

心肌细胞直接重编程研究进展

常小倩 胡晓 吕志慧 安荣 宋延彬

【摘要】 心脏疾病如缺血性心脏病和心肌病,主要表现为心肌纤维化增加和心肌细胞丢失,可引起心力衰竭,最终导致死亡。成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞可能成为心脏病治疗的新途径,在心脏再生领域有着广阔的应用前景。该文介绍了心肌细胞直接重编程的发展及相关机制。

【关键词】 直接重编程;心肌样细胞;成纤维细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.06.003

心血管疾病的典型特征是心肌细胞丢失、胶原沉积以及瘢痕形成^[1]。Ieda 等^[2]首次提出转录因子 Gata4、Mef2c 和 TBx5(GMT)可以将小鼠的心脏成纤维细胞在体外直接重编程为心肌样细胞,随后有很多研究利用转录因子、微小 RNA(miRNA)及小分子来提高心肌细胞直接重编程的效率。但是,这些方法都是通过将逆转录病毒或慢病毒整合到基因组中来实现成纤维细胞向心肌样细胞的直接转化,这有可能会引起基因突变和表达中断等风险,使重编程效率降低。因此,有学者提出用非整合型病毒载体转染进行心肌细胞直接重编程,以弥补之前研究的不足。

1 整合型病毒载体直接重编程

1.1 体外直接重编程

Ieda 等^[2]利用 GMT 进行的重编程虽然效率低下,但是为后来的心肌细胞直接重编程研究奠定了基础。Song 等^[3]发现在 GMT 的基础上加入转录因子 Hand2(GHMT)也可以将小鼠的心脏成纤维细胞和鼠尾成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞。在成年小鼠的鼠尾成纤维细胞中,GHMT 可诱导 9.2% (5.2%~19.7%)的心肌样细胞同时表达心肌重链蛋白启动子驱动绿色荧光蛋白(α MHC-GFP)和心脏肌钙蛋白 T (cTnT),而 GMT 仅能诱导 2.9% (1.5%~5.6%)的心肌样细胞同时表达 α MHC-GFP 和 cTnT。在成年小鼠的心脏成纤维细胞中,用 GHMT 转染可以使 7.5%的心肌样细胞

同时表达 α MHC-GFP 和 cTnT,而用 GMT 转染仅有 1.4%的心肌样细胞表达 α MHC-GFP 和 cTnT。转染 1 个月后,GHMT 就可诱导成年小鼠的心脏成纤维细胞和鼠尾成纤维细胞直接重编程为有自发性跳动的心肌样细胞,而且这些细胞具有钙离子瞬变和电活动特性,这提示加入 Hand2 可以提高心肌细胞直接重编程的效率。此后,有研究将更多的转录因子加入 GMT 以提高心肌细胞直接重编程的效率。Addis 等^[4]发现在 GHMT 的基础上加入转录因子 Nkx2.5(HNGMT)可以高效地将小鼠胚胎成纤维细胞和成年小鼠的心脏成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞。在小鼠胚胎成纤维细胞中,HNGMT 的效率比单用 GMT 高出 50 倍,而且诱导的心肌样细胞可以表达更多的心脏标记物,具有钙瞬变特性,可以长时间维持自发性跳动。

Protze 等^[5]发现使用慢病毒转染 Tbx5、Mef2c 和 Myocd(3F-Myocd)可以将小鼠胚胎成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞。与 GMT 相比,3F-Myocd 诱导的心肌样细胞可以表达更多的心脏标记物,这提示 Gata4 可能并不是心肌细胞直接重编程所必须的核心转录因子。Mathison 等^[6]也证实了单独使用 Gata4 确实不能诱导产生心肌样细胞,但是单独用慢病毒转染 Gata4 可以显著减小心肌梗死后纤维化面积,从而改善心功能。

Zhou 等^[7]发现 Bmi1 是心肌细胞直接重编程早期主要的表观遗传障碍,通过短发夹 RNA(shRNA)抑制 Bmi1 可以提高组蛋白第三亚基 4 号赖氨酸的三甲基化(H3K4me3)水平,同时抑制心脏位点上的组蛋白 H2A 在赖氨酸 119(H2AK119ub)的单链化,从而显著提高 GMT 的直接重编程效率。

基金项目:国家自然科学基金(81760069);陕西省重点研发计划(2018SF-116);延安医疗卫生攻关项目(2018KS-16)

