

成纤维细胞直接重编程为心肌细胞的研究进展

王艳艳¹ 师淑君¹ 刘慧雯^{1*} 孟 励²

(¹哈尔滨医科大学基础医学院, 哈尔滨 150081; ²California Fertility Partners Inc. Los Angeles CA 90025, USA)

摘要 最近有研究通过直接重编程的方法, 采用心脏特异的转录因子和miRNA的不同组合形式, 成功地将人和小鼠成纤维细胞转化为心肌样细胞, 这些细胞具有与心肌相似的基因表达模式和肌节结构, 甚至有少量可以跳动的细胞。直接心肌细胞重编程可将心脏原位成纤维细胞转换成有功能的心肌细胞, 成为心血管再生医学的一个全新的方法。该文综述了小鼠和人类成纤维细胞在体内、外直接重编程为心肌细胞研究的发展和现状, 对其研究价值、重编程方法、研究过程中的教训、存在的问题及采用这些方法获得的细胞的启示与不足进行了比较分析。

关键词 成纤维细胞; 直接重编程; 心肌细胞; 心脏转录因子

Direct Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocyte

Wang Yanyan¹, Shi Shujun¹, Liu Huiwen^{1*}, Meng Li²

(¹School of Basic Medical Sciences, Harbin Medical University, Harbin 150081;

²California Fertility Partners Inc. Los Angeles CA 90025, USA)

Abstract Recently functional cardiomyocytes can be generated directly from fibroblasts using several combinations of cardiac transcription factors or microRNAs in mouse and human. The cells have similar global cardiac gene-expression patterns with cardiomyocytes, and some of them have sarcomere formation and spontaneous contraction. Direct cardiomyocyte reprogramming potentially offers an attractive strategy to cardiovascular regenerative medicine by converting cardiac fibroblasts into functional cardiomyocytes *in situ*. This paper reviews the new research progress of direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into cardiomyocytes *in vitro* and *in vivo*, and discusses value and method of direct cardiac reprogramming. The unsolved problems and further research direction in this new approach are also discussed in this review.

Key words fibroblasts; direct reprogramming; cardiomyocytes; cardiac transcription factors

急性心肌梗塞(acute myocardium infarction, AMI)所致心功能不全的共同特点是, 具有完整舒缩功能的心肌细胞数量绝对或相对减少以及梗死后产生的心脏疤痕组织无舒缩功能所致, 心脏修复的最终目的就是在心脏损伤之后使心肌再生来预防或者治疗心脏衰竭。目前的医疗手段可以改善心脏功能, 但是在心脏损伤后不能修复损伤的心脏组织。用心脏

内源或外源的前体细胞移植到损伤的心脏^[1-2], 能通过旁分泌机制产生某些作用, 比如促进血管生成和细胞存活, 但是对产生心肌细胞的作用有限。通过移植多功能干细胞诱导来的心脏细胞可能增加心肌细胞组织的数量, 但需进一步研究解决这些细胞在心脏中增殖、移植、存活、成熟和与其他细胞的关联等问题^[3]。

人们同时也在设法绕过多潜能阶段, 直接将成熟细胞转化为另一种成熟细胞, 即通过直接重编程产生体外高效分化的可供移植的体细胞。1987年, Davis等^[4]的发现最先奠定了细胞重新编程的科学基础。他们的研究表明, 过表达单一转录因子生肌调节因子(myogenic determination, MyoD), 足以在体外

收稿日期: 2013-12-10 接受日期: 2014-04-16

国家自然科学基金(批准号: 31271287)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0451-86674518, E-mail: liuhw_11@126.com

Received: December 10, 2013 Accepted: April 16, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271287)

*Corresponding author. Tel: +86-451-86674518, E-mail: liuhw_11@126.com

网络出版时间: 2014-07-28 10:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0411.html>

