

DOI: 10.13376/j.cblls/2023051

文章编号: 1004-0374(2023)04-0419-10

## 提高神经细胞直接重编程效率的研究进展

杜淑娴<sup>1</sup>, 莫李存<sup>1</sup>, 程乐平<sup>1,2,3\*</sup>

(1 广西医科大学再生医学与医用生物资源开发应用省部共建协同创新中心, 广西再生医学重点实验室, 南宁 530021; 2 广西医科大学基础医学院, 神经科学研究所, 广西脑科学研究重点实验室, 广西壮族自治区卫生健康委员会脑功能与脑疾病基础研究重点实验室(广西医科大学), 南宁 530021; 3 长寿与老年相关疾病教育部重点实验室, 南宁 530021)

**摘要:**近年来,神经细胞直接重编程技术已经成为潜在的细胞替代治疗新手段。体内直接重编程利用与缺失细胞相邻的内源细胞再生目标细胞进行替换,可避免由外部细胞移植引起的免疫排斥反应,有效降低致癌风险,具有良好的应用前景。但同时,神经细胞直接重编程也面临着诸多挑战,如重编程后的神经元存活困难、需要损伤或疾病期间丢失的特定神经元亚型的再生、重编程效率低下等。如何实现高效的在体神经细胞直接重编程,是目前需要克服的难题。该综述主要对如何提高神经细胞直接重编程的效率进行概述,主要包括抗氧化剂、铁死亡抑制剂和抗凋亡蛋白的应用、激活神经元富含的线粒体基因、运用表观遗传因子和转录因子组合等,这些将为更好地发挥神经细胞直接重编程的效用提供参考。

**关键词:** 细胞分化; 直接重编程; 细胞代谢; 线粒体; 染色质; 转录因子

**中图分类号:** Q243; Q251; Q254; Q731 **文献标志码:** A

## Research progress on improving efficiency of direct neuronal reprogramming

DU Shu-Xian<sup>1</sup>, MO Li-Cun<sup>1</sup>, CHENG Le-Ping<sup>1,2,3\*</sup>

(1 Collaborative Innovation Centre of Regenerative Medicine and Medical BioResource Development and Application Co-constructed by the Province and Ministry, Guangxi Key Laboratory of Regenerative Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2 Institute of Neuroscience and Guangxi Key Laboratory of Brain Science, Guangxi Health Commission Key Laboratory of Basic Research on Brain Function and Disease, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3 Key Laboratory of Longevity and Aging-related Diseases of Chinese Ministry of Education, Nanning 530021, China)

**Abstract:** In recent years, direct neuronal reprogramming technology has become a potential new choice for cell replacement therapy. Direct reprogramming *in vivo* converts endogenous cells into desired target cells, avoiding the immune rejections caused by exogenous cell transplantation and effectively reducing the risk of developing cancers. At the meanwhile, however, direct neuronal reprogramming *in vivo* is faced with much challenge such as low neuronal survival rate, low reprogramming efficiency, and the necessity to regenerate specific neuronal subtypes lost during injury or diseases. This review mainly summarizes the progress on improving the efficiency of direct neuronal reprogramming by means of the applications of the antioxidants, ferroptosis inhibitors, anti-apoptotic proteins, the activation of neuron-enriched mitochondrial genes, and the use of epigenetic factors and combination of transcription factors, which will be of immense help for its future usage.

**Key words:** cellular differentiation; direct reprogramming; cellular metabolism; mitochondrion; chromatin; transcription factor

收稿日期: 2022-12-05; 修回日期: 2023-01-11

基金项目: 广西科技基地和人才专项(AD21075052); 广西研究生教育创新项目(YCSW20211122)

\*通信作者: E-mail: lpcheng@gxmu.edu.cn; Tel: 0771-5787806

## 1 神经细胞直接重编程的背景和研究进展

神经退行性疾病和中枢神经系统损伤常导致不可逆的神经元丢失,而成年中枢神经系统中新生神经发生能力有限,只能再生少部分神经元以补充因组织损伤或疾病丢失的细胞<sup>[1-3]</sup>。因此,开发能够促进新生神经元生成以实现细胞替代治疗的技术非常重要<sup>[4-5]</sup>。目前细胞替代治疗的途径包括以下几种:移植胚胎神经组织、胚胎干细胞诱导分化得到神经元、诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)分化得到神经元、直接重编程得到神经元等<sup>[6-9]</sup>。直接重编程得到神经元相比于干细胞分化得到神经元具有一些优势,因为直接重编程是将一种终末分化细胞直接转变成另外一种终末分化细胞<sup>[10]</sup>,不经过干细胞增殖阶段,所得到的神经元移植后致癌风险显著降低<sup>[10-11]</sup>;而且利用直接重编程诱导得到神经元的操作相对简单,相比 iPSC 诱导得到神经元其周期更短<sup>[12]</sup>,同时可以避免细胞移植的免疫排斥反应,具有良好的应用前景<sup>[11, 13]</sup>。早在 1987 年 Davis 等<sup>[14]</sup>就利用转录因子 *MyoD* 将成纤维细胞直接转分化成肌细胞,到 2010 年 Wernig 实验室用 *Ascl1*、*Brn2* 和 *Myt1l* 这三个转录因子将成纤维细胞直接转分化成神经元<sup>[15]</sup>,掀起了神经细胞直接重编程的热潮,此后发现不同的转录因子可将多种起始细胞转变成不同的神经元亚型<sup>[16]</sup>。目前,利用直接重编程的方法在体外、体内已经得到多种神经元亚型,主要包括谷氨酸能神经元、GABA 能神经元、多巴胺能神经元、乙酰胆碱能神经元、五羟色胺能神经元和去甲肾上腺素能神经元等<sup>[12, 16-17]</sup>。但是,近年来利用谱系示踪的方法标记星形胶质细胞开展转分化研究发现,有些在体星形胶质细胞到神经元的转分化可能为病毒非特异性感染神经元的结果<sup>[18-22]</sup>。进一步的研究发现,下调多嘧啶区结合蛋白 1 (polypyrimidine tract-binding protein 1, PTBP1) 的表达不能实现海马和视网膜中的星形胶质细胞转分化为神经元<sup>[23-26]</sup>。虽然有的研究中使用的病毒载体不太特异,但多种实验证据表明反应性胶质细胞、NG2 胶质细胞在体转分化为神经元确实发生,而且可以促进脊髓损伤与癫痫动物模型中的功能恢复<sup>[27-30]</sup>。接下来在谱系示踪技术的基础上,增强转录因子的表达水平(待发表资料),结合转分化过程中基因表达调控研究,有望明确不同的转录因子是否可以在体原位将胶质细胞转分化为神经元,并用于疾病损伤模型的功能恢复。

