

成纤维细胞向内皮细胞转分化促进缺血性心脏病血管新生

赵晓峰 贺治青 吴宗贵 梁 春

【摘要】 细胞转分化通过重编程或小分子化学诱导的方式使一种分化细胞类型直接转化为另一种期望的细胞类型。该文介绍成纤维细胞向内皮细胞转分化策略及促进缺血性心脏病血管新生的应用前景。

【关键词】 成纤维细胞; 转分化; 缺血性心脏病; 血管新生

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.03.007

心肌纤维化和血管新生是缺血性心脏病(IHD)发生发展过程中的重要因素。抑制心肌纤维化、促进血管内皮细胞新生可抑制心肌重构,改善心功能。IHD 干细胞治疗的临床转化存在较多制约因素,如移植所致心律失常、多能干细胞在体定向分化不可控、致癌风险以及干细胞的远期存活率低等。

转分化是通过重编程(reprogramming)或小分子化学诱导的方式使一种细胞绕过多能干细胞阶段而转化为另一种细胞类型^[1-2]。传统观点认为成纤维细胞是相对成熟的成体细胞,但新近研究发现成纤维细胞可转分化为功能性内皮细胞并融合到宿主组织中,促进血管新生,改善局部血供^[1,3]。IHD 的实质是心肌缺血缺氧引起的级联瀑式反应,通过转分化策略将成纤维细胞诱导为内皮细胞促进“治疗性血管新生”,有望避免干细胞治疗的不足,成为治疗 IHD 的新方法。

1 转分化的发现

以往认为成体器官的细胞相对稳定,表型不发生改变,近年发现转分化途径可改变细胞类型^[4-5]。最初转分化现象是在两栖动物下肢再生和蝴蝶幼虫变态发育中发现的,此后在生理性肠上皮化生和肿瘤发生中也发现存在转分化现象。转分化在再生医学中的应用有两大优势:(1)用于转分化的细胞如成纤维细胞来源丰富、获取方便;(2)转分化可减少局部组织纤维化,同时还可促进重要器官功能

性细胞的再生。利用病毒转导谱系特异性转录因子可将成纤维细胞转分化为神经元细胞、星形胶质细胞,将成人胰腺外分泌细胞转分化为胰岛 β 细胞^[2,6];运用非病毒载体途径可将肝细胞转分化为胰岛 β 细胞^[7];运用小分子策略途径可将心肌成纤维细胞转分化为内皮细胞^[3],将大脑星形胶质细胞转分化为内皮细胞^[8]。

2 成纤维细胞向内皮细胞转分化策略

2.1 短暂性多能性转录因子为基础的转分化策略(transient pluripotent transcription factors based strategy, TPS 策略)

成体细胞通过脱分化(differentiation)可转变为诱导多能干细胞(iPSC),iPSC 在不同条件下可进一步形成不同的细胞类型,成为潜在的治疗性内皮细胞来源。但 iPSC 转化率和分化率低及致癌风险限制了此方法的临床应用。在诱导形成 iPSC 之前存在一个更早的时间点,对成纤维细胞用病毒载体转染 iPSC 转录因子,用分化培养基诱导,继以内皮细胞生长培养基(EGM2)培养,成纤维细胞可快速形成具有同源性的内皮细胞而未激活细胞多能性,称为 TPS 策略。Li 等^[1]证明在诱导环境下,仅转染两种转录因子 Oct4 和 Klf4(OK 组合)就可以使人类成纤维细胞转分化为有一定功能的诱导内皮细胞(iEnd);在体内和体外实验中,iEnd 均呈现出特征性内皮细胞表型,且在小鼠的下肢缺血模型中能促进血管再生和血液灌注。