将成纤维细胞转化为骨骼肌。2010年,受到诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)技术^[5]多种转录因子组合效果的启发, Ieda等^[6]首次报道了通过引进三个心脏发育核心转录因子Gata4、Mef2c和Tbx5(GMT)可在体外成功地诱导成纤维细胞出现心肌样细胞表型,用同样的转录因子组合在体内实验能够获得更高的重编程效率^[7-8],并加入其他转录因子^[9]或使用miRNA^[10]等不同的方法来进行心肌的直接编程。类似的方法已被用于成纤维细胞重编程为神经元^[11]、神经干细胞^[12-13]、肝细胞^[14]、造血细胞^[15]和内皮细胞^[16]等。这种直接重编程不产生中间的前体细胞类型阶段,可以没有细胞分裂发生,重编程更迅速、过程更简单^[17]。心肌细胞直接重编程为研究心脏正常发育过程中谱系决定和最终的分化提供了一个新的实验工具,并为心血管病患者的细胞治疗提供了一个新方法。

1 小鼠心肌细胞体外直接重编程

1.1 经典GMT三因子法

Ieda等^[6]采用三个转录因子GMT将心肌成纤维细胞和鼠尾成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞(induced cardiomyocytes, iCMs)。Ieda等^[6]采用新生鼠的心脏成纤维细胞作为诱导心肌细胞的来源细胞。该研究用心肌重链蛋白启动子驱动绿色荧光蛋白(α MHC promoter-driven green fluorescent protein, α MHC-GFP)的转基因小鼠来筛选重编程因子。用逆转录病毒转导GMT入新生小鼠的心脏成纤维细胞,可以诱导出15%的GFP⁺细胞,在转导1周和4周后分别有1/3和1/2 GFP⁺细胞表达心肌肌钙蛋白T(Cardiac Troponin T, cTNT)。这些结论证明,重编程是个渐进的过程。iCMs表达心肌的关键标志蛋白: α -肌动蛋白(α -actin)、cTNT和心房利尿肽,而且有较好的横纹结构。流式细胞分选技术揭示,分选出的iCMs的整体的基因表达模式和一些表观遗传标记与新生小鼠的心肌细胞很相似。大约30% iCMs有自发的钙振荡,在培养了4~5周后有0.5%的细胞能够自发地跳动。最后,将GMT转导1 d后的心肌成纤维细胞移植到小鼠的心脏中,发现移植2周后在注射原位出现了心肌样的细胞。

同时, Ieda等^[6]也选用鼠尾成纤维细胞作为心肌直接重编程供体细胞。逆转录病毒转导GMT后出现了15%的GFP⁺细胞和心脏标志蛋白的表达。尽

管cTnT表达阳性的细胞仅占心脏成纤维细胞诱导来的iCMs的一半,而且抑制心脏相关基因启动子的组蛋白H3K27me3位点表达水平要高于心脏成纤维细胞来源的iCMs。鼠尾成纤维细胞来源的iCMs也有心肌细胞的某些功能特点,比如自发的细胞内钙瞬变,但是没有观察到细胞的收缩,说明鼠尾成纤维细胞抵抗GMT转导的心肌样细胞的成熟。该文献用DOX诱导慢病毒系统,短暂地过表达GMT,结果只有0.5%~1% GMT转导的鼠尾成纤维细胞表达了GFP,因此不能确定这种细胞的全基因表达模式和电生理特点。此外, Ieda等^[6]用黄色荧光蛋白标记胰岛素因子1(Isl1-cre/YFP)和心血管发育中胚层相关蛋白1(Mesp1-cre/YFP)(这两个基因在早期的心肌前体细胞中短暂表达),发现从这两种小鼠的成纤维细胞诱导来的iCMs不表达YFP,说明成纤维细胞不经过前体细胞阶段,而是直接转变为已分化的心肌细胞。