直接重编程常用的起始细胞包括星形胶质细胞、成纤维细胞、周细胞、肝细胞或 NG2 胶质细胞等<sup>[16, 31-32]</sup>。其中,星形胶质细胞是成年中枢神经系统中数量最多和分布最广泛的非神经元细胞<sup>[33-35]</sup>,而且星形胶质细胞与神经元谱系相近,更容易发生转分化<sup>[5, 16]</sup>。直接重编程的主要方式包括过量表达转录因子,应用表观遗传因子、化学小分子、miRNA 以及采用 CRISPR/dCas9 技术直接激活内源性转录因子等<sup>[36-38]</sup>。需要指出的是,神经细胞直接重编程并不是简单的发育过程的重现,除了过量表达转录因子,以上可调控关键转录因子表达水平的分子操作均可有效实现细胞重编程<sup>[16, 39]</sup>。利用病毒载体过量表达不同转录因子或转录因子组合,已经诱导得到多种神经元亚型。例如,转录因子组合 *Ascl1*、*Brn2*、*Myt1l* 可将培养的成纤维细胞转分化为谷氨酸能神经元<sup>[15]</sup>;转录因子 *Neurog2* 与 *Dlx2* 可分别将培养的大脑皮层星形胶质细胞转分化为谷氨酸能神经元与 GABA 能神经元<sup>[40]</sup>;转录因子组合 *Foxg1*、*Sox2*、*Ascl1*、*Dlx5* 及 *Lhx6* 可将培养的成纤维细胞转分化成 GABA 能神经元<sup>[41]</sup>;三种转录因子组合 (*Ascl1*、*Nurr1*、*Lmx1a*; *Ascl1*、*Brn2*、*Myt1l*、*Lmx1a*、*FoxA2* 以及 *Ascl1*、*Pitx3*、*Lmx1a*、*Nurr1*、*Foxa2*、*EN1*) 可将培养的成纤维细胞重编程为多巴胺能神经元<sup>[42-44]</sup>;转录因子组合 *Ascl1*、*Brn2*、*Myt1l*、*Lhx3*、*Hb9*、*Isl1* 及 *Ngn2* 或者转录因子 *Neurog2* 与 *SOX11* 联合小分子 forskolin 及 dorsomorphin 都可将培养的成纤维细胞转分化为乙酰胆碱能神经元<sup>[45-46]</sup>;转录因子组合 *Ascl1*、*Phox2b*、*AP-2a*、*Gata3*、*Hand2*、*Nurr1* 及 *Phox2a* 可将成纤维细胞与星形胶质细胞转分化成去甲肾上腺素能神经元<sup>[47]</sup>;两种转录因子组合 (*ASCL1*、*NEUROG2*、*NKX2.2*、*FEV*、*GATA2*、*LMX1B*; *Ascl1*、*Foxa2*、*Lmx1b*、*FEV*) 可将人成纤维细胞重编程为五羟色胺能神经元<sup>[48-49]</sup>;此外,在体过量表达转录因子 *NeuroD1* 可将星形胶质细胞转分化为谷氨酸能神经元,同时它可将 NG2 胶质细胞转分化为谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元<sup>[50]</sup>;联合使用三种转录因子 *NEUROD1*、*ASCL1* 和 *LMX1A* 以及 miR218 可将体外培养的人星形胶质细胞和小鼠体内的星形胶质细胞重编程为多巴胺能神经元<sup>[51]</sup>。

尽管直接重编程技术可将胶质细胞与成纤维细胞转分化成神经元,但是,如何高效地实现直接重编程仍然是一个难题。影响直接重编程效率的因素

主要包括以下几个方面<sup>[5]</sup>: (1) 起始细胞的选择<sup>[16, 52]</sup>。来源于不同胚层的细胞其表观遗传修饰差异较大, 与神经元发育谱系相同或相近的细胞更容易发生命运转变。比如, 与成纤维细胞相比, 星形胶质细胞更容易转分化成神经元。(2) 区域特异性<sup>[53-54]</sup>。在重编程过程中必须考虑起始细胞的区域特异性, 以便于转分化生成特定区域的神经元亚型。例如, 在大脑皮层, 转录因子 *Sox2* 不能将星形胶质细胞转分化成神经元<sup>[55]</sup>, 但在纹状体中这可以实现<sup>[56]</sup>。(3) 发生转分化的环境。研究显示, 损伤状况对神经系统直接重编程的效率和转分化得到的神经元的存活有显著影响<sup>[57]</sup>。以上研究提示, 细胞命运转变时伴随的细胞属性改变与组织损伤造成的氧化应激反应, 以及非神经元细胞与神经元间的遗传差异对非神经元细胞转分化为神经元有显著影响。针对以上问题, 目前已尝试了以下几种方法以提高神经细胞直接重编程的效率, 这些方法主要包括应用抗氧化剂、铁死亡抑制剂和抗凋亡蛋白, 激活神经元富含的线粒体基因, 运用表观遗传因子和转录因子组合等<sup>[5, 27]</sup>(图1)。本综述主要概述提高神经细胞直接重编程效率的研究进展, 这将为神经退行性疾病和中枢神经系统损伤的治疗提供新的思路。

