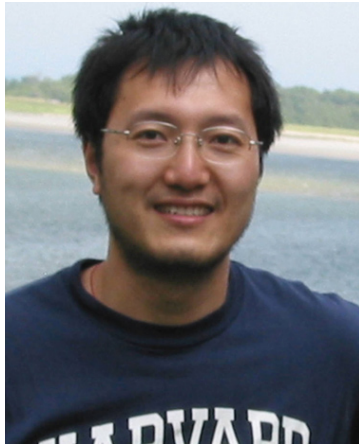


## 领域前沿 · 中国



周斌, 中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所研究员。2002年毕业于浙江大学医学院, 获学士学位; 2006年毕业于中国医学科学院协和医科大学, 获博士学位; 2006~2010年在美国哈佛大学医学院波士顿儿童医院从事博士后研究。2009年担任哈佛大学医学院讲师和助理研究员。2010年受聘于中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所担任研究员和研究组长。2011年入选中国科学院“百人计划”获择优支持, 同年获得上海市“浦江人才”和“赛诺菲-安万特-中国科学院上海生命科学研究院优秀青年人才奖”, 2012年获得国家基金委首批优秀青年科学基金, 2013年获得中央组织部首批万人计划“青年拔尖人才”支持, 2014年获得“中国科学院上海分院第四届杰出青年科技创新人才奖”。周斌研究员主要从事心脏发育与再生过程中心脏干细胞的起源及命运、揭示先天性心脏病及成体心血管疾病的分子调控机制以及新一代遗传谱系示踪技术的建立及应用等研究工作, 并致力于推动心脏干细胞在心脏损伤修复和再生医学中的应用。周斌研究员利用已建立的多项转基因小鼠模型结合遗传谱系示踪技术揭示了冠状动脉起源之谜, 发现心内膜是大部分冠状动脉血管的起源, 新生小鼠心脏具有新生血管的能力(Tian *et al.* Science, 2014)。近期的研究论文发表在Nature、Science、Cell Stem Cell、Cancer Cell、J Clin Invest、Circ Res、Cell Res、Proc Natl Acad Sci USA、J Biol Chem等学术期刊上。

## 揭示冠状动脉起源之谜——心内膜

田雪莹 周斌\*

(中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031)

冠状动脉是为心肌供应血液的血管, 在医学上具有非常重要的意义。当冠状动脉较大的分支发生堵塞时, 下游心肌因缺血缺氧导致急性心肌梗死。随后, 受损的心脏通过瘢痕组织替代损伤的心肌, 以维持心室壁的完整性, 而心脏的泵功能却受到了不可逆的影响, 最终导致心力衰竭<sup>[1]</sup>。

冠心病引起的心梗是全世界因疾病死亡的首要原因。冠状动脉是如何发育的, 这是一个对于人类健康和疾病具有重要意义的基础生物学问题。冠状动脉血管的发育以及冠状动脉干连接到胚胎封闭的血管系统, 是胚胎持续生长和存活的基础。随着

心脏发育生长和腔室壁增厚, 氧气和营养物质的被动扩散被重构扩大形成的成熟冠脉系统血管丛所替代。尽管心脏血管发育这一课题已经相对密集地研究了一个多世纪, 关于冠状动脉血管的细胞起源和组织来源问题仍在不断地争论。明确冠状动脉起源的发育过程, 将为先天性心脏病和成年心血管疾病冠状动脉血管损伤修复和再生提供重要信息<sup>[2]</sup>。

最近, 围绕冠状动脉发育起源和心血管细胞的组织来源以及决定其命运和功能的特异性信号开展了许多讨论。目前认为, 前体心外膜结构(pro-epi-cardial organ, PEO)/心外膜、静脉窦(sinus venosus, SV)和心内膜为冠状动脉内皮潜在的细胞来源。

