

# 心脏重编程在心肌梗死修复中的研究进展

张欣<sup>1,2</sup>, 王晨曦<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>延安大学附属医院心血管内科, 陕西 延安

<sup>2</sup>延安大学第一临床医学院, 陕西 延安

收稿日期: 2023年8月28日; 录用日期: 2023年9月21日; 发布日期: 2023年10月8日

## 摘要

人类成年心脏缺乏强大的内源性修复机制来完全恢复损伤后的心功能, 因此, 再生和修复受损心肌的能力是治疗心力衰竭或心肌梗死的首要任务。在体外和体内直接将成纤维细胞转化为心肌样细胞为这一问题提供了巨大的希望。此外, 心肌成纤维细胞的直接重编程可规避干细胞疗法在临床应用中产生的许多问题, 且为心脏再生和修复提供了有力的治疗策略。在这篇综述中, 我们阐述了心脏直接重编程研究的进展, 以及改善心脏重编程的效率的方法。最后, 我们讨论了未来临床应用的更安全重编程方法的发展。

## 关键词

心脏重编程, 心肌样细胞, 成纤维细胞, 心肌梗死

# Research Progress of Cardiac Reprogramming in the Repair of Myocardial Infarction

Xin Zhang<sup>1,2</sup>, Chenxi Wang<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Medicine, The Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an Shaanxi

<sup>2</sup>The First Clinical Medical College of Yan'an University, Yan'an Shaanxi

Received: Aug. 28<sup>th</sup>, 2023; accepted: Sep. 21<sup>st</sup>, 2023; published: Oct. 8<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

The human adult heart lacks a strong endogenous repair mechanism to completely restore the injured heart function. Therefore, the ability to regenerate and repair damaged myocardium is the

primary task in the treatment of heart failure or myocardial infarction. Direct transformation of fibroblasts into cardiomyocytes *in vitro* and *in vivo* provides great hope for this problem. In addition, direct reprogramming of cardiac fibroblasts can avoid many problems in clinical application of stem cell therapy, and provide a powerful therapeutic strategy for heart regeneration and repair. In this review, we describe the research progress of direct cardiac reprogramming and the methods to improve the efficiency of cardiac reprogramming. Finally, we discuss the development of safer reprogramming methods for clinical application in the future.

## Keywords

Cardiac Reprogramming, Cardiomyocyte-Like Cells, Fibroblasts, Myocardial Infarction

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

在全球范围内,缺血性心脏病(IHD)影响约 1.26 亿人(每 10 万人中有 1655 人),约占世界人口的 1.72%。全球有 900 万人死于 IHD。IHD 是全球主要的死亡原因也是最常见的心脏疾病[1]。在心肌梗死(MI)期间,数十亿的心肌细胞(CMs)会在几分钟内因缺血导致细胞凋亡进而出现组织坏死,出现不可逆转的损伤。死亡的心肌细胞(CMs)形成非收缩的瘢痕组织并被心脏成纤维细胞(CFs)取代,经历持续的重塑,最终导致心肌肥厚和进展性心力衰竭[2] [3]。心肌细胞受损后内源性再生能力受限,因此需要有效的替代疗法来恢复心脏功能[4] [5]。在过去的十年里,心脏再生取得了巨大的进步。一种正在发展的再生方式是干细胞疗法,其衍生出的另一种心脏再生的直接重编程途径,是指诱导的心肌细胞样细胞(iCMs)由成纤维细胞直接转化而来。心脏再生医学是一个具有挑战性的且正在迅速发展的领域。本综述的目的是阐述心脏直接重编程研究的进展以及改善心脏重编程的效率的方法。最后讨论未来更安全的临床应用重编程方法的发展。

## 2. 心脏重编程的概述

细胞重编程是细胞生物学中的一种新方式,它提供了一种独特而有效的方法,即将体细胞谱系转化为多能干细胞(IPSCs) [6]、CMs [7]或内皮细胞(ECs) [8]的手段。通常,重编程在体外和体内都被用于心脏损伤部位修复[9]、心脏病建模或药物筛选[10] [11]。在改变细胞命运的过程中,中间多能状态是区分直接和间接重编程的关键[12]。

### 2.1. 心脏间接重编程

从成熟体细胞到 IPSC 来源的 CMs (IPSC-CMs)的间接细胞重编程是一个成熟的过程[13]。间接重编程途径需要体外工程化 3D 组织,然后在体内移植[14]。不同来源的 iPSC 现在已经商业化。这种重新编程方法被广泛使用,不仅克服了在体外培养人类原代 CMs 等困难,而且包含患者特定的基因组信息,可用于自体心脏再生医学[15]。通常,成人的成纤维细胞通过激活碱性磷酸酶、沉默体细胞特异性表达和 SSEA1 的表达,以及随着 Oct4 和 Nanog 的上调,而逐渐沉默外源基因被重编程为 IPSCs [16]。然而,这些 CMs 在标记表达、超微结构特征、代谢特征和电生理特性方面更接近于未成熟阶段[17]。首先,体细胞的来源是 iPSCCM 成熟的决定因素[18]。对心脏来源的间充质干细胞(CPC)、骨髓来源的间充质干细胞(BMC)和同一患者的真皮成纤维细胞(HDF)来源的 IPSCCM 的比较表明,心脏基因上调(MYH6、TNNT3、

KCNQ1、KCNE1), 体细胞重新分化的能力增强[18] [19]。此外, iPSC-CM 的应用受纯化过程的影响很大, 在 iPSC 的体外培养过程中会形成肿瘤, 增加了体内应用的恶性风险[20]。为了克服纯化障碍, 设计了一种独特的代谢流技术, 通过葡萄糖消耗和乳酸补充实现大规模纯化, 使成熟的 iPSC-CM 具有更高的耗氧率和线粒体成熟度增加[17] [20]。

