

DOI: 10.13376/j.cblls/2017027

文章编号: 1004-0374(2017)02-0202-07

心肌转分化研究进展

李 然, 鲍礼智, 沈 明, 郑 兴*

(第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433)

摘 要: 成人固有心肌细胞受损伤后几乎没有再生能力, 是心血管疾病仍然是世界范围内致死率最高的疾病之一的重要原因。通过导入转录因子、microRNA 以及一些小分子等方法的体细胞心肌转分化技术有望解决该医学难题。近年来, 成纤维细胞转分化心肌细胞在方法策略、诱导时间及效率上又取得新的重大进展。现对当前该方面体内体外研究进展进行综述。

关键词: 转分化; 直接重编程; 成纤维细胞; 心肌细胞; 再生医学

中图分类号: Q344; Q813; R318 **文献标志码:** A

Advances in transdifferentiation of induced cardiomyocytes

LI Ran, BAO Li-Zhi, SHEN Ming, ZHENG Xing*

(Department of Cardiovasology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Cardiovascular disease remains one of the leading causes of mortality worldwide. One of the important reasons is resident cardiomyocytes hardly have the capacity to regenerate in adult heart after injury. Such transdifferentiation, with the use of transcription factors, microRNAs and small molecule delivery to reprogram somatic cells to cardiac cells, has great potential for tackling the compelling medical problem. In recent years, great progress was made in strategy, time consuming and efficiency of transdifferentiation in the generation of cardiomyocytes from fibroblasts. Here, we aim to present a brief overview of the current *in vitro* and *in vivo* progress on this topic.

Key words: transdifferentiation; direct reprogramming; fibroblast; cardiomyocyte; regenerative medicine

当前, 人们对以心肌细胞损伤和心功能受损为特征的心血管疾病的认识以及诸如药物、介入、手术等治疗方式有很大提高, 心血管疾病死亡率整体呈下降趋势; 但是, 由于心肌细胞一旦受损伤几乎没有再生能力, 传统治疗手段主要限制疤痕的形成和不良重塑, 使得该类疾病依然是世界范围内致死率最高的疾病之一^[1]。然而, 随着诱导多能干细胞体外分化和心肌细胞诱导方法的建立, 细胞替换治疗有望改变这种局面。

细胞转分化技术是将一种类型的细胞直接重编程成为另一种具有不同形态功能的细胞类型。该技术不经过多能干细胞阶段, 将一种相对丰富易得的细胞转变成为一种相对缺少却具有重要功能的细胞, 具有用时短且减少肿瘤发生的可能性等优势^[2], 可广泛应用于疾病的治疗、模型的构建和再生医学

的研究。成纤维细胞转分化研究开始于 2002 年 Etzion 等^[3] 利用 MyoD 诱导成纤维细胞转分化为成肌细胞。随后的研究发现, 抑制来源细胞表观特征是成功转分化需要跨越的主要分子阻碍, 转分化过程中细胞不仅经历转录水平变化, 而且在 DNA 甲基化和组蛋白修饰等表观遗传上也发生相应变化。

近年来, 研究者采用过表达转录因子、microRNA (miRNA) 或添加小分子等方法诱导成纤维细胞向心肌细胞 (induced cardiomyocytes, iCMs) 及心脏祖细胞 (induced cardiac progenitor cells, iCPCs) 转分化研

收稿日期: 2016-06-06; 修回日期: 2016-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170092)

*通信作者: E-mail: zhengxing57530@163.com; Tel: 021-31161262

究进展迅速, 不断涌现新的成果, 为心脏发育与心血管疾病细胞治疗提供新的方法, 具有极其重要的价值。现就这方面最新进展进行综述, 并对不同方法获得的 iCMs 或 iCPCs 的功能进行分析比较。