然而,也存在不同的报道,Chen等^[18]报道了用强力霉素(doxycycline, DOX)诱导的慢病毒系统转导GMT到3~6周成年小鼠的鼠尾成纤维细胞和心脏成纤维细胞,但没有产生有效的重编程心肌细胞。在其研究中, α MHC-Cre、Nkx2.5-Cre和cTnT-Cre小鼠用于检测重编程过程, α MHC和Nkx2.5均没有激活,但是cTnT和一些心脏基因(*Tbx20*、*Gata6*、*cTnT*、*Serca2a*、*MyBPC*和*Gja1*)表达。同时发现,21%的被感染的鼠尾成纤维细胞有电压依赖的钙离子电流,没有自发的活动电位和细胞收缩,说明心肌样细胞功能不完全。此外,心脏成纤维细胞转导后,在移植到小鼠的梗死心脏时表现出较弱的生存能力,心脏的基因并没有激活。这些结果说明,DOX诱导的慢病毒介导的基因转导GMT只是部分地改变了成年的成纤维细胞为心肌样的细胞,但效率和程度都是非常低的。上述结果与Ieda的结果相差甚远,原因可能是,尽管Ieda发现DOX诱导的慢病毒体系可以诱导鼠尾成纤维细胞,但是产生 α MHC-GFP阳性细胞与逆转录病毒比起来是非常低的。也可能由于水泡性口炎病毒包膜糖蛋白(envelope G glycoprotein of the vesicular stomatitis virus, VSVG)的毒性作用,慢病毒感染的细胞在小鼠梗死心脏中很难存活^[19-20]。

1.2 其他因子组合法

为了提高重编程效率,在GMT三因子的基础上采用其他转录因子组合或者miRNA也可以诱导

心肌细胞的直接重编程,并在一定程度上改善其重编程效率^[8-10,21]。Song等^[8]在GMT的基础上加入Hand2(GHMT)能够更有效地使成年心脏成纤维细胞和鼠尾成纤维细胞转变为有功能的心肌样细胞。该研究发现,用GHMT对于成年小鼠的鼠尾成纤维细胞来说能够产生大约9%的 α MHC和cTnT双阳性的细胞,而用GMT只能产生大约3%这样的细胞。诱导的心肌样细胞在转导GHMT后第30 d时表现出肌节结构。而且,经过GHMT转导后成年鼠的心脏成纤维细胞和鼠尾成纤维细胞分别有15%和18%成为 α MHC阳性的细胞,当中分别有30%和10%有肌节结构。值得一提的是, Song等的研究证明,成年的心脏和鼠尾成纤维细胞转导GHMT后,经过1个月的培养,开始出现了跳动的细胞,而且这些细胞具有钙离子瞬变和活动电势。

Protze等^[9]用胚胎成纤维细胞筛选心脏的重编程因子,发现与GMT组合和其他组合相比,用Mef2c、Myocd和Tbx5(MMT)组合能够更广泛地上调心肌的基因表达。最近Christoforou等^[21]发现,其他的转录因子MYOCD、SRF、Mesp1和SMARCD3能够增强GMT在重编程过程中的效率。他们用确定的10个心脏转录因子诱导小鼠胚胎成纤维细胞重编程为心肌样细胞,发现分别过表达转录因子MYOCD和SRF组合或Mesp1和SMARCD3组合均能增强GMT的诱导能力,特别是5个或7个转录因子组合增强心脏报告载体的激活,诱导心肌特异性基因的上调。对细胞整体基因表达分析表明,加入MYOCD和SRF表现出更显著的心肌诱导作用。

除了前述转录因子外,特异的miRNA组合也可以直接重编程心肌细胞。Jayawardena等^[10]发现,一组肌肉特异的miRNA(miR-1、miR-133、miR-208和miR-499)可以在体外将心脏成纤维细胞转变成心肌细胞。使用 α MHC驱动青色荧光蛋白(α MHC promoter-driven CFP, α MHC-CFP)转基因小鼠作为实验对象,这几个miRNA的组合能够诱导出5%青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)阳性细胞。更有趣的是,蛋白酪氨酸激酶1(Janus kinase 1, JAK1)抑制剂能够使CFP⁺细胞提高为28%,产生的心肌细胞能够表达心肌的基因,表现出肌节结构和钙震荡,在第10 d出现1%~2%自主的跳动。

