

心肌细胞直接重编程的研究进展

赵梦梦 谢玉才

【摘要】 心肌细胞直接重编程是一种新兴的心脏再生技术,它使用表观遗传修饰技术将心脏成纤维细胞转化为终末分化的心肌细胞。该文介绍了心肌细胞直接重编程的研究进展、所面临的问题以及未来的发展方向。

【关键词】 直接重编程;诱导心肌细胞;成纤维细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.02.006

心脏疾病末期心肌细胞大量丢失,因此心肌细胞再生成为研究热点^[1-2]。胚胎细胞和诱导多能干细胞可用于心肌细胞再生,但是由于其转化效率低^[3]、不稳定^[4],存在肿瘤形成、宿主基因型改变的风险及伦理学问题,应用受到限制。新兴的直接重编程(direct reprogramming)指在不改变细胞基因序列的情况下,通过表观遗传修饰使另一种细胞的发育程序完全激活表达,使某种终末分化细胞直接转化为另一种终末分化细胞,而不经过多能干细胞阶段。直接重编程可降低肿瘤形成风险,避免由于使用干细胞带来的伦理学问题。直接重编程研究涉及胰岛 β 细胞^[5]、神经细胞^[6-7] 和肝细胞样细胞^[8] 等,本文介绍心肌细胞直接重编程的研究进展以及目前面临的问题。

1 心脏 GMT 直接重编程

Gata4、Mef2c 和 Tbx5 是心脏发育早期的核心转录因子^[9],其相互作用可激活心脏基因表达,促进心肌细胞分化^[10-13]。2010 年,Ieda 等^[14]首次发现 3 种转录因子(Gata4、Mef2c 和 Tbx5,即 GMT)通过逆转录病毒或慢病毒转染,能够在体外将小鼠心脏成纤维细胞和真皮成纤维细胞转化为有功能的诱导心肌细胞(induced cardiomyocytes, iCMs)。Gata4 可看作“先锋”因子,能开放染色质结构中的心脏位点,使 Mef2c 和 Tbx5 能够结合到特异的目标位点而让心脏程序(cardiac program)完全激活。使用基因谱系示踪技术显示,直接重编程过程中 iCMs 不表达心脏祖细胞的表面标志,表明该过程不经过干

祖细胞阶段。

2 多种因子结合的直接重编程

与诱导多能干细胞增殖相比,体外直接重编程效率低下。为了提高直接重编程效率,研究人员提出了多种重编程因子的不同组合。

Song 等^[15]发现转录因子 GATA4、Hand2、Mef2c 和 Tbx5(即 GHMT)可诱导成年小鼠尾尖成纤维细胞(tail-tip fibroblasts, TTFs)转化为能够自主收缩的 iCMs。GHMT 将 TTFs 转化为 iCMs 的效率比 GMT 高 4 倍,且 TTFs 来源的 iCMs 有心肌细胞的全基因表达谱。这些转录因子能够直接重编程,可能是因为它们阻断了成纤维细胞的激活,使细胞向心肌细胞分化^[16-17]。Nam 等^[18]研究发现,在体外 GHMT 重编程成纤维细胞为心肌细胞的过程中出现了多种细胞表型,包括心房肌样细胞、心室肌样细胞以及起搏细胞。

微小 RNA(miRNA)能够同时抑制多条信号通路,化学合成的 miRNA 类似物在动物实验中呈低毒性^[19]。Jayawardena 等^[20]发现 miR-1、-133、-208、-499 组合能直接将成纤维细胞转化为 iCMs, iCMs 中可见心脏特异性蛋白表达和节律钙振荡,1%~2% iCMs 存在自主收缩,加入 JAK 抑制剂可使重编程效率增加, iCMs 自主收缩增强。该研究首次证明 miRNA 能够在体内外直接重编程成纤维细胞为心肌细胞,说明 miRNA 在调节细胞重编程中作用强大。Muraoka 等^[21]证明,在小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)重编程过程中,GMT 联合 miR-133 过表达产生 iCMs 的效率是单独使用 GMT 的 7 倍;miR-133a 通过直接抑制锌指转录因子 Snail 和沉默成纤维细胞相关基因,促进心肌细胞重编程。