## 2 提高直接重编程效率的方法

### 2.1 应用抗氧化剂

在直接重编程的过程中, 细胞命运发生改变, 其中, 起始细胞在发育和重编程过程中的代谢变化

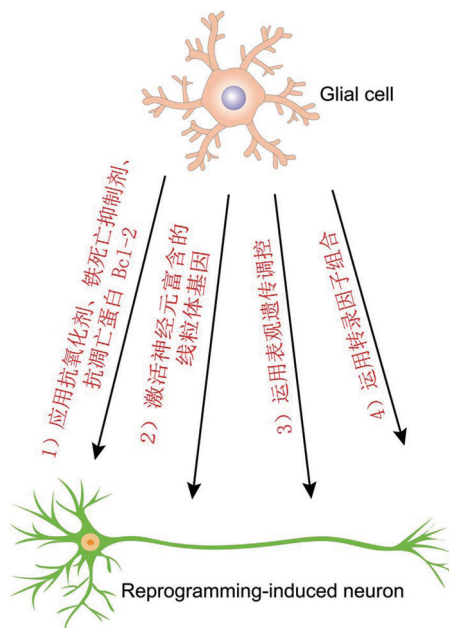


图1 提高神经细胞直接重编程效率的潜在策略

对于分化或转分化成另一种细胞类型至关重要<sup>[5]</sup>。目前, 越来越多的证据表明代谢调节在分化和直接转分化中起着核心作用, 代谢变化为重编程过程中神经元存活所必需, 也是细胞命运转变的先决条件<sup>[5, 16, 27, 58]</sup>。起始细胞如成纤维细胞或星形胶质细胞的代谢方式为糖酵解, 而神经元主要依赖氧化磷酸化来满足其高能量的需求<sup>[59-61]</sup>。因此, 将成纤维细胞或星形胶质细胞直接重编程为神经元, 其发生的代谢转换对于神经元的生成至关重要<sup>[27, 62]</sup>。起始细胞转分化成神经元时被迫适应神经元的代谢模式, 从厌氧糖酵解转换为氧化磷酸化, 或者从较少的氧化磷酸化转换为较多的氧化磷酸化<sup>[63-65]</sup>。厌氧糖酵解迅速转向氧化磷酸化, 使得氧化应激增加进而造成脂质过氧化以及过量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, ROS 是具有高度活性的还原形式分子氧, 其过量增加造成不利于神经元存活的神经毒性环境, 从而降低直接重编程的效率<sup>[5, 27, 66]</sup>。此外, 在创伤性急性或慢性损伤后的较长时间内, 神经元均处于活性氧生成增加为特征的神经毒性环境<sup>[67-68]</sup>, 这也部分解释了为什么许多在体外有效驱动神经元转分化的转录因子在体内急性损伤的环境中应用时效果不佳。因此, 需要进行抗氧化处理以增加神经元的存活率和提高转分化效率<sup>[40, 57, 69]</sup>。体外体内研究表明, 清除代谢障碍可以提高神经细胞直接重编程的效率<sup>[5]</sup>。克服由过量活性氧引起的细胞死亡, 可以使单个促神经发生因子介导的反应性胶质细胞的重编程效率达到 90% 以上<sup>[27]</sup>。抗氧化剂骨化三醇 (calcitriol) 通过激活维生素 D 受体 (vitamin D receptor, Vdr) 通路提高重编程效率, 主要是因为这种处理有利于诱导得到的神经元的成熟。同时, 维生素 E 类似物  $\alpha$ -生育三烯酚 ( $\alpha$ -tocotrienols 3,  $\alpha$ T3), 与骨化三醇的作用相似, 也提高了转分化效率<sup>[27]</sup>。

### 2.2 应用铁死亡(ferroptosis)抑制剂

神经细胞直接重编程过程中由氧化代谢产生的活性氧会导致铁死亡, 主要是由于半胱氨酸含量减少、谷胱甘肽消耗和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 活性抑制, 造成脂质过氧化<sup>[70-72]</sup>。脂质过氧化是铁死亡的标志<sup>[73]</sup>。铁死亡和脂质过氧化为神经细胞直接重编程过程中的关键因素, 活性氧的产生会干扰神经元的氧化代谢, 并导致细胞因铁下降而死亡<sup>[27]</sup>。研究显示, 在神经细胞直接重编程过程中添加铁死亡抑制剂, 比如利普罗他汀-1 (liproxstatin-1) 可以抑制细胞转换过程中发生的脂质过氧化, 提高神经元的存活率<sup>[27]</sup>。GPX4 使脂质过



氧化物还原成羟基化合物从而防止铁死亡<sup>[72]</sup>。二者均可有效提高神经细胞直接重编程的效率。

### 2.3 应用抗凋亡蛋白Bcl-2 (B-cell lymphoma-2)

Gascon 等<sup>[27]</sup>研究表明, Bcl-2 的作用似乎不仅与其抗凋亡作用相关, 在体外过量表达抗凋亡蛋白 Bcl-2 或添加与抗氧化应激反应相关的分子, 可以防止转分化发生时由氧化应激诱发的大量细胞死亡, 进一步加快星形胶质细胞的转分化速度<sup>[27, 74]</sup>。Bcl-2 的主要作用是通过抗脂质过氧化来促进星形胶质细胞向神经元的命运转变, 转录因子与 Bcl-2 联合使用可以使转分化得到的神经元更快获得神经元形态及其特征性的膜电位, 降低细胞死亡率。突变型 EE-Bcl-2 可提高过量表达转录因子 *Ascl1* 介导的起始细胞的存活率, 但并不改变诱导神经元的比例。与之相反的是, 突变型 A(145)-Bcl-2 的使用增加了由转录因子 *Ascl1* 介导的起始细胞转分化成神经元的比例, 但是对提高起始细胞的存活率没有显著作用。而突变型 A(70)-Bcl-2 不仅提高起始细胞的存活率, 还增加了起始细胞转分化为神经元的比例。同时, A(70)-Bcl-2 和 *Ascl1* 共同表达获得的神经元其突起更长而且更加复杂。不同的 Bcl-2 突变型提高星形胶质细胞转分化为神经元的比例与其抗脂质过氧化的活力密切相关。此外, Bcl-2 也提高了过量表达转录因子 *Neurog2* 的星形胶质细胞转分化为神经元的效率。在 Bcl-2 的所有结构中, A(70)-Bcl-2 促进神经细胞重编程的效率最高。但是, 在缺乏促神经发生因子的情况下单独表达 A(70)-Bcl-2 或其他结构的 Bcl-2 都不能诱导神经细胞重编程。正如在体外一样, 在体内 Bcl-2 也能有效提高体内直接重编程的速度和效率, 在大脑皮层的星形胶质细胞和 NG2 胶质细胞中过量表达转录因子 *Neurog2* 同时联合 Bcl-2 不仅增加诱导得到的神经元的数量, 而且还加速神经元的成熟<sup>[27]</sup>。

当转录因子 *Neurog2* 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 联合表达并用抗氧化剂处理时, 转分化得到的神经元在损伤环境中存活时间超过 4 周<sup>[27]</sup>。同样, 抑制 p53 (Protein 53) 促凋亡途径, 以及联合使用脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 抑制剂 *Noggin* 蛋白, 可以减弱 ROS 效应, 使转分化得到的神经元在半切脊髓损伤环境中存活时间长达 8 周, 并促进其成熟<sup>[75-76]</sup>。因此, 抗氧化剂和抗凋亡蛋白的使用可以有效促进转分化得到的神经元的存活以及提高神经细胞直接重编程效率, 特别是

