

DOI: 10.13376/j.cbbs/2014098

文章编号: 1004-0374(2014)07-0703-06

多能干细胞诱导分化及体细胞转分化为心肌细胞的研究进展

姜良霞, 陈忠良, 杨世华*

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

摘要: 心血管疾病是威胁人类健康的重大疾病, 而心肌细胞数量逐渐减少, 甚至衰竭是其核心病变。心肌细胞补偿性替代治疗是未来用于治疗这类疾病的重要手段, 因此, 心肌细胞的来源和有效治疗将成为关键。目前, 心肌细胞构建的主要方法有多能干细胞诱导分化成心肌祖细胞或心肌细胞、心源性心肌祖细胞, 以及体细胞重编程等。其中, 多能干细胞向心肌细胞分化是最常用的方法; 而体细胞转分化技术相较于传统的诱导多潜能干细胞衍生心肌细胞缩短了时间窗, 为潜在的心血管疾病治疗提供了另一种思路。随着获取心肌细胞效率及其质量的提升, 未来心血管疾病的治疗将有望获得重大突破。

关键词: 心肌细胞; 分化; 重编程

中图分类号: Q813 **文献标志码:** A

Progress in pluripotent stem cell differentiation and somatic cell transdifferentiation into cardiomyocytes

JIANG Liang-Xia, CHEN Zhong-Liang, YANG Shi-Hua*

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Cardiovascular diseases are one of the leading causes of human death in the whole world. The progressive decrease and even exhaustion of myocardial cells are the root causes of cardiac problems. Cardiac muscle engineering will be an important tool for curing the cardiovascular disorders in future. Therefore, production of perfectly matched cardiomyocytes is important for cardiovascular replacement therapy. But the challenge is how to generate the cardiomyocytes. There are some methods to construct myocardial cells, including differentiating induced pluripotent stem cells into cardiac myocytes, myocardial cells derived directly from animal or human heart, somatic cell reprogramming, and so on. Differentiating pluripotent stem cells is the most popular method; also somatic cell reprogramming and transdifferentiation can shorten the time for generating cardiomyocytes compared with the traditional method with induced pluripotent stem cells. Recently published observations confirm the hope that differentiating pluripotent stem and somatic cell reprogramming will be potential methods for cardiovascular disease treatment. With the improved efficiency in obtaining cardiomyocytes, it is possible to have a big achievement in cell therapy for cardiovascular diseases.

Key words: cardiomyocyte; differentiation; reprogramming

心血管疾病是危及人类健康与生命的重大疾病。风心病、心肌病和冠脉疾病等心脏疾病的共同

特点是: 具有完整收缩功能的心肌细胞数量相对或绝对减少, 纤维瘢痕组织增生替代正常的心肌细胞,

收稿日期: 2013-09-15; 修回日期: 2013-10-29

基金项目: 科技部重大科学研究计划重大科学问题导向项目(2012CBA01302); 教育部“新世纪国家优秀人才”支持计划项目(NCET-12-1078); 国家自然科学基金项目(31071279, 30871232); 云南省科技创新人才计划项目(2011CI009)

*通信作者: E-mail: yshhm@163.com

最终导致心脏衰竭。新生哺乳动物的心脏损伤部位能够通过心肌细胞增殖来修复^[1],但在出生后不久,几乎所有的心肌细胞由增生型转变成肥厚型,即形成双核心肌细胞,退出细胞分裂周期^[2]。研究表明,成人心肌细胞每年的更新率小于1%,且成人心脏中只有40%的心肌细胞是后天生成的^[3]。成年小鼠心肌梗死后形成的持久性瘢痕组织也说明,心脏形成新生心肌细胞的能力有限。虽有报道称哺乳动物胎儿出生前心脏发育所需的生长因子,如 neuregulin 1 (NRG1)^[4] 和 periostin (POSTN)^[5] 可在体外诱导心肌细胞亚群重新进入细胞周期,但到目前为止还不能确定其产生的机理。另一方面,心肌细胞的替代治疗也成为人们关注的焦点。多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)具有分化为三个胚层中各种类型细胞的特性。这些特性不仅赋予了PSCs在研究心肌细胞发生与发育过程中分子机制的重要价值,而且为研究治疗心肌梗死的细胞替代疗法以及心肌组织工程提供可能性。心肌细胞体内、体外重编程技术的建立,为心肌细胞再生和功能恢复带来了更为广阔的应用前景。本文重点总结了心肌细胞再生和其中的细胞分子生物学机理。