为了进一步提高重编程效率,研究者们重点研究了JAK抑制剂对心肌直接重编程的作用。除了

上述Jayawardena等^[10]用此通路的抑制剂提高重编程效率外,2011年,Ding等^[22]用传统的“Yamanaka四因子”^[5]将小鼠胚胎成纤维细胞引入重编程,但是阻断了酪氨酸激酶/信号转导和转录激活因子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)通路,这条通路是小鼠细胞达到多能性所需要的,最后加入心脏发生的因子BMP4。该方法模拟了iPSCs的产生,但是激活了心脏前体程序,在2周内,产生了大量可以跳动的细胞群落。诱导18 d后,大约40%的细胞表达心脏蛋白。但是也有报道指出,在用胚胎成纤维细胞诱导心肌过程中加入JAK抑制剂后,在提高效率方面作用很小^[21]。

2 小鼠心肌细胞体内直接重编程

体外研究取得的进展促使学者们思考,在体内是否可以在心肌损伤的部位用相似的方法将心脏成纤维细胞转变成心肌细胞。最近发表的4篇论文已经证明,在小鼠体内,非心肌细胞(主要还是心脏成纤维细胞)可以诱导出心肌细胞^[7-8,10,23]。首先,Qian等^[7]直接在小鼠心肌梗死部位注射GMT逆转录病毒,在梗死边缘灶大约有35%的心肌细胞是由原位的心脏成纤维细胞诱导来的。诱导来的细胞大约有一半表达有条理的肌节结构,表现出成年的心室肌的功能特点,包括细胞的收缩、电生理特点和其他心脏细胞的功能性偶联。这些发现说明,比起单纯的体外实验,在体内重编程诱导出成熟的心肌细胞效率更高,能够显著改善心肌梗死后2~3个月后心脏的功能,并减少纤维化的形成。在另外一个研究中, Song等^[8]发现,在小鼠心肌梗死部位注射GHMT逆转录病毒也能将心脏成纤维细胞转变为心肌样细胞。他们发现在心肌梗死的边缘出现了2%~6%新生的心肌细胞,这些细胞有清晰的条纹,与内源性的心室细胞有相似的功能特点,并证明iCMs并不是发生了细胞融合,而且证明GHMT处理的小鼠其心脏射血分数为对照组的2倍,瘢痕面积减少了一半。

其次, Inagawa等^[23]发现,通过多顺反子载体表达GMT能够增强心肌的分化。GMT诱导出 α -actin阳性的细胞,转换的效率大概是1%,然而用多顺反子逆转录病毒表达GMT,通过自剪切多肽2A(2A“self-cleaving” peptides)分割基因,能够产生更多的成熟的心肌样细胞,而且他们采用的是转导GMT的时候

共转导标记基因入免疫抑制的裸鼠中来证明体内的心脏诱导。这项研究证明,多顺反子载体能够在体内用于细胞重编程。不同研究中用相同转录因子方法进行体内心肌细胞的重编程,效率不同的原因可能是小鼠品系不同,或病毒滴度不同导致^[7,23]。

最后, Jayawardena等^[10]证明,直接用慢病毒导入miR-1、miR-133、miR-208和miR-499小鼠缺血的心脏,能够将原位心脏成纤维细胞转变为心肌样细胞。大约有1%梗死部位的心肌细胞是新产生的心肌样细胞。尽管这些作用可能为活体心脏功能改善提供潜在的可能,但到底有多少新生的心脏细胞能够在心肌梗死后受伤的心脏长期存活、新生的心肌细胞对改善心脏功能有多大的贡献还不清楚。另外,这些实验都是在心脏急性缺血模型下完成的,需要研究是否够能应用于慢性心脏衰竭和遗传性心脏紊乱。理解这些功能改善的机制,对心脏再生领域的研究将起到推动作用。

