生理学报 *Acta Physiologica Sinica*, August 25, 2016, 68(4): 525–533
DOI: 10.13294/j.aps.2016.0055 http://www.actaps.com.cn

综 述

心外膜与心脏的修复再生

夏 禹，周 勇*

中国科学院干细胞重点实验室，中国科学院上海生命科学研究院/上海交通大学医学院健康科学研究所，上海 200031

摘 要：心外膜是心脏的重要组成部分之一，它在心脏的发育过程中起到了关键的作用。随着研究的深入，心外膜在心脏损伤后的修复再生中的作用也渐渐被人们所了解。心脏受损后，心外膜分泌了多种信号因子调控心肌细胞的增殖以及新血管的生成。同时，在损伤刺激下，心外膜分化为多潜能的心外膜衍生细胞，这些细胞在心脏的损伤修复中至关重要。本文将从心外膜的作用、心外膜相关的信号因子和通路以及其潜在的临床应用等方面的研究进展进行综述，为未来心外膜和心脏再生的更深入研究提供参考。

关键词：心外膜；心脏损伤修复；心脏再生
中图分类号：Q46；R331

The epicardium in cardiac repair and regeneration

XIA Yu, ZHOU Yong*

Key Laboratory of Stem Cell Biology, Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences & Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200031, China

Abstract: Epicardium is one of the important components of the heart and plays a critical role in cardiogenesis. Moreover, further studies have shown that epicardium contributes to post-injury heart regeneration. After heart injury, epicardium secretes various signaling factors, regulating the cardiomyocyte proliferation and neovascularization. In addition, epicardium differentiates into many kinds of cells which take part in the heart repair in response to heart damage. In this review, we summarize recent progress on epicardial function, related signaling pathways and the potential clinical application, and provide a reference for future studies in epicardium and heart regeneration.

Key words: epicardium; heart injury repair; heart regeneration

心血管疾病严重威胁人类的健康，其中心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 导致的心力衰竭、猝死以及为此付出的庞大医疗费用困扰着无数家庭 [1]。如何恢复坏死的心肌细胞是治疗 MI 的研究重点。新的研究发现成年哺乳动物的心肌细胞仍然能够缓慢地自我更新，打破了以往人们所认为的终末分化的心肌细胞失去了增殖能力这一思维定式 [2, 3]，为激活内源性心肌再生潜能治疗 MI 带来了希望。人类早就已经发现肝脏、皮肤等一些器官或组织在损伤后能够再生，而心脏被认为不能进行再生。最近有研究发现出生后一周内的小鼠心脏在损伤后能够进行再生修复，虽然这一能力在出生一周后迅速失去，但证明了哺乳动物的心脏仍然存在再生的潜能 [4]。相对而言，较低等的脊椎动物如蝾螈、斑马鱼等则具有强大的心脏再生能力。如斑马鱼 20% 的心室尖切除后可以在 30 天内完全再生 [5]，这些再生的心肌细胞的主要来源可能是内源性的心肌细胞去分化并增殖产生 [6]。而早先外源性补充心脏干细胞或其它多能干细胞的研究发现，移植细胞在宿主心脏内存活的数量非常少，疗效有限 [7, 8]。心外膜是心脏重要的组成部分之一，越来越多的研究揭示了心外膜在心脏发育和内源性再生修复中起到关键作用。

Received 2016-03-28 Accepted 2016-06-26
*Corresponding author. Tel: +86-21-54923289; E-mail: zhouyong@sibs.ac.cn

本文将对心外膜与心脏再生修复的研究进展作一综述。

1 心外膜的形成、衍生与功能

心脏是一个主要由心外膜、心肌层、心内膜三层组织组合而成的复杂腔室结构 [9]。心外膜紧贴心肌层的外围，是一层鳞状上皮细胞。与近乎同步发育的心内膜和心肌不同，心外膜是由体腔上皮发育而来。这群细胞首先形成一个短暂存在的胚胎组织前心外膜 (proepicardium)。当前心外膜细胞指状突触与环化后的心肌表面接触，这群细胞开始增殖并包裹整个心脏形成心外膜 [10, 11]。一部分心外膜细胞通过外皮 - 间质细胞转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 分化为心外膜衍生细胞 (epicardium-derived cells, EPDCs)。这一过程最初于单层的心外膜细胞开始，逐步从房室沟延伸到心室尖，和冠状血管丛的生长同步。心外膜与心肌间由一层薄薄的胞外基质分隔，部分心外膜细胞通过 EMT 产生间充质细胞，侵入心外膜下的基质并随后迁移到心肌层中去，之后分化为心脏中的多种组成细胞。心外膜细胞通过 EMT 所产生的间质细胞具有众多分化潜能，在成体心脏中许多的非心肌细胞：心脏中大部分的血管平滑肌细胞，成纤维细胞以及成体心脏中驻留的大部分间充质干细胞，都被认为是由 EPDCs 分化而来。在哺乳动物中成纤维细胞占了成体心脏细胞总数的大部分。心外膜通过 EMT 产生的成纤维细胞迁移进入心肌层中并驻留于此 [12, 13]。与此相对，在心外膜是否能够分化成为心脏中另外两种重要细胞上仍然存在不少争议，即血管内皮细胞和心肌细胞。更详细的内容我们将在后文进行论述。