## 2.2. 心脏直接重编程

直接细胞重编程是绕过早期发育阶段, 直接将体细胞转化为期望的细胞而没有多能状态的过程。从转化的角度来看, 直接重编程技术具有巨大的治疗潜力, 因为它具有快速周转时间和体内应用可行性等特点, 且在理想状态下, 通过在受损心脏的原位产生重编程细胞, 使得直接细胞重编程更适合体内心脏修复[12]。然而, 近年来直接心脏重编程的概念被提出后, 已验证小鼠[21] [22] [23] [24]和人类成纤维细胞[25] [26] [27] [28]可以直接重编程为 iCMs, 这为预防瘢痕形成和替代死亡心肌提供了潜在的治疗方法。尽管在体外和体内已经实现了几种细胞类型的直接重编程[23] [29] [30]。由于转化效率低, 将直接重编程应用于临床之前仍有许多挑战需要克服。转录因子如 Gata4、Oct4、Tbx5、Sox2 和 Klf4 的直接重编程被直接递送到受损心脏中启动再生[21] [31]。检测到六个核心转录因子 Gata4、Hand2、Mef2c、Mesp1、Nkx2.5 和 Tbx5 的心脏线性重编程能力[32] [33]。逆转录病毒可将转录因子整合到成年小鼠的成纤维细胞中基因组内[21] [24] [34]。另一项研究报道了表达转录因子 Gata4、Mef2c 和 Tbx5 (GMT)可在体外进行成纤维细胞到 CMs 的重编程, 从而在功能上代替了心肌细胞[23] [32]。虽然直接细胞重编程绕过了早期发育阶段[35], 但致癌风险可能不会低于间接重编程, 因为无法保证小分子也能产生 iPSCs [31]。尽管单细胞转录组学发现了从成纤维细胞到 CMs 的命运转变机制[36], 但还存在一定争议。此外, miRNAs 能够同时调节各种信号通路, 这使重编程成为一种有前途的替代方法[37]。已有证据表明, 通过在靶位点基于质粒转染, 直接使用 miRNAs 成功地在体内将成纤维细胞转化为 iCMs [38] [39]。当结合 JAK 抑制剂 I 时, 通过基于 miRNA (miR-1、miR-133、miR208 和 miR499)的心脏重编程得到增强[22] [40]。

## 3. 心脏重编程的实验研究

### 3.1. 体外重编程

Ieda 等人[21]首次成功将小鼠心脏和尾尖成纤维细胞进行重编程, 在体外获得具有功能性的 iCMs。该组人分离出三个重编程所必需的转录因子: GMT [21]。GMT 已被证明有促进心脏发育、心肌细胞增殖等功能[41] [42] [43]。通过逆转录病毒和慢病毒载体进行基因转染, 使成纤维细胞直接重编程为 iCMs。这种方法省略了多能状态这一过程, 直接产生具有类似新生心肌细胞基因表达谱的 iCMs。尽管 iCMs 的生产效率很低, 但该研究开启了将内源性成纤维细胞直接重编程为心肌细胞的可能性。iCMs 的形成跳过 iPSC 产生的中间步骤, 降低了肿瘤形成的风险。此外, 自体 iCMs 可能会消除免疫抑制治疗和消除同种异体移植物所带来的风险。

随后, Song 等人[24]使用逆转录病毒转染 GMT 和 Hand2 转录因子(GHMT)来重编程体外培养的小鼠成纤维细胞。结果表明, Hand2 可与 GMT 存在协同作用, 共同促进 iCMs 的生成。Protze 等人[44]筛选了与心脏发育相关的转录因子, 通过多基因定量聚合酶链式反应(Q-PCR)检测 iCMs 的形成, 为寻找更有效的潜在转录因子组合。结果显示, 小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)通过慢病毒转导 Tbx5、Mef2c 和 Myocd (3F-Myocd)重编程获得的 iCMs 比 GMT 转导的 iCMs 所含心脏基因更多, 表达量更高。证明了 Myocd 在心脏重编程中的作用。此外, 3F-Myocd 中缺少 GMT 中的 Gata4 转录因子。这表明 GMT 中的个别转录因子可能不是重编程所必需的。Mathion 等人[45]也证实了单独使用 Gata4 并不能诱导产生 iCMs, 但是单独使用慢病毒转导 Gata4 可以使心肌梗死后纤维化的面积显著减小, 降低心肌梗死后纤维化程度, 进一

步改善心肌梗死后心室功能。

Addis 等人[46]对转录因子组合进行了比较。发现在 GHMT 中加入转录因子 Nkx2.5 (HNGMT)可以有效地将 MEF 直接重编程为 iCM (HNGMT-iCM)。证明了 Nkx2.5 可以提高心脏重编程的效率。Hirai 等人[47] [48]发现了 MyoD 反式激活结构域(TAD)和单个 GHMT 因子之间的融合基因。使用病毒载体分别将 MyoD-Mef2c 融合基因与 Gata4、Hand2 和 Tbx5 进行转导,可增加产生 iCMs 的效率。并且指出, MyoDTAD 融合基因比 Gata4 和 Tbx5 更能增加 Mef2c 的活性。MyoD-Mef2c 处理过的小鼠尾尖成纤维细胞(TTF)重编程的速度是未处理的 15 倍,并在更短的时间内形成了更多的跳动的 iCMs。TAD 融合基因技术不仅应用于增强 iCMs 的形成,还表明了心脏重编程会受单因素调节的表达水平的影响。

Wang 等人[32]为证明 GMT 组合中单个转录因子的相对表达量,得出 Gata4、Mef2c 和 Tbx5 的存在表达差异,证明了与单独的 Gata4、Mef2c 和 Tbx5 转导相比,导致较 Mef2c 的表达与较低水平的 Gata4 和 Tbx5 的组合显著提高了重编程效率。Zhou 等人[49]筛选了 192 种蛋白激酶,发现 Akt/蛋白激酶 B 在三种不同类型的成纤维细胞(小鼠胚胎、尾尖和成人心脏)中显著提高 GMT 重编程效率。约 50%的重编程 MEFs 在 Akt 加 GHMT 诱导 3 周后表现出自发跳动。在 GHMT 中添加 Akt1 可使 iCMs 获得更成熟的心脏表型。Abad 等人[50]报告称, DAPT 是一种经典的 Notch 抑制剂,通过转录因子 GATA4, HAND2, MEF2C 和 TBX5 增强小鼠成纤维细胞转化为 iCMs。DAPT 增加了 Mef2c 与心脏相关基因 Myh6、Tnnt2 和 Actc2 启动子的结合。证明了 Notch 和 Akt 信号在重编程中的互补作用。DAPT 与 AKT 激酶结合,产生了高达 70%的转化效率。此外, DAPT 促进特定心肌细胞特征的 iCMs 的表达,显著增加钙通量,肌节结构和自发跳动细胞的数量。

Collesi 等人[51]报道 Notch1 表达刺激新生大鼠心肌细胞增殖,减轻纤维化,并防止凋亡。Notch1 具有复制未成熟心肌细胞表型的潜力。Liu 等人[52]报道了鼠 iPSCs 中 Notch 信号以时间和组织特异性方式发挥作用。Notch 促进早期心肌细胞分化,抑制晚期分化。Zhou 等人[53]筛选了 iCM 重编程的表观遗传调节因子。通过 shRNA 抑制 Bmi1 显著提高了 GMT 重编程的效率。在缺乏 shRNA 的情况下, Bmi1 抑制心脏位点,阻止重新编程。此外, Bmi1 缺失可以在 iCM 重编程期间代替 Gata4。故 Bmi1 被认为是细胞重编程过程早期的一个关键障碍。