作者单位:716000 延安大学附属医院心内科

通信作者:宋延彬,Email:592331246@qq.com

该研究还发现抑制 Bmi1 可以使内源性转录因子 Gata4 增多,从而减少了直接重编程过程中外源性 Gata4 的加入。这证明去除某些表观遗传障碍后,使用较少的转录因子就可以促进心肌细胞的直接重编程。通过 shRNA 调控表观遗传来提高重编程效率是心肌细胞直接重编程的重要进展,提示其他分子也可能通过调控表观遗传机制促进心肌细胞直接重编程。

Abad 等^[8]证实,在 GHMT 的基础上加入经典的 Notch 抑制剂 DAPT 可以促进小鼠胚胎成纤维细胞向心肌样细胞转化。与 GHMT 相比,DAPT 的加入使有肌节结构的细胞数量增加了 5 倍,在第 25 天时自发跳动的心肌样细胞数量增加了 6 倍,具有钙瞬变特性的细胞数量也显著增加。在此基础上加入丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(Akt1)可以使高达 70%的心肌样细胞表达 cTnT。更重要的是,在第 18 天时 45%的心肌样细胞即可发生自发性跳动。该研究还发现,DAPT 可通过激活与转录因子 Mef2c 连接的心脏相关基因(Myh6、Tnnt2、Actc2),提高心肌细胞直接重编程的效率。

Guo 等^[9]通过化学筛选的方法发现 IMAP(胰岛素样生长因子-1、MII1 抑制剂 MM589、转化生长因子- β 抑制剂 A83-01 和 Bmi1 抑制剂 PTC-209)的协调作用可以提高心肌细胞直接重编程效率,它们通过抑制特定的 C-C 趋化因子信号通路[C-C 基序趋化因子配体(CCL)3、CCL6、CCL17]和增加转录因子 Gata4、Mef2c、TBx5 的表达,提高心肌细胞直接重编程效率。

1.2 体内直接重编程

Qian 等^[10]首次证实了用逆转录病毒 GMT 可以诱导小鼠的心脏成纤维细胞在体内直接重编程为心肌样细胞。在体内,心肌样细胞形成了肌节结构,可产生动作电位,还可以对电刺激产生收缩反应。GMT 转染后的第 8 周和第 12 周,超声心动图检查发现心脏的射血分数、心搏出量和心输出量均增加,而心肌梗死的面积减小。Song 等^[3]进一步证实了用逆转录病毒 GHMT 可以将小鼠心脏成纤维细胞在体内直接重编程为心肌样细胞。超声心动图检查发现 GHMT 转染后的第 6 周小鼠的心功能就开始改善,GHMT 比 GMT 能更有效地改善心功能。Zhang 等^[11]后来也证实,加入转录因子 Hand2 可显著改善心肌样细胞的结构和功能,同时心脏的 4 种转录因子 GHMT 在心肌样细胞的肌节结构和

收缩特性的形成过程中至关重要,这 4 种转录因子中没有一种转录因子可以独立地将成纤维细胞直接重新编程成为心肌样细胞。

Mathison 等^[12]发现用慢病毒多顺反子 GMT 转染可以促进小鼠体内外心肌细胞直接重编程。蛋白质印迹分析显示三联体(多顺反子 GMT)和单体(单顺反子 Gata4、Mef2c、Tbx5)载体产生了等同的 GMT 转基因表达,而荧光激活细胞分选(FACS)显示三联体载体直接重编程的能力大约是单体载体的 2 倍。此外,与 3 个单独的单顺反子载体(EF = 7%~13%)相比,单个多顺反子 GMT 载体(EF = 10%~37%)可以显著改善小鼠的心功能。多顺反子载体可以通过单个病毒载体诱导心肌样细胞形成来提高心肌细胞直接重编程效率,而不需要每个单顺反子载体的 3 次分别转染,这就减少了转染的次数,从而降低了多次转染产生的免疫原性、不良反应及对转分化过程的抵抗性。Inagawa 等^[13]也证实了利用逆转录病毒多顺反子 GMT 载体可以将梗死心肌的成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞。