1 心脏发育机制

心脏发育过程较为复杂。小鼠与人在基因上有高达90%的同源性且两者的心血管系统极为相似^[6],通过基因修饰小鼠模型的分析使得人们对心脏及血管发育的分子机制有了更多的认识,比如心脏的起源与诱导、心血管形成、心脏的不对称发育、心脏扭转(环化)与心室分化、心脏传导系统与血管形成、心肌的分化。小鼠心脏和血管的发育起源于中胚层的祖细胞——生心祖细胞(cardiac progenitor)和生血管祖细胞(angioblast),它们受不同的诱导信号激活开始定向发育^[7]。在小鼠胚胎发育第5天,外胚层近端Nodal信号被激活,诱导BMP4表达,BMP4又进一步上调近端外胚层Wnt3的表达。在第5.5天,Wnt信号抑制剂Dkk1、Nodal信号抑制剂Lefty1以及Cer1阻断Wnt信号和Nodal信号在后期外胚层的表达,进而促进外胚层定向发育。在第5.75天左右,在Wnt信号的作用下中胚层的相关基因,如T(brachyury)、Eomes等开始表达。随后,中胚层内参与上皮-间充质转换的基因(如Fgf4和Fgf8)也被激活。T、Eomes开始诱导MESP1的表达^[8-9]。MESP1可直接或间接地调控Tbx5、Nkx2-5、Mef2c、Gata4、Hand2、Myocd、Isl1和Foxh1等

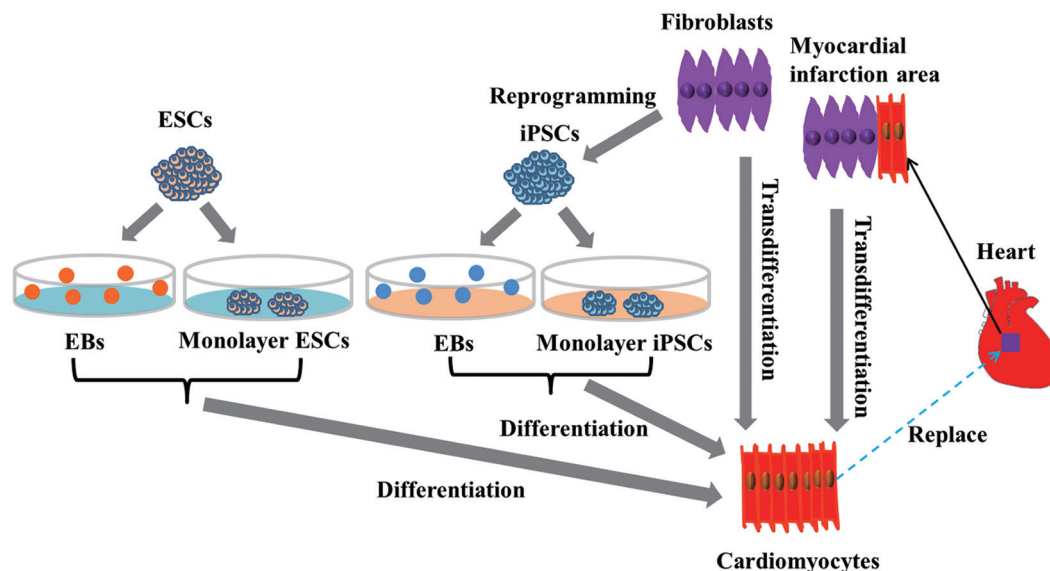
与心脏发育相关的核心转录因子的表达^[10]。一旦生心中胚层被确定,经典Wnt和Notch信号通路就会调控心肌祖细胞的增殖和分化^[11-12]。生心中胚层可分化出心肌膜、第一生心区(可形成心房、左心室、心传导系统)、第二生心区(可形成右心室、外流道和部分心房)及心外膜间充质^[13]。小鼠心脏发育经过原始心管的形成和复杂的形态发生,最后形成四腔室结构的的心脏。整个过程可以分为四个阶段:(1)生心细胞的诱导和特化;(2)心血管形成;(3)心脏环化和不对称发育;(4)腔室特化和生长^[14]。

