

间充质干细胞定向心肌细胞分化的研究进展

刘泰东 黄 艳*

(北京航空航天大学生物与医学工程学院, 生物力学与力生物学教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要 心肌梗死是由心脏缺血引发心肌细胞不可逆的坏死造成的疾病。目前, 用干细胞来治疗心肌梗死越来越具有吸引力。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多能干细胞, 普遍存在于动物体的一些间质组织(如骨髓、脂肪)中。由于其良好的体外扩增能力、多向分化的潜能且不受伦理学制约等优点, 学者们对如何让MSCs高效、定向地分化为心肌细胞, 从而补充心脏病人缺血心肌的坏死细胞做了大量的研究。目前已经发现, 使MSCs向心肌方向分化的体外诱导方法主要包括化学药物诱导、生物因子诱导、物理诱导、共培养诱导以及分子改造诱导(转移miRNA和转录因子)。该文旨在通过对以上五类方法进行综述, 以此了解体外诱导MSCs心肌向分化的研究现状。

关键词 心肌细胞; 间充质干细胞; 诱导分化; 体外

Progress in the Study of Cardiomyogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells

Liu Taidong, Huang Yan*

(School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University,

Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, Beijing 100083, China)

Abstract Myocardial infarction is a kind of disease caused by irreversible necrosis of cardiomyocytes resulted from cardiac ischemia. Concurrently, using stem cells to treat myocardial infarction is more and more attractive. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells and commonly found in some interstitial tissues of human and animals, such as bone marrow and fat. Owing to their good ability to expand *in vitro*, the potential for multilineage differentiation and without ethical constraints, scholars have done numerous studies on how to differentiate MSCs into cardiomyocytes efficiently and selectively, so as to replace ischemic myocardium necrosis cells in patients' body. To yet, it has been found that *in vitro* induction of MSCs to differentiate into cardiomyocytes mainly use chemical agent induction, biological factor induction, physical induction, co-culture induction and molecular manipulation induction (transfer miRNA and transcription factor). This article mainly summarizes the above five methods in order to understand the current research status in inducing cardiomyogenic differentiation of MSCs *in vitro*.

Keywords cardiomyocytes; mesenchymal stem cells; induced differentiation; *in vitro*

如何有效应对多发的心脏疾病是当前我国在医疗卫生领域面临的一项巨大考验。我国心脏疾病

患者数量庞大, 这对医院的医疗资源有了更高要求, 也增加了国家的财政负担。急性心肌梗死是在血液

收稿日期: 2017-12-23 接受日期: 2018-03-29

国家自然科学基金(批准号: 11302020)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-82339861, E-mail: huangyan@buaa.edu.cn

Received: December 23, 2017 Accepted: March 29, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.11302020)

*Corresponding author. Tel: +86-10-82339861, E-mail: huangyan@buaa.edu.cn

网络出版时间: 2018-06-27 11:23:59 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180627.1123.002.html>

循环发生障碍之后,由冠状动脉补给心脏营养的血流量骤然并持续减少而使心肌细胞死亡所形成的一种疾病。因为心肌细胞的自我更新能力非常有限,所以急性心肌梗死几乎是不可逆的病理现象。心肌细胞死亡及心脏纤维化会导致心脏泵血功能逐渐下降,患者若不及时接受治疗,可能造成心律不齐、休克、心力衰竭甚至死亡。传统治疗急性心肌梗死的方法有再灌注治疗、镇静止痛等,但是这些方法并不能从根本上解决问题。目前极具前景的一种治疗方法是干细胞疗法,即通过干细胞定向分化为心肌细胞从而再生心肌。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类易获取、能在体外大量扩增、具有多向分化潜能且不涉及伦理学争议的成体干细胞。到目前为止,人们发现的MSCs包括骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)、脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, AMSCs)、脐带血间充质干细胞(umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, UCMSCs)、胎盘间充质干细胞(placenta-derived mesenchymal stem cells, PMSCs)等。MSCs除了能够分化为成骨细胞、脂肪细胞以及成软骨细胞外,还有实验证明其能在体内、体外分化为心肌样细胞。所以基于MSCs的上述优点,临床使用MSCs治疗心肌梗死在理论上是可行的。虽然部分研究表明,直接将MSCs植入受损心脏能取得一定的治疗效果,但是在体外经过心肌向分化诱导的预处理后,这种修复效果更加明显^[1-2]。在此,本文主要对体外诱导MSCs分化为心肌样细胞的五类诱导方法(化学药物诱导、生物因子诱导、物理诱导、共培养诱导以及分子改造诱导)进行综述。