早期的解剖学观察证明, 冠状动脉血管仅仅是主动脉的分支, 但是后来观察到冠状动脉伸入主动

\*通讯作者。Tel: 021-54920974, E-mail: zhoubin@sibs.ac.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54920974, E-mail: zhoubin@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2014-07-28 14:09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.9002.html>

脉的研究对此提出了质疑<sup>[3]</sup>。最近, 逆转录病毒标记、腺病毒细胞谱系示踪和鸡-鹌鹑嵌合体(chimera)研究提出PEO是冠状动脉血管的来源<sup>[4-6]</sup>。PEO是一个短暂的心外间皮细胞群, 位于鸡的静脉窦和肝脏之间, 小鼠的横膈表面<sup>[7]</sup>。PEO细胞迁移到正在发育的心脏, 形成包裹在表面的心外膜。心外膜来源的祖细胞亚群从原始上皮分层而来, 经过上皮-间质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)产生一群间质细胞, 迁移到下面的心肌层并形成血管平滑肌细胞、周细胞、成纤维细胞和心肌细胞<sup>[4,8-10]</sup>。冠状动脉来源于心外膜的观点是有争议的。不是所有的血管内皮细胞都是由心外膜参与形成的<sup>[11]</sup>。诱导小鼠前体心外膜中的Cre重组酶表达, 标记一部分(Scx-Cre和Sema3d-Cre)<sup>[12]</sup>或很少的(Wt1-Cre和Tbx18-Cre)<sup>[9-10,13]</sup>冠状动脉内皮细胞。目前, 越来越多的研究表明, 几乎没有冠状动脉内皮是PEO心外膜来源的。在鸡-鹌鹑嵌合体研究中, 内皮免疫组化显示冠状动脉内皮是由肝窦通过PEO延伸到静脉窦腔内而来的, 随后提出肝脏是内皮祖细胞最初的来源。在小鼠发育期间, 利用谱系示踪(lineage tracing)和命运图谱(fate mapping)技术, 研究人员很少观察到心外膜来源的内皮细胞<sup>[14-15]</sup>。

最近, 在小鼠的研究中表明, 冠状动脉来源于静脉窦的血管生成萌芽, 静脉窦是位于胚胎心脏流入部位内皮衬里的腔<sup>[6]</sup>。在巨头鲸经典胚胎学研究中, 已经确定静脉窦是心脏最早出现血管的部位<sup>[17]</sup>, 在小鼠中也已经证实未分化的冠状动脉血管网与静脉窦相连<sup>[18]</sup>。Red-Horse等<sup>[16]</sup>最近的研究发现, 冠状动脉内皮起源于静脉窦。通过ephrinB2-lacZ报告基因对lacZ<sup>+</sup>内皮细胞的命运作图, 确定了冠状动脉萌芽与静脉窦是连续的, 而不是来源于PEO。器官培养和组织重组证明, 内皮细胞生长限制在静脉窦和心房, 依赖于来自心室和心外膜的未知信号, 用可诱导的VE-cadherin-CreER转基因克隆分析, 在体内定位起源并对冠状动脉内皮祖细胞命运作图。通过早期(胚胎7.5天)诱导VE-cadherin-CreER的克隆分析表明, 冠状动脉祖细胞来源于已分化的静脉, 由于动静脉是从静脉窦出现的, 在冠状动脉萌芽中从静脉(EphB4<sup>+</sup>)到动脉(EphB2<sup>+</sup>)的分子识别标志转换证实了这一观点。