Guo 等人[54]筛选并确定了四种药物,胰岛素样生长因子-1, Mll1 抑制剂 MM589, 转化生长因子  $\beta$  抑制剂 A83-01 和 Bmi1 抑制剂 PTC-209 (IMAP),它们协同提高了重编程效率。Singh 等人[55]筛选了 Hippo 效应子 Yap, Taz 和 Tead1(Td),然后用 Td 代替 GMT 中的 Tbx5 去诱导成纤维细胞。发现相比 GMT, GMTd 诱导产生的 iCMs 的 cTnT 表达增强, Hippo 通路中间体 Tead1 是心脏重编程的重要调节剂,可提高成熟 iCMs 生成的效率。

## 3.2. 体内重编程

### 3.2.1. 小鼠体内重编程

在体外成功地直接对成纤维细胞进行重编程后, Qian 等人[23]首次报道了在小鼠体内 GMT 诱导 CFs 重编程为 iCMs。在心肌梗死模型中,冠状动脉结扎后,将 GMT 注射入受损的心脏。心梗后 12 周通过磁共振成像(MRI)和超声心动图包括每搏输出量(SV)、心输出量(CO)和射血分数(EF)等来评估心功能。GMT 治疗在所有指标中都显示出心功能得到改善、梗塞面积和疤痕形成减少。在小鼠心肌梗死后加入胸腺素  $\beta 4$  可进一步增强心功能并限制病变面积。已知胸腺素  $\beta 4$  可激活 AKT,对心肌细胞提供保护作用,并促进小鼠心肌梗死后的修复[56]。这些发现加强了 Zhou 等人的体外数据[49],暗示胸腺素  $\beta 4$  和 AKT 在临床中的应用。这项研究明确了成纤维细胞重编程可以用于改善小鼠的心功能心肌梗死模型。

Song 等人[24]利用 GHMT 在体外和体内均可重编程 iCMs。Hand2 在前面讨论过的 Notch 信号通路

的下游起作用, 在重编程过程中是必不可少的, Hand2 缺失干扰了心肌细胞形成, 导致心功能受损[57][58]。在小鼠左前降支结扎心肌梗死模型中, GHMT 减少梗死后纤维化并增强心功能。根据 MRI 和超声心动图的检测, GHMT 治疗的小鼠在 6 周后显著改善了心功能。与对照组小鼠相比, GHMT 治疗的小鼠在 12 周后表现出持续的心功能增加, EF 大约是对照组小鼠的 2 倍, 纤维化面积是对照组小鼠的一半。这表明 GHMT 比单独使用 GMT 更有效地增强心功能。

Qian 等人[23]和 Song 等人[24]发现, 体内 iCMs 的重编程效率和成熟度都优于体外。对于心肌细胞来说, 自然的心脏组织环境更适合心肌细胞的培养与存活, 优于体外培养。对于这一观察结果可能受生长因子、细胞外基质和局部自主跳动的心肌细胞的影响。尽管与体外条件相比有这些优势, 但体内重编程的效率仍然很低。成纤维细胞重编程为 iCMs 与心功能改善之间的相关性被提出, 但因果关系尚不能得到确凿的证明。Song 等人[24]报道, 在体内, GHMT 处理只将  $2.4\% \pm 1.5\%$  到  $6.5\% \pm 1.2\%$  的成纤维细胞转化为 iCMs。但治疗后的心功能指标几乎是未治疗组的 2 倍。虽然 iCMs 产量不高, 但心功能却有明显改善, 这表明在此过程中成纤维细胞的重编程可能不是改善心功能的唯一因素, 成纤维细胞活性的改变和瘢痕形成的减弱可能参与了这一过程。

Inagawa 等人[59]构建了逆转录病毒多顺反子 GMT 载体, 并发现在体外和体内该载体转导产生的小鼠 iCMs 比单顺反子的 iCMs 有更成熟的心肌细胞表型。同样, Mathison 等人[60]发现慢病毒多顺反子 GMT 载体在大鼠体外和体内增强了心脏重编程效率。在大鼠心肌梗死模型中, 与 3 个单独的单顺反子 GaTa4、Mef2c 和 Tbx5 载体( $13\% \pm 7\%$ )和对照载体( $9\% \pm 5\%$ )相比, 多顺反子 GMT 载体显著改善了 EF ( $37\% \pm 10\%$ )。证实多顺反子 GMT 载体可增强心脏重编程。

### 3.2.2. 人类体内重编程

成功地在体外和体内对小鼠成纤维细胞进行重新编程之后, Wada 等人[27]发现与小鼠不同, 仅表达逆转录病毒 GMT 不足以将人成纤维细胞直接转化为 iCMs。然而, 将 Mesp1 和 Myocd 转录因子添加到 GMT (GMTMM)中, 可以从体外培养的人 CFs 和真皮成纤维细胞中产生 iCMs。Mesp1 以一种环境依赖的方式促进细胞向造血细胞、心脏和骨骼肌组织的分化。Mesp1 功能丧失与先天性心脏缺陷有关。Myocd 通过影响胚胎心肌细胞的增殖和凋亡而促进心脏发育。通过将 GMTMM 处理过的人 CFs 和真皮成纤维细胞与小鼠心肌细胞一起培养, iCMs 显示出成熟度增加, 且具有动作电位和自发收缩。这些发现表明, 心脏环境潜在旁分泌的相互作用有利于心肌细胞的分化和成熟。人成纤维细胞的转化是心脏重编程发展的关键一步。

Islas 等人[61]曾报道过, 慢病毒诱导 ETS2 和 MESP1 在 EMT 基础上将人真皮成纤维细胞重编程为心脏祖细胞。无论是 ETS2 还是 MESP2 都不足以使人成纤维细胞进行重编程, 但它们的组合激活了特定的心脏基因表达谱。此外, ETS2 的上调诱导了 Gata4、Mef2c、Tbx20、Mesp1/2 和 Nkx2.5 转录因子的表达。Fu 等人[25]证明, 逆转录病毒 GMT 和雌激素相关受体  $\gamma$  (ESRRG)是心脏代谢和功能中必不可少的转录因子[62], 和 MESP1 (5F)将人成纤维细胞重新编程为 iCMs。添加另外两个因素, Myocd 和 ZFPM2 (7F)显著改善了重新编程。ZFPM2 是一种转录因子, 在心脏形成过程中与 Gata4 相互作用[63]。与 5F 相比, 7F 促进了肌节、钙电流和动作电位的形成。但重编程效率仍然很低, 大多数细胞只经历部分重编程过程。