1 化学药物诱导

1.1 5-氮胞苷诱导

5-氮胞苷是一种经典的非特异性DNA去甲基化试剂,研究表明,它能诱导MSCs的心肌向分化^[3]。1999年,Makino等^[3]首次发现,5-氮胞苷能够诱导小鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells)向心肌细胞方向分化。他们还发现,用3 μmol/L 5-氮胞苷诱导MSCs后,约有30%的细胞由成纤维细胞样变为心肌细胞样,处理1周后细胞相互靠拢,2周后形成了肌管样结构,开始自发搏动,3周后细胞开始有节律性的搏动^[3]。电镜结果显示了心肌细胞状的

超微结构,即典型的肌节以及位于胞质中心的细胞核和心房颗粒。研究还发现,细胞表现电生理现象、表达心肌标记物^[3]。另外,细胞表达的具有功能的肾上腺素能受体(adrenergic receptor)和毒蕈碱受体(muscarinic receptor)说明细胞具备调控心率和心收缩的结构基础^[4]。后续的研究也证明了5-氮胞苷的这种诱导作用^[5-6]。

然而,也有用5-氮胞苷诱导不利的报道。有研究者采用3 μmol/L的5-氮胞苷处理小鼠BMSCs 24 h并持续培养6周后并未检测到心肌标志物,但是可以检测到明显的电生理现象^[7],5-氮胞苷的这种诱导失利的结果可能是种属差异造成的^[8-9]。值得注意的是,5-氮胞苷或许具有致癌效果^[10]。因为仍不清楚5-氮胞苷的作用机制,所以解释这些现象尚需进一步研究。另外,在表观遗传修饰中,组蛋白乙酰化似乎比DNA去甲基化有更强的心肌向诱导效果^[11-12]。

1.2 去乙酰化酶抑制剂诱导

目前在MSCs的心肌向诱导领域中常用到的去乙酰化酶抑制剂主要包括曲古抑菌素A(trichostatin A)和辛二酰苯胺异羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid)。Choi等^[12]用曲古抑菌素A处理AMSCs 2周后发现,心脏肌动蛋白的表达量为对照组的11倍,若在心肌细胞培养基中培养,该水平可维持2周。在辛二酰苯胺异羟肟酸和5-氮胞苷的对比实验中,辛二酰苯胺异羟肟酸被发现能够比5-氮胞苷更有效地诱导MSCs心肌向分化,且两者结合诱导的效果与单独使用辛二酰苯胺异羟肟酸的诱导效果没有差异。Feng等^[11]猜测, MSCs心肌向分化的机制可能是组蛋白乙酰化,而不是DNA去甲基化。另外,有研究将10 μmol/L的辛二酰苯胺异羟肟酸用于处理人牙囊来源的MSCs也得到细胞表达心肌蛋白的结果^[13]。将这些诱导后的细胞从腹腔注射到小鼠体内2周后,发现有5.6%±1.0%的细胞迁移到心脏,说明部分心肌样细胞还具有自我“归巢”的能力^[13]。

1.3 佛波酯诱导

佛波酯(phorbol myristate acetate)是一种蛋白激酶C激活子,Song等^[14]发现,它在MSCs的心肌向命运决定中具有重要作用。经佛波酯处理后的MSCs不仅在形态上类似心肌细胞,而且能表达心肌肌钙蛋白T、肌球蛋白轻链、肌球蛋白重链、间隙连接蛋白43、毒蕈碱受体、肾上腺素能受体以及表达肌浆网(sarcoplasmic reticulum)钙离子ATP酶和L型钙

离子通道。将诱导后的大鼠BMSCs移植到心梗模型大鼠中,发现心肌中的炎症细胞和纤维化标记物减少, MSCs与心肌组织通过间隙连接蛋白43高度偶联,梗死心肌的电传导速度有所恢复,这说明用佛波酯处理后的MSCs能在体内很好地形成电耦合。细胞中的活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells)和MyoD被发现参与了佛波酯的心肌向诱导过程^[15]。

化学试剂诱导法的实验操作过程较简单,诱导效果一般比较明显。此外,化学试剂对于人体可能具有副作用,所以将经过药物处理的细胞植入人体治疗心肌梗死还需要经过大量的实验验证。

2 生物因子诱导

2004年, Planat-Bénard等^[16]从6周龄雄性小鼠脂肪组织中提取了一种MSCs——基质血管组分细胞(stroma vascular fraction),并且在含有造血细胞因子IL3、IL6和干细胞因子(stem cell factor, SCF)的甲基纤维素培养基中培养,20天后细胞分化成为具有搏动能力的心肌样细胞。这是一次在没有5-氮胞苷的情况下体外诱导MSCs分化为心肌样细胞的研究实例。