1 转录因子诱导心肌细胞转分化

2010年, Ieda 等^[4]借助标记有特异心肌肌球蛋白重链启动子 (α -MHC-GFP) 的转基因小鼠, 从 14 个心肌发育转录因子中筛选出 Gata4、Mef2c 和 Tbx5 (GMT) 组合, 成功将终末分化的小鼠心脏成纤维细胞 (MCFs) 体外转分化为具有自发跳动的 iCMs。为排除 iCMs 源于诱导前原有少量心脏祖细胞或心肌细胞污染的可能, 研究者采用相同方式诱导小鼠尾尖成纤维细胞 (TTFs) 向心肌转分化, 同样成功获得了自发跳动的 iCMs。经进一步鉴定, 两种来源的 iCMs 均具有明显的肌节结构和 α -actinin 表达, 不同的是, TTFs 来源 iCMs 的 cTnt⁺ 细胞数量及自发钙振荡频率均少于 MCFs 来源 iCMs。此后, 在 Ieda 经典 GMT 转录因子基础上, 研究者通过添加不同的转录因子组合诱导成纤维细胞也成功获得 iCMs, 虽然诱导效率及时间较前有所提高^[5-6], 但总体上重编程依然耗时长、效率低。2015年, Zhao 等^[7]研究发现, Gata4、Hand2、Mef2c 和 Tbx5 (GHMT) 在诱导心肌重编程过程中同时伴有纤维化通路信号表达上调。研究者利用小分子 A83-01/Y27632 抑制 TGF- β / ρ 因子相关激酶信号通路, 发现细胞自发跳动出现时间由单独 GHMT 诱导转分化至少需要 4 周缩短到不到 2 周时间; 同时, 小鼠胚胎成纤维细胞和成年成纤维细胞的转分化效率均有大幅提高, 其中胚胎成纤维细胞转分化效率可高达 60%。研究者还发现, miR-1 和 miR-133 有弱化促纤维化基因表达作用进而可提高心肌重编程效率。研究者的这一重要发现为成纤维细胞转分化为功能性心肌细胞的分子机制提供了新的研究切入点。2015年, Wang 等^[8]研究发现, GMT 组合不仅是心肌正常发育精细调控网络中最重要且广泛存在的转录因子, 而且 GMT 因子间化学剂量比也是影响重编程效率与质量的重要因素, 具体为 Mef2c 蛋白高表达和 Gata4、Tbx5 低表达是多顺反子载体诱导成纤维细胞获得 iCMs 的关键。这一现象在通过非病毒 miRNA 导入系统诱导转分化中也得到证实^[9]。这一发现也解释了部分研究者采用相似方法获得转分化效率的不同可能是由于导入转录因子过表达量的不同造成的^[8]。

然而, 不同于成体细胞重编程 iPSCs 过程, 小鼠细胞转分化明确的组合 (转录因子、miRNA 及小分子) 在诱导人成纤维细胞转分化时却差异很大^[10], 人源成纤维细胞转分化心肌细胞研究进展缓慢。2013年, Nam 等^[11]首次报道了人成纤维细胞经诱导转分化为表达 cTnt⁺ 心肌样细胞。研究者采用 4 个转录因子 (Gata4、Tbx5、Hand2、Myocd, GHTMy) 和 2 个 miRNA (miR-1 和 miR-133) 组合, 在人包皮成纤维细胞诱导 iCMs 效率可达 20%, 但在人心脏成纤维细胞和皮肤成纤维细胞效率仅为 13% 和 9.5%, 而且仅心脏成纤维细胞诱导产生的 iCMs 经过 11 周培养后才观察到少量的细胞跳动现象。这提示成纤维细胞取材的遗传背景、年龄及组织部位等因素也会影响转分化的效率。2013年, Fu 等^[12]在 GMT 基础上联合 MESP1、MYOCD、RSRRG 及 ZFPM2, 体外也诱导人成纤维细胞获得 iCMs, 这些细胞有肌节形成、钙瞬变和动作电位。然而, 经过较长时间的培养观察, 却未能出现细胞自发跳动活动, 提示这些细胞可能是部分重编程的心肌细胞。此外, Wada 等^[13]研究也发现, 在 GMT 基础上联合 MESP1 和 Myocd 组合尽管诱导人成纤维细胞向心肌细胞转分化未出现细胞自发性的跳动, 但可诱导心肌相关基因的表达。有趣的是, 将人心脏成纤维细胞诱导来源的 iCMs 与小鼠心肌共培养 7 d 后, iCMs 也出现了跳动。这说明细胞间接触、旁分泌、电和机械刺激等心肌微环境对 iCMs 分化成熟可能起促进作用, 其中的机制尚不清楚, 仍需要进一步研究。