Nam 等人[26]发现, 过表达 miRNAs、miR-1 和 miR-133, 与 GMT 一起, 改善了人成纤维细胞到心肌细胞的重编程。此外, miR-1 和 miR-133 消除了对 Mef2c 表达的限制。但人成纤维细胞重编程仍然比小鼠成纤维细胞花费时间更长, 自发跳动更少。Muraoka 等人[64]也发现 miR-133 提高了 GMT 和 GMTMM 在成年鼠和人成纤维细胞中的重编程效率。除了 GMT 或 GMTMM 外, miR-133 还降低成纤维细胞转录因子的表达, 特别是 Snai1 (也被称为 Snail), 它是上皮向间充质转化(EMT)的调节因子。MIR-133 介导的

Snai1 抑制使成纤维细胞基因表达减少, 心脏基因转录增加。Snai1 的激活也被证明抑制 iPSC 的形成, 这表明在 iPSC 和 iCMs 的形成中存在守恒机制[65]。单独的 Snai1 抑制没有达到像 miR-133 那样的重编程效率, 提示 miR-133 在重编程中存在其他功能。

Christoforou 等人[66]证明了迄今为止所报道过的最有效的转录因子介导的人成纤维细胞诱导产生的 iCMs。GMT、MYOCD 和 Nkx2.5 (GTMMN)转录因子的组合以及 miR-1 和 miR-133 单独处理可促进 iCMs 的形成。

## 4. 改善重编程效率

直接心脏重编程在 2010 年首次报道时是一个开创性的发现, 但经过长时间的研究后, 发现直接重编程很少产生跳动的 iCMs。此外, 间接重编程已实现了大约 70% 甚至 90% 的高转换效率[67]; 而由于存在 Bmi1 等表观遗传屏障[53], 直接重编程的转化效率较低。这种低转化效率仍然是直接重编程的主要障碍, 近年来大部分研究也都集中在通过研究重编程的表观遗传机制来提高重编程效率。优化基因传递方法、抑制表观遗传屏障和促纤维化信号传导、操纵成纤维细胞周期和优化 iCMs 细胞培养等方法已被研究用于提高重编程效率。这些方法可大致分为: 改善直接心脏重编程因子, 改善细胞培养条件和调节表观遗传因子。

### 4.1. 改善直接心脏重编程因子

2010 年 Ieda 等人[21]首次报道通过病毒过表达三种重要的心脏发育转录因子 Gata4、Mef2c 和 Tbx5 在小鼠心脏和尾尖成纤维细胞中将成纤维细胞直接重编程为 iCMs。随后, 研究人员意识了解结合模式和机制并修改转录因子以增加其靶向结合可能会发现更简单和更有效的重新编程因子组合。例如, GMTH 诱导产生心脏肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、 $\alpha$ -肌动蛋白从而促进心脏基因表达[24]; GMTH 与 Myod 反式激活域能更有效地激活心肌标志物如: 肌钙蛋白 T、肌球蛋白轻链 2v、肌球蛋白重链等, 增加了搏动的 iCMs 的数量[48]; GMTH、Nkx2.5 诱导产生了更多的功能性 iCMs, 且钙素与受磷蛋白基因表达显著上调[46]; ETS2、Mesp1 通过诱导 Nkx2.5、Gata4、Tbx20、BMP2 的表达将人皮肤成纤维细胞转化为心脏祖细胞[61]; Tbx6 表达延长抑制中胚层向心脏的分化, 进一步诱导中胚层相关基因的表达[68]; GMT、miR-133 组合与 GMT、Mesp1、Myocd 组合均抑制 Snail 通路下调成纤维细胞基因表达, 上调心脏重编程基因的表达[64]; GMT、Myocd、Srf 组合使一种对中胚层形成至关重要的转录因子, GMT、Myocd、Srf、Mesp1 组合使另一种诱导形成中胚层的转录因子, 以及 Smarcd3 是一种增强重编程和心肌肌节蛋白的表达染色质结构改变蛋白[69]; GMT 和 ESSRG (转录激活剂)、Mesp1、Myocd 和 ZFPM2 (Gata 蛋白的调节剂)可以促进心脏重编程, 包括肌节形成、钙瞬变和产生动作电位[25]; GMT、Myocd、Sall4 组合(GMTMS)通过诱导更多的表达心脏结构蛋白肌钙蛋白 T 和肌钙蛋白 I 且跳动的 iCMs, 提示 Myocd 主要有助于诱导心脏蛋白的表达, 而 Sall4 则负责功能特性的诱导[70]。谱系特异性转录因子是直接重编程的分子基础, 不同转录因子可以协同作用激活基因表达。

### 4.2. 改善细胞培养条件

此前与体外 2D 培养相比, 小鼠模型体内实验的重编程效率更高。故模拟心脏组织生物、物理和生化特性的三维(3D)培养微环境具有显著改善心脏直接重编程的潜力。在模拟心脏组织的微环境中体外培养 miRNA 转基因的成纤维细胞可能会提高重编程的效率和 iCMs 的成熟。

2016 年, Sia 等人[71]研究了表达 Gata4、MEF2C 和 Tbx5(GMT)逆转录病毒的 TTF 的直接重编程。转染后, 将细胞接种于不同硬度(1~62 kPa)的基质包被聚丙烯酰胺水凝胶上。培养 10 天后的重编程产率不随底物硬度变化。相反, 微槽培养底物可使成纤维细胞转化为 iCMs 的产率提高 30%。细胞显示出肌

节结构和自发收缩活动, 归因于机械敏感性因子 MKL1 的高表达, 以及染色质重塑的组蛋白 H3 乙酰化。此外将转 GMTH 基因的 MEFs 培养在不同硬度(1~126 kPa)的 Matrigel-偶联聚丙烯酰胺水凝胶上。与刚性聚苯乙烯平板相比, 在硬度与健康心肌相似的基质(8 kPa)上获得了更高的直接重编程效率。得出软底物通过 YAP/TAZ (具有 PDZ 结合结构域的 YAP/TAZ)信号抑制了成纤维细胞基因程序的沉默, 进一步增强了仙台病毒载体的心脏重编程[72], 说明了机械转导可以为改善心脏重编程提供新的靶标。尽管使用相似的培养底物, 但 GMTH 转染方法和胚胎成纤维细胞的使用可能仍然是提升直接重编程效率的主要原因。而且这两项研究都受到水凝胶或微槽基质表面 2D 细胞培养的研究的限制。Li 等人[73]研究植入 3D 仿生基质的成纤维细胞直接重编程。发现与 2D 培养相比, 在 3D 纤维蛋白/Matrigel 水凝胶中培养的 miR 复合转基因小鼠成纤维细胞重编程的 iCMs 的  $\alpha$ -MHC、心肌钙蛋白 I、 $\alpha$ -肌动蛋白和 Kcnj2 的表达更高, 显示出更高的直接重编程效率。这一结果归因于当细胞被包埋在 3D 水凝胶中时, 特定的基质金属蛋白酶的上调。此外, 与 2D 细胞培养相比, 3D 细胞培养本身足以增强未转染小鼠成纤维细胞中功能性心肌细胞转录因子的表达, 这表明 3D 培养微环境本身可以促进心肌细胞基因的表达。