基金项目:国家自然科学基金(81170122)

作者单位:233030 蚌埠医学院(赵梦梦);200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院内科(谢玉才)

通信作者:谢玉才,Email:xiyucui@medmail.com.cn

另外, Addis 等^[22]发现转录因子 Hand2、Nkx2.5、Gata4、Mef2c 和 Tbx5 的混合物(HNGMT)重编程 MEFs 和成年小鼠成纤维细胞为 iCMs 的效率最高。

3 其他相关小分子参与的直接重编程

除转录因子和 miRNA 外,其他小分子也能够参与心肌细胞的重编程。Ifkovits 等^[23]证明转化生长因子- β (TGF- β)抑制剂 SB431542 能够增加成纤维细胞直接重编程为 iCMs 的效率。Wang 等^[24]报道, 硒能够通过转录因子 Nanog 增加 miRNA 直接重编程成纤维细胞为心肌细胞的效率。Park 等^[25]和 Fu 等^[26]证明用小分子化学混合物(如 forskolin、A-8301 和 Chir99021 等)能够直接重编程小鼠成纤维细胞为 iCMs。仅用化学混合物进行直接重编程,不需要病毒载体,不改变小鼠的基因结构,理论上可以减少基因改变和肿瘤形成的风险,这些特性可能成为其临床应用时的优点。

4 动物体内成纤维细胞直接重编程为心肌细胞

Qian 等^[27]和 Song 等^[15]直接将鼠类体内非心肌细胞重编程为有功能的 iCMs。Qian 等^[27]将编码 GMT 的逆转录病毒直接注射到小鼠的梗死心肌层内,在梗死边缘区大约有 35% 的心肌细胞来自于原位心脏成纤维细胞,心肌梗死 3 个月后,小鼠心功能明显改善,纤维化程度降低。Song 等^[15]将编码 GHMT 的逆转录病毒注射到小鼠的缺血心脏中,使 2%~6% 内源性心脏成纤维细胞转化为有功能的 iCMs;小鼠左冠状动脉结扎 3 个月后, GHMT 处理小鼠的射血分数较未处理小鼠增加了 2 倍,心肌梗死后瘢痕缩小了 50%。同样, Inagawa 等^[28]在小鼠心脏的梗死区注入编码 GMT 的逆转录病毒 2 周后,感染病毒的细胞中大约 1% 的细胞表达心脏特异性蛋白 α -actinin,提示细胞转化为 iCMs,而在使用多顺反子 GMT 载体(polycistronic GMT vector)时,得到的 iCMs 更成熟,说明多顺反子载体有望成为体内细胞重编程的工具。Mathison 等^[29]在大鼠左冠状动脉前降支结扎 3 周后注射 GMT 到心肌梗死区,7 周后心功能得到改善, GMT 处理组与对照组相比心脏纤维化减少 50%,射血分数显著增高。Jayawardena 等^[20]发现使用 miRNA 混合物(miR-1、-133、-208 和 -499)后,梗死的心肌中约有 1% 的细胞为 iCMs。

尽管体内重编程效率高于体外重编程,但是 Yi 等^[30]认为,重编程的新生心肌细胞数量太少,与心功能改善的程度不相符,不能完全解释心功能的改

善。病毒转染细胞的过程可能改变了产生瘢痕组织的成纤维细胞的数量和旁分泌行为,使心肌梗死瘢痕面积减少,心功能改善。

5 人类成纤维细胞直接重编程为心肌细胞

有研究尝试将人类成纤维细胞直接重编程为心肌细胞。Nam 等^[31]发现小鼠重编程因子 GHMT 不足以激活人类心脏成纤维细胞相关基因表达,人类心脏基因表达需要额外的转录因子 Myocd。增加肌肉特异性 miRNA,如 miR-1 和 miR-133 可提高人类成纤维细胞的心肌重编程效率,降低 Mef2c 的需要量。成纤维细胞转化为肌钙蛋白 T 阳性细胞的效率为 10%~20%,但只有少量成人心脏成纤维细胞在 11 周后出现自发收缩活动,表明这些 iCMs 只是部分重编程。与小鼠相比,人类心肌细胞的直接重编程效率低,速度慢。