2 心肌细胞转分化的 miRNA 诱导法

除转录因子外, 部分 miRNA 组合也具有重编程的功能^[14-15]。miRNA 是一类在基因转录后起调节作用的非编码小 RNA, 在细胞分化和器官发育过程中发挥重要作用^[16]。2012年, Jayawardena 等^[17]报道 4 种 miRNA (miR-1、-133、-208、-499) 组合过表达可替代转录因子诱导小鼠胚胎成纤维细胞向心肌细胞转分化。研究者基于 miRNA 在心肌分化发育中功能, 在 6 种候选 miRNA 中采用组合的方法, 利用非病毒瞬时导入方式, 发现导入上述 4 种 miRNA 后, 7 d 内细胞出现 Mef2C、cTnt 和 α MHC 的表达, 大约 4 周后可观察到自发性钙瞬变、收缩及肌节结构。研究者还发现, 过表达 miR-1, 通过添加 JAK 抑制剂 I 能促进 miRNA 部分重编程细胞向心肌细胞分化, 重编程效率提高到 13%~27%。

相较于单纯 miRNA 组合诱导转分化, 联合转录因子则表现出更高的效率。2014 年, Muraoka 等^[18]报道了利用病毒导入 GMT 联合 miR-133 诱导人和鼠类成纤维转分化效率比单纯 GMT 诱导提高了 5 倍, 细胞自发性跳动出现的时间由 GMT 诱导至少 4 周缩短到 10 d。而且有趣的是, 进一步细胞亚型分析显示获得的诱导细胞多数为心房表型。

体内 miRNA 诱导转分化研究也有新的进展。2015 年, Jayawardena 等^[19]利用相同 miRNA 组合证实, 在小鼠心肌梗模型体内也可将成纤维细胞转分化为 iCMs。研究者造模成功后立即在结扎动脉下方区域注入 miRNA 组合, 饲养 5~6 周后对获得的心肌样细胞进行形态和生理功能分析。经鉴定, 获得的 iCMs 表现出与完全成熟心肌细胞同样的心肌标记、肌节结构、兴奋收缩偶联及动作电位特征。更为重要的是, 经超声心动图证实, 梗死后小鼠的心功能得到很大改善。虽然如此, 研究者所采用的慢病毒载体导入方式转分化效率依然不高, 在注射剂量、导入方式以及重编程机制方面仍需要深入的研究。

3 小分子方法转分化获得心肌细胞

2011 年, Efe 等^[20]利用小分子结合转录因子 (OSKM) 细胞活化信号靶向 (cell-activation and signaling-directed, CASD) 的方式, 不经多能性阶段直接将鼠成纤维细胞转分化为具有自主收缩的心肌样细胞。研究者在 OSKM 因子转入后 4 d, 加入一些生长因子和小分子, 经 11~12 d 可直接将小鼠胚胎成纤维细胞重编程为 iCMs。这种短时过表达多能转录因子结合谱系性信号靶向分子, 不经多能性阶段直接将体细胞重编程为多种细胞的方法为转分化提供了一种策略。这种策略具有多种优势: 首先, 研究者使用的小分子化合物易于合成、保存以及规范化; 其次, 该类化合物使用方便, 具有细胞渗透性易进入细胞, 效应具有可塑性, 即通过对小分子浓度、组合及持续时间的控制可微调整个过程; 最后该方法绕开了基因操作引发的技术挑战和安全问题, 具有广阔的发展前景。2014 年, Wang 等^[21]通过导入 Oct4 利用系列小分子 (SB431542、CHIR99021、parnate、FSK) 体外诱导小鼠胚胎成纤维细胞转分化, 成功获得 iCMs。2015 年, Fu 等^[22]首次报道采用“鸡尾酒式”全化学小分子方法经遗传谱系追踪证实体外将小鼠成纤维细胞成功转分化为 iCMs。这些化学诱导的心肌样细胞 (CiCMs) 表达心肌细胞特异性