3 人类心肌细胞直接重编程

心肌细胞直接重编程技术最重要的目的就是从小鼠实验研究中获得的知识应用到人类细胞上。近期的研究证明,在人类,仅采用GMT和GHMT不能像小鼠一样直接将成纤维细胞重编程为有功能的心肌样细胞,但是特定的因子组合能够促使人的成纤维细胞向心肌样细胞的状态发展^[24-27]。Nam等^[24]报道了4个因子GHTM(GATA4、HAND2、TBX5、MYOCD)和2个miRNA(miR-1和miR-133)组合能够诱导20%的人成纤维细胞表达cTnT。加入MYOCD能够显著地提高心脏肌节蛋白的表达水平。此外, HAND2对于产生原肌球蛋白和cTnT至关重要。与小鼠体外重编程相似,能够观察到钙瞬变,很多心脏相关基因的mRNA水平提高,并偶尔出现可以跳动的细胞。然而不是所有的心脏基因都上调,暗示从成纤维细胞表型向心肌细胞表型的转变只是局部的。其原因可能是:(1)不均质的人诱导心肌细胞似乎反映出化学计量和转录因子在不同细胞中表达水平的变化。(2)不同实验中表达心肌Marker的细胞的比例变化也可能与人成纤维细胞的异质性相关,因为人的基因背景和年龄也不同。(3)人成纤维细胞的表观稳定性变化非常大,因为它们对重编程的敏感性有很大的变换范围。(4)此外,病毒的质量也会导致重编程效率的变化。

Fu等^[25]也有相似的结论,在GMT的基础上,增加了核激素受体-雌激素相关受体伽马(Estrogen-related receptor gamma, ESRRG)、MESP1、MYOCD和锌指蛋白多型2(zinc finger protein, multitype 2, ZFPM2),能够将人类的成纤维细胞诱导出与小鼠体外GMT诱导的心肌样细胞具有相似的程度。20%被诱导的细胞有钙瞬变,而且有些细胞与ESCs诱导来的心肌细胞有相似的活动电位。Fu等认为:(1)ESRRG与钙信号调控、动作电位的发生等有关,能够激活编码肌质网钙离子控制蛋白和心室特异表达的收缩蛋白亚型的转录。(2)MESP1是心血管发育中特异的关键调节因子,与心肌前体转录因子表达有关,能够调节心血管细胞命运的基因网络。比如Islas等^[27]用MESP1和ETS-2能够诱导人皮肤成纤维细胞为心肌前体细胞状态,之后能够分化为心肌细胞样细胞,高度提示MESP1在心肌细胞命运中的重要作用。(3)MYOCD是平滑肌和心肌中丰富的共转录激活因子,与肌性Marker表达有关,可以保持心肌的机构和肌节的组成。它在细胞中的丢失,能够导致心肌细胞程序化死亡。尽管MYOCD在血管平滑肌分化中起到关键的作用,但是与其他心脏转录因子一起,也能够激活心肌基因的表达。(4)ZFPM2与心脏形态发生至关重要。它是GATA转录因子的辅因子,能够激活和抑制GATA基因的目标基因。其中,MYOCD和ZFPM2与提高重编程效率有关,在GMT、ESRRG和MESP1的基础上增加MYOCD和ZFPM2能够在数量和质量上显著增加人心肌细胞的直接重编程的效率。这些转录因子似乎通过互相增强信号网络的功能来调节基因的表达。此外,Fu等发现,TGF- β 信号通路对人成纤维细胞重编程为心肌细胞具有重要作用,激活此通路能够改善重编程的效率。加入TGF- β 1可能替代MYOCD和ZFPM2,将来还要研究这个关键信号级联在子心脏重编程中的作用。

Fu等还发现,人iCMs呈现出与心肌细胞相似的表现遗传学状态。成纤维细胞在MYH6、MYH7和MYL7这三个基因的启动子区域的DNA呈高甲基化水平,而iCMs在该位点表现出相对的去甲基化状态,与心肌细胞相似。另外还发现,iCMs心肌相关基因ACTC1、ACTN2、RYR2、TNNT2、PLN和COL1A1等基因的启动子的H3K27me3和H3K4me3位点三甲基化水平与心肌相似(H3K27me3代表该基因转

录失活染色质状态, 而H3K4me3代表该基因染色质转录激活状态)。除了COL1A1外, iCMs的上述基因的启动子表现出H3K4me3位点甲基化水平与心肌

细胞相似的高水平, 而成纤维细胞则表现出很低的水平, 而H3K27me3位点的甲基化水平则正好相反。这与Ieda等^[6]对小鼠心肌直接重编程的研究结果一

表1 心肌直接重编程比较(根据文献[20]做适当修改)