2.2 细胞激活和信号指导(cell activation and signaling-directed, CASD)策略

近年提出了通过 CASD 进行谱系转变的转分

基金项目:国家自然科学基金(9153910092,91539118,81473445,8151101216),上海市医学领军人才计划

作者单位:200003 上海,第二军医大学附属长征医院心血管内科

通信作者:梁 春,Email:chunliangliang@hotmail.com

化概念^[9-10]。细胞激活是指短暂性过表达的 iPSC 生成相关转录因子激活成体细胞,使之获得多能性,信号指导是指谱系特异性可溶性信号随后被用来进行谱系定向分化指导,使具有多能性的细胞形成多种不同的细胞类型。与传统的使用多组不同谱系特异性转录因子的转分化方法不同,CASD 转分化策略仅采用一组通用的转录因子组合,通过信号通路指导来诱导各种细胞类型定向分化。随后一些研究表明,某些小分子可以部分替代转录因子组合,包括转化生长因子- β (TGF- β)信号通路抑制剂、组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂、Wnt 信号通路激动剂等,我们推测小分子化合物鸡尾酒组合可以通过 CASD 策略替代转录因子诱导成纤维细胞形成内皮细胞。

2.3 小分子策略

小分子可产生较快的生物学效应,因不与靶蛋白共价结合,产生的效应是可逆的。小分子合成、保存和标准化方便,比蛋白质、mRNA、细胞因子更稳定,性价比更高。通过对小分子结构、浓度进行优化和将不同小分子进行组合,可使其效应提高。小分子可以容易地调控信号通路和表观遗传学修饰。小分子可能通过以下机制调节基因表达:(1)作为信号通路调节者,通过激活或抑制信号转导通路上的靶点来调节下游转录活动;(2)作为表观遗传调节者,调节表观遗传复合物的生物活性;(3)作为细胞代谢调节者,调节细胞状态,改变表观遗传学配体蛋白和共效性分子的代谢产物平衡;(4)作为核受体激动剂或拮抗剂,通过核受体直接调节转录活动。目前,研究发现 2 种小分子途径可以调节小鼠成纤维细胞向内皮细胞转分化。

2.3.1 激活细胞应激相关信号通路的小分子途径 Ubil 等^[3]研究显示利用成纤维细胞的可塑性可实现对细胞表型的调控。他们发现在小鼠急性心肌梗死造模过程中心肌成纤维细胞经历从间叶向内皮谱系的转变,且此过程依赖 p53 的调控;体外实验进一步发现,血清饥饿(模拟急性心肌梗死微环境)促使成纤维细胞发生谱系变化,这些细胞可表达内皮细胞特异性蛋白,并具有促进体外微血管形成、吞噬 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-Ac-LDL)、分泌内皮舒张因子一氧化氮(NO)等内皮细胞的功能,利用小分子 p53 激动剂 RITA 可提高血清饥饿下心肌成纤维细胞向内皮细胞的转分化效率。Brumm 等^[8]的研究也验证了小分子策略诱导

间质细胞转分化为血管内皮细胞的可行性,他们发现细胞应激下大脑星形胶质细胞具有转分化为内皮细胞的固有潜能,在血清饥饿刺激下,大脑星形胶质细胞反应性上调内皮细胞特异性基因 CD31、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、血管内皮钙黏着蛋白复合体(VECAD)等的表达水平,并且可在体外形成微管样结构。上述研究证明,细胞应激可能会激活某种信号通路(如 p53 信号通路),使间质细胞向内皮细胞转分化,从而促进血管新生,起到自我修复的作用。

2.2.2 激活固有免疫的小分子途径 Sayed 等^[11]发现固有免疫信号通路也参与转分化细胞谱系的调控:(1)固有免疫中 Toll 样受体 3(TLR3)的配体 TLR3 激动剂 Poly(I:C)联合外源性内皮生长因子,可诱导人类包皮成纤维细胞和鼠尾尖成纤维细胞转分化为表型与人类脐静脉内皮细胞(HMVEC)高度相似的诱导型内皮细胞(iEC),转化率分别为 2.01%和 3.93%;(2)iEC 在注射到小鼠缺血下肢后,具有与 HMVEC 类似的改善下肢灌注和缺血损伤的功能;(3)iEC 的诱导主要依赖于激活固有免疫的小分子途径。这说明固有免疫信号通路在损伤和再生时的转分化过程中发挥一定调节作用。