WNT基因家族表达的Wnt11和转化生长因子β家族中的转化生长因子β、骨形态发生蛋白在研究中被发现能控制MSCs的分化。研究表明,通过病毒转染使Wnt11在MSCs中表达后,细胞会进一步表达心脏转录因子GATA结合蛋白4(GATA4)等心肌标记物^[17]。对于同时表达心肌标记物和骨骼肌标记物的MSCs,在处于低血清和含有骨形态发生蛋白-4的培养环境中,心肌标记物的表达会增强,骨骼肌标记物的表达则会减弱^[18]。进一步研究表明,Wnt11和骨形态发生蛋白-2能协同促进MSCs的心肌向分化^[19]。转化生长因子β1的作用效果则类似于5-氮胞苷,能够诱导MSCs在形态和基因表达上类似于心肌细胞^[20]。Shi等^[21]联合使用转化生长因子β1和5-氮胞苷诱导大鼠BMSCs分化,结果显示,细胞分化增加、凋亡减少,表达心肌相关基因的细胞数量增加且基因表达强度增大,胞外信号调控激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)的磷酸化增加。结果表明,这种联合诱导方法可以在离体情况下有效促进细胞的心肌向分化,并且其分化程度与ERK1/2的磷酸化程度呈正相关。

上文中的各种生物因子作为生物体内源的因素,可能在体内天然作用于MSCs。正是由于这种与细胞天然的亲和力,使用生物因子代替化学试剂诱导MSCs的心肌向分化可能是一种趋势。这些研究证明,生物因素联合诱导的效果比单因素诱导的效果更好^[19-21]。实际操作中,使用生物因素诱导的操作较简单,但是生物因子价格较高,用于临床诱导分化成本较大。

3 物理诱导

人类的活动离不开力的参与,力在生命过程中起到重要作用。如在生物体中,血管内皮细胞要经受来自血液的剪切应力,心肌细胞则无时无刻不在经受心脏搏动带来的牵张应力。特别是在力学生物学概念的提出后,越来越多的研究者开始探讨力对细胞增殖、分化等基本生命过程的影响。另外,人体心脏是通过电脉冲传导来实现节律性搏动的,所以参与构成心脏的心肌细胞必定是处于一种电场环境中的。因此,电场对干细胞的分化影响也值得探究。此外,随着微图案技术(micropattern)的发展,人们发现在合理控制细胞的形状后,即使没有生物化学因素的辅助,细胞也能表现出心肌细胞特性。再生医学的发展也让组织工程及材料在诱导干细胞分化的研究中崭露头角。

3.1 力学诱导

Huang等^[22]通过流动腔中培养基的循环流动给MSCs施加剪切应力,研究发现,10 dyne/cm²的剪切应力能够很好地诱导大鼠BMSCs的心肌向分化。另外,Huang等^[23]研究了不同作用强度、不同作用时间和不同作用频率的动态牵张应力对大鼠BMSCs的影响。研究发现,心肌向诱导的最佳牵张应力参数是:10%的牵张应力、1 Hz的频率、24 h的诱导时间^[23]。在此条件下,联合10 μmol/L 5-氮胞苷共同处理BMSCs,发现心肌细胞分化比单独使用牵张应力时显著增强^[23]。进一步对比研究牵张应力和剪切应力对干细胞分化的影响发现,牵张应力的诱导效果更佳^[23]。就细胞骨架(微丝)变化而言,牵张应力使骨架垂直于牵张方向排列,剪切应力则使骨架顺应流体方向排列。随着近年来对力转导途径研究的深入,细胞骨架被发现在将胞外力学信号传导到细胞核内进而引发干细胞分化的过程中起到重要作用。通过对细胞骨架的短期观测,我们即可判断