心外膜在心脏生长发育以及冠状血管的形成过程中起到了非常重要的作用。心外膜的缺失或心外膜与心肌细胞间交流受阻，均会导致心肌细胞的发育不良 (hypoplasia) 以及伴随的心肌分化的受阻 [14, 15]。心外膜除了能够影响心肌细胞的增殖，对于心肌细胞的成熟和心室致密层 (compact layer) 的形成也起到关键的作用 [16, 17]。另一方面，心外膜分泌的促血管生成因子刺激了冠状血管的发育，并参与了冠状血管的生长和维持 [18]。而且，心外膜及 EPDCs 分泌多种胞外蛋白，维持了心脏内的胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 内稳态。其中起到最主要作用的是心外膜衍生的成纤维细胞。同心外膜类似，心脏成纤维细胞分泌多种细胞因子和生长因子调控胚胎心肌的发育 [19]。与胚胎期心脏的发育主要靠细胞增殖不同，出生后心脏的生长主要依赖心肌细胞的增大 (hypertrophy)，而成体心肌细胞的增大与心脏成纤维细胞分泌的生长因子息息相关 [20]。值得注意的是，在胚胎期及成体中，心脏成纤维细胞分泌的生长因子很可能是不同的。心脏成纤维细胞能促进胚胎心肌细胞的增殖，然而在成体却促进了心肌细胞的增大 [19, 20]。

人们普遍认为，修复与再生很大程度上是一个发育过程的回溯，因此更加详细深入地认识心外膜的发生以及发育中的功能对我们理解心外膜与心脏的损伤修复和再生具有重要意义，对心外膜相关的研究起到指导作用。

2 心外膜启动了心脏损伤修复

在成年哺乳动物中，MI 造成数十亿的心肌细胞死亡。而损失的细胞由被激活的成纤维细胞替代，造成 ECM (主要是胶原) 的沉积，最终导致疤痕的形成。成纤维细胞的早期激活帮助机体免于经受器官破裂的伤害，但失去了具有收缩性的心肌细胞使得心脏功能减弱 [21]。在心脏再生的研究中，如何促进心肌细胞的增殖以及如何促进损伤部位新血管的生成是成功达成心脏再生的关键。而心外膜恰好参与了这些过程。

心外膜对心脏损伤具有快速而强烈的反应。在正常情况下，成体心外膜处于相对静默状态。而小鼠心脏 MI 或者斑马鱼心室尖切除模型中，损伤部位的心肌与心外膜的坏死，导致了整个器官心外膜开始反应。心外膜基因 *Wt1*，*Tbx18* 和 *Raldh2* 重新开启表达，心外膜由邻近损伤部位增殖扩张，包裹住暴露的心肌。早期心外膜强烈的损伤反应结束之后，心外膜胚胎期基因的表达集中于损伤部位，并随着修复的完成渐渐回归静默状态 [22, 23]。除了心外膜重新开始增殖之外，损伤后被激活的心外膜也重启了其通过 EMT 向多种心脏细胞分化的能力。斑马鱼中，部分心外膜通过 EMT 产生的 EPDCs 能够迁移到心肌层中，参与新血管的构建和损伤的修复再生 (图 1)。然而与斑马鱼心外膜通过 EMT 侵入到心肌层不同，成年小鼠 MI 后心外膜产生的 EPDCs 不能向心肌层迁移，主要在心脏表面形成一层，这些细胞通过旁分泌因子来刺激血管的生成 [24]。