Table1 Comparison of direct cardiac reprogramming (modified from reference [20])

重编程因子 Reprogramming factors	体外 <i>In vitro</i>					体内 <i>In vivo</i>	参考文献 References
	载体 Vector	细胞类型 Cell type	心肌内源 标记 Cardiac reporter	心肌基因达 Cardiac gene ex- pression (FACS、 IHC)	功能 Function		
Gata4/Mef2c/ Tbx5	Retrovirus	Neonatal/ Adult CF Neonatal TTF	15% α MHC-GFP	5% cTNT ⁺ cells	0.5% of iCMs beating	Yes	[6-7,23]
	Dox-on Lentivirus	Neonatal TTF	0.5%~1% α MHC-GFP	α -Actinin ⁺ cells	ND	ND	
Gata4/Hand2/ Mef2c/Tbx5	Retrovirus	Adult CF/ TTF	15% α MHC-GFP	9% cTnT ⁺ cells	0.2% of iCLMs beating	Yes	[8]
Mef2c/Myocd/ Tbx5	Lentivirus	MEF/ Neonatal CF	2% α MHC- CreERT	12% cTNT ⁺ cells	0.08% of total cells beating	ND	[9]
miR-1/133/ 208/499	Mimic	Neonatal/ Adult CF	①5% ②28% (JAKi) (α MHC-CFP)	cTNT ⁺ cells	1%~2% of total cells beating	Yes	[10]
Gata4/Mef2c/ Tbx5	Dox-on Lentivirus	Adult CF/ TTF	①0% α MHC-Cre ②35% cTnT-Cre	ND	①22% of total cells Ca ²⁺ channel- mediated depolar- ization ②No beating cells	ND	[18]
GATA4/HANG2/ MYOCD/TBX5/ miRNA-1/ miRNA-133	Retrovirus	Neonatal HFF/ Adult HCF	ND	35%~43% cTnT ⁺ / 60%~70% tropomyosin ⁺ / α -Actinin ⁺ cells	A small subset of hiCLMs beating	ND	[24]
GATA4/MEF2C/ TBX5/MYOCD/ MESP1/ESSRG/ ZFPM2	Dox-on	H9F	20% α MHC- mCherry	cTnI ⁺ / α -Actinin ⁺ cells	ND	ND	[25]
	Retrovirus/ Retrovirus	Fetal HCF Neonatal HFF					
GATA4/MEF2C/ TBX5/MYOCD/ MESP1	Pantropic Retrovirus	HCF/ Neonatal HFF	ND	5% cTNT ⁺ / 5% α -Actinin ⁺ / ANP ⁺ /cTNI ⁺ cells	5% cells beat- ing (cocultivated with neonatal rat cardiomyocytes)	ND	[26]

CF: 心脏成纤维细胞; TTF: 鼠尾成纤维细胞; MEF: 胚胎成纤维细胞; cTnT: 心肌肌钙蛋白T; cTnI: 心肌肌钙蛋白I; FACS: 流式分选技术; IHC: 免疫组织化学; GFP: 绿色荧光蛋白; CFP: 蓝绿色荧光蛋白; MHC: 肌球蛋白重链; ND: 未确定; JAKi: 酪氨酸激酶抑制剂; iCMs: 诱导的心肌细胞; iCLMs: 诱导的心肌样细胞; HFF: 人包皮成纤维细胞; HCF: 人心脏成纤维细胞; H9F: 人胚胎干细胞衍生纤维细胞。

CF: cardiac fibroblast; TTF: tail-tip fibroblast; MEF: mouse embryonic fibroblast; cTnT: cardiac troponin T; cTnI: cardiac troponin I; FACS: fluorescence-activated cell sorting; IHC: immunohistochemistry; GFP: green fluorescent protein; CFP: cyan fluorescent protein; MHC: myosin heavy chain; ND: not determined; JAKi: Janus tyrosine kinase inhibitor; iCMs: induced cardiomyocytes; iCLMs induced cardiomyocyte-like cells; HFFs: human foreskin fibroblasts; HCF: human cardiac fibroblasts; H9F: H9 human ESC (hESC)-derived fibroblasts.