损伤后短期内在富含 ROS 的环境中发生的转分化。

### 2.4 激活神经元富含的线粒体基因

Russo 等<sup>[77]</sup>的研究显示, 早期由失去 DNA 切割活性的 Cas9 蛋白 (dead Cas9) 诱导编码神经元富含的线粒体蛋白基因的激活, 可显著提高神经细胞直接重编程的速度和效率。单独诱导具有抗氧化功能的超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, Sod1) 或联合诱导 Sod1 和过氧化物还原酶 2 (peroxiredoxin 2, Prx2) 可增加转分化过程中起始细胞的招募以及对异常增加的 ROS, 从而提高由转录因子重编程得到的神经元的存活率, 促进神经元成熟, 同时加快转分化速度<sup>[27]</sup>。这表明线粒体蛋白在重编程过程中起着驱动和促进作用。

在没有任何抗氧化活性的情况下, 早期激活神经元富含的线粒体蛋白也可显著提高神经细胞直接重编程效率。线粒体磷酸酶 *Pgam5* 是受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor interacting protein kinase 1, RIP1)、RIP3 和混合谱系激酶样结构域蛋白 (mixed lineage kinase-like domain protein, MLKL) 等分子的复合物的组成部分<sup>[78]</sup>, 它可能通过抑制铁死亡使 *Ascl1* 介导的重编程效率加倍<sup>[27]</sup>。此外, *Pgam5* 通过去磷酸化动力相关蛋白 1 (dynamin related protein, Drp1)、抗凋亡蛋白 BCL-xL 和有丝分裂受体 *FUNDC1* 来调节线粒体的内稳态和动力学, 这些是神经元存活和发挥功能的关键过程<sup>[79-80]</sup>。同样, 线粒体谷氨酸转运体 *SIC25A22* (solute carrier family 25 member 22, 也称为“GC1”) 通过调节谷氨酸水平可将重编程效率提高两倍<sup>[77]</sup>。精氨酸酶 2 (arginase 2, Arg2) 和微粒体 *Gst3* (microsomal *Gst3*, *Mgst3*) 的诱导也显著提高了大脑皮层星形胶质细胞的重编程效率<sup>[77]</sup>。在这些神经元富含的线粒体蛋白基因中, 激活 *Sod1* 对于提高神经细胞直接重编程效率的效果最好, 这与其在神经退行性疾病具有抗氧化保护功能一致<sup>[81]</sup>。这些数据表明转分化发生时诱导神经元特异性线粒体蛋白表达的重要性, 它们可以通过调节不同的线粒体依赖途径以提高细胞存活率, 从而加快转分化速度。

### 2.5 运用表观遗传调控

染色质重塑发生在重编程的早期<sup>[82]</sup>, 同时也是重编程发生的限制因素<sup>[83]</sup>。起始细胞是否增殖影响转分化涉及的特定基因的染色质状态, 这些基因可能处于抑制 (R-染色质) 或开放 (L-染色质) 状态<sup>[5]</sup>。将来源于不同胚层的细胞实现命运转变, 比如中胚层的成纤维细胞转分化为外胚层的神经元,

会发生大量的染色质重塑并激活起始细胞原来封闭的染色质区域, 使得起始细胞中特异的促神经发生相关转录因子开始表达, 进而启动神经元转录程序。染色质重塑剂包括组蛋白去乙酰化酶抑制剂丙戊酸 (valproic acid, VPA)、DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine) 和抗坏血酸 (ascorbic acid) 等均可以提高体细胞重编程的效率<sup>[51]</sup>。研究显示, 联合使用三种转录因子 *NEUROD1*、*ASCL1* 和 *LMX1A*, 以及 miR218 (统称 NeAL-218), 可以将体外培养的人星形胶质细胞和小鼠体内的星形胶质细胞重编程为诱导多巴胺能神经元 (induced dopamine neurons, iDAN), 同时依次添加生长因子 (TGF $\beta$ 1) 和小分子 (VPA、Dec、SB、LDN、AA、CT 和嘌呤吗啡胺) 可提高星形胶质细胞的重编程效率, 同时快速获得中脑神经元的分子标记<sup>[51]</sup>。Wapinski 等<sup>[84]</sup>发现, *Ascl1* 在以染色质紧密状态为标志的非活化位点上充当先驱因子, 直接将成纤维细胞转分化成神经元, 这与 *Ascl1* 在神经发生过程中协调基因表达和染色质开放程度的观察结果一致<sup>[85-86]</sup>。在 microRNA、CRISPR/cas9 和转录因子 *Nuerog2* 介导的成纤维细胞到神经元的转分化中也观察到染色质可及性增强<sup>[87-89]</sup>。有研究表明, 染色质重塑因子 Chd7 (chromodomain helicase DNA binding protein 7) 通过激活 *SoxC* 等转录因子来调节成年神经发生, 在小脑的正常发育中不可或缺<sup>[90-91]</sup>。Rao 等<sup>[92]</sup>发现 Chd7 基因表达敲低后, 由转录因子 *Ascl1* 介导的星形胶质细胞转分化成神经元的效率显著降低。值得注意的是, Chd7 基因表达敲低后, *Sox11*、*Myt1*、*Ebf3*、*Neurod4* 和 *Zfp821* 等与神经元发育和分化相关的基因的表达显著下降, 这提示染色质重塑因子可能是通过调控发育过程中的相关分子来提高神经细胞直接重编程的效率。

Forskolin(Fk) 可以直接促进染色质可及性, 从而实现更高效的由 *Neurog2* 介导的重编程; Fk 在不影响细胞增殖的情况下也可增加过量表达转录因子 *Ascl1* 的星形胶质细胞的存活率以及转分化为神经元的效率; 在不同转录因子 (*Ascl1*、*Neurog2*、*Sox2*) 介导下, Fk 还可提高成纤维细胞 MEF 和周细胞的重编程效率, 但在没有任何促神经发生因子的情况下, Fk 不会诱导神经细胞转分化<sup>[27, 89]</sup>。

染色质重塑还包括组蛋白甲基化。*Brn2* 和 *Myt1l* 等因子的过量表达, 可改变细胞的表观遗传特性, 提高转分化效率和促进转分化得到的神经元成熟<sup>[12]</sup>。敲除组蛋白甲基化的相关基因组蛋白 H3

赖氨酸 4 甲基化酶 (histone H3 lysine 4 methylase)、组蛋白-赖氨酸 N-甲基转移酶 KMT2A (histone lysine N-methyltransferase 2A) 和 KMT2B, 导致无法生成成熟的神经元<sup>[12, 93]</sup>。此外, 调控 DNA 去甲基化的表观遗传因子 Tet3 (ten-eleven translocation 3) 和 KMT2B 有助于成纤维细胞直接转分化为功能性神经元<sup>[93-94]</sup>。相反, *MoyD* 介导的人成纤维细胞的不完全转分化与染色质重塑缺陷相关<sup>[95]</sup>。这进一步表明, 组蛋白甲基化在神经元成熟中的重要性——组蛋白甲基化控制着神经元的突触形成和神经元功能相关基因的可及性<sup>[93]</sup>。