标志物, 具有典型的心肌钙通量和电生理特征。同时, CiCMs 并不经过多能干阶段, 而是经过心脏祖细胞阶段分化生成。

然而, 基于成纤维细胞转分化研究只有适用于人类才具有更广阔的应用空间。很快在 2016 年, Cao 等^[23]首次报道全化学小分子在人成纤维细胞获得成功。研究者利用人类新生儿包皮源性成纤维细胞和胎儿肺源成纤维细胞, 通过筛选已知的用于重编程的 89 种小分子和已知的信号通路中包括激酶、磷酸酶和其他一些信号受体等的抑制剂 292 种小分子化合物, 筛选出直接重编程必要的 7 种小分子 (CHIR99021、A83-01、BIX01294、AS8351、SC1、Y27631、OAC2), 还发现在此基础上增加两种血小板源的生长因子通路抑制剂 SU16F 和 JNJ10198409, 可大大提高人类成纤维细胞向心肌样细胞转分化效率。经鉴定 CiCMs 具有均匀收缩, 类似于人类心肌细胞的转录组、表观遗传及电生理特性等特点。同时, 诱导后的细胞植入心肌梗模型小鼠后显示出很好的微环境适应性, 并可进一步在体内分化为成熟心肌细胞。该研究不仅获得了较已有报道质量更高的 iCMs, 而且提供了一种人类细胞转分化诱导方法。该化学方法经进一步优化相信会诱导出更加成熟的心肌细胞, 进而具有重要的治疗应用。

4 转分化获得心肌祖细胞

相对于经 iPSCs 来源的 iCMs, 经直接转分化获得 iCMs 主要优势在于能够快速、简便地获得心肌细胞; 但是, 两种途径获得的 iCMs 均不能增殖, 一次所获得的细胞量无法满足基础研究和临床应用。此外, 相比具有分化潜能的细胞, iCMs 更难在体外进行纯化培养或向体内移植。为了克服这些障碍, 研究者们将目光投向了将成纤维细胞直接重编程为 iCPCs。

转分化得到的祖细胞在新药研发和再生医学应用方面具有更多的潜在优势。祖细胞具有增殖能力, 可进行大规模培养, 而且组织特异性祖细胞因为具有增殖和分化产生特定组织细胞的能力, 在修复病变或受损组织中具有更大的优势。干细胞或祖细胞阶段的重编程需要维持细胞自我更新和多能性, 需要对主要调节因子及适当的培养条件进行探索^[24]。近年来, 重编程至祖细胞阶段研究进展迅速, 包括神经祖细胞^[25]和肝脏祖细胞^[26]在内的组织特异性的祖细胞重编程已经取得成功。2016 年, Lalit 等^[27]报道了成功诱导小鼠成纤维细胞获得心脏祖细胞。

研究者对 22 个基因进行 (18 种心脏转录因子 / 心脏染色质重塑因子和 4 种 iPSC 因子) 重编程能力筛选, 筛选出联合 11 种心脏因子 (Mesp1、Mesp2、Gata4、Gata6、Baf60c、SRF、IS11、Nkx2.5、Irx4, 以及 Tbx5 和 Tbx20) 或 5 种因子 (Mesp1、Tbx5、Gata4、Nkx2.5 和 Baf60c) 结合 Wnt 信号通路和经典酪氨酸激酶 / 信号转导和转录激活因子 (JAK/STAT) 通路成功将成年小鼠心脏、肺及尾尖的成纤维细胞诱导转化为 iCPCs。研究显示, 该细胞具有增殖及体外分化成心肌细胞、平滑肌细胞和内皮细胞的能力。体内试验表明, iCPCs 注射到小鼠胚胎新月期的心脏能够分化出成熟的心肌细胞; 移植到梗死后的小鼠心脏可提高小鼠存活率, 并在体内分化为心肌细胞 (CMs)、平滑肌细胞 (SMCs) 和内皮细胞 (ECs)。而且, 相较于以往研究所采用的胚胎或新生儿成纤维细胞作为初始细胞, 该研究将 3 种不同成体组织来源的成纤维细胞转分化为心肌祖细胞, 更具有实际应用价值。2016 年, Zhang 等^[28]报道在化学成分明确的条件下培养分离获得可扩增的小鼠成纤维细胞源性的心血管祖细胞 (induced expandable cardiovascular progenitor cells, ieCPCs)。ieCPCs 培养传代到 18 代仍具有相同形态, 表达相同类型心脏标志基因, 较强增殖能力以及可稳定地分化为 CMs、SMCs 和 ECs。ieCPCs 经移植到心梗小鼠后, 可自发分化为 3 种心血管细胞, 使心脏功能得到改善。研究还发现该方法在多能干细胞向 ieCPCs 分化也获得成功。这些研究 (表 1) 的突破为深入研究心肌分化机制及远期临床应用打下了基础。