干细胞分化的方向^[24]。所以细胞在经受牵张应力、剪切应力等刺激后引起的骨架变化可能是决定干细胞命运的关键。

3.2 电场诱导

为了模拟心脏电环境, 实验中常用脉冲电刺激MSCs。Genovese等^[25]利用电压为10 V、频率为0.5 Hz、脉宽为5 ms的电流刺激人MSCs, 在分别经过1周、2周和3周的电刺激后, 发现虽然随着电刺激时间的增加, 活细胞数量在逐步减少, 但存活细胞逐渐变为纺锤形, 更多细胞能表达心肌标记物。到了第3周, 细胞形态则类似于成熟肌细胞。为了探索细胞所在电刺激环境中的电场性质并更好地对细胞施加电刺激, Pavesi等^[26]用有限元方法研究了电刺激装置中电场的分布和密度。他们还发现, 相比参数为8 V、2 ms、1 Hz的电场, 用+4 V、1 ms、1 Hz, -4 V、1 ms、1 Hz的电场诱导后AMSCs的转录谱更类似于心肌细胞。随着近年来纳米技术的发展, 电活性纳米材料在运用于电刺激诱导中体现出以下优点: 首先, 电活性纳米材料可以作为电刺激MSCs的良好介质; 其次, 电场会对细胞内的纳米颗粒产生电驱动, 从而影响细胞内环境; 此外, 用纳米颗粒可以模拟心脏内细小拓扑结构, 促进MSCs心肌向分化^[27-28]。Thrivikraman等^[28]将人MSCs接种到含有游离金纳米颗粒的培养基中, 并让细胞贴附在交联有金纳米颗粒的基质上, 对细胞加载100 mV/cm、10% 占空比、1 Hz的电场后, 细胞逐渐变成管状, 同时表达心肌向标记物。

虽然电场能诱导MSCs的心肌向分化, 但是在具体实验过程中需要考虑以何种导电方式使细胞感受电刺激, 以及选择何种参数能兼顾细胞的存活和分化。为了更加真实地模拟心脏环境, 力电联合刺激MSCs也是一个值得尝试的方向^[29]。

3.3 微图案诱导

无需加生化因子, 仅通过物理因素诱导MSCs分化为成熟心肌细胞始终是研究者们不懈努力的方向。近年来, 微图案技术已经逐步应用到诱导干细胞分化领域。干细胞所依附基底的两个性质(基底形状和基底硬度)对其命运决定产生作用。微图案技术通过特殊材料控制细胞形状, 进而控制细胞骨架, 促使干细胞分化。

2010年, Tay等^[30]将聚二甲基硅氧烷制作的含胞外基质和人血清来源的纤连蛋白的弹性图章印在乳

酸-乙醇酸共聚物[poly (lactic-co-glycolic acid)]支架上, 再将人MSCs接种于该材料上, 此后分别在第4天和第14天观察发现, 细胞形状发生了明显变化, 细胞明显变长并且整齐有序地排列着, 细胞核也变得更加椭圆。虽然在第4天和第14天均能检测到心肌向mRNA和神经向mRNA, 但是只能观测到肌球蛋白重链的荧光, 而不能观察到神经标记物的荧光, 这说明细胞更倾向于分化为心肌样细胞。这是一次在不添加任何生化试剂, 仅仅通过改变MSCs形状诱导分化的研究实例。此后, 该课题组在微图案技术领域取得一系列进展: 微图案中MSCs的心肌向分化是通过阻碍“黏着斑激酶-胞外信号调控激酶”级联通路实现的^[31]; 制备出新型的微图案材料^[32]; 多种组织来源的MSCs均能在形态束缚下表现出心肌细胞特征^[33]; 微图案诱导后的心肌样细胞能很好地保持心肌细胞特性^[34]。另外, 有研究报道, 基底硬度在干细胞命运决定中也有重要作用^[35], 这在微图案技术的应用中也有所体现^[36]。

3.4 组织工程/材料诱导

组织工程是再生医学中必不可少的一种治疗思路, 它的三要素是: 种子细胞、材料和培养因子。近年来, 将干细胞植入一定材料中诱导分化的报道逐渐增多。其优点主要表现在以下两方面: 首先, 可以通过将干细胞接种于模拟心脏结构和力学特性的材料中^[37], 或者接种于脱细胞支架中^[38]进行诱导; 其次, 诱导成熟的人造心肌组织能直接作为梗死心肌的替换组织。

研究发现, 将MSCs接种于模拟心脏结构和力学特性的三维材料, 并对材料施加75%的牵张使细胞实现三维排列后, MSCs心肌向分化明显, 这也说明大幅度牵张能促进细胞的分化^[37]。为了模拟心脏搏动状态, 另有研究将大鼠MSCs接种在脱细胞猪心脏中, 并施加20%动态牵张和5 V、1 Hz的脉冲电刺激后, 发现MSCs状态良好, 实现了心肌向分化且组织的类心肌力学性质得以高效重建^[38]。最近还有将纳米材料应用于干细胞分化的报道^[39]。Kai等^[39]将人MSCs接种在纳米纤维材料聚(ϵ -己内酯)-明胶上, 并加入5-氮胞苷处理, 15天后发现, 细胞能表达心肌标记物。如果进一步通过材料缓释血管内皮生长因子, 不仅能增强MSCs的增殖能力, 而且能增加它心肌向分化的程度。