先前的研究显示, 在神经细胞重编程过程中使用褪黑素可显著提高神经干细胞重编程为多能干细胞的效率<sup>[96]</sup>。Sotthibundhu 等<sup>[97]</sup>发现联合使用组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制剂、糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK3) 抑制剂、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 抑制剂、Rho 相关蛋白激酶 (rho-associated protein kinase) 抑制剂、环腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 激活剂和褪黑素 (melatonin) 可以实现人皮肤成纤维细胞向神经元的直接重编程, 同时增强神经转录因子 *Brn2*、*Ascl1* 和 *Myt1l* 的表达。褪黑素的这种作用可能与其自噬调节能力和参与表观遗传修饰有关。

## 2.6 运用转录因子组合

在首次报道转录因子 *MyoD* 可将小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 转分化为肌细胞后<sup>[4]</sup>, 其他转录因子或转录因子组合陆续被发现能够将一种细胞类型转分化成另一种细胞类型。*Ascl1* 作为一种促神经生成的 bHLH 家族转录因子, 它在胚胎发育期的神经前体细胞中瞬时表达<sup>[98]</sup>。研究表明, 过量表达 *Ascl1* 可以将小鼠成纤维细胞重编程为神经元, 在重编程过程中 *Ascl1* 激活内源性 *Myt1l* 和 *Brn2*, 同时结合外源性 *Brn2* 和 *Myt1l* 可显著提高转分化效率和促进神经元成熟<sup>[15, 99]</sup>。此外, 在体外培养的人成纤维细胞中 *Ascl1* 结合过量表达转录因子 *Neurog2* 比仅过量表达 *Ascl1* 和 *Sox2* 或 *Ascl1*, 其转分化成神经元的效率明显提高<sup>[100]</sup>。

Mattugini 等<sup>[101]</sup>发现在小鼠大脑皮层过量表达转录因子 *Nurr1* 和 *Neurog2* 可以提高星形胶质细胞转分化成锥体神经元的效率, 同时转分化得到的神经元数量显著增加; 值得注意的是, 转分化得到的神经元具有与该区域内源性神经元相似的成熟形态和轴突投射。事实上, 因为神经干细胞中 *Nurr1* 过



量表达引起神经生长因子- $\beta$  (nerve growth factor- $\beta$ , NGF- $\beta$ )、Wnt1- 诱导性分泌蛋白 1 (Wnt1-inducible secreted protein 1) 和转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 表达上调, 重编程过程中由氧化应激造成的有害环境得到改善, 同时下调了有丝分裂后期 B2、D1 和 p21 等细胞周期蛋白的表达<sup>[102]</sup>, 这些通路的改变可能有助于 *Nurr1* 提高皮层星形胶质细胞重编程成神经元的效率。

单独过量表达促神经生成因子 *Neurog2* 足以在体外将星形胶质细胞转分化为谷氨酸能神经元, 但只有一小部分被病毒感染的星形胶质细胞实现转分化<sup>[40]</sup>。当 *Neurog2* 与转录因子 *Nurr1* 结合时, 由星形胶质细胞转分化得到的神经元数量增加<sup>[27]</sup>。此外, *Nurr1* 与 *Ascl1* 结合诱导得到的神经元的比例比单独过量表达 *Ascl1* 增加了一倍<sup>[101]</sup>。这表明促神经生成因子 *Neurog2* 或 *Ascl1* 与 *Nurr1* 的结合提高了星形胶质细胞转分化成神经元的效率。这些研究结果均表明, 转录因子联合表达可以提高神经细胞直接重编程的效率。

### 3 局限性

虽然抗氧化剂、铁死亡抑制剂和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的使用可减少转分化过程中氧化应激产生的过量活性氧并提高重编程效率, 而且使用方便, 但并非活性氧越少越好。研究表明, 脂肪酸  $\beta$ -氧化为神经胶质细胞重编程中的一个普遍障碍<sup>[77]</sup>, 中等至高剂量 (分别为 25 mmol/L 和 100 mmol/L) 的肉碱棕榈酰基转移酶 1a (carnitine palmitoyl-transferase 1a, CPT1a) 抑制剂依托莫司 (etomoxir) 通过抑制脂肪酸  $\beta$ -氧化 (fatty acid  $\beta$ -oxidation) 可增强神经细胞直接重编程<sup>[77, 103]</sup>。然而, 依托莫司与活性氧清除剂维生素 E 类似物  $\alpha$ -生育三烯酚的联合处理降低了 *Ascl1* 介导的重编程效率, 这表明依托莫司的转分化促进作用可能部分归因于活性氧的增加<sup>[103]</sup>。依托莫司介导的脂肪酸  $\beta$ -氧化的减少可增强神经细胞重编程, 这表明对特定代谢途径的操控将有助于消除转分化过程中的部分障碍。转录因子与依托莫司联合的同时添加 ROS 清除剂降低了重编程效率, 提示在某些情况下, ROS 具有潜在的有益作用。以上研究表明, 在应用抗氧化剂、铁死亡抑制剂和抗凋亡蛋白调节细胞代谢活动以提高神经细胞直接重编程效率的同时, 除了需要操控细胞的特定代谢途径, 还应该考虑细胞的活性氧水平, 超过一定水平, 活性氧将会产生有害作用<sup>[77]</sup>。

在重编程早期激活神经元富含的某些线粒体基因, 特别是具有抗氧化活性的线粒体蛋白基因, 可以改善神经细胞直接重编程。而不激活神经元富含的线粒体蛋白基因或后期激活可能在多个水平上不利于转分化发生, 最终导致细胞死亡<sup>[77]</sup>。这提示未来可以尝试激活神经元富含的其他具有抗氧化活性的线粒体蛋白基因, 以检测是否可以提高神经细胞直接重编程的效率。这些研究表明, 开展细胞重编程时, 开启神经元富含的线粒体蛋白基因的表达时间非常重要。已有文献报道, 带有标记线粒体外膜蛋白质的小鼠可全方位指示线粒体蛋白质组, 并揭示其表达时间<sup>[104]</sup>。除了激活内源性神经元富含的线粒体蛋白基因, 还可以进一步探索是否能够通过添加外源性神经元富含的线粒体蛋白基因来提高神经细胞直接重编程的效率。