除了培养底物的生物物理特性外, 生化线索如心脏细胞外基质(cECM)的蛋白质, 可以帮助重建与体内微环境相似的体外培养条件[74]。在对转导 Mef2c、Gata4、Tbx5 的 MEFs 的基因集浓缩分析(GSEA)表明, cECM 蛋白(如胶原蛋白和层粘连蛋白)在转导后 48 和 72 小时已经表达[75]。这些发现证实了在成纤维细胞重编程的早期阶段, 细胞自然地创造了一个合适的微环境, 从而促进了转分化的能力。事实上, Smith 等人[76]设计了以高层粘连蛋白和 RGD 多肽功能化的聚乙二醇水凝胶为基础的培养基质, 与低浓度 RGD 黏附基序的水凝胶或组织培养聚苯乙烯表面相比, 实现了更有效的小鼠成纤维细胞向 iCMs 的直接重编程。

### 4.3. 调节表观遗传因子

表观遗传格局在决定重编程效率方面发挥着重要作用, 因为转录因子与其 DNA 靶标的可及性是至关重要的。在重新编程期间, 必须从成纤维细胞和心脏特异基因中添加和删除表观遗传标记, 如组蛋白甲基化、乙酰化和泛素化。这些修饰将抑制成纤维细胞基因的表达, 同时通过重塑染色质结构来激活心脏基因, 以允许或限制转录因子访问其靶基因。在成纤维细胞直接重编程为心肌细胞的过程中靶基因的表观遗传学发生了显著变化。2010 年, 报道了将 GMT 引入成纤维细胞会导致 Nppa 和 Myh6 去甲基化, 这两个心源性基因在成纤维细胞中被甲基化。组蛋白-H3 赖氨酸-4-三甲基化(H3K4me3: 活性修饰)和组蛋白-H3 赖氨酸-27-三甲基化(H3K27me3: 抑制性修饰)是心源性和成纤维细胞基因中被广泛认可的两种组蛋白修饰[77]。将 GMT 引入成纤维细胞增加了心源性基因区域的 H3K4me3 并减少了 H3K27me3, 但减少了成纤维细胞基因区域的 H3K4me3 并增加了 H3K27me3。将 GMT 与参与组蛋白修饰的基因的 shRNA 引入成纤维细胞, 并评估调节直接心脏重编程的表观遗传因素。Bmi1 是多梳蛋白复合物(PRC1)的一种成分, 可导致组蛋白 H2A 在赖氨酸 119 上的单泛素化(H2AK119ub: 抑制性修饰), 被发现可在表观遗传上抑制心源性基因的表达。降低 Bmi1 的表达可改变心源性基因的组蛋白修饰, 导致抑制状态降低。这种修饰提高了重编程效率, 表明 Bmi1 是重编程的表观遗传屏障[53]。总之, 调节表观遗传因子的重要性和在重编程期间发生的变化最近已经被 Liu 等人用单细胞转录方法佐证[78]。

这些结果突出了重编程过程的复杂性和各种因素影响的重要性, 转录因子、非编码 RNA、细胞因子、抑制剂和表观遗传修饰物的顺序添加, 值得进一步研究, 以进一步提高重编程效率。

## 5. 心脏重编程应用的发展方向

尽管近年来在心脏直接重编程方面有很大的进展, 但在将这项技术完全转化为再生医学之前, 还需

要在基础研究方面做更多的工作。首先, 人类心脏直接重编程和 iCMs 功能成熟的分子机制仍有待阐明。与小鼠成纤维细胞相比, 人成纤维细胞需要更复杂的因素进行重编程, 但重编程效率较低, iCMs 成熟度较低也需要被解决。因此, 在重编程过程中存在着人类特有的障碍, 提高人类重新编程细胞的成熟度, 对于推动这项技术未来的临床应用是非常必要的。其次, 目前该领域的大多数研究都集中在转录调控上, 然而转录水平与蛋白质水平的相关性很低[79]。在心脏重编程过程中, 蛋白质翻译的调节, 以及转录和翻译后的修饰以及蛋白质稳定性的动力学研究很少。蛋白质组学的最新进展已经开始描述 iCMs 重新编程早期阶段的蛋白质变化[75]。将这些数据与 RNA 测序和核糖体测序分析相结合, 将进一步促进我们对心脏重编程过程中翻译调节和潜在机制的理解。第三, CRISPR 激活(CRISPRa)为细胞重新编程提供了一种强大的替代方法。CRISPRa 是一种改进的 CRISPR 工具, 它使用核酸酶死亡的 Cas9 与转录激活剂融合, 并引导 RNA 激活内源基因表达。由于 CRISPRa [80] [81]具有很高的复接能力和直接靶向内源性位点, 研究人员已经成功地实现了其他细胞命运的转化。因此, 除了应用外源性重编程进行 iCMs 转化外, 探索使用 CRISPRa 对成纤维细胞中的 iCMs 进行重编程的可能性将是很有意义的。最后, 研究成纤维细胞亚群在动态平衡、疾病和衰老过程中的不同可塑性将是很有意义的, 这样就可以在迄今所做的基础上进行直接重编程。不同类型的成纤维细胞, 包括新生心脏成纤维细胞、胚胎成纤维细胞、尾尖成纤维细胞和成年成纤维细胞, 产生不同的心脏重编程效率, 提示起始细胞类型对直接重编程的重要性。随着单细胞组学的发展, 越来越多的证据表明 CFs 是一个异质性群体[82] [83]。通过 scRNA-seq 分析揭示了小鼠和人成纤维细胞的心脏重编程结果。与小鼠心脏重编程相比, 在人类心脏重编程过程中, 确定了两条不同的路径: 产生 iCMs 的重编程路径和将体细胞转变为纤维细胞状态的路径。

