

· 综述 ·

成纤维细胞直接重编程为心肌细胞研究进展

徐正燕, 李鹰

首都医科大学附属北京朝阳医院医学研究中心, 北京 100020

徐正燕, 李鹰. 成纤维细胞直接重编程为心肌细胞研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1069–1074.

Xu ZY, Li Y. Direct reprogramming from fibroblasts into cardiomyocytes. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1069–1074.

摘要: 心肌细胞的再生疗法作为心脏疾病的新型疗法受到人们的广泛关注。细胞直接重编程技术为诱导获得心肌细胞提供了新的方法, 它可以绕过多潜能的阶段, 将一种终末分化的细胞直接重编程为心肌细胞, 为将来细胞移植提供更为安全的细胞来源。文中对体内外直接重编程成纤维细胞为心肌细胞的研究方法及其存在的问题进行了总结, 并对心肌细胞直接重编程的未来发展进行展望。

关键词: 成纤维细胞, 直接重编程, 心肌细胞

Direct reprogramming from fibroblasts into cardiomyocytes

Zhengyan Xu, and Ying Li

Medical Research Center, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

Abstract: Cardiac regenerative therapy has attracted much attention as a novel approach for heart diseases. Direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes without going through a pluripotent stem cell stage would provide a promising source of cells for cell transplantation in future. This review summarizes the research methods and problems of direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes *in vitro* and *in vivo*, and forecasts the future development of this new strategy.

Keywords: fibroblasts, direct reprogramming, cardiomyocytes

Received: December 22, 2016; **Accepted:** February 9, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31440062).

Corresponding author: Ying Li. Tel: +86-10-85231482; E-mail: leeying2013@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 31440062) 资助。

网络出版时间: 2017-02-20

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170220.1417.002.html>

心脏作为胚胎发育过程中首个形成的器官,在一生中都有着非常重要的作用,但是由于哺乳动物的心脏在成年后再生和修复能力有限,因此,心脏疾病往往会产生致命性的后果,并且在发达国家是导致死亡的主要原因之一^[1]。为了获得再生的心肌细胞,研究者尝试采用间充质干细胞、猪羊水干细胞^[2]等向心肌细胞诱导分化的方法,目前采用较多的是将胚胎干细胞或人工诱导多能干细胞体外培养,使其向心肌细胞分化,但由于胚胎干细胞的伦理问题以及目前技术制备的人工诱导多能干细胞的潜在致癌性和重编程效率低的问题,大大限制了其在临床上的应用。

细胞的直接重编程(Direct reprogramming)是指将一种终末分化的细胞直接转变为另一种终末分化的细胞,这一转变不经过诱导多能干细胞阶段和去分化、再分化等过程。该方法不需要经过将成体细胞重编程为多能干细胞、再由多能干细胞分化为另一种终末分化细胞的复杂环节,避免了细胞获得性免疫原性的问题,也不涉及到伦理和法律问题。理论上,这种越过多能干细胞阶段、直接重编程而来的细胞降低了肿瘤形成的风险,有希望为将来的细胞移植治疗提供更为安全的细胞来源^[3]。因此,这项研究具有十分重要的临床意义。Vierbuchen等^[4]第一次报道,在小鼠成纤维细胞中导入特异性转录因子(Ascl1, Brn2, Myt1l),无需经过*ips*阶段,将成纤维细胞直接重编程为神经元样细胞。此后,直接重编程的方法也用于成纤维细胞向神经干细胞^[5-6]、造血细胞^[7]、肝细胞^[8]、骨骼肌细胞^[9]、胰岛 β 细胞^[10]和内皮细胞^[11]等的诱导。本文主要针对成纤维细胞向心肌细胞的直接重编程研究进展进行综述,并对其未来

发展进行展望。

1 体外直接重编程

1.1 转录因子

2010年,Ieda等^[12]从心脏发育过程中起重要作用的14种转录因子中筛选出3种关键转录因子Gata4、Mef2c和Tbx5(GMT),将小鼠心肌成纤维细胞和小鼠尾尖成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞(Induced cardiomyocytes, iCMs),首次报道了成纤维细胞向心肌细胞的直接重编程。Ieda等^[12]发现成纤维细胞不经过心脏前体细胞阶段可以直接重编程为心肌样细胞,通过流式细胞分选技术分选出的iCMs与新生小鼠的心肌细胞在基因的整体表达模式和一些表观遗传标记方面很相似。研究者用心肌肌球蛋白重链启动子驱动绿色荧光蛋白(α MHC promoter-driven green fluorescent protein, α MHC-GFP)标记新生小鼠心脏成纤维细胞,然后用携带GMT转录因子编码基因的病毒感染小鼠心脏成纤维细胞,转染3d后即有GFP⁺细胞出现,10d后,GFP⁺表达率达到20%,并且在转染4周后仍可检测到GFP⁺细胞。在转染1周后,GFP⁺细胞中肌钙蛋白T(cTNT)阳性表达仅有30%,4周后cTNT⁺细胞达到45%。同时发现,大约30%的GFP⁺细胞显示出一定程度代表新生心肌细胞的自发的钙离子浓度瞬时变化,这些细胞在培养了4-5周后有自发跳动的细胞出现。随即,研究者在此基础上进行改进以期提高重编程效率。2011年,Efe等^[13]利用“Yamanaka四因子”中Oct4、Sox2、Klf4三个转录因子对小鼠胚胎成纤维细胞进行重编程,并且通过阻断小鼠细胞达到多能性所需的酪氨酸激酶/信号转导和转录激活因子(Janus kinase/signal transducer and