6 直接重编程应用面临的问题

6.1 动物与人类直接重编程条件不同

心脏直接重编程技术还面临着许多挑战,例如对心脏直接重编程分子机制的了解不够深入。研究表明小鼠和人类的重编程过程不同^[23, 32],如转录因子不同、需要的时间不同等。从目前的技术到转化为临床应用还有很大距离,需要进行大型动物实验。

6.2 缺乏统一且有效的重编程效率评价体系

重编程效率的评价标准需有效且统一。由于不同实验室使用的起始细胞、实验条件以及最终效率评价标准不同,使各项结果无法相互比较。起始细胞可能会被其他细胞污染而影响结果,如心脏成纤维细胞作为起始细胞可能会被心脏祖细胞甚至心肌细胞污染;使用的转基因模型特异性不高也可能导致假阳性结果。而对于重编程效率的评估,最初依赖于非功能性标志物的测定,如心脏特异性启动子驱动荧光蛋白^[14-15]或心脏特异性基因^[22],其结果较实际重编程可能偏高,有肌节蛋白结构的重编程心肌细胞未必可以自主收缩。目前最严格的标准是评估心肌细胞自主收缩的能力,可用于量化筛查。Addis 等^[22]报道了对心肌细胞内钙振荡进行检测的方法,钙振荡被看作是电生理学上的心肌细胞收缩,他们构造的心肌细胞特异性肌钙蛋白 T 驱动的钙离子检测系统使心肌细胞收缩可视化和可量化。

6.3 直接重编程效率低下

虽然体内重编程效率比体外重编程高,但仍不足以使受损心肌全部再生,且直接重编程心脏细胞

存活时间短,不能增殖。Chen 等^[33]认为应该在 5~10 d 内使至少 50% 的起始细胞转化为完全成熟的心肌细胞,且速度和质量都足够高。

6.4 存在肿瘤形成风险

直接重编程大多使用病毒转染法,可能存在转基因病毒过表达,甚至肿瘤形成的风险^[33],要进一步探索其他转染方法或小分子替代方法^[34-35]。

6.5 可能引起心律失常

由于部分重编程细胞不能与已有心肌细胞充分兴奋收缩耦联,故可能引起心律失常^[36]。尽管目前没有在接受重编程因子的小鼠中检测到心律失常,但为将直接重编程应用于临床,尚需在大型动物模型中观察是否会引起心律失常^[27]。

7 小结

心脏直接重编程技术是通过表观遗传修饰,使另一种终末分化的细胞基因完全表达而实现的。与体外直接重编程相比,体内重编程效率更高,这可能是因为将体外培养细胞移植到心脏的过程中会造成效率降低,也可能是由于小鼠体内环境,包括三维空间结构、多种旁分泌因子作用和细胞间相互作用等有利于体内直接重编程细胞的生长成熟和功能发挥。目前多种因子结合及各种因子比例调整提高了直接重编程效率,对重编程效率的评价也由单纯结构性标志物的检测深入到功能性标志物的检测,但是心脏成纤维细胞直接重编程为心肌细胞仍存在效率低下和缺乏公认有效的评价体系等局限性。直接重编程的有效性和安全性尚需在大型动物上得到证实,未来的研究重点是人类成纤维细胞的直接重编程。