总的来说, 物理诱导实验成本较生物因子诱导

成本低,但是单独诱导分化的效果不理想,很多实验还需联合其他方法共同诱导。此外,该方法极依赖于反应器的可靠性和操作者的娴熟度,处理不当容易出现诸如培养物污染、细胞死亡、反应器运行不稳定等问题。

4 共培养诱导

MSCs与心肌细胞共培养是一种在体外初步模拟心脏微环境诱导MSCs分化的方法。实验证明,内皮细胞在心肌细胞环境下能转分化为跳动心肌细胞^[40],MSCs也能在心肌细胞环境中表达心肌标记物^[41],在共培养中MSCs甚至能与心肌细胞形成有效的电耦合^[42]。共培养可分为直接共培养和间接共培养。直接共培养中MSCs与心肌细胞之间没有任何物理阻隔,两种细胞相互紧邻,所以MSCs不仅能感知心肌细胞分泌的化学信号,还能感知心肌细胞自发搏动产生的机械信号,甚至两者间可能形成间隙连接传输胞质因子和电信号。间接共培养则将MSCs与心肌细胞在同一培养皿中通过物理屏障分隔培养,虽然两种细胞无法接触,但是可以相互交流各自分泌的因子。

4.1 直接共培养诱导

目前已有大量关于直接共培养诱导MSCs分化的研究,其中大部分实验的诱导效果显著。2004年,Xu等^[41]将小鼠BMSCs与新生大鼠心室肌细胞以1:40的比例共培养,7天后,细胞能表达α辅肌动蛋白、GATA4和肌细胞增强子2(myocyte enhancer factor 2,Mef2),并且和心肌细胞形成间隙连接。除了新生鼠心肌细胞外,用胎鼠心肌细胞与MSCs共培养诱导的效果也明显^[43]。此外,在共培养中,心肌细胞的排列对MSCs的分化效果也有影响。有研究证明,模拟体内排列的心肌细胞能促进MSCs获得心肌细胞样的细胞骨架、转录因子、间隙连接蛋白43和电生理特性^[44]。纳米材料在共培养诱导中也具有重要作用。Han等^[45]发现,用氧化铁纳米颗粒处理成心肌细胞,能使其高表达间隙连接蛋白43。MSCs与这样的成心肌细胞共培养可以形成间隙连接并实现很好的“交流”,共培养后的MSCs在被移植到动物病变模型后,心脏功能得到了改善。值得一提的是,该实验中MSCs与心肌细胞“磁分离”的方法值得进一步尝试。另有研究发现,在共培养条件下,早期妊娠的人类脐带血管外周细胞(human umbilical cord perivascular

cells,HUCPVCs),比BMSCs有更强的心肌向分化能力,且经过悬滴法诱导产生的早期妊娠HUCPVCs聚集物与心肌细胞共培养1周后,能产生与心肌细胞同步收缩的细胞^[46]。所以,HUCPVCs可能作为一种治疗心肌梗死的新型干细胞来源^[46]。

4.2 间接共培养诱导

Li等^[47]将BMSCs和新生大鼠心室肌细胞按1:10的比例共培养于半透膜的两侧。第1周内,有小部分纺锤状BMSCs逐渐变长;到第7天时,单细胞的收缩现象出现;到第10天时,细胞团节律性的收缩出现,并且随着时间的延长,收缩变得越来越规律和强烈,但促进分化的因子尚不清楚。另外,也有在心肌细胞微环境中添加生长因子联合诱导MSCs收缩的报道^[48]。

共培养能通过MSCs与心肌细胞的信号交流,实现MSCs心肌向分化。但是此方法操作较复杂,需要培养心肌细胞,且对于直接共培养还需标记MSCs。共培养因子成分复杂,要将经处理的MSCs用于人体,还需进行大量的实验证。有报道称,间接共培养对MSCs的心肌向分化并无作用^[41],这可能和MSCs来源不同或者MSCs与心肌细胞相对位置不同等因素有关系。

5 分子改造诱导

miRNA被发现能够通过特异结合mRNA的某序列(一般为3'非翻译区)阻止其翻译,这样实现了细胞在转录后水平上对基因表达的调控。转录因子能够通过结合基因启动子启动基因的表达。随着分子生物学的发展,人为导入miRNA和转录因子并实现它们在特定细胞中的表达并非难事。所以人们也开始探索特定的miRNA或转录因子在调控MSCs心肌向分化中的作用。