1.3 miRNA 参与的直接重编程

Jayawardena 等^[14]发现 miRNA 的特定组合能够在体内外将非心肌细胞直接重新编程成为心肌样细胞。他们证实了单用 miR-1 就可以诱导成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞,但与 miR-133、-208、-499 联合作用可使直接重编程的效率显著提高。miR-1、-133、-208、-499 不仅可以使心肌样细胞表达心脏标记物,而且还使其具有自发钙瞬变及收缩特性。随后 Jayawardena 等^[15]使用同样的 miRNA 来评估体内心肌样细胞的形态和生理特性以及对左室收缩功能的影响,结果发现 miRNA 不仅产生了与成熟心肌细胞相似的肌节结构,而且还可以诱发动作电位及兴奋-收缩耦联反应。经反复超声心动图检查发现,miRNA 可在心肌梗死后 1 个月内减小纤维化面积,并在 3 个月内逐步改善心室的收缩功能,这提示心功能在逐步改善。该研究认为成纤维细胞的诱导、分化、整合、成熟所需的时间可能是左室收缩功能延迟和逐步改善的原因。

2 非整合型病毒载体直接重编程

2.1 仙台病毒(SeV)载体直接重编程

SeV 载体为单负链 RNA 病毒,具有高效转导、非整合性、低污染等优点,主要用于诱导多能干细

胞(iPSC)的研究^[16-18]。Miyamoto 等^[19]证实在外用 SeV-GMT 诱导小鼠成纤维细胞 1 周后就可以出现 aMHC-GFP⁺、 α 辅肌动蛋白(α -Actinin⁺)、cTnT⁺的细胞,这些免疫阳性细胞的数量可持续增长直至第 4 周,且在第 4 周心肌样细胞就可以表现出良好的肌节结构。在胚胎成纤维细胞中,用 SeV-GMT 诱导产生的心肌样细胞比用逆转录病毒 GMT 诱导产生的多 100 倍,并且心肌样细胞的跳动时间可以从第 25 天提前到第 10 天。与内源性心肌细胞相似,SeV-GMT 诱导的心肌样细胞对肾上腺素能和胆碱能刺激均有反应。在体内,SeV-GMT 同样可以增加心脏直接重编程的效率,改善心功能,同时减小心肌梗死后的瘢痕面积。SeV-GMT 转染后,1.5%的心脏成纤维细胞在 1 周后被重编程为心肌样细胞,其中约 20%具有良好的肌节结构。4 周后重编程效率提高至 5%,其中约 40%的心肌样细胞在形态上趋于成熟。SeV-GMT 载体也可以将人成纤维细胞直接重新编程为心肌样细胞,但是该心肌样细胞没有自发性跳动,只有与新生小鼠的心肌细胞共培养 1~2 周后才可以使心肌样细胞与周围的心肌细胞同步收缩。

2.2 金纳米颗粒(AuNP)/GMT/PEI 载体直接重编程

Passaro 等^[20]提出纳米技术具有独特的靶向定位能力,能维持所负载物质稳定的生物活性,可推广应用于心肌细胞重编程。Chang 等^[21]证实负载有 Gata4、Mef2c 和 Tbx5 的阳离子 AuNP 确实可用于心肌细胞直接重编程。在体外,与 GMT/PEI 载体相比,使用 AuNP/GMT/PEI 载体转染 2 周后 aMHC-GFP⁺的细胞增加了近 3 倍,且心肌样细胞产生了具有明显 Z 线结构的肌节形态。实时荧光定量 PCR 结果显示,用 AuNP/GMT/PEI 载体转染后,心肌细胞标记物(Tbx18、Myl2、cTnT 和 Myh6)显著增加,而成纤维细胞标记物(结蛋白、Fsp1 和 Colla1)被显著抑制。在转染 5 周后,AuNP/GMT/PEI 载体诱导产生的能自发跳动的心肌样细胞是 GMT/PEI 载体的 5 倍多。在体内,AuNP/GMT/PEI 纳米载体转染使小鼠的心肌梗死面积明显减小。AuNP/GMT/PEI 纳米载体也可以将人皮肤成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞。在用 AuNP/GMT/PEI 纳米载体转染 2 周后可以观察到与内源性心肌细胞形态相似的心肌样细胞。