5 总结和展望

心肌成纤维细胞占整个心脏细胞总数的一半以上, 发挥着结构支持、旁分泌信号因子以及修复损伤的作用。若能将在心脏中的成纤维细胞重编程为心肌细胞, 对心源性疾病的治疗将会有很大的帮助。为此, 研究人员一直致力于寻求不经过多能状态将成纤维细胞直接重编程为功能性心肌细胞的最佳策略。目前, 体外实验已经在转录因子、miRNA、小分子诱导方式及培养液化学成分确定等方面取得了令人鼓舞的成果, 体内实验也有报道在小鼠体内将非心肌细胞转分化为功能性心肌细胞, 而且比体外有更高的效率^[5,15,19,31-33]。然而, 既往研究表明, 成纤维细胞向心肌样细胞转化不容易直接从小鼠模型转移到人类系统, 况且直到现在, 还没有发现用转录因子、miRNAs 或小分子组合高效地将不同来源

的小鼠成纤维细胞转分化为成熟的心肌细胞或心肌祖细胞的快速方法, 直接重编程技术距离可以安全地转化为临床应用还有漫长的道路要走。

总的来说, 以直接重编程为基础的下一代再生医学治疗手段是生物医学发展的趋势, 必将给心血管疾病治疗带来革命性的改变。以心梗为代表的大多数心脏疾病与心脏纤维化有关^[34], 借助直接重编程技术, 或许不久的将来可直接将“诱导组合物”引入到靶组织中诱导瘢痕内成纤维细胞转分化为成熟的、有功能的心肌细胞, 增加功能心肌细胞数量, 降低疤痕的大小, 进而恢复心脏功能, 改善患者生活质量。

[参 考 文 献]

- [1] Sun R, Li X, Liu M, et al. Advances in stem cell therapy for cardiovascular disease. *Int J Mol Med*, 2016, 38: 23-9
- [2] Prasad A, Manivannan J, Loong DT, et al. A review of induced pluripotent stem cell, direct conversion by trans-differentiation, direct reprogramming and oligodendrocyte differentiation. *Regen Med*, 2016, 11: 181-91
- [3] Etzion S, Barbash IM, Feinberg MS, et al. Cellular cardiomyoplasty of cardiac fibroblasts by adenoviral delivery of MyoD *ex vivo*: an unlimited source of cells for myocardial repair. *Circulation*, 2002, 106: I125-30
- [4] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, 142: 375-86
- [5] Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 2012, 485: 599-604
- [6] 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 Mol Cell Cardiol*, 2013, 60: 97-106
- [7] Zhao Y, Londono P, Cao Y, et al. High-efficiency reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes requires suppression of pro-fibrotic signalling. *Nat Commun*, 2015, 6: 8243
- [8] Wang L, Liu Z, Yin C, et al. Stoichiometry of Gata4, Mef2c, and Tbx5 influences the efficiency and quality of induced cardiac myocyte reprogramming. *Circ Res*, 2015, 116: 237-44
- [9] Lee K, Yu P, Lingampalli N, et al. Peptide-enhanced mRNA transfection in cultured mouse cardiac fibroblasts and direct reprogramming towards cardiomyocyte-like cells. *Int J Nanomed*, 2015, 10: 1841-54
- [10] Doppler SA, Deutsch MA, Lange R, et al. Direct reprogramming-the future of cardiac regeneration? *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 17368-93
- [11] Nam YJ, Song K, Luo X, et al. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 5588-93
- [12] Fu JD, Stone NR, Liu L, et al. Direct reprogramming of