致。此外,用DOX诱导的逆转录病毒系统,发现撤去DOX后,iCMs仍然表达心肌报告基因,而且能继续形成早期的肌节结构,说明iCMs的重编程是稳定的。

Wada等^[26]在GMT的基础上,加入MESP1和MYOCD,能够使人成纤维细胞表现出更多心肌细胞特点,在重编程第4周有1%细胞发生自发的钙震荡。加入MYOCD上调了肌节基因的表达,MESP1可诱导钙震荡,两者在心肌细胞重编程的过程中的作用不同。但延长培养时间,并没有发现自发收缩现象。为此,Wada等^[34]在转导1周后将重编程的细胞与新生大鼠的心肌细胞共培养,7 d后大约有5%的iCMs细胞与周围大鼠心肌细胞同步收缩,而用大鼠心肌细胞条件培养基培养并不能引起iCMs细胞的自发收缩。跳动的iCMs表现出与人胚胎干细胞诱导来的心肌细胞相似的周期钙瞬变和活动电位,提示诱导出现的心肌细胞表型不成熟是由于本身iCMs重编程的效率较低、在异质的培养条件下细胞与细胞之间的接触很少造成的。富集iCMs有可能会增强心肌细胞的重编程。在共培养中细胞分泌的蛋白、电或机械的刺激和细胞与细胞之间的接触可能促进心肌的分化和重编程。

从整体角度看,尽管人类的细胞似乎对于重编程表现出一定的抵抗,各种核心的重编程因子依然能够在一定程度上将成纤维细胞转换为心肌细胞状态。

4 展望

研究人员通过3~4个转录因子重编程小鼠成纤维细胞为心肌细胞和用6~7个因子重编程人类成纤维细胞为心肌细胞样细胞,发现了用于修复受损心脏组织的新方法(表1)。尽管上述实验室都证明了心肌细胞重编程的事实,但心肌的直接重编程应用还有很远的路要走:(1)直接重编程的效率很低。不同实验室的重编程效率存在差异,但总体来说,在体外重编程出心肌细胞的效率还是极低的,还有很多问题可能导致重编程的失败。因此,还需要精确的化学计算或者更优化的重编程因子来达到细胞命运的转变,以提高直接重编程的效率。并且需要研究出更高标准的方案,使不同的实验室结果标准化^[28]。还可以从细胞的微环境出发,在体外观察是否可以通过低氧、小分子化合物和植物化学物质等提高心肌细胞直接重编程的效率。(2)另一个需

要解决的重要的问题是安全性问题。体内研究中重编程因子是通过病毒携带的,病毒载体的安全性问题使人担心。未来可以与iPSCs的研究策略一样,采用无基因整合或者无DNA过表达策略,来提高重编程的安全性。比如是否可以通过腺病毒、化学改良的RNA^[29]和小分子物质^[30]来达到直接重编程的目的。(3)提高重编程获得的心肌细胞样细胞的功能成熟度是个需解决的重要问题。目前直接重编程获得心肌细胞不成熟,只能获得少部分不同成熟程度的心肌样细胞,只有一少部分细胞完全重新编程和有自发的收缩活动。诱导来的心肌样细胞的功能特点还有待进一步的研究,在重编程出真正的心肌细胞前还有许多工作要做。此外,同样需要注意那些被部分重编程的细胞,应该评估其对心脏节律的失调带来的潜在危害。(4)重编程的机制问题。有必要确定这些重编程因子的DNA靶标、组合因子的功能和它们启动的级联分子事件。确定哪些转录调节在表观遗传学上是稳定的也很重要。心脏的微环境为iCMS提供使其更加成熟的必要条件,在重编程过程中细胞外基质的作用、细胞和细胞的信号转导还有心脏的跳动的张力作用都是未知的。(5)比较小鼠体内外研究提示,是否可以利用猪或灵长动物体内微环境运用目前的组合因子来促进人类成纤维细胞重编程。利用心肌梗死区域内源性细胞通过控制细胞的命运来再生组织,是一个令人兴奋的技术途径,未来也可以应用到脊髓、肝脏、胰岛和脑等器官中。