5.1 miRNA诱导

在干细胞分化的miRNA调控过程中,如果miRNA水平的升高会促进分化,那么这样的miRNA具有正调控分化作用;反之,miRNA则具有负调控分化作用。研究发现,miR-16和miR-133a具有正调控作用^[49-50],miR-124具有负调控作用^[51]。有研究者将miR-16导入人BMSCs后,细胞周期G₁至S期相关蛋白的表达会被抑制,使得BMSCs滞留在G₁期,不再增殖,由于心肌细胞环境的诱导,原本增殖的BMSCs发生心肌向分化^[49]。Cai等^[51]报道了一个

miRNA在分化过程中起相反作用的例子。同样在大鼠BMSCs与心肌细胞共培养的基础上, 检测发现miR-124的表达水平下降, 磷酸化STAT3的水平上升, GATA4的表达启动, 进而引发了心肌下游基因的表达。这从另一个角度说明, miR-124能抑制细胞的心肌向分化, 是一个典型的负调控分化的分子。此外, miR-133a被发现是通过抑制表皮生长因子受体, 从而诱导MSCs心肌向分化的^[50]。

5.2 转录因子诱导

在细胞中一些早期心肌相关转录因子的表达往往意味着细胞有向心肌方向分化的趋势, 所以理论上讲, 如果把相关转录因子导入MSCs, 那么会在一定程度上启动心肌下游基因的表达。Myocardin作为血清反应因子(serum response factor)的转录协因子, 能激活细胞心脏基因的表达^[52]。有报道称, 将腺病毒载体将*myocardin*基因导入人MSCs, 1周后发现细胞能同时表达心肌和平滑肌细胞基因, 可见Myocardin能实现MSCs的初步分化^[53]。NKx2.5作为心肌向分化的早期转录因子, 在MSCs中表达后会诱发心肌向标记物的表达, 并且这些细胞被移植入心衰模型大鼠心

脏后, 心脏功能会得到一定的修复^[54-55]。

用miRNA和转录因子诱导MSCs心肌向分化实质上是在分子机制的层面上对干细胞命运进行调控, 而具体的机制还需要深入研究。全面掌握MSCs心肌向分化的分子机制并进一步优化分子转移方法后, 或许可以实现利用miRNA和转录因子定性甚至定量地诱导干细胞分化。

6 展望

要实现MSCs对梗死心肌的细胞治疗, 需要寻求一种可靠的诱导因素刺激MSCs的心肌向分化。从本文可以看出, 各实验室的结果大都显示能在一定程度上诱导MSCs心肌向分化, 但大部分并不能诱导产生成熟的心肌细胞。从具体的诱导方式来看, 每种方法各有优缺点(表1)。总的来说, 联合诱导的分化效果往往会比单因素诱导的效果好, 所以我们可以结合上述各因素联合诱导MSCs分化。从临床应用的角度来看, 生物因子诱导明显优于化学试剂诱导。另外, 不管从模拟心脏电环境的角度, 还是从模拟心肌组织结构和力学特性的角度来看, 仿生

表1 MSCs定向CMs分化各种诱导方法的优缺点

Table 1 The advantages and disadvantages of various induction methods for cardiomyogenic differentiation of MSCs

诱导方法 Induction methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References
Chemical agent induction	(1) Agents are generally cheap (2) Experimental process is simple (3) Induction results are generally positive	(1) Agent may inhibit cell proliferation (2) Agent may induce tumorigenesis (3) Induction results can be negative	[56]
Biological factor induction	(1) Biological factors come from body and are relatively safe for use (2) Experimental process is simple (3) Induction results are generally positive	Biological factors are relatively expensive	[10]
Physical induction	Experimental cost is relatively low	(1) This method can cause physical damage to cells (2) This method is very dependent on the reliability of the reactor and the operator's experimental proficiency (3) Induction results can be not so good if without auxiliary stimuli	[78]
Co-culture induction	Induced cells generally can be nearly mature CMs	(1) Need to culture CMs (2) Need to label MSCs for direct co-culture induction (3) CMs secreting factors are complex (4) Induction results can be negative (5) The sorting procedure for dividing CLMs and CMs can compromise CLMs viability	[22]
Molecular manipulation induction	Induction results are generally positive	Molecular manipulation is relatively complex	[12,42]

CMs: 心肌细胞; CLMs: 心肌样细胞。

CMs: cardiomyocytes; CLMs: cardiac-like myocytes.