activator of transcription, JAK-STAT) 通路和加入心脏发生因子 BMP4, 激活心脏前体程序, 最后获得可以跳动的心肌细胞, 与传统 GMT 法相比, 诱导效率可提高近 3 倍。2012 年, Song 等^[14]研究发现, 在 GMT 基础上加入 HAND2 (GHMT) 亦可在体外将小鼠心肌成纤维细胞和鼠尾尖成纤维细胞重编程为心肌样细胞, 且可使 α MHC-GFP 和 cTNT 共表达细胞的比率提高 3 倍左右。GHMT 诱导产生的心肌样细胞可以形成肌节样结构, 并且能够产生钙瞬变, 在诱导 5 周以后, 一小部分诱导心肌细胞可出现自发跳动。但是也有研究者对 Ieda 等^[12]的研究方法提出了质疑, Chen 等^[15]报道, 单独使用转录因子 GMT 不能有效地直接重编程成纤维细胞产生功能性的心肌细胞, 研究者将携带 GMT 的慢病毒转染小鼠心脏成纤维细胞和小鼠尾尖成纤维细胞后, 仅有 cTNT 的表达出现上调, 并没有功能性心肌细胞产生。之后, 有研究者发现, 转录因子 GMT 的化学计量对于直接重编程获得心肌细胞的 α MHC-GFP 和 TNT 的表达是特别重要的, Mef2c 的高表达和 Gata4 与 Tbx5 的低表达可以增加诱导性心肌细胞的产量^[16]。这可能也是 Chen 等^[15]不能有效获得诱导性心肌细胞的原因。

近几年, 人们开始探索将人来源成纤维细胞向心肌样细胞进行重编程, 研究发现, 无论是 GMT 还是 GMTH 组合都不足以实现人成纤维细胞向心肌样细胞的转分化, 人源成纤维细胞比小鼠来源的成纤维细胞更难实现重编程, 所需时间更长, 而且往往需要加入额外的转录因子。Fu 等^[17]在 GMT 的基础上加入 ESRRG、MESP1、MYOCD 和 ZFPM2, 诱导人成纤维细胞得到心肌样细胞, 其中, MYOCD 和 ZFPM2 与提高人心肌细胞直接重编程效率有关。同时,

Wada 等^[18]发现, 在 GMT 基础上加入 MESP1 和 MYOCD (GMTMM) 也可以在体外将人成纤维细胞诱导为心肌样细胞。遗憾的是, 他们没有发现自发跳动的诱导心肌细胞, 但是将转录 1 周后的细胞与新生大鼠心肌细胞共培养 7 d 后, 5% GMTMM/GFP⁺ 细胞出现同步收缩。Wada 等^[18]的研究表明, 虽然 GMTMM 可以重编程人成纤维细胞为心肌细胞, 但是诱导得到的心肌样细胞并不成熟。另外, 由于 *snai1* 在疾病发展阶段可以促进纤维化, 有研究证明, 在 GMT 转导期间用 siRNA 敲掉 *snai1* 的表达可以提高心肌细胞的诱导效率^[19]。考虑到 TGF- β 对 *snai1* 具有促进作用, 研究者发现, 在 GMT+Hand2+Nkx2.5 转染的基础上, 加入 TGF- β 信号通路的抑制剂 SB431542 可以使重编程效率提高 5 倍^[20]。

1.2 microRNA

Jayawardena 等^[21]发现一组肌肉特异的 miRNA (miR-1、miR-133、miR-208 和 miR-499) 可以在体外将小鼠心脏成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞, 约 1%–2% 的细胞可观察到心肌特异性蛋白的表达、节律性跳动和钙瞬变, 但效果也只能维持一段时间, 随着核酸的代谢降解, 效应减弱消失, 需持续转染。另外, 有研究者发现, miR-133 对 GMT 诱导小鼠胚胎成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞具有促进作用^[19], 在 GMT 中加入 miR-133, 可在诱导后第 10 天观察到跳动的心肌细胞, 而单独用 GMT 处理的细胞在诱导后 4 周左右才出现跳动。