2 多能干细胞定向诱导分化成心肌细胞

多能干细胞定向诱导分化为心肌细胞的研究较为深入和广泛,为心肌细胞替代治疗奠定了基础。人多能干细胞也可在一定环境下自发分化为心肌细胞。目前人多能干细胞诱导分化成心肌细胞的方法有拟胚体(embryoid body, EB)诱导法和多能干细胞单层诱导法(图1)。

2.1 EB诱导法

EB法诱导人多能干细胞分化成心肌细胞,最初是将人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)悬浮在含有20%血清的培养基中形成球状体^[15],该球状体能形成胚外卵黄囊和胚胎的3个胚层,在贴壁4~7d后可诱导出心肌细胞。虽然这种方法效率很低,但几乎所有的人多能干细胞系用此种方法都能获得5%~15%跳动的心肌细胞^[16]。通过在前2d加入Wnt3a^[17],在前4d加入BMP4^[18],第4~6天加入IWR-1^[19]等均可提高人多能干细胞诱导分化为心肌细胞的比率。但由于其分化过程中含有血清,制约了其在临床中的应用,无血清分化体系也就应运而生。在无血清分化体系中,通过加入一些小分子可将人多能干细胞诱导分化成心肌细胞^[20-22],如前4d在分化培养基内加入BMP4、FGF2和activin A,第4~8天加入VEGFA和DKK1,第8天以后加入VEGF和FGF2,约70%左右的EB可自发跳动^[21]。另外,在第3~5天加入小分子SB431542和dorsomorphin^[20]或在第4~10天加入Wnt信号抑制剂IWR-1^[23]均可提高其分化比率。5-azacytidine在人多能干细胞分化为心肌细胞的过程中也经常用到^[22]。一些促进心肌祖细胞产生的小分子,如WNT3a^[24]、G-CSF^[25]和抗坏血酸^[26]等也可提高其分化比率。然而,如果在分化过程中形成的EB大小不均一,则每次分化为心肌细胞的效率可能不同,不宜应用于药物筛选和细胞模型等方



ESCs: 胚胎干细胞; EB: 拟胚体; cardiomyocytes: 心肌细胞; monolayer ESCs: 单层胚胎干细胞; iPSCs: 诱导多能干细胞; myocardial infarction area: 心肌梗死区

图1 多能干细胞诱导分化成心肌细胞及心肌细胞转分化

面。通过使用 U 型或 V 型底的 96 孔板可形成大小均一的 EB, 最初用这种方法, 从 4 株不同的人类胚胎干细胞均获得了 23% 左右跳动的 EB (其内含有分化成心肌细胞的)^[27]。Elliot 和其同事采用了此方法, 通过在前 3 d 添加 BMP4、activin A、Wnt3a、KITLG (SCF) 和 VEGFA, 得到了较高的分化比率^[28]。到目前为止, 悬浮 EB 分化方法已经较为成熟, 用这种方法通常能使人多能干细胞诱导分化为心肌细胞的比率高达 70%, 且由于整个诱导分化过程为悬浮体系, 有利用于心肌细胞的大量生产。但此方法较耗时, 在不同的时间段需要添加不同种类的小分子使得技术较复杂, 产生的心肌细胞类型复杂, 且由于受多能干细胞状态及 EB 大小等影响, 使得其重复性较差。