参 考 文 献

- [1] 鲁映映, 李一文. 心外膜和心外膜源细胞在心脏缺血修复治疗中的作用[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(5):272-275.
- [2] 张汉平, 蔡晓庆, 马 凌. 脂肪间充质干细胞移植治疗兔急性心肌梗死的实验[J]. 国际心血管病杂志, 2015, 42(6):407-411.
- [3] Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming[J]. Cell, 2008, 132(4):567-582.
- [4] Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(8):848-855.
- [5] Cavelti-Weder C, Li W, Zumsteg A, et al. Direct reprogramming for pancreatic beta-cells using key developmental genes[J]. Curr Pathobiol Rep, 2015, 3(1):57-65.
- [6] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors[J]. Nature, 2010, 463(7284):1035-1041.
- [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[J]. 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[J]. Nature, 2011, 475(7356):390-393.
- [9] Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart[J]. Science, 2006, 313(5795):1922-1927.
- [10] Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease[J]. Cell, 2001, 106(6):709-721.
- [11] Garg V, Kathiriyi IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5[J]. Nature, 2003, 424(6947):443-447.
- [12] Ghosh TK, Song FF, Packham EA, et al. Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development [J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(8):2205-2218.
- [13] Lin Q, Schwarz J, Bucana C, et al. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C[J]. Science, 1997, 276(5317):1404-1407.
- [14] 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.
- [15] Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors[J]. Nature, 2012, 485(7400):599-604.
- [16] Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, et al. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(4):389-398.
- [17] Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury[J]. Nat Med, 2007, 13(8):970-974.
- [18] Nam YJ, Lubczyk C, Bhakta M, et al. Induction of diverse cardiac cell types by reprogramming fibroblasts with cardiac transcription factors[J]. Development, 2014, 141(22):4267-4278.
- [19] Elmen J, Lindow M, Schutz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates [J]. Nature, 2008, 452(7189):896-899.
- [20] 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.
- [21] Muraoka N, Yamakawa H, Miyamoto K, et al. MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing Snail and silencing fibroblast signatures[J]. EMBO J, 2014, 33(14):1565-1581.
- [22] 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.
- [23] Ifkovits JL, Addis RC, Epstein JA, et al. Inhibition of TGFbeta signaling increases direct conversion of fibroblasts to induced cardiomyocytes [J]. PLoS One, 2014, 9(2):e89678.
- [24] Wang X, Hodgkinson CP, Lu K, et al. Selenium augments microRNA directed reprogramming of fibroblasts to cardiomyocytes via Nanog[J]. Sci Rep, 2016, 6:23017.
- [25] Park G, Yoon BS, Kim YS, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells using small molecule treatments[J]. Biomaterials, 2015, 54:201-212.
- [26] Fu Y, Huang C, Xu X, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails [J]. Cell Res, 2015, 25(9):1013-1024.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Mathison M, Gersch RP, Nasser A, et al. In vivo cardiac cellular reprogramming efficacy is enhanced by angiogenic preconditioning of the infarcted myocardium with vascular endothelial growth factor[J]. J Am Heart Assoc, 2012, 1(6):e5652.
- [30] Yi BA, Mummery CL, Chien KR. Direct cardiomyocyte reprogramming: a new direction for cardiovascular regenerative medicine[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013, 3(9):a14050.
- [31] Nam YJ, Song K, Luo X, et al. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(14):5588-5593.
- [32] Fu JD, Stone NR, Liu L, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state [J]. Stem Cell Reports, 2013, 1(3):235-247.
- [33] Chen JX, Plonowska K, Wu SM. Somatic cell reprogramming into cardiovascular lineages[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2014, 19(4):340-349.
- [34] Muraoka N, Ieda M. Direct reprogramming of fibroblasts into myocytes to reverse fibrosis [J]. Annu Rev Physiol, 2014, 76:21-37.
- [35] Qian L, Srivastava D. Direct cardiac reprogramming: from developmental biology to cardiac regeneration[J]. Circ Res, 2013, 113(7):915-921.
- [36] Srivastava D, Berry EC. Cardiac reprogramming: from mouse toward man[J]. Curr Opin Genet Dev, 2013, 23(5): 574-578.

(收稿:2016-07-27 修回:2016-12-18)

(本文编辑:胡晓静)

节能减排 低碳出行