3 直接重编程的可能机制

3.1 抑制成纤维细胞信号增强心肌细胞直接重编程

Zhao 等^[22]证实了抑制转化生长因子- β 或 Rho 相关激酶(ROCK)参与的促纤维化信号转导途径可以将小鼠胚胎成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞,且效率高达 60%,在抑制促纤维信号后不到 2 周的时间内即可出现自发跳动的心肌样细胞,而单用 GHMT 则需要 4 周。Mohamed 等^[23]进一步证实了体外联合使用转化生长因子- β 抑制剂(SB431542)和 WNT 抑制剂(XAV939)可使 GMT 的直接重编程效率提高 8 倍。在体内,与 GMT 相比,GMT 联合 SB431542 和 XAV939 转染可显著提高心肌梗死后小鼠心肌细胞直接重编程的效率,改善其心功能。超声心动图检查发现心脏的每搏输出量、射血分数、心输出量明显改善,瘢痕面积明显减小。进一步分析发现,SB431542 可下调纤维化信号,减少细胞外基质的形成^[24],而 XAV939 下调了与染色质调控、DNA 包装和核小体结构相关基因的表达^[25]。

3.2 抑制炎症反应增强心肌细胞直接重编程

Muraoka 等^[26]发现将双氯芬酸钠加入 GMT 或者 GHMT,可显著提高出生后小鼠心脏成纤维细胞和鼠尾成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞的效率,但是并不能提高小鼠胚胎成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞的效率。该研究证实双氯芬酸钠通过抑制环氧合酶-2、前列腺素 E2/前列腺素 E 受体 4、环磷酸腺苷/蛋白激酶 a 和白细胞介素-1 β 信号,阻止炎症反应和心肌纤维化的进一步发展,从而提高心肌细胞直接重编程效率。Zhou 等^[27]也证实了锌指转录因子 281(ZNF281)可通过调节心脏和炎症基因的表达,促进心肌细胞直接重编程效率。这提示抑制成纤维细胞信号是心肌细胞直接重编程的先决条件,抗炎可能是促进心肌细胞直接重编程的途径,二者协同作用可能会大大提高心肌细胞直接重编程的效率。

4 展望

心肌细胞再生是富有挑战性的新研究领域。细胞直接重编程技术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,而不经 iPSC 阶段和去分化、再分化等过程。使用整合型逆转录病毒或慢病毒转染诱导产生心肌样细胞可能会破坏内源基因的表达,带来插入突变等风险。最重要

的是,使用整合型病毒载体直接重编程的过程缓慢且效率低下,这会阻碍心肌细胞直接重编程技术的发展。因此,学者们探索了适用于体内外心肌细胞直接重编程且效率较高的非整合型病毒载体直接重编程的方法。非整合型病毒载体具有细胞毒性小、转导高效、污染率低等优点,在未来的生物医学再生领域将会有着广阔的应用前景。然而,要将这项技术运用到临床还需要对心肌细胞直接重编程的确切分子机制及其适宜的微环境进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(4):945-953.
- [2] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors[J]. *Cell*, 2010, 142(3):375-386.
- [3] Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors[J]. *Nature*, 2012, 485(740):599-604.
- [4] Addis RC, Ifkovits JL, Pinto F, et al. Optimization of direct fibroblast reprogramming to cardiomyocytes using calcium activity as a functional measure of success[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 60:97-106.
- [5] Protze S, Khattak S, Poulet CA, et al. A new approach to transcription factor screening for reprogramming of fibroblasts to cardiomyocyte-like cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(3):323-332.
- [6] Mathison M, Singh VP, Sanagasetti D, et al. Cardiac reprogramming factor Gata4 reduces postinfarct cardiac fibrosis through direct repression of the profibrotic mediator snail[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 154(5):1601-1610.
- [7] Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, et al. Bmi1 is a key epigenetic barrier to direct cardiac reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(3):382-395.
- [8] Abad M, Hashimoto H, Zhou HY, et al. Notch inhibition enhances cardiac reprogramming by increasing MEF2C transcriptional activity[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(3):548-560.
- [9] Guo Y, Lei I, Tian S, et al. Chemical suppression of specific C-C chemokine signaling pathways enhances cardiac reprogramming[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(23):9134-9146.
- [10] Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes[J]. *Nature*, 2012, 485(7400):593-598.
- [11] Zhang Z, Zhang AD, Kim LJ, et al. Ensuring expression of four core cardiogenic transcription factors enhances cardiac reprogramming[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):6362.
- [12] Mathison M, Singh VP, Gersch RP, et al. "Triplet" polycistronic vectors encoding Gata4, Mef2c, and Tbx5 enhances postinfarct ventricular functional improvement compared with singlet vectors[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 148(4):1656-1664.
- [13] Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, et al. Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5[J]. *Circ Res*, 2012, 111(9):1147-1156.
- [14] Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, et al. microRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2012, 110(11):1465-1473.
- [15] Jayawardena TM, Finch EA, Zhang L, et al. MicroRNA induced cardiac reprogramming in vivo evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function[J]. *Circ Res*, 2015, 116(3):418-424.
- [16] Macarthur CC, Fontes A, Ravinder N, et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions[J]. *Stem Cells Int*, 2012, 2012:564612.
- [17] Haase A, Göehring G, Martin U. Generation of non-transgenic iPS cells from human cord blood CD34(+) cells under animal component-free conditions[J]. *Stem Cell Res*, 2017, 21:71-73.
- [18] Tan X, Dai Q, Guo T, et al. Efficient generation of transgene- and feeder-free induced pluripotent I stem cells from human dental mesenchymal stem cells and their chemically defined differentiation into cardiomyocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(4):2490-2497.
- [19] Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, et al. Direct in vivo reprogramming with sendai virus vectors improves cardiac function after myocardial infarction[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(1):91-103.
- [20] Passaro F, Testa G, Ambrosone L, et al. Nanotechnology-based cardiac targeting and direct cardiac reprogramming: the betrothed[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017:4940397.
- [21] Chang Y, Lee E, Kim J, et al. Efficient in vivo direct conversion of fibroblasts into cardiomyocytes using a nanoparticle-based gene carrier[J]. *Biomaterials*, 2019, 192:500-509.
- [22] Zhao Y, Londono P, Cao Y, et al. High-efficiency reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes requires suppression of pro-fibrotic signalling[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8243.
- [23] Mohamed TM, Stone NR, Berry EC, et al. Chemical enhancement of in vitro and in vivo direct cardiac reprogramming[J]. *Circulation*, 2017, 135(10):978-995.
- [24] Ifkovits JL, Addis RC, Epstein JA. Inhibition of TGF beta signaling increases direct conversion of fibroblasts to induced cardiomyocytes[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e89678.
- [25] Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(4):276-286.