表1 心肌转分化对比表

诱导因子	组成	载体	细胞类型/小鼠基因型	标记物及效率	功能特点	参考文献
转录因子	Gata4, Mef2c, Tbx5	逆转录病毒	MCFs, TTFs	α MHC-GFP + cTnt ⁺ (FACS, 7 d) MCFs: ~4%~6% TTFs: ~2.5%	4~5周后出现少量自发跳动 不经过祖细胞阶段	[4]
	Gata4, Mef2c, Tbx5, Hand2	逆转录病毒	aMCFs, aTTFs	α MHC-GFP ⁺ + cTnt ⁺ (FACS) aMCFs: ~6.8%(7 d), aTTFs: ~9.2%(9 d)	5周后出现少量自发跳动	[5]
	Gata4, Mef2c, Tbx5, Nkx2.5, Hand2	慢病毒	MEFs, aMCFs	cTnt ⁺ -GCaMP ⁺ (14 d) MCFs: (1.6% ± 0.3%) MCFs: (4.5% ± 2.0%)	MEFs, 14 d后出现自发跳动	[6]
	Gata4, Mef2c, Tbx5, Hand2 + A83-01/Y27632	逆转录病毒	MEFs, aCFs	MEFs (FACS, 14 d) ~58% cTnt ⁺ , ~57% α -actinin ⁺ aCFs (FACS, 4周)~10% cTnt ⁺	MEFs: 2周内出现自发跳动 aCFs: 5周后出现自发跳动 GMTH诱导分化的同时上调了纤维化通路, 利用小分子抑制此通路可提高转分化效率	[7]
	Gata4, Mef2c, Tbx5	逆转录病毒	MCFs, TTFs	MCFs (FACS, 10 d) GMT: ~1%GFP ⁺ ~0.02%cTnt ⁺ MTG: ~9%GFP ⁺ , ~3.5%cTnt ⁺ MGT: ~10%GFP ⁺ ~4.8%cTnt ⁺ 4周后	MCFs(MGT)3周后有自发跳动 因子剂量比在重编程中起重要作用 (Mef2c高表达有利于重编程)	[8]
	Gata4, Mef2c, Tbx5, Mesp1, Myocardin	逆转录病毒	HCFs, HFFs	HCFs: 5% cTnt ⁺ + α -actinin ⁺ HCFs: ~1% Ca ²⁺ 瞬变 14 d, FACS α MHC-mCherry H9Fs: (18.1% ± 11.2%) α MHC-mCherry + cTnt ⁺ H9Fs: (13.0% ± 9.3%) HDFs/HCFs: 1%~4%	HCFs:未观察到自发跳动 HCFs与鼠心肌共培养, 7 d后出现自发跳动 未观察到自发跳动 H9Fs:10周后观察到清晰肌节结构	[13]
	Gata4, Mef2c, Tbx5, Mesp1, Myocardin, ESRRG, ZFPM2	逆转录病毒	H9Fs, HDFs, HCFs	α MHC-mCherry H9Fs: (18.1% ± 11.2%) α MHC-mCherry + cTnt ⁺ H9Fs: (13.0% ± 9.3%) HDFs/HCFs: 1%~4%	未观察到自发跳动	[12]
	Gata4, Mef2, Tbx5 + miR-133	逆转录病毒	MEFs, aMCFs	7 d后, FACS ~33% α MHC-GFP ⁺ ~12% cTnt ⁺	MEFs, 10 d后有自发跳动 aMCFs无自发跳动	[29]
	Gata4, Mef2c, Tbx5, Mesp1, Myocardin + miR-133	慢病毒	HCFs	7 d后, FACS cTnt ⁺ + α -actinin ⁺ : 23%~27%	未获得自发跳动细胞簇	[29]

表1 心肌转分化对比表(续)