小分子途径可通过激活细胞应激相关信号通路和固有免疫信号通路实现对心肌成纤维细胞表型的调控,是成纤维细胞向内皮细胞转分化策略中更为便利的在体应用途径,有望应用于 IHD 的治疗。

3 成纤维细胞转分化促进 IHD 血管新生的应用前景

IHD 患者可能存在大量功能失调但可逆的冬眠心肌,从这种意义上来说改善心脏血流供应和干细胞治疗对 IHD 同等重要。运用转分化的方法实现成纤维细胞谱系直接转化可能是 IHD“治疗性血管新生”的一种新颖的、潜在模式。转录因子过表达的方法可能会导致意外的基因修饰。小分子转分化策略减少了基因水平的操作,在再生医学中具有明显优势,但分子机制有待于进一步阐明。HDAC、糖原合成酶激酶-3(GSK-3)和 TGF- β 是化学小分子转分化策略中常用的 3 个靶点,研究发现使用相同的小分子可以使细胞转分化为完全不同的细胞类型,如在特定时间用不同浓度的 DNA 甲基化抑制剂 5-氮杂胞苷处理,人类成纤维细胞可以转分化为功能性的神经元、胰腺细胞、肌细胞^[12]。

另一种表观遗传调节剂 HDAC 抑制剂可通过改变染色体状态诱导细胞脱分化。而 TGF- β 抑制剂可能通过调节间叶与上皮谱系转变促进细胞重编程, GSK3 抑制剂可能通过激活 WNT 信号通路在细胞转分化中发挥作用。

未来转分化策略可能通过以下方式应用于 IHD 的治疗:(1)体外将成纤维细胞转分化为内皮细胞,扩增后移植到宿主缺血部位,利用移植细胞的旁分泌机制通过所分泌的细胞因子改善局部微环境,促进梗死边缘区血管新生;(2)局部或全身性给予某种小分子,使其作用于转分化通路中某一位点,促进体内原位的成纤维细胞向内皮细胞转分化;(3)小分子和干细胞疗法的联合方式,利用小分子途径增加干、祖细胞生成数量或提高其功能。通过何种途径给药(如局部注射、口服或静脉注射等)仍有待进一步研究评估。小分子途径也可能会产生不可预期的不良反应,需要在将来的临床研究中予以考虑。

总之,成纤维细胞具有转分化为内皮细胞的潜能,激活这种潜能并促进“治疗性血管新生”有望成为 IHD 的治疗选择。完全运用小分子而不涉及外源性基因修饰的化学转分化将是成纤维细胞转分化的理想策略。

参 考 文 献

- [1] Li J, Huang NF, Zou J, et al. Conversion of human fibroblasts to functional endothelial cells by defined factors [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33 (6): 1366-1375.
- [2] Caiazzo M, Giannelli S, Valente P, et al. Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(1):

25-36.

- [3] Ubil E, Duan J, Pillai IC, et al. Mesenchymal-endothelial transition contributes to cardiac neovascularization [J]. *Nature*, 2014, 514(7524):585-590.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells[J]. *Nature*, 2008, 455(7213):627-632.
- [7] Motoyama H, Ogawa S, Kubo A, et al. In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385(1):123-128.
- [8] Brumm AJ, Nunez S, Doroudchi MM, et al. Astrocytes can adopt endothelial cell fates in a p53-dependent manner[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, Jul 8. [Epub ahead of print].
- [9] Li W, Li K, Wei W, et al. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(3): 270-283.
- [10] Liu K, Yu C, Xie M, et al. Chemical modulation of cell fate in stem cell therapeutics and regenerative medicine[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(8):893-916.
- [11] Sayed N, Wong WT, Ospino F, et al. Transdifferentiation of human fibroblasts to endothelial cells: role of innate immunity[J]. *Circulation*, 2015, 131(3):300-309.
- [12] Brevini TA, Pennarossa G, Rahman MM, et al. Morphological and molecular changes of human granulosa cells exposed to 5-azacytidine and addressed toward muscular differentiation[J]. *Stem Cell Rev*, 2014, 10(5):633-642.

(收稿:2016-11-13 修回:2017-03-08)

(本文编辑:胡晓静)