- [26] Muraoka N, Nara K, Tamura F, et al. Role of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E₂-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming [J]. Nat Commun, 2019, 10(1):674.
- [27] Zhou HY, Morales MG, Hashimoto HA, et al. ZNF281 enhances cardiac reprogramming by modulating cardiac and

inflammatory gene expression [J]. Genes Dev, 2017, 31 (17):1770-1783.

(收稿:2019-04-19 修回:2019-07-30)

(本文编辑:胡晓静)

(上接第 323 页)

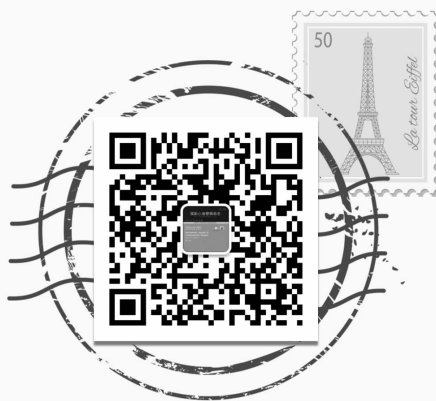
- [22] Todd Neale. ERADICATE-AF: could add-on renal denervation give a-fib ablation a boost? [EB/OL] (2019-05-10)[2019-06-16]. <https://www.tctmd.com/news/eradicate-af-could-add-renal-denervation-give-fib-ablation-boost>.
- [23] Ukena C, Mahfoud F, Ewen S, et al. Renal denervation for treatment of ventricular arrhythmias: data from an International Multicenter Registry [J]. Clin Res Cardiol, 2016, 105(10):873-879.
- [24] Guo Z, Zhao Q, Deng H, et al. Renal sympathetic denervation attenuates the ventricular substrate and electrophysiological remodeling in dogs with pacing-induced

heart failure[J]. Int J Cardiol, 2014, 175(1):185-186.

- [25] De Jong MR, Hoogerwaard AF, Adiyaman A, et al. Treatment of atrial fibrillation in patients with enhanced sympathetic tone by pulmonary vein isolation or pulmonary vein isolation and renal artery denervation: clinical background and study design: the ASAF trial: ablation of sympathetic atrial fibrillation [J]. Clin Res Cardiol, 2018, 107(7):539-547.

(收稿:2019-06-16 修回:2019-09-06)

(本文编辑:丁媛媛)



欢迎关注《国际心血管病杂志》公众号!