心脏纤维化和损伤后疤痕的形成也与心外膜存在联系。在健康的心脏中，胶原蛋白的沉积是有限的。当心脏损伤发生后，被激活的心外膜增殖分化

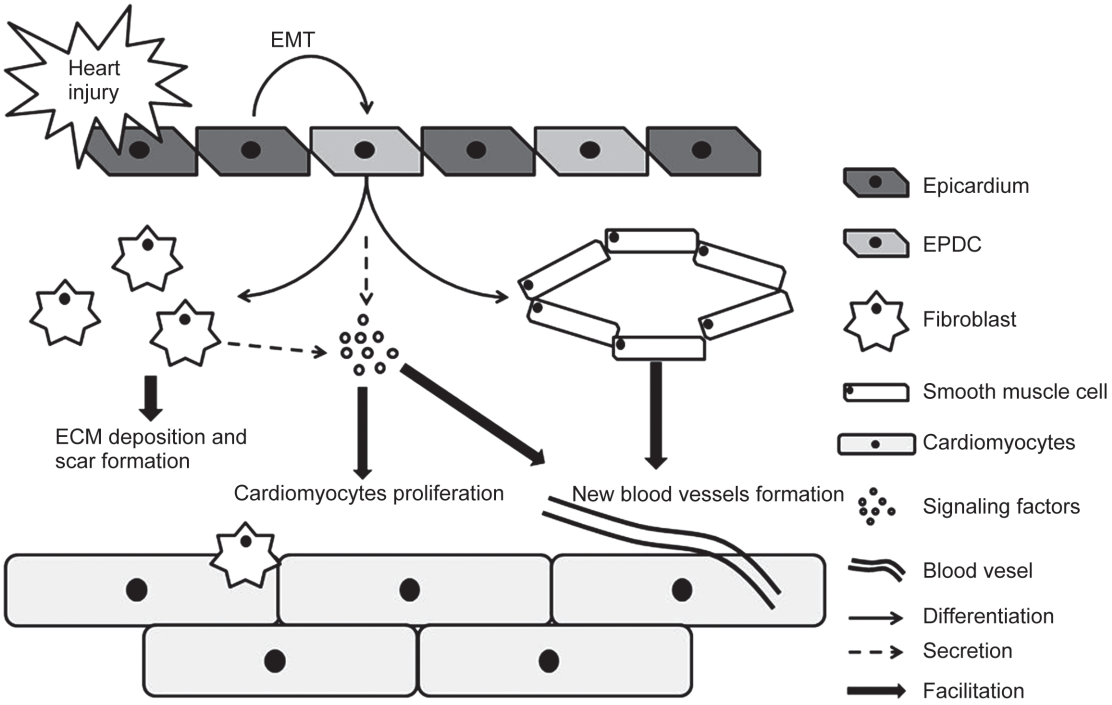

图 1. 心外膜在心脏损伤后的响应

Fig. 1. Response of epicardium after heart injury. After heart injury, the quiescent epicardium becomes activated, re-expresses the embryonic genes and proliferates. The activated epicardium envelops the injury exposed area and differentiates into EPDCs through EMT. EPDCs differentiate into several cardiac cell types like fibroblasts and smooth muscle cells. Those epicardial derived fibroblasts participate in ECM deposition and scar formation, while smooth muscle cells become the composition of new blood vessels. Besides, epicardium and EPDCs secrete many factors which regulate the cardiomyocyte proliferation and neovascularization.

和本来存在的成纤维细胞增殖，产生大量新的成纤维细胞。成纤维细胞侵入损伤部位，取代坏死的组织并分泌了大量胶原蛋白。当成纤维细胞凋亡后，残余的胶原蛋白与其它 ECM 成分结合，形成成熟的疤痕。疤痕的形成会导致器官形态和功能上的恶化，也是造成MI病人心力衰竭的重要原因之一[25]。

以上研究证明，心外膜在心脏损伤初期即能迅速地做出响应并起到关键作用。快速增殖的心外膜细胞重新包覆损伤部位，通过分化为成纤维细胞以及分泌多种因子和胞外蛋白对损伤心脏进行了最初的支撑和修补，阻止损伤的扩大。

3 心外膜与心脏再生修复的调控信号

心外膜在心脏发育过程中分泌了大量的促心脏和血管发育的生长因子和信号因子，这些因子在再生过程中同样能起到关键的作用。在体外实验中，将心外膜间皮细胞株 (epicardial mesothelial cell, EMC) 与鼠胚胎干细胞诱导的心肌细胞共培养，刺激了心肌细胞的增殖和心肌基因的表达；而 EMC 的条件培养液可以重复出这一现象。相似的现象同样可以通过使用成体 EPDCs 条件培养液来实现，说明了成体心外膜分泌的活性物质可以促进胚胎心肌的增殖[26]。心肌细胞的代谢以及免疫反应产物残骸的清除都需要充足的血管支持，新血管的生成在受损心脏的修复以及恢复心脏功能中是非常重要的一个环节。EPDCs 具有分化成为冠状血管系细胞的能力，并且相当一部分心外膜分泌信号是促进血管生成的因子[24]，所以在损伤后心脏新血管的生成中，心外膜的作用是非常重要的。下面我们列举了部分心外膜相关的信号通路和因子以及它们在心脏再生和修复中所起到的作用。

3.1 维甲酸(retinoic acid, RA)信号通路

这是由损伤修复激活的最早响应的通路之一。斑马鱼中，RA 信号通路关键因子维甲酸合成酶基因 *raldh2* 在心室尖切除损伤后几小时内在心内膜首先被激活，在第 3 天整个心外膜开始表达 *raldh2*，其后到第 7 天，*raldh2* 的表达集中于损伤部位[23, 27]。RA 通路受体的抑制或者 RA 的降解会导致损伤后的斑马鱼心肌增殖受阻[27]。哺乳动物心脏损伤后没有像斑马鱼一样的强烈的心内膜 RA 通路激活，而

心外膜 *Raldh2* 确有被重开启表达 [24]。小鼠冠状动脉结扎造成的 MI 提高了心肌和心成纤维细胞维甲酸受体的表达，并且视黄醇 (retinol) 在梗死区域内积累。而全反式维甲酸能够抑制心成纤维细胞的增殖。*Raldh2* 的启动子区域具有保守的 CCAAT/ 增强子结合蛋白 (C/EBP) 结合位点。抑制心外膜 C/EBP 信号能够显著地降低心脏纤维化变性，增强缺血损伤后的心脏收缩功能 [28]。提示了 RA 通路可能通过调控成纤维细胞的激活和胶原的沉积来参与影响损伤后的心脏重塑 (cardiac remodeling)[29]。

3.2 Notch信号通路

Notch 信号通路在心脏发育的多个过程中起到关键作用，同时也参与到了心脏损伤修复中。斑马鱼心脏再生中，心室尖切除后，Notch 信号通路在心内膜以及心外膜中被激活；而抑制 Notch 信号通路后，心内膜心外膜的激活缺失，心肌细胞的去分化受阻，增殖减少，并在损伤部位最终留下疤痕 [30]。在小鼠心脏损伤研究中，Russell 等发现损伤诱导的 Notch 信号通路激活了心外膜，增加了心成纤维细胞的分化 [31]。虽然 Notch 信号通路在心内膜 EMT 中是必要的，然而特异性抑制 Notch 的激活并不会影响心外膜 EMT。但是 Notch 信号通路指导了 EPDCs 的分化，并且促进 *Raldh2* 的表达 [32]。