1.3 小分子化合物

由于转录因子诱导的潜在致癌性和重编程效率低的问题, 人们开始探索小分子化合物的诱导方法。2014 年, Wang 等^[22]报道, 在培养基中加入一系列特定小分子化合物 (SB431542、

CHIR99021、parnate 和 forskolin) 后,仅导入一个转录因子 OCT4 即可使小鼠胚胎成纤维细胞直接重编程为心肌细胞,此方法引入小分子化合物后,减少了转录因子的使用,为小分子化合物对转录因子的完全取代奠定了基础。2015年 Fu 等^[23]用小分子化合物 CRFVPTZ (C: CHIR99021; R: RepSox; F: Forskolin; V: VPA; P: Parnate; T: TTNPB; Z: DZnep) 将鼠胚胎成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞,诱导得到的心肌样细胞表达心肌特异性标志物,可看到肌节结构,有典型的钙流动和电生理特性,并且发现早在加入小分子化合物培养的第 6-8 天出现跳动的细胞群落,同样的方法亦可将新生小鼠尾尖成纤维细胞重编程为心肌样细胞。该项研究实现了小分子化合物对转录因子的完全取代,为利用小分子化合物进行体内诱导获得心肌样细胞提供了新的方法,为治疗心衰造成的心脏损伤奠定了基础。

同时,也有研究者尝试使用小分子化合物对人成纤维细胞进行直接重编程,以获得心肌样细胞。基于 Wang 等^[22]的报道,Cao 等^[24]从已知的 89 种有利于重编程的小分子中筛选出不同小分子化合物,分别加入以 SB431542、CHIR99021、parnate 和 forskolin 作为基础的小分子化合物中,研究发现 7C (CHIR99021、A8301、BIX01294、AS8351、SCI、Y27632 和 OAC2) 足以有效地诱导人类包皮成纤维细胞直接重编程为心肌细胞,以此为基础,研究者发现加入血小板衍生生长因子通路的两个抑制剂 SU16F 和 JNJ10198409 (9C) 可以促使成纤维基因的下调和增加诱导心肌跳动的群落。在诱导 20 d 左右可观察到跳动的细胞群落,第 30 天,有近 6.9% 9C 处理的细胞表达心肌特异性标志

物细胞肌钙蛋白 T (cTNT),通过透射电镜,可以观察到 Z 带、线粒体、肌纤维结构。在重编程 45-50 d 后,大部分诱导所得心肌细胞表现心室肌样动作电位,并可观察到钙离子流动。并且研究者发现,9C 诱导获得的心肌细胞与人工诱导多能干细胞来源的心肌细胞具有相似的特性,都是顺序性地经过了中胚层、心脏前体阶段和心肌细胞的基因表达过程。此外,9C 诱导所得心肌细胞中,与心脏发育和心脏功能相关的基因表达上调,而与成纤维相关的基因表达下调。同样的,研究者发现 9C 也可以将人新生肺成纤维细胞体外直接重编程为心肌样细胞。此研究证实,小分子化合物可以完全取代转录因子,诱导人成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞。

2 体内直接重编程

大部分直接重编程研究都是在体外进行的,对于再生医学,体内实验更具有研究价值,相对于细胞移植更具有临床意义,这也是直接重编程的方法优于胚胎干细胞和 iPS 细胞的地方。近几年,研究者尝试运用类似于体外诱导的方法将心肌受损后堵塞的成纤维细胞体内直接重编程为心肌细胞。Qian 等^[25]建立心肌梗死模型后,在梗死部位注射携带有 GMT 的逆转录病毒,发现梗死区域缩小,梗死部位边缘区域约有 35% 心肌细胞是由心脏成纤维细胞诱导而来的,并且诱导所得心肌细胞可表现成年心室肌的功能特点,约有一半具有有条理的肌节结构,使心肌梗死后 2-3 个月的心脏功能得到改善。该研究表明,相对于体外诱导,体内可诱导出更加成熟的心肌细胞,且诱导效率较高。随后,Song 等^[14]研究发现,在小鼠心肌梗死部位注射

GHMT 也可引起心脏成纤维细胞重编程为心肌细胞,且射血分数是对照组的 2 倍,瘢痕组织也减少一半。另外, Jayawardena 等^[21]尝试用慢病毒将 miR-1、miR-133、miR-208 和 miR-499 导入小鼠缺血心脏,发现有 1%缺血部位心肌细胞由心脏成纤维细胞转变而来。2016 年, Mohamed 等^[26]研究发现, TGF- β 抑制剂 SB431542 和 WNT 抑制剂 XAV939 联合 GMT 可以加强心肌细胞重编程的效率,研究者建立心肌梗死的小鼠模型后,发现在小鼠心肌梗死部位,暴露于 GMT、SB431542 和 XAV939 两周后的小鼠与单独暴露于 GMT 的小鼠相比,其重编程效率和心肌功能明显提高。目前体内诱导的方法仍以逆转录病毒和慢病毒作为载体介导为主,因为有致癌的风险,且体内诱导所得心肌细胞生存时间等问题不清楚,故体内诱导的方法还需进一步探索,至今尚未见报道以人为研究对象的体内直接重编程研究。