联合使用染色质重塑因子或敲除某些基因调控因子可增强神经细胞直接重编程, 凸显了染色质重塑因子在介导染色质可及性和激活细胞命运转变中的重要性。但同时, 应该了解染色质的高级结构可能存在的障碍以及敲除某些基因是否会对正常神经元发挥功能造成不利影响<sup>[5, 105-107]</sup>。在调节某些染色质重塑因子时, 一些与神经元发育和分化相关因子的表达量也会发生变化, 这可能是染色质重塑因子提高神经细胞直接重编程效率的原因。因此, 除了目前利用的染色质重塑因子, 还可以从与神经元发育和分化相关的因子出发, 寻找与这些因子发生相互作用的染色质重塑因子, 并检测其在神经发育及神经细胞直接重编程中的作用。此外, 染色质重塑因子如何被招募到特定靶点并重塑染色质结构为该领域今后需要探索并解决的重要问题。

利用转录因子组合可显著提高神经细胞直接重编程的效率。值得注意的是, 这些转录因子组合一般包含促神经发生因子 *Ascl1* 和 *Neurog2* 以及与目标神经元发育和分化密切相关的转录因子。比如在小鼠大脑皮层联合表达转录因子 *Neurog2* 和 *Nurr1* 可以显著提高星形胶质细胞转分化成锥体神经元的效率, 其中神经发生因子 *Nurr1* 参与了大脑皮层神经元的发育<sup>[101]</sup>。因此, 设计转录因子组合时, 需要充分考虑目标神经元的区域特异性, 建议优先选用与这些神经元发育、分化、成熟和存活密切相关的转录因子。

### 4 小结

综上所述, 提高神经细胞直接重编程效率的方

法主要是解决转分化过程中发生的氧化应激、染色质重塑、表观遗传调控以及单个转录因子转分化效率低等问题。目前, 转录因子与抗氧化剂、铁死亡抑制剂、抗凋亡蛋白、染色质重塑因子、神经元富含的线粒体基因等的联合使用以及转录因子组合可有效地提高转分化效率。在以上方法中, 考虑到应用染色质重塑因子和转录因子组合都是为了激活或增加神经元的相关属性, 从认识转分化发生的生物学基础出发, 未来值得探讨增加神经元富含的细胞骨架成分、内膜系统或其他细胞生物学属性是否也能提高神经细胞直接重编程的效率。但是, 无论应用哪种方法来提高神经细胞直接重编程效率, 都需要结合实际条件。理想的提高神经细胞直接重编程效率的方法应满足以下条件: (1) 选择转分化的最佳时间窗口<sup>[57]</sup>; (2) 提高转分化得到的神经元的存活率<sup>[5]</sup>; (3) 加快转分化得到的神经元的成熟并能够发挥功能<sup>[4]</sup>; (4) 方法简单易行, 稳定性高<sup>[112]</sup>; (5) 不会对人体或动物产生副作用<sup>[89]</sup>; (6) 能够安全有效地应用于临床<sup>[51, 106, 108]</sup>。因此, 在实现非神经元细胞转分化为神经元的同时, 了解转分化发生的机制, 逐步探索出能够安全有效且方便地提高转分化效率的方法, 是该领域今后需要努力的方向。

### [参 考 文 献]

- [1] Bond AM, Ming GL, Song H. Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 385-95
- [2] Obernier K, Tong CK, Alvarez-Buylla A. Restricted nature of adult neural stem cells: re-evaluation of their potential for brain repair. *Front Neurosci*, 2014, 8: 162
- [3] Quadrato G, Elnaggar MY, Di Giovanni S. Adult neurogenesis in brain repair: cellular plasticity vs. cellular replacement. *Front Neurosci*, 2014, 8: 17
- [4] Barker RA, Götz M, Parmar M. New approaches for brain repair—from rescue to reprogramming. *Nature*, 2018, 557: 329-34
- [5] Gascon S, Masserdotti G, Russo GL, et al. Direct neuronal reprogramming: achievements, hurdles, and new roads to success. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 18-34
- [6] Lei W, Li W, Ge L, et al. Non-engineered and engineered adult neurogenesis in mammalian brains. *Front Neurosci*, 2019, 13: 131
- [7] Mccomish SF, Caldwell MA. Generation of defined neural populations from pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2018, 373: 20170214
- [8] Steinbeck JA, Studer L. Moving stem cells to the clinic: potential and limitations for brain repair. *Neuron*, 2015, 86: 187-206
- [9] Wang LL, Zhang CL. Engineering new neurons: *in vivo* reprogramming in mammalian brain and spinal cord. *Cell Tissue Res*, 2017, 371: 201-12
- [10] Bajohr J, Faiz M. Direct lineage reprogramming in the CNS. *Med Biol*, 2019, 1212: 31-48
- [11] Wang F, Cheng L, Zhang X. Reprogramming glial cells into functional neurons for neuro-regeneration: challenges and promise. *Neurosci Bull*, 2021, 37: 1625-36
- [12] Traxler L, Edenhofer F, Mertens J. Next-generation disease modeling with direct conversion: a new path to old neurons. *FEBS Lett*, 2019, 593: 3316-37
- [13] Li H, Chen G. *In vivo* reprogramming for CNS repair: regenerating neurons from endogenous glial cells. *Neuron*, 2016, 91: 728-38
- [14] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 1987, 51: 987-1000
- [15] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463: 1035-41
- [16] Masserdotti G, Gascon S, Gotz M. Direct neuronal reprogramming: learning from and for development. *Development*, 2016, 143: 2494-510
- [17] Vasan L, Park E, David LA, et al. Direct neuronal reprogramming: bridging the gap between basic science and clinical application. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 681087
- [18] Chen YC, Ma NX, Pei ZF, et al. A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through *in vivo* astrocyte-to-neuron conversion. *Mol Ther*, 2020, 28: 217-34
- [19] Liu MH, Li W, Zheng JJ, et al. Differential neuronal reprogramming induced by NeuroD1 from astrocytes in grey matter versus white matter. *Neural Regen Res*, 2020, 15: 342-51
- [20] Qian H, Kang X, Hu J, et al. Reversing a model of Parkinson's disease with *in situ* converted nigral neurons. *Nature*, 2020, 582: 550-6
- [21] Wang LL, Serrano C, Zhong X, et al. Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing *in vivo*. *Cell*, 2021, 184: 5465-81
- [22] Zhou H, Su J, Hu X, et al. Glia-to-neuron conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice. *Cell*, 2020, 181: 590-603
- [23] Chen W, Zheng Q, Huang Q, et al. Repressing PTBP1 fails to convert reactive astrocytes to dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Elife*, 2022, 11: e75636
- [24] Guo T, Pan X, Jiang G, et al. Downregulating PTBP1 fails to convert astrocytes into hippocampal neurons and to alleviate symptoms in Alzheimer's mouse models. *J Neurosci*, 2022, 42: 7309-17
- [25] Hoang T, Kim DW, Appel H, et al. Genetic loss of function of Ptbp1 does not induce glia-to-neuron conversion in retina. *Cell Rep*, 2022, 39: 110849
- [26] Xie Y, Zhou J, Chen B. Critical examination of Ptbp1-mediated glia-to-neuron conversion in the mouse retina. *Cell Rep*, 2022, 39: 110960
- [27] Gascon S, Murenu E, Masserdotti G, et al. Identification