假设心脏成纤维细胞亚群可能更容易重编程, 利用单细胞多组学进一步了解这些亚群的易感性将对该领域有很大的帮助, 这将为通过靶向特定亚群修复心脏开辟了可能性。单细胞组学技术的快速发展使我们能够以前所未有的精度和分辨率研究直接重编程的机制。此外, 在研究 CFs 的可塑性时, 考虑不同年龄、疾病进展和遗传背景的患者对体内重编程的顺从性, 并建立标准来评估体内重编程的功效和安全性, 以便在未来的应用中进行靶向定制。除了基础研究外, 还应在动物模型中优化和监测给药方法、安全性和长期效果, 特别是使用猪和非人灵长类等大型动物。

尽管许多挑战摆在面前, 但直接心脏重编程的机会和潜在益处是巨大的。随着技术的快速进步和对心脏直接重编程基础生物学的了解, 在全面的监管指南规范、结合单细胞组学、3D 成像、组织重建和生物工程方面的技术进步以及协调学术界和工业界的力量, 我们相信这些进展与跨学科合作使我们能够克服上述这些挑战, 并为治疗机会开辟新途径。这项技术在临床中的应用, 将使心脏病患者比我们预期的更快受益。期待心脏重编程研究的进一步进展, 相信心脏再生治疗在未来几十年成为可能。

## 参考文献

- [1] Khan, M.A., et al. (2020) Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*, **12**, e9349. <https://doi.org/10.7759/cureus.9349>
- [2] Madonna, R., et al. (2016) Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: Cell-Based Therapies for Myocardial Repair and Regeneration in Ischemic Heart Disease and Heart Failure. *European Heart Journal*, **37**, 1789-1798. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw113>
- [3] Bektik, E. and Fu, J.D. (2019) Ameliorating the Fibrotic Remodeling of the Heart through Direct Cardiac Reprogramming. *Cells*, **8**, Article 679. <https://doi.org/10.3390/cells8070679>
- [4] van Berlo, J.H. and Molkenin, J.D. (2014) An Emerging Consensus on Cardiac Regeneration. *Nature Medicine*, **20**, 1386-1393. <https://doi.org/10.1038/nm.3764>
- [5] Fu, J.D. and Srivastava, D. (2015) Direct Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocytes for Cardiac Regenerative Medicine. *Circulation Journal*, **79**, 245-254. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-1372>



- [6] Rao, M.S. and Malik, N. (2012) Assessing iPSC Reprogramming Methods for Their Suitability in Translational Medicine. *Journal of Cellular Biochemistry*, **113**, 3061-3068. <https://doi.org/10.1002/jcb.24183>
- [7] Fu, Y., et al. (2015) Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Cardiomyocytes with Chemical Cocktails. *Cell Research*, **25**, 1013-1024. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.99>
- [8] Lee, C.S., et al. (2017) Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes & Diseases*, **4**, 43-63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
- [9] Patel, V., et al. (2016) Direct Cardiac Cellular Reprogramming for Cardiac Regeneration. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, **18**, Article No. 58. <https://doi.org/10.1007/s11936-016-0480-8>
- [10] Ebert, A.D., Liang, P. and Wu, J.C. (2012) Induced Pluripotent Stem Cells as a Disease Modeling and Drug Screening Platform. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **60**, 408-416. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318247f642>
- [11] Chen, T. and Vunjak-Novakovic, G. (2018) *In vitro* Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, **4**, 142-153. <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0056-0>
- [12] Wang, H.F., Yang, Y.C., Liu, J.D. and Qian, L. (2021) Direct Cell Reprogramming: Approaches, Mechanisms and Progress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **22**, 410-424. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00335-z>
- [13] Tai, Y.L., Chen, K.C., Hsieh, J.T. and Shen, T.L. (2018) Exosomes in Cancer Development and Clinical Applications. *Cancer Science*, **109**, 2364-2374. <https://doi.org/10.1111/cas.13697>
- [14] Querdel, E., et al. (2021) Human Engineered Heart Tissue Patches Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner. *Circulation*, **143**, 1991-2006. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047904>
- [15] Martins, A.M., Vunjak-Novakovic, G. and Reis, R.L. (2014) The Current Status of iPS Cells in Cardiac Research and Their Potential for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, **10**, 177-190. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9487-7>
- [16] Teshigawara, R., Cho, J., Kamed, M. and Tada, T. (2017) Mechanism of Human Somatic Reprogramming to iPSC Cell. *Laboratory Investigation*, **97**, 1152-1157. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.56>
- [17] Tang, B.L. (2020) Maturing iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Cells*, **9**, Article 213. <https://doi.org/10.3390/cells9010213>
- [18] Pianezzi, E., et al. (2020) Role of Somatic Cell Sources in the Maturation Degree of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular Cell Research*, **1867**, Article ID: 118538. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118538>
- [19] Altomare, C., et al. (2016) Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes from Cardiac Progenitor Cells: Effects of Selective Ion Channel Blockade. *Europace*, **18**, iv67.
- [20] Tohyama, S., et al. (2013) Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*, **12**, 127-137. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.013>
- [21] Ieda, M., et al. (2010) Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell*, **142**, 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.002>
- [22] Wang, D., et al. (2014) MicroRNA-124 Controls the Proliferative, Migratory, and Inflammatory Phenotype of Pulmonary Vascular Fibroblasts. *Circulation Research*, **114**, 67-78. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301633>
- [23] Qian, L., et al. (2012) *In vivo* Reprogramming of Murine Cardiac Fibroblasts into Induced Cardiomyocytes. *Nature*, **485**, 593-598. <https://doi.org/10.1038/nature11044>
- [24] Song, K., et al. (2012) Heart Repair by Reprogramming Non-Myocytes with Cardiac Transcription Factors. *Nature*, **485**, 599-604. <https://doi.org/10.1038/nature11139>
- [25] Fu, J.D., et al. (2013) Direct Reprogramming of Human Fibroblasts toward a Cardiomyocyte-Like State. *Stem Cell Reports*, **1**, 235-247. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.07.005>
- [26] Nam, Y.J., et al. (2013) Reprogramming of Human Fibroblasts toward a Cardiac Fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 5588-5593. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301019110>
- [27] Wada, R., et al. (2013) Induction of Human Cardiomyocyte-Like Cells from Fibroblasts by Defined Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 12667-12672. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304053110>
- [28] Bektik, E., Dennis, A., Prasanna, P., Madabhushi, A. and Fu, J.D. (2017) Single Cell qPCR Reveals That Additional HAND2 and MicroRNA-1 Facilitate the Early Reprogramming Progress of Seven-Factor-Induced Human Myocytes. *PLOS ONE*, **12**, e0183000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183000>
- [29] Jorstad, N.L., et al. (2017) Stimulation of Functional Neuronal Regeneration from Müller Glia in Adult Mice. *Nature*, **548**, 103-107. <https://doi.org/10.1038/nature23283>
- [30] Li, H. and Chen, G. (2016) *In Vivo* Reprogramming for CNS Repair: Regenerating Neurons from Endogenous Glial

