation*, 2018, 138: 2931–2939
- 80 Zhang L, Sultana N, Yan J, et al. Cardiac Sca-1⁺ cells are not intrinsic stem cells for myocardial development, renewal, and repair. *Circulation*, 2018, 138: 2919–2930
- 81 Tang J, Li Y, Huang X, et al. Fate mapping of Sca1⁺ cardiac progenitor cells in the adult mouse heart. *Circulation*, 2018, 138: 2967–2969
- 82 Neidig L E, Weinberger F, Palpant N J, et al. Evidence for minimal cardiogenic potential of stem cell antigen 1-positive cells in the adult mouse heart. *Circulation*, 2018, 138: 2960–2962
- 83 Soonpaa M H, Lafontant P J, Reuter S, et al. Absence of cardiomyocyte differentiation following transplantation of adult cardiac-resident Sca-1⁺ cells into infarcted mouse hearts. *Circulation*, 2018, 138: 2963–2966
- 84 Zhou S, Schuetz J D, Bunting K D, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 2001, 7: 1028–1034
- 85 Martin C M, Meeson A P, Robertson S M, et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol*, 2004, 265: 262–275
- 86 Oyama T, Nagai T, Wada H, et al. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Biol*, 2007, 176: 329–341
- 87 Maher T J, Ren Y, Li Q, et al. ATP-binding cassette transporter Abcg2 lineage contributes to the cardiac vasculature after oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306: H1610–H1618
- 88 Doyle M J, Maher T J, Li Q, et al. *Abcg2*-labeled cells contribute to different cell populations in the embryonic and adult heart. *Stem Cells Dev*, 2016, 25: 277–284
- 89 Cai C L, Liang X, Shi Y, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*, 2003, 5: 877–889
- 90 Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic *isl1*⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*, 2006, 127: 1151–1165
- 91 Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*, 2009, 460: 113–117
- 92 Laugwitz K L, Moretti A, Lam J, et al. Postnatal Isl1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 2005, 433: 647–653
- 93 Weinberger F, Mehrkens D, Friedrich F W, et al. Localization of Islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circ Res*, 2012, 110: 1303–1310
- 94 Valiente-Alandi I, Albo-Castellanos C, Herrero D, et al. Cardiac *Bmi1*⁺ cells contribute to myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 205
- 95 Valiente-Alandi I, Albo-Castellanos C, Herrero D, et al. *Bmi1*⁺ cardiac progenitor cells contribute to myocardial repair following acute injury. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 100
- 96 Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, 2004, 95: 911–921
- 97 Smith R R, Barile L, Cho H C, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*, 2007, 115: 896–908
- 98 Malliaras K, Li T S, Luthringer D, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation*, 2012, 125: 100–112
- 99 Malliaras K, Smith R R, Kanazawa H, et al. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. *Circulation*, 2013, 128: 2764–2775
- 100 Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, et al. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61: 1108–1119
- 101 Chimenti I, Smith R R, Li T S, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells

- transplanted into infarcted mice. [Circ Res](#), 2010, 106: 971–980
- 102 Makkar R R, Smith R R, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. [Lancet](#), 2012, 379: 895–904
- 103 Lim G B. Stem cells: Myocardial regeneration after infarction-promising phase I trial results. [Nat Rev Cardiol](#), 2012, 9: 187
- 104 Fogel J, Znamensky V. Cardiosphere-derived cells for heart regeneration. [Lancet](#), 2012, 379: 2426
- 105 Kasai-Brunswick T H, Costa A R, Barbosa R A Q, et al. Cardiosphere-derived cells do not improve cardiac function in rats with cardiac failure. [Stem Cell Res Ther](#), 2017, 8: 36
- 106 Grigorian-Shamagian L, Liu W, Fereydooni S, et al. Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats. [Eur Heart J](#), 2017, 38: 2957–2967
- 107 Zhao Z A, Han X, Lei W, et al. Lack of cardiac improvement after cardiosphere-derived cell transplantation in aging mouse hearts. [Circ Res](#), 2018, 123: e21–e31
- 108 Li Y, He L, Huang X, et al. Genetic lineage tracing of nonmyocyte population by dual recombinases. [Circulation](#), 2018, 138: 793–805
- 109 Maliken B D, Molkentin J D. Undeniable evidence that the adult mammalian heart lacks an endogenous regenerative stem cell. [Circulation](#), 2018, 138: 806–808
- 110 Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. [Nature](#), 2010, 464: 606–609
- 111 Kikuchi K, Holdway J E, Werdich A A, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4*⁺ cardiomyocytes. [Nature](#), 2010, 464: 601–605
- 112 Puente B N, Kimura W, Muralidhar S A, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. [Cell](#), 2014, 157: 565–579
- 113 Ali S R, Hippenmeyer S, Saadat L V, et al. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 8850–8855
- 114 Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. [Nature](#), 2012, 492: 376–381
- 115 Aguirre A, Montserrat N, Zacchigna S, et al. *In vivo* activation of a conserved microRNA program induces mammalian heart regeneration. [Cell Stem Cell](#), 2014, 15: 589–604
- 116 Diez-Cuñado M, Wei K, Bushway P J, et al. miRNAs that induce human cardiomyocyte proliferation converge on the Hippo pathway. [Cell Rep](#), 2018, 23: 2168–2174
- 117 Torrini C, Cubero R J, Dirx E, et al. Common regulatory pathways mediate activity of microRNAs inducing cardiomyocyte proliferation. [Cell Rep](#), 2019, 27: 2759–2771.e5
- 118 Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro G D, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. [Nature](#), 2019, 569: 418–422
- 119 Xin M, Kim Y, Sutherland L B, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2013, 110: 13839–13844
- 120 Leach J P, Heallen T, Zhang M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction. [Nature](#), 2017, 550: 260–264
- 121 Mohamed T M A, Ang Y S, Radzinsky E, et al. Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. [Cell](#), 2018, 173: 104–116.e12

Progress and prospect of research on cardiac stem cells and heart regeneration

HE LingJuan & ZHOU Bin

The State Key Laboratory of Cell Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

Cardiovascular diseases, such as myocardial infarction, remain as the leading cause of death worldwide. Myocardial infarction causes death of billions of cardiomyocytes. Due to the minimal repair and regenerative capacity of mammalian heart, a severe myocardial infarction usually leads to heart failure. Therefore, how to generate new cardiomyocytes and promote heart regeneration represent an urgent and important question in the cardiovascular field. Identification of endogenous cardiac stem cells with the ability to differentiate into cardiomyocytes has been a hot topic in the past two decades. Many types of stem cells such as c-Kit⁺, Sca1⁺, Abcg2⁺, Bmi1⁺ stem cells have been reported to be endogenous adult cardiac stem cells. Of note, “c-Kit⁺ cardiac stem cells” have received most attention, as both basic studies and clinical trials have been carried out in the past two decades. However, in the recent years, with the development of advanced genetic lineage tracing technology, more and more experimental evidence suggest that the adult heart lacks an endogenous cardiac stem cell in mammals. In this review, we introduced the relevant research on adult cardiac stem cells and discussed the future development of strategies for heart regeneration.

heart failure, heart regeneration, cardiac stem cells, c-Kit⁺ cells, genetic lineage tracing

doi: [10.1360/SSV-2020-0087](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0087)