3 展望

通过将成纤维细胞直接重编程获得心肌样细胞,不仅避免了诱导心肌细胞中混入多能干细胞从而增加细胞移植的致癌风险,还缩短了诱导获得心肌细胞的时间,有望成为修复受损心脏组织的新方法。但是转录因子的方法存在致癌性的风险, microRNA 的方法需要反复转染,近几年,研究者已研究出小分子化合物对转录因子完全取代的诱导方法,诱导效率也有很大提高,但对于临床应用仍是不足的,目前小分子化合物诱导方法得到的细胞避免了转录因子诱导致癌性的风险,但得到的细胞仍不完全成熟,仅有一小部分细胞产生自发性收缩、自发电活动等,有研究发现,不成熟的心肌细

胞会引起心律不齐^[27]。因此,研究者还应寻求更加完善的小分子诱导方案,提高诱导效率和诱导所得心肌细胞的成熟度,为临床应用提供安全有效的细胞来源。细胞直接重编程的方法给研究者们提供了新的思路,目前心脏直接重编程的方法也在不断进步,但距离临床应用还有很长的路要走,对于重编程的机制问题、重复性问题以及移植入体内的细胞存活时间问题等还需进一步研究。

REFERENCES

- [1] Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*, 2006, 367(9524): 1747-1757.
- [2] Chen JH, Wei YL, Peng S, et al. Differentiation of porcine amniotic fluid stem cells into the beating cardiomyocytes. *Chin J Biotech*, 2011, 27(8): 1206-1214 (in Chinese).
陈家欢, 魏育蕾, 彭莎, 等. 猪羊水干细胞特定向跳动心肌细胞诱导分化. *生物工程学报*, 2011, 27(8): 1206-1214.
- [3] Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(25): 10343-10348.
- [4] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463(7284): 1035-1041.
- [5] Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(7): 2527-2532.
- [6] Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*, 2010, 468(7323): 521-526.
- [7] Ring KL, Tong LM, Balestra ME, et al. Direct

- reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(1): 100–109.
- [8] Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 2011, 475(7356): 390–393.
- [9] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 1987, 51(6): 987–1000.
- [10] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 2008, 455(7213): 627–632.
- [11] Margariti A, Winkler B, Karamariti E, 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): 13793–13798.
- [12] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, 142(3): 375–386.
- [13] Efe JA, Hilcove S, Kim J, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3): 215–222.
- [14] Song KH, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 2012, 485(7400): 599–604.
- [15] Chen JX, Krane M, Deutsch MA, et al. Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using *Gata4*, *Mef2c* and *Tbx5*. *Circ Res*, 2012, 111(1): 50–55.
- [16] Wang L, Liu ZQ, Yin CY, et al. Stoichiometry of *Gata4*, *Mef2c* and *Tbx5* influences the efficiency and quality of induced cardiac myocyte reprogramming. *Circ Res*, 2015, 116(2): 237–244.
- [17] Fu JD, Stone NR, Liu L, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem Cell Rep*, 2013, 1(3): 235–247.
- [18] Wada R, Muraoka N, Inagawa K, et al. Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(31): 12667–12672.
- [19] Muraoka N, Yamakawa H, Miyamoto K, et al. MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing *snail* and silencing fibroblast signatures. *EMBO J*, 2014, 33(14): 1565–1581.
- [20] Ifkovits JL, Addis RC, Epstein JA, et al. Inhibition of TGF β signaling increases direct conversion of fibroblasts to induced cardiomyocytes. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e89678.
- [21] Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, et al. MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*, 2012, 110(11): 1465–1473.
- [22] Wang HX, Cao N, Spencer CI, et al. Small molecules enable cardiac reprogramming of mouse fibroblasts with a single factor, *Oct4*. *Cell Rep*, 2014, 6(5): 951–960.
- [23] Fu YB, Huang CW, Xu XX, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res*, 2015, 25(9): 1013–1024.
- [24] Cao N, Huang Y, Zheng JS, et al. Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science*, 2016, 352(6290): 1216–1220.
- [25] Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 2012, 485(7400): 593–598.
- [26] Mohamed TM, Stone NR, Berry EC, et al. Chemical enhancement of *in vitro* and *in vivo* direct cardiac reprogramming. *Circulation*, 2017, 135(10): 978–995.
- [27] Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, et al. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, 2002, 106(10): 1294–1299.

(本文责编 陈宏宇)