- Cells. *Neuron*, **91**, 728-738. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.004>
- [31] Chen, Y.Q., Yang, Z.Y., Zhao, Z.A. and Shen, Z.Y. (2017) Direct Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocytes. *Stem Cell Research & Therapy*, **8**, Article No. 118. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0569-3>
- [32] Wang, L., *et al.* (2015) Stoichiometry of Gata4, Mef2c, and Tbx5 Influences the Efficiency and Quality of Induced Cardiac Myocyte Reprogramming. *Circulation Research*, **116**, 237-244. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305547>
- [33] Li, X.H., *et al.* (2015) Generation of Functional Human Cardiac Progenitor Cells by High-Efficiency Protein Transduction. *Stem Cells Translational Medicine*, **4**, 1415-1424. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0136>
- [34] Pasumarthi, K.B. and Field, L.J. (2002) Cardiomyocyte Cell Cycle Regulation. *Circulation Research*, **90**, 1044-1054. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000020201.44772.67>
- [35] Barreto, S., Hamel, L., Schiatti, T., Yang, Y. and George, V. (2019) Cardiac Progenitor Cells from Stem Cells: Learning from Genetics and Biomaterials. *Cells*, **8**, Article 1536. <https://doi.org/10.3390/cells8121536>
- [36] Li, P., Kaslan, M., Lee, S.H., Yao, J. and Gao, Z.Q. (2017) Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, **7**, 789-804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- [37] Sandmaier, S.E. and Telugu, B.P. (2015) MicroRNA-Mediated Reprogramming of Somatic Cells into Induced Pluripotent Stem Cells. In: Verma, P. and Sumer, H., Eds., *Cell Reprogramming*, Humana Press, New York, 29-36. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2848-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2848-4_3)
- [38] Elmén, J., *et al.* (2008) LNA-Mediated MicroRNA Silencing in Non-Human Primates. *Nature*, **452**, 896-899. <https://doi.org/10.1038/nature06783>
- [39] Sridharan, R. and Plath, K. (2011) Small RNAs Loom Large during Reprogramming. *Cell Stem Cell*, **8**, 599-601. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.05.009>
- [40] Jayawardena, T.M., *et al.* (2012) MicroRNA-Mediated *in Vitro* and *in Vivo* Direct Reprogramming of Cardiac Fibroblasts to Cardiomyocytes. *Circulation Research*, **110**, 1465-1473. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.269035>
- [41] Maitra, M., *et al.* (2009) Interaction of *Gata4* and *Gata6* with *Tbx5* Is Critical for Normal Cardiac Development. *Developmental Biology*, **326**, 368-377. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.11.004>
- [42] Oka, T., *et al.* (2006) Cardiac-Specific Deletion of *Gata4* Reveals Its Requirement for Hypertrophy, Compensation, and Myocyte Viability. *Circulation Research*, **98**, 837-845. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4>
- [43] Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C. and Olson, E.N. (1997) Control of Mouse Cardiac Morphogenesis and Myogenesis by Transcription Factor MEF2C. *Science*, **276**, 1404-1407. <https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1404>
- [44] Protze, S., *et al.* (2012) A New Approach to Transcription Factor Screening for Reprogramming of Fibroblasts to Cardiomyocyte-Like Cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **53**, 323-332. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.04.010>
- [45] Mathison, M., *et al.* (2017) Cardiac Reprogramming Factor *Gata4* Reduces Postinfarct Cardiac Fibrosis through Direct Repression of the Profibrotic Mediator Snail. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **154**, 1601-1610.E3. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.06.035>
- [46] Addis, R.C., *et al.* (2013) Optimization of Direct Fibroblast Reprogramming to Cardiomyocytes Using Calcium Activity as a Functional Measure of Success. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **60**, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.04.004>
- [47] Hirai, H., Katoku-Kikyo, N., Karian, P., Firpo, M. and Kikyo, N. (2012) Efficient iPS Cell Production with the MyoD Transactivation Domain in Serum-Free Culture. *PLOS ONE*, **7**, e34149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034149>
- [48] Hirai, H., Katoku-Kikyo, N., Keirstead, S.A. and Kikyo, N. (2013) Accelerated Direct Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocyte-Like Cells with the MyoD Transactivation Domain. *Cardiovascular Research*, **100**, 105-113. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt167>
- [49] Zhou, H., Dickson, M.E., Kim, M.S., Bassel-Duby, R. and Olson, E.N. (2015) Akt1/Protein Kinase B Enhances Transcriptional Reprogramming of Fibroblasts to Functional Cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 11864-11869. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516237112>
- [50] Abad, M., *et al.* (2017) Notch Inhibition Enhances Cardiac Reprogramming by Increasing MEF2C Transcriptional Activity. *Stem Cell Reports*, **8**, 548-560. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.025>
- [51] Collesi, C., Zentilin, L., Sinagra, G. and Giacca, M. (2008) Notch1 Signaling Stimulates Proliferation of Immature Cardiomyocytes. *Journal of Cell Biology*, **183**, 117-128. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806091>
- [52] Liu, Y., *et al.* (2014) Timely Inhibition of Notch Signaling by DAPT Promotes Cardiac Differentiation of Murine Pluripotent Stem Cells. *PLOS ONE*, **9**, e109588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109588>
- [53] Zhou, Y., *et al.* (2016) Bmi1 Is a Key Epigenetic Barrier to Direct Cardiac Reprogramming. *Cell Stem Cell*, **18**, 382-

395. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.003>
- [54] Guo, Y., *et al.* (2019) Chemical Suppression of Specific C-C Chemokine Signaling Pathways Enhances Cardiac Reprogramming. *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 9134-9146. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006000>
- [55] Singh, V.P., *et al.* (2021) Hippo Pathway Effector Tead1 Induces Cardiac Fibroblast to Cardiomyocyte Reprogramming. *Journal of the American Heart Association*, **10**, e022659. <https://doi.org/10.1161/JAHA.121.022659>
- [56] Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M.D., DiMaio, J.M. and Srivastava, D. (2004) Thymosin  $\beta$ 4 Activates Integrin-Linked Kinase and Promotes Cardiac Cell Migration, Survival and Cardiac Repair. *Nature*, **432**, 466-472. <https://doi.org/10.1038/nature03000>
- [57] Vincentz, J.W., Toolan, K.P., Zhang, W.J. and Firulli, A.B. (2017) Hand Factor Ablation Causes Defective Left Ventricular Chamber Development and Compromised Adult Cardiac Function. *PLOS GENETICS*, **13**, e1006922. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006922>
- [58] VanDusen, N.J., *et al.* (2014) Hand2 Is an Essential Regulator for Two Notch-Dependent Functions within the Embryonic Endocardium. *Cell Reports*, **9**, 2071-2083. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.021>
- [59] Inagawa, K., *et al.* (2012) Induction of Cardiomyocyte-Like Cells in Infarct Hearts by Gene Transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circulation Research*, **111**, 1147-1156. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.271148>
- [60] Mathison, M., *et al.* (2014) "Triplet" Polycistronic Vectors Encoding Gata4, Mef2c, and Tbx5 Enhances Postinfarct Ventricular Functional Improvement Compared with Singlet Vectors. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **148**, 1656-1664.E2. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.03.033>
- [61] Islas, J.F., *et al.* (2012) Transcription Factors ETS2 and MESP1 Transdifferentiate Human Dermal Fibroblasts into Cardiac Progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 13016-13021. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120299109>
- [62] Wang, T., *et al.* (2015) Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) and ERR $\gamma$  Are Essential Coordinators of Cardiac Metabolism and Function. *Molecular and Cellular Biology*, **35**, 1281-1298. <https://doi.org/10.1128/MCB.01156-14>
- [63] Zhang, W., *et al.* (2014) Novel Missense Variants of ZFPM2/FOG2 Identified in Conotruncal Heart Defect Patients Do Not Impair Interaction with GATA4. *PLOS ONE*, **9**, e102379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102379>
- [64] Muraoka, N., *et al.* (2014) MiR-133 Promotes Cardiac Reprogramming by Directly Repressing Snai1 and Silencing Fibroblast Signatures. *The EMBO Journal*, **33**, 1565-1581. <https://doi.org/10.15252/emj.201387605>
- [65] Christoforou, N., *et al.* (2017) Core Transcription Factors, MicroRNAs, and Small Molecules Drive Transdifferentiation of Human Fibroblasts towards the Cardiac Cell Lineage. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 40285. <https://doi.org/10.1038/srep40285>
- [66] Gassmann, M., *et al.* (1995) Aberrant Neural and Cardiac Development in Mice Lacking the ErbB4 Neuregulin Receptor. *Nature*, **378**, 390-394. <https://doi.org/10.1038/378390a0>
- [67] Pomeroy, J.E., Helfer, A. and Bursac, N. (2020) Biomaterializing the Promise of Cardiac Tissue Engineering. *Biotechnology Advances*, **42**, Article ID: 107353. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.009>
- [68] Sadahiro, T., *et al.* (2018) Tbx6 Induces Nascent Mesoderm from Pluripotent Stem Cells and Temporally Controls Cardiac versus Somite Lineage Diversification. *Cell Stem Cell*, **23**, 382-395.E5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.07.001>
- [69] Christoforou, N., *et al.* (2013) Transcription Factors MYOCD, SRF, Mesp1 and SMARCD3 Enhance the Cardio-Inducing Effect of GATA4, TBX5, and MEF2C during Direct Cellular Reprogramming. *PLOS ONE*, **8**, e63577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063577>
- [70] Zhao, H., *et al.* (2021) Sall4 and Myocd Empower Direct Cardiac Reprogramming from Adult Cardiac Fibroblasts after Injury. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, Article 608367. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.608367>
- [71] Sia, J., Yu, P.Z., Srivastava, D. and Li, S. (2016) Effect of Biophysical Cues on Reprogramming to Cardiomyocytes. *Biomaterials*, **103**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.034>
- [72] Kurotsu, S., *et al.* (2020) Soft Matrix Promotes Cardiac Reprogramming via Inhibition of YAP/TAZ and Suppression of Fibroblast Signatures. *Stem Cell Reports*, **15**, 612-628. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.07.022>
- [73] Li, Y., *et al.* (2016) Tissue-Engineered 3-Dimensional (3D) Microenvironment Enhances the Direct Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocytes by MicroRNAs. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 38815. <https://doi.org/10.1038/srep38815>
- [74] Bunney, P.E., Zink, A.N., Holm, A.A., Billington, C.J. and Kotz, C.M. (2017) Orexin Activation Counteracts Decreases in Nonexercise Activity Thermogenesis (NEAT) Caused by High-Fat Diet. *Physiology & Behavior*, **176**, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- [75] Sauls, K., *et al.* (2018) Initiating Events in Direct Cardiomyocyte Reprogramming. *Cell Reports*, **22**, 1913-1922. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.047>
- [76] Smith, A.W., *et al.* (2013) Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts to Cardiomyocyte-Like Cells Using Yamanaka

- Factors on Engineered Poly (Ethylene Glycol) (PEG) Hydrogels. *Biomaterials*, **34**, 6559-6571. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.050>
- [77] Liu, Z., *et al.* (2016) Re-Patterning of H3K27me3, H3K4me3 and DNA Methylation during Fibroblast Conversion into Induced Cardiomyocytes. *Stem Cell Research*, **16**, 507-518. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.02.037>
- [78] Liu, Z., *et al.* (2017) Single-Cell Transcriptomics Reconstructs Fate Conversion from Fibroblast to Cardiomyocyte. *Nature*, **551**, 100-104. <https://doi.org/10.1038/nature24454>
- [79] Plotkin, J.B. (2010) Transcriptional Regulation Is Only Half the Story. *Molecular Systems Biology*, **6**, 406. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.63>
- [80] Liu, Y., *et al.* (2018) CRISPR Activation Screens Systematically Identify Factors That Drive Neuronal Fate and Reprogramming. *Cell Stem Cell*, **23**, 758-771.E8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.003>
- [81] Weltner, J., *et al.* (2018) Human Pluripotent Reprogramming with CRISPR Activators. *Nature Communications*, **9**, Article No. 2643. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05067-x>
- [82] Farbehi, N., *et al.* (2019) Single-Cell Expression Profiling Reveals Dynamic Flux of Cardiac Stromal, Vascular and Immune Cells in Health and Injury. *eLife*, **8**, e43882. <https://doi.org/10.7554/eLife.43882>
- [83] Skelly, D.A., *et al.* (2018) Single-Cell Transcriptional Profiling Reveals Cellular Diversity and Intercommunication in the Mouse Heart. *Cell Reports*, **22**, 600-610. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.072>