2.2 单层诱导培养法

单层细胞诱导分化的技术简单, 重复性好, 并且细胞可与小分子化合物、生长因子等充分作用, 故多能干细胞单层诱导法也受到研究者的关注。该方法最初是将 hESCs 高密度培养, 加入高剂量的 activin A, 随后用 BMP4 处理 4 d, 在第 12 天可产生约 30% 的心肌细胞^[29]。后来, 此方案不断得到改进, 心肌细胞的分化比率也得到了明显的提高, 如在第 1 天加入 Wnt3a, 在第 5~11 天加入 DKK1^[30], 在第 3 天加入 Wnt 信号抑制剂 IWR-1 或 IWP-4 等均可提高心肌细胞分化比率^[31]。其中, 通过在第

0~1 天加入 CHIR99021 和第 3~5 天加入 IWP4 或 IWP2 诱导人多潜能干细胞分化为心肌细胞, 其效率达到 80%^[32], 这为心肌细胞应用于临床治疗用提供了可能。

3 成纤维细胞转分化为心肌细胞

转分化是一种类型的细胞或组织在某些理化因素作用下转变为另一种正常细胞或组织的现象。这早在几十年前就有报道^[33-34]。最近的研究已经证明, 谱系重编程可产生各类医学相关的细胞类型, 包括胰腺 β - 细胞、神经细胞、软骨核细胞和肝细胞等^[35-39], 而心肌细胞转分化 (体外转分化和原位转分化) (图 1) 有可能为未来人体内相关细胞重编程为心肌细胞提供思路。

3.1 体外转分化

2006 年, Takahashi 和 Yamanaka^[40] 通过转入 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 四种转录因子将小鼠成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)。随后的研究发现, 在 iPSCs 形成后期偶尔可以看到各种终末分化的细胞, 包括跳动的心肌细胞。这表明体细胞可以通过外源转录因子的导入, 直接被转分化为其他类型的体细胞或祖细胞。利用 Gata4、Mef2c 和 Tbx5 (GMT) 这 3 个转录因子, 可以有效地将胎鼠心肌成纤维细胞转分化成为跳动的类心肌细胞, 而这种类心肌细

胞具有胎鼠心肌细胞相似的基因表达谱和电生理特性^[41],但其转化比率仅约6%。通过强制表达心肌细胞的转录因子或 microRNA (如 micR-1/133/208/499^[42])也可使小鼠的成纤维细胞转分化为心肌细胞。另外,也可通过在此基础上加入一些转录因子来提高心肌转分化的比率,如 GMT (Gata4、Mef2c、Tbx5、Hand2)^[43]。通过在 GMT 的基础上加入 ESRRG 和 MESP1 这两种转录因子可将人胚胎干细胞来源的成纤维细胞转分化为心肌样细胞,在此基础上再添加 MYOCD 和 ZFPM2 可提高其重编程效率,且重编程的心肌细胞具有与人心肌细胞相似的基因表达谱和电生理特性,这可能归功于在重编程过程中,近百种心肌细胞基因的表达上调及近百种成纤维细胞基因的表达下调^[44]。然而,到目前为止,体外转分化获得的心肌细胞比率较低,且体外转分化获得的心肌细胞和体内的心肌细胞仍有一定的差异,其中实验室之间使用的成纤维细胞系或诱导载体以及病毒滴度等不同是引起差异重要原因之一。由于这种方法可将患者皮肤成纤维细胞直接转分化为心肌细胞,在临床治疗上有重要意义,也对转分化的机制研究有重要作用,故受到极大关注。