克隆分析也揭示了心内膜是冠状动脉内皮的第二个来源<sup>[6]</sup>。在小鼠中, 心内膜细胞位于生心区

内从Vegf-2<sup>+</sup>的多潜能祖细胞分化而来的最早的内皮细胞之中<sup>[19]</sup>。它们通过重新生长或血管发生形成一个心内膜的管<sup>[20]</sup>, 后来变成心脏的内层上皮衬里或心内膜, 接着通过内皮-间质转化参与形成心脏瓣膜和膜性室间隔<sup>[21]</sup>。与心内膜内皮细胞相比, 冠状动脉内皮细胞出现较晚, 在发育的心脏中建立了心内膜内皮细胞参与形成冠状动脉内皮的潜能, 虽然到目前为止这一观点仍有争议。在发育的大鼠心脏以及随后在小鼠中描述了原始血管床的出现可能是心内膜的延续, 通过心内膜的内陷套叠形成心脏的第一根血管<sup>[7,22]</sup>。相反, 鸡中的逆转录病毒示踪表明, 冠状动脉血管内皮除心内膜内皮外, 有一个不同的克隆起源<sup>[8]</sup>。Red-Horse等<sup>[14]</sup>首次运用基因示踪和克隆技术发现冠状动脉内皮细胞的心内膜起源, 虽然观察到心内膜细胞很少参与血管内皮的形成, 但是描述了心内膜萌芽形成内皮血岛(blood island)的过程, 提出了血岛可能加入静脉窦来源的血管丛的假说。

冠状动脉有三层组织: 由内皮组成的内层、平滑肌细胞组成的中间层和成纤维细胞组成的外层。在冠状动脉形成过程中, 内皮层是最早形成的。原始冠状动脉血管(或冠状动脉丛)由一层内皮细胞组成。然后, 冠状动脉丛招募平滑肌细胞和成纤维细胞组装成成熟的动脉。内皮也是成年冠状动脉疾病首先发生的部位。因此, 确定冠状动脉内皮的细胞起源是阐明冠状动脉发育或再生的机制所必需的。心内膜是心脏内部的上皮层。心内膜细胞是发育过程中必需的最早的内皮细胞群之一, 由生心区的多能干细胞分化而来。通过血管发生过程形成心内膜管, 后来变成心脏的心内膜。冠状动脉血管的内皮细胞在发育晚期出现, 并在心肌层形成冠状动脉血管。心室的心内膜细胞被认为是终末分化的, 在冠状动脉血管形成中贡献很少内皮细胞。最近, Wu等<sup>[23]</sup>的研究认为, 心室心内膜细胞是冠状动脉内皮的主要来源。心肌Vegf-a到心内膜Vegfr-2信号通路是心室心内膜细胞分化为冠状动脉内皮所必需的。由于心内膜细胞和内皮前体细胞非常相似, 不易进行明确的谱系示踪和嵌合体分析, 因此心内膜内皮细胞是否广泛参与冠状动脉血管的形成仍有待确定<sup>[15]</sup>。

为了追溯冠状动脉的细胞起源, 根据Apln基因在冠状动脉内皮细胞中表达, 而在心内膜内皮细胞中不表达的特点, 我们首次成功构建了AplnCreER

基因敲入小鼠,对冠状动脉内皮细胞进行遗传标记谱系示踪。小鼠心脏在胚胎发育11.5天(E11.5)开始形成血管。我们通过在胚胎发育10.5天(E10.5)给AplnCreER基因敲入小鼠灌注他莫昔芬(tamoxifen),诱导Cre报告等位基因的重组,永久地标记早期冠状动脉新生血管内皮细胞及其子代细胞。在胚胎发育15.5天(E15.5)观察到,几乎标记了胚胎心室壁所有的冠状动脉血管。我们发现心外膜下内皮细胞是心脏发育过程中心肌内冠状动脉血管的主要来源,既能够迁移到胚胎心室的致密心肌层形成冠状动脉,也能够于心室表面形成冠状静脉。这些心外膜下内皮细胞主要来源于静脉窦和心房的心内膜,是心脏发育过程中冠状动脉和静脉共同的起源<sup>[24]</sup>。