3.3 Wnt/β-Catenin信号通路

Wnt/β-Catenin 信号通路参与了心外膜 EMT 的调控。在心脏损伤后，心外膜 WNT1 水平上调，其后在损伤部位的心成纤维细胞中表达并诱导心成纤维细胞增殖和表达前纤维化基因 (pro-fibrotic genes)。心外膜 Wnt 信号的缺失使得损伤后心外膜的扩张和 EMT 减少。心成纤维细胞 Wnt 信号的缺失损害损伤部位的愈合，最终导致损伤后的心脏功能变得更加虚弱 [33]。心外膜 β-Catenin 缺失导致心肌细胞的发育不良，主冠状动脉形成的受阻，而血管平滑肌细胞也大量减少 [34]。除了调控心外膜 EMT，β-Catenin 本身是细胞间粘附复合体的重要组分，在指导心外膜细胞的极性上发挥功能。细胞的极性决定了细胞分裂的方向，在心外膜中细胞极性不能正确建立会导致细胞的分裂方向的混乱，导致向内侧心成纤维细胞的分化减少 [35]。

3.4 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)

FGFs 调控了心外膜与心肌细胞间交互作用。心外膜在 RA 刺激下表达 FGF9，通过心肌细胞上的 FGFR1c 和 FGFR2c 受体控制心肌细胞的增殖并且能够影响冠状血管的形成 [36]。同时，FGFR1 和 FGFR2b 表达于前心外膜、心外膜及其衍生细胞中，并在心外膜 EMT 时表达升高。心肌细胞表达的 FGF10 信号通过心外膜和 EPDCs 上的 FGFR 受体，刺激心外膜的 EMT，增强 EPDCs 的运动性并刺激其向心成纤维细胞分化 [37]。而 FGF 信号的抑制减少了心外膜的 EMT 以及 EPDCs 向心肌层的迁移 [38]。在心脏损伤修复中，FGF2 缺失的小鼠成纤维细胞数量减少，心肌层变薄。FGF 信号的缺少最终导致了胶原沉积密度的下降，梗死面积扩张以及心腔的膨胀 [39]。

3.5 血小板源性生长因子(platelet-derived growth factors, PDGF)

PDGF 在血管的形成和生长中起着重要的作用。心外膜表达了 PDGF 信号的两个受体 α 和 β，但是在 EPDCs 中相互独立 [40]。心外膜 *Pdgfrb* 的抑制损害了心外膜 EMT，导致 EPDCs 的减少和迁移，冠状血管平滑肌细胞的缺失。而心外膜 *Pdgfra* 的抑制减少了心肌层中成纤维细胞的数量 [41, 42]。在斑马鱼心脏再生中，*pdgfrb* 和一些 EMT 标记基因表达上调，而 PDGF 通路的抑制导致了心外膜增殖的减少，EMT 和冠状血管生成的损害 [43]。

3.6 CXCL12/CXCR4通路

在心脏再生模型中，新增殖的心肌细胞需要向损伤部位迁移，进行修补。心脏损伤刺激心外膜分泌趋化因子 *cxcl12a*，并指导表达其受体 *cxcr4b* 的心肌细胞的迁移。在心脏损伤后，心外膜下的 *gata4*$^{+}$ 心肌细胞被激活 [44]，这群被激活的心肌细胞增殖并向损伤部位迁移。使用药物抑制 Cxcr4 的功能后，心外膜组织的激活和生长以及心肌细胞的增殖不受影响，然而增殖的心肌细胞滞留在损伤部位之外，导致再生受阻 [45]。

除了以上列举的这些经典信号通路和生长因子之外，心外膜分泌的大量趋化因子、营养因子、炎症因子等都被证实在心脏再生中起到重要作用，细胞外基质中的重要成分在心脏修复心外膜 EMT 过程中也起到关键调控作用 [26, 28, 46]。表 1 中列举出了一部分心外膜相关的信号通路和因子以及其在心脏再生和修复中的作用。以上这些研究证明了心外膜与其它心脏重要组成细胞通过各种信号通路及因子相互调控，共同维持了心脏微环境的内稳态，再次强调了心外膜在心脏损伤后修复与再生中的重要作用。

表 1. 部分心外膜相关通路和因子在心脏再生和修复中的作用

Table 1. Function of epicardial pathways and factors during heart regeneration and repair

Pathway and factors	Function	References
Retinoic acid	Increases cardiomyocyte proliferation, inhibits fibroblast proliferation and collagen deposition	29
Notch	Induces EDPCs differentiation	30, 31, 32
Wnt/β-catenin	Regulates epicardial EMT, regulate epicardial spindle orientation	33, 34, 35
Fibroblast growth factors	Increase cardiaomyocyte proliferation and neovascularization, induce epicardial EMT and migration	36, 37, 38, 39
Platelet-derived growth factors	Regulate epicardial EMT, differentiation and EPDCs migration	41, 42, 43
Cxcl12/cxcr4	Guide cardiomyocyte migration	45
C/EBP	Induces fibrosis	28
Hypoxia inducible factor	Regulates EPDCs migration	56
Follistatin-like 1	Increases cardiac function and survival after infarction	26

4 心外膜与心脏多能干细胞

由于 EPDCs 具有增殖以及多样分化的潜能，在一些研究中将其作为一种心脏多能干细胞 [12]。心脏绝大部分的平滑肌细胞，成纤维细胞以及成体间充质干细胞都衍生自胚胎期的心外膜细胞 [47, 48]。而心外膜特异性敲除血小板源生长因子受体 (platelet-derived growth factor, PDGFR) 导致心外膜 EMT 的受阻，表现出心脏中成纤维细胞的显著缺乏，从侧面证实了心成纤维细胞的心外膜源性 [40]。在心外膜分化为血管内皮细胞的追溯中，由不同基因标记的转基因谱系最终得到的结果不尽相同，此外大部分冠状血管内皮并不能被心外膜谱系标记。但是往前追溯，研究者们发现有一部分前心外膜细胞的亚群具有特异向内皮分化的潜能，说明其很有可能能够分化为血管内皮细胞的前心外膜细胞与分化为心外膜的细胞在心外膜形成前已经特化完成 [49]。