诱导可能成为未来最佳的心肌向诱导方式。

由于MSCs具有异质性,且不同实验用的细胞可能取自不同组织或者不同物种,加以细胞不同代数的区别以及冻存复苏后细胞性质的变化,这些因素使得MSCs在诱导前的状态是不一致的,再结合多样的诱导方法,这自然会造成诱导结果千差万别的现状。当然我们也应该清楚地认识到目前诱导方法不规范、不统一带来的问题。比如在电刺激诱导中,不同研究使用的电刺激参数尚不统一,分别有用电流值、电压值和电场值来表征的情况。所以目前我们需要做的是将MSCs的分离、鉴定、培养、诱导方式及后续检测手段等步骤尽量规范化,并且努力建立动物模型和临床治疗更直接的联系,积极探索临床治疗所需要的心肌样细胞的性质,这样才能更好地将干细胞基础研究转化为心肌梗死治疗的临床应用。此外显而易见的是,关于MSCs心肌向诱导的分子机制尚需进一步研究。只有对诱导的分子机制有了较全面的了解才能获得足够多分化成熟的细胞,才能使MSCs治疗心肌梗死的方案更加可靠。通过MSCs诱导为心肌样细胞替代坏死心肌,相比传统方法有着更为广阔前景。随着诱导分化过程中一系列问题的逐步解决,具有巨大优势的MSCs来源的心肌细胞必能成为人类治疗心肌梗死的一大利器。

参考文献 (References)

- 1 Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, Kim TS, Kim MH, Chung JH, et al. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(9): 933-43.
- 2 Behfar A, Yamada S, Crespo-Diaz R, Nesbitt JJ, Rowe LA, Perez-Terzic C, et al. Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardio* 2010; 56(9): 721-34.
- 3 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999; 103(5): 697-705.
- 4 Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002; 105(3): 380-6.
- 5 Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22(7): 1330-7.
- 6 Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, Ghosh K. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2(7): 394-9.
- 7 Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res* 2006; 16(12): 949-60.
- 8 Roura S, Farre J, Hove-Madsen L, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Galvez-Monton C, et al. Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Basic Res Cardiol* 2010; 105(3): 419-30.
- 9 Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 2003; 75(3): 775-9.
- 10 Harrison JJ, Anisowicz A, Gadi IK, Raffeld M, Sager R. Azacytidine-induced tumorigenesis of CHEF/18 cells: correlated DNA methylation and chromosome changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(21): 6606-10.
- 11 Feng C, Zhu J, Zhao L, Lu T, Zhang W, Liu Z, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2009; 315(17): 3044-51.
- 12 Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL, Collas P, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2010; 14(4): 878-89.
- 13 Sung IY, Son HN, Ullah I, Bharti D, Park JM, Cho YC, et al. Cardiomyogenic differentiation of human dental follicle-derived stem cells by suberoylanilide hydroxamic acid and their *in vivo* homing property. *Int J Med Sci* 2016; 13(11): 841-52.
- 14 Song H, Hwang HJ, Chang W, Song BW, Cha MJ, Kim IK, et al. Cardiomyocytes from phorbol myristate acetate-activated mesenchymal stem cells restore electromechanical function in infarcted rat hearts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(1): 296-301.
- 15 Seo HH, Lee CY, Lee J, Lim S, Choi E, Park JC, et al. The role of nuclear factor of activated T cells during phorbol myristate acetate-induced cardiac differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1): 90.
- 16 Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004; 94(2): 223-9.
- 17 He Z, Li H, Zuo S, Pasha Z, Wang Y, Yang Y, et al. Transduction of Wnt11 promotes mesenchymal stem cell transdifferentiation into cardiac phenotypes. *Stem Cells Dev* 2011; 20(10): 1771-8.
- 18 Grajales L, Garcia J, Geenen DL. Induction of cardiac myogenic lineage development differs between mesenchymal and satellite cells and is accelerated by bone morphogenetic protein-4. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53(3): 382-91.
- 19 Zhang Z, Li H, Ma Z, Feng J, Gao P, Dong H, et al. Efficient cardiomyogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stromal cells by combination of Wnt11 and bone morphogenetic protein 2. *Exp Biol Med (Maywood, N.J.)* 2012; 237(7): 768-76.
- 20 Mohanty S, Bose S, Jain KG, Bhargava B, Airan B. TGF β 1 contributes to cardiomyogenic-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol* 2013; 163(1): 93-9.
- 21 Shi S, Wu X, Wang X, Hao W, Miao H, Zhen L, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte-