关于冠状动脉起源,以往的研究大多集中在胚胎发育中期,即冠状动脉血管在心脏上最初形成的时期。而且,普遍认为出生后的冠状动脉血管就是来源于这些胚胎期已经形成的冠状动脉血管。然而这种假设并没有严格地论证过。胚胎期冠状动脉血管最初形成血管丛覆盖心脏外表面。心肌组织由致密心肌层和心肌小梁两部分组成。外侧的致密心肌层形成游离心室壁,而内侧的心肌小梁向心室腔内形成指状凸起。致密心肌层中发育形成心肌内冠状动脉血管,而心肌小梁因缺乏心肌内冠状动脉血管,直接与心室腔内的血液进行氧气和营养物质交换。然而,在出生后心脏内侧的心肌小梁经过致密化,与外侧致密心肌层融合。心脏内侧新形成的致密心肌层得到了冠状动脉血管丰富的血液供应。出生后新形成的致密心肌层发生血管化的发育过程,以前是未知的。

我们将E10.5通过AplnCreER激活标记上的冠状动脉血管群定义为第一冠状动脉血管群。随后,我们继续观察在出生后0天(P0)到7天(P7)的新生小鼠心脏中第一冠状动脉血管群的命运。我们发现,在出生后3天(P3)和7天(P7),标记上的冠状动脉血管仅限于外侧心室壁。在此期间,心肌致密化过程伴随着内侧心室壁中未标记的冠状动脉血管的逐渐增多。通过冠状动脉内皮细胞分子标记物APLN和FABP4(fatty acid binding protein 4)抗体的免疫组化染色,证实了这些血管确实是冠状动脉血管。这些数据表明,新生小鼠心脏内侧心室壁中新形成的血管并不是来源于第一冠状动脉血管群,而是另有起源。在E10.5用他莫昔芬诱导,很少标记室间隔

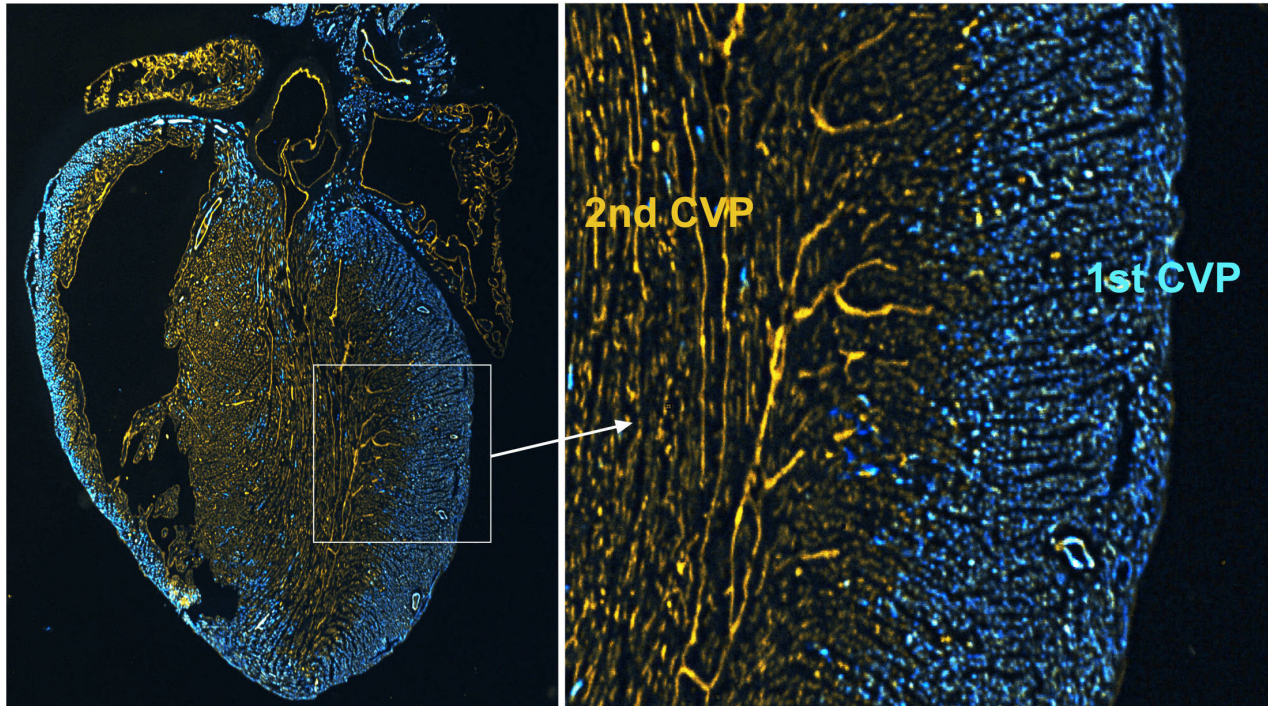
的血管内皮细胞。在E13.5用他莫昔芬诱导,标记上了为室间隔供应血液的冠状动脉血管,这些血管也不是来源于第一冠状动脉血管群。