在对心外膜分化为心肌细胞的研究中，通过体外实验前心外膜细胞能够自发地分化为心肌细胞，证实了心外膜向心肌细胞分化的潜能 [50]。使用心外膜标记基因 *Tbx18* 和 *Wt1* 的谱系示踪中发现了能够被标记的心肌细胞 [47, 51]；但是进一步的研究认为，*Tbx18* 在心肌细胞中原本就有表达并不能说明有心肌细胞是由心外膜分化而来 [52]。此外，在斑马鱼 *tcf21* 标记的谱系中，无论是在胚胎或是成体中，均没有发现有由心外膜分化来的心肌细胞 [53]。

另一方面，心外膜下区域 (subepicardum) 是一个低氧的状态 [54]，而多种器官成体干细胞正是处于一种低氧微环境中 [55]。在心外膜及心外膜下区域的心脏低氧巢 (cardiac hypoxic niche) 内，Kocabas 等发现了一群具有干细胞特性的心脏细胞，其代谢及分化受到低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 的调控，具有多样性的分化潜能 [54]。EPDCs 向心肌层的迁移也受到 HIF 信号的调控 [56]。HIF1α 表达在心外膜内的特定位置，与冠状血管发生的结构存在联系。通过向心外膜介入持续激活的 HIF1α (caHIF1α)，EPDCs 向心肌层的迁移受到了抑制。而与此同时，心外膜 EMT 在 caHIF1α 作用下表现出增强，并且 EPDCs 在心外膜下的移动和向平滑肌细胞的分化没有受到影响。

成体 EDPCS 在体外研究中已经被证明了仍然能够自发的行使 EMT，仍然保持有胚胎心外膜的分化潜能 [57, 58]。在没有损伤的情况下，成体心脏的心外膜处于静默状态，一些胚胎期的基因表达关闭 [58]。当心脏受到损伤后，心外膜重新开始或增强表达一些胚胎期的基因 [24]，暗示有一部分心外膜被激活或脱分化。被激活的心外膜能够通过 EMT 产生的 EPDCs 分化为多种心脏组分细胞来支持受损的心脏，重构血管丛。

干细胞治疗在心脏修复中具有广阔的前景。早期的研究发现单纯的注入心脏干细胞虽然对心脏功能有一定改善，但是绝大部分注入的干细胞并没有在心脏中停留下来，对损失的心肌细胞没有起到补充 [59, 60]。对心外膜的研究将为指导我们如何调控干细胞的微环境，细胞命运涉及的信号通路以及干细胞功能提供依据，而 EPDCs 也可能是一种在再生中可利用的多能干细胞。

5 心外膜及衍生细胞潜在的临床应用

EPDCs 在心脏再生与修复中是一个非常引人注目的治疗材料。通过注射人 EPDCs 到心肌缺血性

损伤的免疫缺陷小鼠中，心脏功能在很短的时间内即获得了显著提高，直到疤痕组织完全形成[61]。这一结果是通过增强小鼠新血管形成、增加 MI 区域及周边细胞的增殖来实现的，并未发现注入的 EPDCs 能够参与宿主的心脏修复。更进一步，研究者们混合注射了 EPDCs 和心脏祖细胞，虽然同样没有发现注入的细胞能够参与心脏的修复，但是说明了 EPDCs 在损伤后心脏的注射能够成为一种潜在的治疗手段[62]。

在心包区域内，心外膜提供了一个具有高度可操作性的微环境。通过使用一些生物材料，比如水凝胶 (hydrogels) 或纤维贴片 (fibrin patches)，我们可以更加容易地对心外膜或心外膜下区域环境进行调控。通过向 MI 的大鼠注射含有 Notch 配体的水凝胶，显著减少了损伤心脏的纤维化，并促进了血管的生成[63]。在心外膜条件培养液的成分质谱分析中，筛选出了类卵泡抑素 1 (follistatin-like 1, FSTL1)。通过胶原贴片的方法模拟心外膜 FSTL1 的表达显著提高了心脏缺血性损伤后的存活率和心脏功能。而心肌细胞过表达 FSTL1 并不能达到这一效果[26]。在猪模型中使用结合了 FSTL1 或 IGF-1 的纤维贴片，MI 后的心脏功能获得了提升[26, 64]。理论上，通过这种方式导入的细胞或因子能够到达我们指定的部位，而传统的细胞注入方法会有大量的流失。同时，纤维贴片可以起到支撑损伤后虚弱的心外膜的作用。目前这些方法还处于初期的研究阶段，必须考虑到诸如免疫反应以及潜在的对材料的排异反应。

Tβ4 在心脏再生修复中的功能同样值得期待。许多数据显示，Tβ4 是一个安全且生物耐受性良好的分子，在许多细胞、血清和组织中存在，并在损伤后提高表达[65]。在新生小鼠中，超过 P7 的小鼠 *Wt1*$^{+}$EPDCs 在损伤后失去了向心肌层迁移的能力。而经过 Tβ4 的处理，小鼠 EPDCs 在 P21 损伤后仍然保持了迁移性，具有更强的再生能力和心脏功能的恢复。说明 Tβ4 具有延长新生小鼠心脏再生潜能的作用[66]。Tβ4 的作用还在于能够促进细胞存活、血管生成并减少炎症反应。MI 后的心脏破裂主要是由于损伤后局部的炎症反应过度造成的，而在小鼠 MI 心脏损伤模型中，经 Tβ4 处理后减少了炎性细胞渗润和心肌细胞的凋亡，并促进了血管生成[67]。