3.2 原位转分化

心脏主要由心肌细胞、血管细胞、心肌成纤维细胞构成,其中心肌成纤维细胞约占正常心脏组织的50%左右^[45-47]。在正常和病态心肌中,心肌成纤维细胞与心脏发育、心肌损伤后瘢痕形成等密切相关^[48]。如果可以将内源性心肌成纤维细胞直接转分化为跳动的心肌细胞,则其可作为一个体内潜在的、巨大的心肌细胞再生来源。最近的研究结果表明,将载有某些基因(如 GMT 三种基因)的逆转录病毒直接注入到小鼠梗死心肌区域可使心肌成纤维细胞转变成成为有功能的心肌细胞,从而改善心脏功能^[42-43,49-50]。如将载有 GMT 的逆转录病毒载体直接注入到小鼠心肌梗死区域,在该区域新产生的心肌细胞中约有35%来自小鼠心肌成纤维细胞^[50],其中一半的心肌细胞有良好的横纹肌结构并且显示出成体心肌细胞的功能特性,包括细胞收缩、电生理特性以及和其他心肌细胞耦合等。另外,直接在心肌梗死处注入 microRNA 如(micR-1/133/208/499)^[42]也可使心脏成纤维细胞转分化为有功能的心肌细胞,且效率达到了1%。和体外转分化相比,体内转分化有以下几个优点:首先,该过程较为简单,用时较短;其次,避免体外直接转分化为心肌细胞可能经历的干细胞或是祖细胞阶段,从而大大降低

形成肿瘤的风险;第三,直接向体内注射明确的因子避免了细胞移植。但是,体内转分化不能人为地控制其转分化出来的心肌细胞的特性和数量,且目前还不清楚新生成的心肌细胞能否长期在心脏受损部位存活^[51-52]。

4 展望

对于治疗由心肌细胞损伤所致的心脏功能低下甚至衰竭来说,增加具有功能性的心肌细胞是关键因素之一。近期利用小分子化合物代替导入外源转录因子可直接将小鼠终末分化的体细胞诱导成为 iPSCs^[53],这为临床上利用自身体细胞重编程为 iPSCs,再将其定向诱导分化为适宜进行细胞移植治疗的心肌(祖)细胞,并借助心肌细胞移植治疗方法,进而实现心脏功能修复提供了理论根据。这不仅避免了细胞移植免疫排斥和细胞来源问题,也解除了患者对接受移植非自身细胞的心理障碍。但是目前尚未建立起一套通用的、标准的、能够大量获得临床级的、且能够用于医学治疗的功能性心肌细胞的方法;另外,用于治疗的心肌细胞的单一性、稳定性、存活率以及如何避免细胞疗法中未分化的 iPSCs 导致畸胎瘤的危险,仍然是这一领域中的最大难点。原位转分化为心肌细胞损伤治疗另辟蹊径,在降低了心脏纤维瘢痕组织增生的同时避免了细胞治疗中的脱靶效应。但是,这方面技术研究还很有限,也存在较多不容忽视的问题,如病毒载体所引发的安全问题,处理的时机和时序性及量效关系等。为此,探求新的、不借助病毒对细胞进行重编程的媒介就显得尤为重要和紧迫。另外,心肌细胞发育的机制问题仍然需要更进一步研究,如何保持构建的心肌细胞在体内的正常的生理反应,以及治疗时间间隔等问题有待解决。目前构建的心肌细胞多限于动物科研阶段,尚未应用于临床。随着人们不断地深入研究,对它们的各种利弊认识也会越来越清晰,这为细胞替代疗法实现心脏修复与再生治疗创造了有利的条件。

[参 考 文 献]

- [1] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-80
- [2] Pasumarthi KB, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res*, 2002, 90(10): 1044-54
- [3] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 2009,