- and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 396-409
- [28] Lentini C, D'orange M, Marichal N, et al. Reprogramming reactive glia into interneurons reduces chronic seizure activity in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 2104-21
- [29] Niu W, Zang T, Zou Y, et al. *In vivo* reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 1164-75
- [30] Tai W, Wu W, Wang LL, et al. *In vivo* reprogramming of NG2 glia enables adult neurogenesis and functional recovery following spinal cord injury. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 923-37
- [31] Tsunemoto RK, Eade KT, Blanchard JW, et al. Forward engineering neuronal diversity using direct reprogramming. *EMBO J*, 2015, 34: 1445-55
- [32] Xu J, Du Y, Deng H. Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 119-34
- [33] Liddel SA, Barres BA. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity*, 2017, 46: 957-67
- [34] Rossi D. Astrocyte physiopathology: at the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog Neurobiol*, 2015, 130: 86-120
- [35] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 2010, 119: 7-35
- [36] Giehl-Schwab J, Giesert F, Rauser B, et al. Parkinson's disease motor symptoms rescue by CRISPRa-reprogramming astrocytes into GABAergic neurons. *EMBO Mol Med*, 2022, 14: e14797
- [37] Ofenbauer A, Tursun B. Strategies for *in vivo* reprogramming. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 61: 9-15
- [38] Wang H, Yang Y, Liu J, et al. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 410-24
- [39] Ichida JK, Kiskinis E. Probing disorders of the nervous system using reprogramming approaches. *EMBO J*, 2015, 34: 1456-77
- [40] Heinrich C, Blum R, Gascon S, et al. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol*, 2010, 8: e1000373
- [41] Colasante G, Lignani G, Rubio A, et al. Rapid conversion of fibroblasts into functional forebrain GABAergic interneurons by direct genetic reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 719-34
- [42] Caiazzo M, Dell'anno MT, Dvoretzkova E, et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 2011, 476: 224-7
- [43] Kim J, Su SC, Wang H, et al. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 413-9
- [44] Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 10343-8
- [45] Liu ML, Zang T, Zou Y, et al. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat Commun*, 2013, 4: 2183
- [46] Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 205-18
- [47] Li S, Shi Y, Yao X, et al. Conversion of astrocytes and fibroblasts into functional noradrenergic neurons. *Cell Rep*, 2019, 28: 682-97
- [48] Vadodaria KC, Mertens J, Paquola A, et al. Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts. *Mol Psychiatry*, 2016, 21: 49-61
- [49] Xu Z, Jiang H, Zhong P, et al. Direct conversion of human fibroblasts to induced serotonergic neurons. *Mol Psychiatry*, 2016, 21: 62-70
- [50] Guo Z, Zhang L, Wu Z, et al. *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 188-202
- [51] Di Val Cervo PR, Romanov RA, Spigolon G, et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes *in vitro* and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 444-52
- [52] Herrero-Navarro A, Puche-Aroca L, Moreno-Juan V, et al. Astrocytes and neurons share region-specific transcriptional signatures that confer regional identity to neuronal reprogramming. *Sci Adv*, 2021, 7: eabe8978
- [53] Hu X, Qin S, Huang X, et al. Region-restrict astrocytes exhibit heterogeneous susceptibility to neuronal reprogramming. *Stem Cell Rep*, 2019, 12: 290-304
- [54] Vignoles R, Lentini C, D'orange M, et al. Direct lineage reprogramming for brain repair: breakthroughs and challenges. *Trends Mol Med*, 2019, 25: 897-914
- [55] Heinrich C, Bergami M, Gascon S, et al. Sox2-mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. *Stem Cell Rep*, 2014, 3: 1000-14
- [56] Niu W, Zang T, Smith DK, et al. SOX2 reprograms resident astrocytes into neural progenitors in the adult brain. *Stem Cell Rep*, 2015, 4: 780-94
- [57] Grande A, Sumiyoshi K, Lopez-Juarez A, et al. Environmental impact on direct neuronal reprogramming *in vivo* in the adult brain. *Nat Commun*, 2013, 4: 2373
- [58] Vierbuchen T, Wernig M. Molecular roadblocks for cellular reprogramming. *Mol Cell*, 2012, 47: 827-38
- [59] Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab*, 2011, 14: 724-38
- [60] Yellen G. Fueling thought: management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. *J Cell Biol*, 2018, 217: 2235-46
- [61] Zhang Y, Chen K, Sloan SA, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*, 2014, 34: 11929-47
- [62] Magistretti PJ, Allaman I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron*, 2015, 86: 883-901