随着关于心外膜以及心脏再生和修复的研究不断深入，越来越多的线索将心外膜与心脏修复联系在一起，心外膜作为治疗 MI 的新靶点正渐渐受到关注。通过结合新型生物材料和细胞治疗，使得更加有效而快速地实现受损心脏的修复成为可能。

6 展望

越来越多的研究表明，心外膜在再生与修复中扮演了非常重要的角色，同时也让我们意识到在对心外膜的研究中仍存在许多不足。前心外膜中含有多个明显不同的祖细胞亚型，其中一些部分分化成为心外膜以及冠状血管内皮。心外膜本身并不是简单的一群同源细胞，其中也存在信号调控和命运不同的亚型。在今后的研究中，如何确定各个亚型的来源和命运，寻找新的特异性标记基因，将为心脏再生修复提供关键线索。例如，一群心外膜具有向平滑肌细胞的分化潜能，而另一群具有向成纤维细胞分化的潜能，通过对不同 EPDCs 的调控，我们可以在促进血管生成的同时限制疤痕组织的形成。最近，Cao 等通过对成体斑马鱼心外膜细胞的单细胞转录组测序分析，使我们对成体心外膜细胞的多样性有了更深入的认识，同时也带来了更多的问题。Cao 等在心外膜的单细胞转录组测序分析结果认为，至少可以将心外膜细胞分为三个亚群。同时，他们新发现了多种心外膜标记基因且有可能参与到心脏的再生修复中，如 *Cav1*。然而具体这些细胞亚群的功能以及相关基因如何行使作用需要更进一步的研究来阐明[68]。

综上所述，心外膜在心脏损伤后的修复和再生中起到了关键作用。心外膜以及 EPDCs 调控了心肌和血管的发生，参与心脏微环境的稳态维持，涉及的信号通路调控心脏多潜能细胞命运。这当中尚存许多关键的过程需要进一步阐明。随着研究的深入，我们可以期待在心外膜为靶向的心脏修复再生中，将有更多快速有效的治疗方案出现。

* * *

致谢：本综述受国家自然科学基金项目 (No. 31322038, 81370232) 资助。

参考文献

1 Celermajer DS, Chow CK, Marijon E, Anstey NM, Woo KS. Cardiovascular disease in the developing world. J Am Coll Cardiol 2012; 60(14): 1207–1216.

2 Kajstura J, Urbanek K, Perl S, Hosoda T, Zheng HQ, Ogorek B, Ferreira-Martins J, Goichberg P, Rondon-Clavo C, Sana-

da F, D'Amario D, Rota M, del Monte F, Orlic D, Tisdale J, Leri A, Anversa P. Cardiomyogenesis in the adult human heart. Circ Res 2010; 107(2): U305–U307.

3 Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science 2009; 324(5923): 98–102.

4 Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. Science 2011; 331(6020): 1078–1080.

5 Poss KD. Heart regeneration in zebrafish. Science 2002; 298(5601): 2188–2190.

6 Sleep E, Boué S, Jopling C, Raya M, Raya Á, Belmonte JCI. Transcriptomics approach to investigate zebrafish heart regeneration. J Cardiovasc Med 2010; 11(5): 369–380.

7 Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003; 114(6): 763–776.

8 Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, McCall F, Carvalho D, Suncion V, Morales AR, Da Silva J, Sussman MA, Heldman AW, Hare JM. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction. Circulation 2013; 127(2): 213–223.

9 Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. Curr Top Dev Biol 2010; 90: 1–41.

10 Komiyama M, Ito K, Shimada Y. Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. Anat Embryol (Berl) 1987; 176(2): 183–189.

11 Serluca FC. Development of the proepicardial organ in the zebrafish. Dev Biol 2008; 315(1): 18–27.

12 Wessels A, Perez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2004; 276(1): 43–57.

13 Limana F, Capogrossi MC, Germani A. The epicardium in cardiac repair: From the stem cell view. Pharmacol Ther 2011; 129(1): 82–96.

14 Mahtab EA, Wijffels MC, Van Den Akker NM, Hahurij ND, Lie-Venema H, Wisse LJ, Deruiter MC, Uhrin P, Zaujec J, Binder BR, Schalij MJ, Poelmann RE, Gittenberger-De Groot AC. Cardiac malformations and myocardial abnormalities in podoplanin knockout mouse embryos: Correlation with abnormal epicardial development. Dev Dyn 2008; 237(3): 847–857.

15 Sengbusch JK, He W, Pinco KA, Yang JT. Dual functions of [alpha]4[beta]1 integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment. J Cell Biol 2002; 157(5): 873–882.

16 Takahashi M, Yamagishi T, Nakematsu M, Kamimura T, Kai M, Nakajima Y. Epicardium is required for sarcomeric maturation and cardiomyocyte growth in the ventricular compact layer mediated by transforming growth factor beta and fibroblast growth factor before the onset of coronary circulation. Congenit Anom (Kyoto) 2014; 54(3): 162–171.

17 Lin SC, Dolle P, Ryckebusch L, Noseda M, Zaffran S, Schneider MD, Niederreither K. Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(20): 9234–9239.

18 Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X, Burch J, Kubalak SW, Kaliman P, Izpisua Belmonte JC, Chien KR, Ruiz-Lozano P. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(51): 18455–18460.