- 324(5923): 98-102
- [4] Bersell K, Arab S, Haring B, et al. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*, 2009, 138(2): 257-70
- [5] Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med*, 2007, 13(8): 962-9
- [6] Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 2002, 420(6915): 520-62
- [7] 吴秀山. 心脏发育概论[M]. 北京: 科学出版社, 2006
- [8] Costello I, Pimeisl IM, Drager S, et al. The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of *Mesp1* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(9): 1084-91
- [9] David R, Jarsch VB, Schwarz F, et al. Induction of *MesP1* by *Brachyury(T)* generates the common multipotent cardiovascular stem cell. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(1): 115-22
- [10] Bondue A, Blanpain C. *Mesp1*: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circ Res*, 2010, 107(12): 1414-27
- [11] Qyang Y, Martin-Puig S, Chiravuri M, et al. The renewal and differentiation of *Isl1*⁺ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(2): 165-79
- [12] Kwon C, Qian L, Cheng P, et al. A regulatory pathway involving Notch1/ β -catenin/*Isl1* determines cardiac progenitor cell fate. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(8): 951-7
- [13] Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(11): 826-35
- [14] Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev*, 2003, 17(16): 1937-56
- [15] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 2001, 108(3): 407-14
- [16] Zwi L, Caspi O, Arbel G, et al. Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2009, 120(15): 1513-23
- [17] Tran TH, Wang X, Browne C, et al. Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27(8): 1869-78
- [18] Takei S, Ichikawa H, Johkura K, et al. Bone morphogenetic protein-4 promotes induction of cardiomyocytes from human embryonic stem cells in serum-based embryoid body development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(6): H1793-803
- [19] Ren Y, Lee MY, Schliffke S, et al. Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(3): 280-7
- [20] Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(2): 228-40
- [21] Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a *KDR*⁺ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, 2008, 453(7194): 524-8
- [22] Yoon BS, Yoo SJ, Lee JE, et al. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation*, 2006, 74(4): 149-59
- [23] Willems E, Spiering S, Davidovics H, et al. Small-molecule inhibitors of the Wnt pathway potentially promote cardiomyocytes from human embryonic stem cell-derived mesoderm. *Circ Res*, 2011, 109(4): 360-4
- [24] Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al. Human *ISL1* heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*, 2009, 460(7251): 113-7
- [25] Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, et al. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(3): 227-37
- [26] Cao N, Liu Z, Chen Z, et al. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res*, 2012, 22(1): 219-36
- [27] Burridge PW, Anderson D, Priddle H, et al. Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability. *Stem Cells*, 2007, 25(4): 929-38
- [28] Elliott DA, Braam SR, Koutsis K, et al. NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. *Nat Methods*, 2011, 8(12): 1037-40
- [29] Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(9): 1015-24
- [30] Paige SL, Osugi T, Afanasiev OK, et al. Endogenous Wnt/ β -catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11134
- [31] Hudson J, Titmarsh D, Hidalgo A, et al. Primitive cardiac cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(9): 1513-23
- [32] Lian X, Hsiao C, Wilson G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(27): E1848-57
- [33] Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature*, 2009, 462(7273): 587-94
- [34] Vierbuchen T, Wernig M. Direct lineage conversions: unnatural but useful? *Nat Biotechnol*, 2011, 29(10): 892-907
- [35] Han DW, Tapia N, Hermann A, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4): 465-72
- [36] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 2011, 475(7356): 386-9

- [37] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 2008, 455(7213): 627-32
- [38] Hiramatsu K, Sasagawa S, Outani H, et al. Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *J Clin Invest*, 2011, 121(2): 640-57
- [39] Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 2011, 475(7356): 390-3
- [40] 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
- [41] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, 142(3): 375-86
- [42] 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): 1465-73
- [43] Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 2012, 485(7400): 599-604
- [44] Fu JD, Stone NR, Liu L, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem Cell Reports*, 2013, 1(3): 235-47
- [45] Baudino TA, Carver W, Giles W, et al. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(3): H1015-26
- [46] Snider P, Standley KN, Wang J, et al. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res*, 2009, 105(10): 934-47
- [47] Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(1): 40-51
- [48] Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, et al. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell*, 2009, 16(2): 233-44
- [49] Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, 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
- [50] Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 2012, 485(7400): 593-8
- [51] Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res*, 2008, 100: 133-58
- [52] Zhang M, Methot D, Poppa V, et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(5): 907-21
- [53] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341(6146): 651-4