这些新生冠状动脉血管究竟起源于哪里?为了揭示起源之谜,我们构建了心内膜特异性Nfatc1CreER基因敲入小鼠。在冠状动脉血管形成之前,通过他莫昔芬诱导,标记E8.5到E9.5的心内膜细胞,我们观察到,出生后7天(P7)的小鼠心脏内侧心室壁中大多数血管内皮细胞都被标记上了,表明新生小鼠心脏内侧心室壁中的冠状动脉血管内皮细胞是在心肌小梁致密化的过程中通过心内膜细胞发生谱系转换而来的。此外,我们还观察到在胚胎期和新生小鼠心脏中,Nfatc1CreER标记了大多数室间隔中的冠状动脉血管内皮细胞。表明室间隔和内侧心室壁一样,都是心内膜细胞经过谱系转换成为冠状动脉内皮细胞的。我们将来源于心内膜的这两部分血管定义为第二冠状动脉群。定量分析表明,第二冠状动脉血管群为心脏的大部分心肌(60%以上)供应血流,对出生后心脏自身的血液供应具有重要意义。

我们的研究首次揭示了心内膜是大部分冠状动脉血管的起源。我们发现心脏的一部分冠状动脉血管是在出生后新生成的,打破了以往研究认为出生后心脏的冠状动脉血管是由胚胎期已经形成的血管扩增而来的观念。心室壁外侧的冠状动脉血管来源于胚胎发育早期生成的血管。位于室间隔中的冠状动脉血管是在胚胎发育中期形成的。而心室壁内侧的冠状动脉血管是在出生后新生成的。依据冠状动脉血管发育在时间和空间上的差异,首次提出冠状动脉血管的起源可以划分为两个血管群:即位于心室壁外侧的第一冠状动脉血管群和心脏内部(包括心室壁内侧和室间隔)的第二冠状动脉血管群(图1)。

我们还发现,来源于两个血管群的冠状动脉血管是通过不同的发育机制形成的,而且在出生后仍然保持在空间上的分隔。第一冠状动脉血管群来源于胚胎心脏最初的冠状动脉血管丛产生的心外膜下祖细胞。心内膜是第二冠状动脉血管群的起源。心内膜不仅仅是内衬于心肌小梁的一层膜,心内膜干/祖细胞可以分化为成纤维细胞、间充质细胞、平滑肌细胞和血管内皮细胞等。心内膜干/祖细胞作为冠状动脉血管内皮细胞库,在心肌小梁融合的过程中发生迁移并分化为血管内皮细胞,是出生后冠状





遗传谱系示踪技术显现新生小鼠心脏中的第一冠状动脉血管群(1st CVP, 蓝色)和第二冠状动脉血管群(2nd CVP, 黄色)。

The first coronary vessel population (1st CVP, blue) and the second coronary vessel population (2nd CVP, yellow) were visualized by genetic lineage tracing.