19 Deb A, Ubil E. Cardiac fibroblast in development and wound healing. J Mol Cell Cardiol 2014; 70: 47–55.

20 Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong TT, Shaw RM, Srivastava D. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. Dev Cell 2009; 16(2): 233–244.

21 Czubryt MP. Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. Fibrogenesis Tissue Repair 2012; 5(1): 19.

22 van Wijk B, Gunst QD, Moorman AFM, van den Hoff MJB. Cardiac regeneration from activated epicardium. PLoS One 2012; 7(9): e44692.

23 Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, Poss KD. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. Cell 2006; 127(3): 607–619.

24 Zhou B, Honor LB, He H, Ma Q, Oh JH, Butterfield C, Lin RZ, Melero-Martin JM, Dolmatova E, Duffy HS, Gise A, Zhou P, Hu YW, Wang G, Zhang B, Wang L, Hall JL, Moses MA, McGowan FX, Pu WT. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. J Clin Invest 2011; 121(5): 1894–1904.

25 Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature 2008; 453(7193): 314–321.

26 Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cunado M, Zhao MM, Maruyama S, Zhu WH, Fajardo G, Noseda M, Nakamura K, Tian XY, Liu QZ, Wang A, Matsuura Y, Bushway P, Cai WQ, Savchenko A, Mahmoudi M, Schneider MD, van den Hoff MJB, Butte MJ, Yang PC, Walsh K, Zhou B, Bernstein D, Mercola M, Ruiz-Lozano P. Epicardial FSTL1 re-

constitution regenerates the adult mammalian heart. Nature 2015; 525(7570): 479–485.

27 Kikuchi K, Holdway Jennifer E, Major Robert J, Blum N, Dahn Randall D, Begemann G, Poss Kenneth D. Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration. Dev Cell 2011; 20(3): 397–404.

28 Huang GN, Thatcher JE, McAnally J, Kong Y, Qi X, Tan W, DiMaio JM, Amatruda JF, Gerard RD, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury. Science 2012; 338(6114): 1599–1603.

29 Bilbija D, Haugen F, Sagave J, Baysa A, Bastani N, Levy FO, Sirsjo A, Blomhoff R, Valen G. Retinoic acid signalling is activated in the postischemic heart and may influence remodelling. PLoS One 2012; 7(9): e44740.

30 Zhao L, Borikova AL, Ben-Yair R, Guner-Ataman B, MacRae CA, Lee RT, Burns CG, Burns CE. Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111(4): 1403–1408.

31 Russell JL, Goetsch SC, Gaiano NR, Hill JA, Olson EN, Schneider JW. A dynamic notch injury response activates epicardium and contributes to fibrosis repair. Circ Res 2011; 108(1): 51–59.

32 Grieskamp T, Rudat C, Lüdtke TH, Norden J, Kispert A. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. Circ Res 2011; 108(7): 813–823.

33 Duan JZ, Gherghe C, Liu DX, Hamlett E, Srikantha L, Rodgers L, Regan JN, Rojas M, Willis M, Leask A, Majesky M, Deb A. Wnt1/beta catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. EMBO J 2012; 31(2): 429–442.

34 Zamora M, Manner J, Ruiz-Lozano P. Epicardium-derived progenitor cells require ss-catenin for coronary artery formation. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(46): 18109–18114.

35 Wu MF, Smith CL, Hall JA, Lee I, Luby-Phelps K, Tallquist MD. Epicardial spindle orientation controls cell entry into the myocardium. Dev Cell 2010; 19(1): 114–125.

36 Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang XQ, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation *in vivo*. Dev Cell 2005; 8(1): 85–95.

37 Vega-Hernandez M, Kovacs A, De Langhe S, Ornitz DM. FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium. Development 2011; 138(15): 3331–3340.

38 Pennisi DJ, Mikawa T. FGFR-1 is required by epicardium-derived cells for myocardial invasion and correct coronary vascular lineage differentiation. Dev Biol 2009; 328(1): 148–159.

39 Virag JAI, Rolle ML, Reece J, Hardouin S, Feigl EO, Murry CE. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair - Effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. Am J Pathol 2007; 171(5): 1431–1440.

40 Smith CL, Baek ST, Sung CY, Tallquist MD. Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling. Circ Res 2011; 108(12): e15–e26.

41 Mellgren AM, Smith CL, Olsen GS, Eskiocak B, Zhou B, Kazi MN, Ruiz FR, Pu WT, Tallquist MD. Platelet-derived growth factor receptor beta signaling is required for efficient epicardial cell migration and development of two distinct coronary vascular smooth muscle cell populations. Circ Res 2008; 103(12): 1393–1401.

42 Bax NA, Bleyl SB, Gallini R, Wisse LJ, Hunter J, Van Oorschot AA, Mahtab EA, Lie-Venema H, Goumans MJ, Betsholtz C, Gittenberger-de Groot AC. Cardiac malformations in pdgfr alpha mutant embryos are associated with increased expression of WT1 and Nkx2.5 in the second heart field. Dev Dyn 2010; 239(8): 2307–2317.

43 Kim J, Wu QO, Zhang Y, Wiens KM, Huang Y, Rubin N, Shimada H, Handin RI, Chao MY, Tuan TL, Starnes VA, Lien CL. PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(40): 17206–17210.

44 Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, MacRae CA, Stainier DYR, Poss KD. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4+ cardiomyocytes. Nature 2010; 464(7288): 601–605.

45 Itou J, Oishi I, Kawakami H, Glass TJ, Richter J, Johnson A, Lund TC, Kawakami Y. Migration of cardiomyocytes is essential for heart regeneration in zebrafish. Development 2012; 139(22): 4133–4142.