诱导因子	组成	载体	细胞类型/小鼠基因类型	标记物及效率	功能特点	参考文献
	Gata4, Mef2c, Tbx5, Hand2, Myocardin + miR-1, miR-133	逆转录病毒	HFFs, aHCFs, aHDFS	14 d后, FACS HFFs: 20% cTnt ⁺ aHCFs: 13% cTnt ⁺ aHDFs: 9.5% cTnt ⁺ 诱导后4周	只有HCFs11周后出现自发跳动	[11]
体内	Gata4, Mef2c, Tbx5	逆转录病毒	Periostin-Cre x R26 ^{lacZ} 心梗小鼠	~35%iCMs (α -actinin ⁺ , β Gal ⁺) Fsp1-Cre x R26 ^{lacZ} (4周) ~6.5%iCMs(β Gal ⁺) Tef21-iCre x R26 ^{tdTomato} 小鼠心梗模型	心梗3月后(磁共振、超声), 盲法研究证实心功能得到改善 心梗3月后(磁共振、超声), 盲法研究证实心功能得到改善	[30] [5]
miRNA	体外 miRs (miR-1, miR-133, miR208, miR-499) + JII	非病毒	MCFs	α MHC-CFP ⁺ (FACS, 7 d) miRs: 1.1%~5.3% miRs + JII: 13.4%~27.9%	10 d后, 1%~2%自发跳动 经过祖细胞阶段	[31]
体内	miR-1, miR-133, miR208, miR-499	慢病毒	Fsp1-Cre x R26 ^{tdTomato} 小鼠心梗模型	12%iCMs(tdTomato ⁺ + cTnt ⁺)	心梗后3月后(超声), 证实心功能得到改善	[19]
小分子	体外 Oct4 + SM + BMP4	慢病毒	MEFs, TTFs	30 d, 跳动细胞簇数与铺板细胞数比例 MEFs(9.9% \pm 1.7%), TTFs ~5%	20 d后, 有自发跳动 经过祖细胞阶段	[21]
	CHIR99021, RepSox, Forskolin, VPA, Parnate, TTNPB	未使用	MEFs, TFFs	24 d, FACS MEFs: 14.5% α -actinin ⁺ MEFs: 9% α MHC ⁺	均观察到自发跳动	[22]
	CHIR99021, A83-01, BIX01294, AS8351, SC1, Y27632, OAC2	未使用	HFFs, HLFs	30 d, FACS HFFs: 6.6% \pm 0.4% cTnt ⁺	20 d后开始出现自发跳动	[23]

MCFs: 鼠心肌成纤维细胞; TTFs: 尾尖成纤维细胞; MEF: 胚胎成纤维细胞; HFFs: 人包皮成纤维细胞; aHCFs: 成人表皮成纤维细胞; H9Fs: 来源于胚胎干细胞H9系分化的人成纤维细胞; aCF: 成年小鼠心脏成纤维细胞; NCFs: 新生儿心脏成纤维细胞; iCMs: 诱导的心脏细胞; SM: 小分子; α -MHC: α 肌球蛋白重链; GFP: 绿色荧光蛋白; cTnt: 心肌肌钙蛋白; FACS: 流式分选技术

- human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem Cell Rep*, 2013, 1: 235-47
- [13] 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: 12667-72
- [14] Jayawardena T, Mirotsov M, Dzau VJ. Direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes using microRNAs. *Methods Mol Biol*, 2014, 1150: 263-72
- [15] Jayawardena TM, Finch EA, Zhang L, et al. MicroRNA induced cardiac reprogramming *in vivo*: evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circ Res*, 2015, 116: 418-24
- [16] Schraivogel D, Meister G. Import routes and nuclear functions of argonaute and other small RNA-silencing proteins. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39: 420-31
- [17] 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: 1465-73
- [18] 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: 1565-81
- [19] Jayawardena TM, Finch EA, Zhang L, et al. MicroRNA induced cardiac reprogramming *in vivo*: evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circ Res*, 2015, 116: 418-24
- [20] Efe JA, Hilcove S, Kim J, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 215-22
- [21] Wang H, Cao N, Spencer CI, et al. Small molecules enable cardiac reprogramming of mouse fibroblasts with a single factor, Oct4. *Cell Rep*, 2014, 6: 951-60
- [22] Fu Y, Huang C, Xu X, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res*, 2015, 25: 1013-24
- [23] Cao N, Huang Y, Zheng J, et al. Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science*, 2016, 352: 1216-20
- [24] Monaghan MG, Holeiter M, Layland SL, et al. Cardiomyocyte generation from somatic sources - current status and future directions. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 40: 49-55
- [25] Han DW, Tapia N, Hermann A, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 465-72
- [26] Yu B, He ZY, You P, et al. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 328-40
- [27] Lalit PA, Salick MR, Nelson DO, et al. Lineage reprogramming of fibroblasts into proliferative induced cardiac progenitor cells by defined factors. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 354-67
- [28] Zhang Y, Cao N, Huang Y, et al. Expandable cardiovascular progenitor cells reprogrammed from fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 368-81
- [29] 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: 1565-81
- [30] Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 2012, 485: 593-8
- [31] 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: 1465-73
- [32] 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 Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 148: 1656-64.e2
- [33] Muraoka N, Ieda M. Direct reprogramming of fibroblasts into myocytes to reverse fibrosis. *Annu Rev Physiol*, 2014, 76: 21-37