图1 第一和第二冠状动脉血管群

Fig.1 1st and 2nd coronary vessel population

动脉血管迅速增多的有效方式, 从而提供充足的血流灌溉为增强泵功能而迅速增厚的心肌层。这种出生后冠状动脉血管快速生长的内源性机制为探索先天性心脏病的发病机制、诊断和治疗提供重要线索,

也为冠心病引起心梗后冠状动脉血管损伤修复和再生治疗以及体外人工心脏血管生成奠定理论基础并提供新的思路和途径<sup>[2]</sup>。

### 参考文献 (References)

- 1 Ertl G, and Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 66(1): 22-32.
- 2 Tian X, Hu T, Zhang H, He L, Huang X, Liu Q, *et al.* *De novo* formation of a distinct coronary vascular population in neonatal heart. *Science* 2014; 345(6192): 90-4.
- 3 Bogers AJ, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Peault BM, Huysmans HA. Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol (Berl)* 1989; 180(5): 437-41.
- 4 Mikawa T, Gourdie RG. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 1996; 174(2): 221-32.
- 5 Munoz-Chapuli R, Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Carmona R, Gonzalez M. Differentiation of hemangioblasts from embryonic mesothelial cells? A model on the origin of the vertebrate cardiovascular system. *Differentiation* 1999; 64(3): 133-41.
- 6 Perez-Pomares JM, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Munoz-Chapuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* 2002; 46(8): 1005-13.
- 7 Viragh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* 1981; 201(1): 157-68.
- 8 Mikawa T, Fischman DA. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: Discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(20): 9504-8.
- 9 Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, *et al.* A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 2008; 454(7200): 104-8.
- 10 Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, *et al.* Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008; 454(7200): 109-13.
- 11 Morabito CJ, Kattan J, Bristow J. Mechanisms of embryonic coronary artery development. *Curr Opin Cardiol* 2002; 17(3): 235-41.
- 12 Katz TC, Singh MK, Degenhardt K, Rivera-Feliciano J, Johnson RL, Epstein JA, *et al.* Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells. *Dev Cell* 2012; 22(3): 639-50.

- 13 Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X, *et al.* Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(51): 18455-60.
- 14 Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Bokenkamp R, Hogers B. Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* 1993; 73(3): 559-68.
- 15 Lie-Venema H, Eralp I, Maas S, Gittenberger-De Groot AC, Poelmann RE, de Ruiter MC. Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium-derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005; 282(2): 120-9.
- 16 Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* 2010; 464(7288): 549-53.
- 17 de Andres AV, Munoz-Chapuli R, Sans-Coma V. Development of the coronary arteries and cardiac veins in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Anat Rec* 1993; 235(3): 436-42.
- 18 van den Akker NM, Caolo V, Wisse LJ, Peters PP, Poelmann RE, Carmeliet P, *et al.* Developmental coronary maturation is disturbed by aberrant cardiac vascular endothelial growth factor expression and Notch signalling. *Cardiovasc Res* 2008; 78(2): 366-75.
- 19 Sugi Y, Markwald RR. Formation and early morphogenesis of endocardial endothelial precursor cells and the role of endoderm. *Dev Biol* 1996; 175(1): 66-83.
- 20 Drake CJ, Fleming PA. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* 2000; 95(5): 1671-9.
- 21 Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res* 1995; 77(1): 1-6.
- 22 Ostadal B, Schiebler TH, Rychter Z. Relations between development of the capillary wall and myoarchitecture of the rat heart. *Adv Exp Med Biol* 1975; 53: 375-88.
- 23 Wu B, Zhang Z, Lui W, Chen X, Wang Y, Chamberlain AA, *et al.* Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. *Cell* 2012; 151(5): 1083-96.
- 24 Tian X, Hu T, Zhang H, He L, Huang X, Liu Q, *et al.* Subepicardial endothelial cells invade the embryonic ventricle wall to form coronary arteries. *Cell Res* 2013; 23(9): 1075-90.