- [63] Kim Y, Zheng X, Ansari Z, et al. Mitochondrial aging defects emerge in directly reprogrammed human neurons due to their metabolic profile. *Cell Rep*, 2018, 23: 2550-8
- [64] Lorenz C, Prigione A. Mitochondrial metabolism in early neural fate and its relevance for neuronal disease modeling. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 49: 71-6
- [65] Zink A, Priller J, Prigione A. Pluripotent stem cells for uncovering the role of mitochondria in human brain function and dysfunction. *J Mol Biol*, 2018, 430: 891-903
- [66] Bell KFS, Al-Mubarak B, Martel MA, et al. Neuronal development is promoted by weakened intrinsic antioxidant defences due to epigenetic repression of Nrf2. *Nat Commun*, 2015, 6: 7066
- [67] Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2012, 43: 3063-70
- [68] Kumar A, Stoica BA, Sabirzhanov B, et al. Traumatic brain injury in aged animals increases lesion size and chronically alters microglial/macrophage classical and alternative activation states. *Neurobiol Aging*, 2013, 34: 1397-411
- [69] Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 7038-43
- [70] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 2012, 149: 1060-72
- [71] Friedmann-Angeli JP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 1180-91
- [72] Yang WS, Sriramaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 2014, 156: 317-31
- [73] Drummen GPC, van Liebergen LCM, Op den Kamp JAF, et al. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Biol Med*, 2002, 33: 473-90
- [74] Falco A, Bartolome-Cabrero R, Gascon S. Bcl-2-assisted reprogramming of mouse astrocytes and human fibroblasts into induced neurons. *Methods Mol Biol*, 2021, 2352: 57-71
- [75] Hachem LD, Mothe AJ, Tator CH. Effect of BDNF and other potential survival factors in models of *in vitro* oxidative stress on adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells. *Biores Open Access*, 2015, 4: 146-59
- [76] Wang LL, Su Z, Tai W, et al. The p53 pathway controls SOX2-mediated reprogramming in the adult mouse spinal cord. *Cell Rep*, 2016, 17: 891-903
- [77] Russo GL, Sonsalla G, Natarajan P, et al. CRISPR-mediated induction of neuron-enriched mitochondrial proteins boosts direct glia-to-neuron conversion. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 524-34
- [78] Wang Z, Jiang H, Chen S, et al. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 2012, 148: 228-43
- [79] Lu W, Karuppagounder SS, Springer DA, et al. Genetic deficiency of the mitochondrial protein PGAM5 causes a Parkinson's-like movement disorder. *Nat Commun*, 2014, 5: 4930
- [80] Ma K, Zhang Z, Chang R, et al. Dynamic PGAM5 multimers dephosphorylate BCL-xL or FUNDC1 to regulate mitochondrial and cellular fate. *Cell Death Differ*, 2019, 27: 1036-51
- [81] Eleutherio ECA, Silva Magalhaes RS, De Araujo Brasil A, et al. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 697: 108701
- [82] Simonsson S, Gurdon J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 984-90
- [83] Luna-Zurita L, Bruneau BG. Chromatin modulators as facilitating factors in cellular reprogramming. *Curr Opin Genet Dev*, 2013, 23: 556-61
- [84] Wapinski OL, Vierbuchen T, Qu K, et al. Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell*, 2013, 155: 621-35
- [85] Aydin B, Kakumanu A, Rossillo M, et al. Proneural factors Ascl1 and Neurog2 contribute to neuronal subtype identities by establishing distinct chromatin landscapes. *Nat Neurosci*, 2019, 22: 897-908
- [86] Raposo A, Vasconcelos FF, Drechsel D, et al. Ascl1 coordinately regulates gene expression and the chromatin landscape during neurogenesis. *Cell Rep*, 2015, 10: 1544-56
- [87] Abernathy DG, Kim WK, Mccoy MJ, et al. MicroRNAs induce a permissive chromatin environment that enables neuronal subtype-specific reprogramming of adult human fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 332-48
- [88] Black JB, Adler AF, Wang HG, et al. Targeted epigenetic remodeling of endogenous loci by CRISPR/Cas9-based transcriptional activators directly converts fibroblasts to neuronal cells. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 406-14
- [89] Smith DK, Yang J, Liu ML, et al. Small molecules modulate chromatin accessibility to promote Neurog2-mediated fibroblast-to-neuron reprogramming. *Stem Cell Rep*, 2016, 7: 955-69
- [90] Feng W, Khan MA, Bellvis P, et al. The chromatin remodeler Chd7 regulates adult neurogenesis via activation of SoxC transcription factors. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 62-72
- [91] Yao H, Hannum DF, Zhai Y, et al. CHD7 promotes neural progenitor differentiation in embryonic stem cells via altered chromatin accessibility and nascent gene expression. *Sci Rep*, 2020, 10: 17445
- [92] Rao Z, Wang R, Li S, et al. Molecular mechanisms underlying Ascl1-mediated astrocyte-to-neuron conversion. *Stem Cell Rep*, 2021, 16: 534-47
- [93] Barbagiovanni G, Germain PL, Zech M, et al. KMT2B is selectively required for neuronal transdifferentiation, and its loss exposes dystonia candidate genes. *Cell Rep*, 2018, 25: 988-1001

- [94] Zhang J, Chen S, Zhang D, et al. Tet3-mediated DNA demethylation contributes to the direct conversion of fibroblast to functional neuron. *Cell Rep*, 2016, 17: 2326-39
- [95] Manandhar D, Song L, Kabadi A, et al. Incomplete MyoD-induced transdifferentiation is associated with chromatin remodeling deficiencies. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 11684-99
- [96] Bai C, Li X, Gao Y, et al. Melatonin improves reprogramming efficiency and proliferation of bovine-induced pluripotent stem cells. *J Pineal Res*, 2016, 61: 154-67
- [97] Sotthibundhu A, Nopparat C, Natphopsuk S, et al. Combination of melatonin and small molecules improved reprogramming neural cell fates via autophagy activation. *Neurochem Res*, 2022, 47: 2580-90
- [98] Dennis DJ, Han S, Schuurmans C. bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming. *Brain Res*, 2019, 1705: 48-65
- [99] Chanda S, Ang CE, Davila J, et al. Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor Ascl1. *Stem Cell Rep*, 2014, 3: 282-96
- [100] Zhao P, Zhu T, Lu X, et al. Neurogenin 2 enhances the generation of patient-specific induced neuronal cells. *Brain Res*, 2015, 1615: 51-60
- [101] Mattugini N, Bocchi R, Scheuss V, et al. Inducing different neuronal subtypes from astrocytes in the injured mouse cerebral cortex. *Neuron*, 2019, 103: 1086-95
- [102] Sousa KM, Mira H, Hall AC, et al. Microarray analyses support a role for Nurr1 in resistance to oxidative stress and neuronal differentiation in neural stem cells. *Stem Cells*, 2007, 25: 511-9
- [103] O'connor RS, Guo L, Ghassemi S, et al. The CPT1a inhibitor, etomoxir induces severe oxidative stress at commonly used concentrations. *Sci Rep*, 2018, 8: 6289
- [104] Fecher C, Trovo L, Muller SA, et al. Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity. *Nat Neurosci*, 2019, 22: 1731-42
- [105] Guo C, Morris SA. Engineering cell identity: establishing new gene regulatory and chromatin landscapes. *Curr Opin Genet Dev*, 2017, 46: 50-7
- [106] Ninkovic J, Gotz M. Understanding direct neuronal reprogramming-from pioneer factors to 3D chromatin. *Curr Opin Genet Dev*, 2018, 52: 65-9
- [107] Riemens RJM, Van Den Hove DLA, Esteller M, et al. Directing neuronal cell fate *in vitro*: achievements and challenges. *Prog Neurobiol*, 2018, 168: 42-68
- [108] Garry GA, Bassel-Duby R, Olson EN. Direct reprogramming as a route to cardiac repair. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 122: 3-13