46 Missinato MA, Tobita K, Romano N, Carroll JA, Tsang M. Extracellular component hyaluronic acid and its receptor Hmmr are required for epicardial EMT during heart regeneration. Cardiovasc Res 2015; 107(4): 487–498.

47 Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, Yang L, Bu L, Liang X, Zhang X, Stallcup WB, Denton CP, McCulloch A, Chen J, Evans SM. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. Nature 2008; 454(7200): 104–108.

48 Chong JJ, Chandrakanthan V, Xaymardan M, Asli NS, Li J, Ahmed I, Heffernan C, Menon MK, Scarlett CJ, Rashidianfar A, Biben C, Zoellner H, Colvin EK, Pimanda JE, Biankin AV, Zhou B, Pu WT, Prall OW, Harvey RP. Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. Cell Stem Cell 2011; 9(6): 527–540.

49 Katz TC, Singh MK, Degenhardt K, Rivera-Feliciano J, Johnson RL, Epstein JA, Tabin CJ. Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells. Dev Cell 2012; 22(3): 639–650.
50 Kruithof BP, van Wijk B, Somi S, Kruithof-de Julio M, Perez Pomares JM, Weesie F, Wessels A, Moorman AF, van den Hoff MJ. BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. Dev Biol 2006; 295(2): 507–522.
51 Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D, von Gise A, Ikeda S, Chien KR, Pu WT. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. Nature 2008; 454(7200): 109–113.
52 Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, Mommersteeg MT, Rudat C, Kispert A. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. Nature 2009; 458(7240): E8–E9; discussion E9–E10.
53 Kikuchi K, Gupta V, Wang J, Holdway JE, Wills AA, Fang Y, Poss KD. tcf21+ epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration. Development 2011; 138(14): 2895–2902.
54 Kocabas F, Mahmoud AI, Sosic D, Porrello ER, Chen R, Garcia JA, DeBerardinis RJ, Sadek HA. The hypoxic epicardial and subepicardial microenvironment. J Cardiovasc Transl Res 2012; 5(5): 654–665.
55 Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell 2010; 7(2): 150–161.
56 Tao J, Doughman Y, Yang K, Ramirez-Bergeron D, Watanabe M. Epicardial HIF signaling regulates vascular precursor cell invasion into the myocardium. Dev Biol 2013; 376(2): 136–149.
57 van Tuyn J, Atsma DE, Winter EM, van der Velde-Van Dijke I, Pijnappels DA, Bax NAM, Knaan-Shanzer S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, van der Laarse A, van der Wall EE, Schalij MJ, de Vries AAF. Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells *in vitro*. Stem Cells 2007; 25(2): 271–278.
58 Wada AM, Smith TK, Osler ME, Reese DE, Bader DM. Epicardial/mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium. Circ Res 2003; 92(5): 525–531.
59 Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. Nature 2008; 451(7181): 937–942.
60 Bernstein HS, Srivastava D. Stem cell therapy for cardiac disease. Pediatr Res 2012; 71(4 Pt 2): 491–499.
61 Winter EM, Grauss RW, Hogers B, van Tuyn J, van der Geest R, Lie-Venema H, Steijn RV, Maas S, DeRuiter MC, deVries AA, Steendijk P, Doevendans PA, van der Laarse A, Poelmann RE, Schalij MJ, Atsma DE, Gittenberger-de Groot AC. Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. Circulation 2007; 116(8): 917–927.
62 Winter EM, van Oorschot AAM, Hogers B, van der Graaf LM, Doevendans PA, Poelmann RE, Atsma DE, Gittenberger-de Groot AC, Goumans MJ. A new direction for cardiac regeneration therapy application of synergistically acting epicardium-derived cells and cardiomyocyte progenitor cells. Circ Heart Fail 2009; 2(6): 643–653.
63 Boopathy AV, Martinez MD, Smith AW, Brown ME, Garcia AJ, Davis ME. Intramyocardial delivery of notch ligand-containing hydrogels improves cardiac function and angiogenesis following infarction. Tissue Eng Part A 2015; 21(17–18): 2315–2322.
64 Ye L, Chang YH, Xiong Q, Zhang PY, Zhang LY, Somasundaram P, Lepley M, Swingen C, Su LP, Wendel JS, Guo J, Jang A, Rosenbush D, Greder L, Dutton JR, Zhang JH, Kamp TJ, Kaufman DS, Ge Y, Zhang JY. Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. Cell Stem Cell 2014 4; 15(6): 750–761.
65 Goldstein AL, Hannappel E, Sosne G, Kleinman HK. Thymosin beta(4): a multi-functional regenerative peptide. Basic properties and clinical applications. Expert Opin Biol Ther 2012; 12(1): 37–51.
66 Rui L, Yu N, Hong L, Feng H, Chunyong H, Jian M, Zhe Z, Shengshou H. Extending the time window of mammalian heart regeneration by thymosin beta 4. J Cell Mol Med 2014; 18(12): 2417–2424.
67 Peng HM, Xu J, Yang XP, Dai XG, Peterson EL, Carretero OA, Rhaleb NE. Thymosin-beta(4) prevents cardiac rupture and improves cardiac function in mice with myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014; 307(5): H741–H751.
68 Cao JL, Navis A, Cox BD, Dickson AL, Gemberling M, Karra R, Bagnat M, Poss KD. Single epicardial cell transcriptome sequencing identifies Caveolin 1 as an essential factor in zebrafish heart regeneration. Development 2016; 143(2): 232–243.