参考文献 (References)

- Alexander JM, Bruneau BG. Lessons for cardiac regeneration and repair through development. *Trends Mol Med* 2010; 16(9): 426-34.
- Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature* 2011; 473(7347): 326-35.
- Srivastava D, Berry EC. Cardiac reprogramming: from mouse toward man. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23(5): 574-8.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transcribed cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51(6): 987-1000.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al*. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, *et*

- al. In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; 485(7400): 593-8.
- 8 Song K, Nam YJ, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, *et al.* Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 2012; 485(7400): 599-604.
- 9 Protze S, Khattak S, Poulet C, Lindemann D, Tanaka E, Ravens U. A new approach to transcription factor screening for reprogramming of fibroblasts to cardiomyocyte-like cells. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53(3): 323-32.
- 10 Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya JA, *et al.* MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res* 2012; 110(11): 1465-73.
- 11 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463(7284): 1035-41.
- 12 Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(7): 2527-32.
- 13 Ring KL, Tong LM, Balestra ME, Javier R, Andrews-Zwilling Y, Li G, *et al.* Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* 2012; 11(1): 100-9.
- 14 Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 390-3.
- 15 Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010; 468(7323): 521-6.
- 16 Margariti A, Winkler B, Karamariti E, Zampetaki A, Tsai TN, Baban D, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue engineered vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(34): 13793-8.
- 17 Vierbuchen T, Wernig M. Direct lineage conversions: Unnatural but useful? *Nat Biotechnol* 2011; 29(10): 892-907.
- 18 Chen JX, Krane M, Deutsch MA, Wang L, Rav-Acha M, Gregoire S, *et al.* Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using *gata4*, *mef2c*, and *tbx5*. *Circ Res* 2012; 111(1): 50-5.
- 19 Srivastava D, Ieda M. Critical factors for cardiac reprogramming. *Circ Res* 2012; 111(1): 5-8.
- 20 Inagawa K, Ieda M. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiac myocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 2013; 6(1): 37-45.
- 21 Christoforou N, Chellappan M, Adler AF, Kirkton RD, Wu T, Addis RC, *et al.* Transcription factors MYOCD, SRF, *mesp1* and SMARCD3 enhance the cardio-inducing effect of GATA4, TBX5, and MEF2C during direct cellular reprogramming. *PLoS One* 2013; 8(5): e63577.
- 22 Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, *et al.* Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 2011; 13(3): 215-22.
- 23 Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, *et al.* Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of *Gata4*, *Mef2c*, and *Tbx5*. *Circ Res* 2012; 111(9): 1147-56.
- 24 Nam Y, Song K, Luo X, Daniel E, Lambeth E, West K, *et al.* Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(14): 5588-93.
- 25 Fu JD, Stone NR, Liu L, Spencer CI, Qian L, Hayashi Y, *et al.* Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem Cell Reports* 2013; 1(3): 235-47.
- 26 Wada R, Muraoka N, Inagawa K, Yamakawa H, Miyamoto K, Sadahiro T, *et al.* Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(31): 12667-72.
- 27 Islas JF, Liu Y, Weng KC, Robertson MJ, Zhang S, Prejusa A, *et al.* Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(32): 13016-21.
- 28 Qian L, Berry EC, Fu JD, Ieda M, Srivastava D. Reprogramming of mouse fibroblasts in cardiomyocyte-like cells *in vitro*. *Nature Protocols* 2013; 8(6): 1204-15.
- 29 Yi BA, Mummery CL, Chien KR. Direct cardiomyocyte reprogramming: A new direction for cardiovascular regenerative medicine. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(9): a014050.
- 30 Xie M, Cao N, Ding S. Small molecules for cell reprogramming and heart repair: Progress and perspective. *ACS Chem Biol* 2014; 9(1): 34-44.