- like cells is regulated by the combined low dose treatment of transforming growth factor- β 1 and 5-azacytidine. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 3816256.
- 22 Huang Y, Jia X, Bai K, Gong X, Fan Y. Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 2010; 41(7): 497-505.
- 23 Huang Y, Zheng L, Gong X, Jia X, Song W, Liu M, et al. Effect of cyclic strain on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2012; 7(4): e34960.
- 24 Treiser MD, Yang EH, Gordonov S, Cohen DM, Androulakis IP, Kohn J, et al. Cytoskeleton-based forecasting of stem cell lineage fates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(2): 610-5.
- 25 Genovese JA, Spadaccio C, Chachques E, Schussler O, Carpenter A, Chachques JC, et al. Cardiac pre-differentiation of human mesenchymal stem cells by electrostimulation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14: 2996-3002.
- 26 Pavesi A, Soncini M, Zamperone A, Pietronave S, Medico E, Redaelli A, et al. Electrical conditioning of adipose-derived stem cells in a multi-chamber culture platform. *Biotechnol Bioeng* 2014; 111(7): 1452-63.
- 27 Mooney E, Mackle JN, Blond DJ, O'Cearbhail E, Shaw G, Blau WJ, et al. The electrical stimulation of carbon nanotubes to provide a cardiomimetic cue to MSCs. *Biomaterials* 2012; 33(26): 6132-9.
- 28 Thrivikraman G, Madras G, Basu B. Electrically driven intracellular and extracellular nanomanipulators evoke neurogenic/cardiomyogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2016; 77: 26-43.
- 29 Yoon JK, Lee TI, Bhang SH, Shin JY, Myoung JM, Kim BS. Stretchable piezoelectric substrate providing pulsatile mechano-electric cues for cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017; 9(27): 22101-11.
- 30 Tay CY, Yu H, Pal M, Leong WS, Tan NS, Ng KW, et al. Micropatterned matrix directs differentiation of human mesenchymal stem cells towards myocardial lineage. *Exp Cell Res* 2010; 316(7): 1159-68.
- 31 Tay CY, Pal M, Yu H, Leong WS, Tan NS, Ng KW, et al. Bio-inspired micropatterned platform to steer stem cell differentiation. *Small* 2011; 7(10): 1416-21.
- 32 Li H, Wen F, Wong YS, Boey FY, Subbu VS, Leong DT, et al. Direct laser machining-induced topographic pattern promotes up-regulation of myogenic markers in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* 2012; 8(2): 531-9.
- 33 Yu T, Chua CK, Tay CY, Wen F, Yu H, Chan JK, et al. A generic micropatterning platform to direct human mesenchymal stem cells from different origins towards myogenic differentiation. *Macromol Biosci* 2013; 13(6): 799-807.
- 34 Tijore A, Wen F, Lam CR, Tay CY, Tan LP. Modulating human mesenchymal stem cell plasticity using micropatterning technique. *PLoS One* 2014; 9(11): e113043.
- 35 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126(4): 677-89.
- 36 Yu H, Tay CY, Pal M, Leong WS, Li H, Li H, et al. A bio-inspired platform to modulate myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through focal adhesion regulation. *Adv Healthc Mater* 2013; 2(3): 442-9.
- 37 Guan J, Wang F, Li Z, Chen J, Guo X, Liao J, et al. The stimulation of the cardiac differentiation of mesenchymal stem cells in tissue constructs that mimic myocardium structure and biomechanics. *Biomaterials* 2011; 32(24): 5568-80.
- 38 Wang B, Wang G, To F, Butler JR, Claude A, McLaughlin RM, et al. Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations. *Langmuir* 2013; 29(35): 11109-17.
- 39 Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Tian L, Ramakrishna S. Potential of VEGF-encapsulated electrospun nanofibers for *in vitro* cardiomyogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11(4): 1002-10.
- 40 Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(19): 10733-8.
- 41 Xu M, Wani M, Dai YS, Wang J, Yan M, Ayub A, et al. Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes. *Circulation* 2004; 110(17): 2658-65.
- 42 Beeres SL, Atsma DE, van der Laarse A, Pijnappels DA, van Tuyn J, Fibbe WE, et al. Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(10): 1943-52.
- 43 Valarmathi MT, Fuseler JW, Goodwin RL, Davis JM, Potts JD. The mechanical coupling of adult marrow stromal stem cells during cardiac regeneration assessed in a 2-D co-culture model. *Biomaterials* 2011; 32(11): 2834-50.
- 44 Ma Z, Liu Q, Yang H, Runyan RB, Eisenberg CA, Xu M, et al. Laser patterning for the study of MSC cardiogenic differentiation at the single-cell level. *Light Sci Appl* 2013; 2, pii: 68.
- 45 Han J, Kim B, Shin JY, Ryu S, Noh M, Woo J, et al. Iron oxide nanoparticle-mediated development of cellular gap junction crosstalk to improve mesenchymal stem cells' therapeutic efficacy for myocardial infarction. *ACS Nano* 2015; 9(3): 2805-19.
- 46 Szaraz P, Librach M, Maghen L, Iqbal F, Barretto TA, Kenigsberg S, et al. *In vitro* differentiation of first trimester human umbilical cord perivascular cells into contracting cardiomyocyte-like cells. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 7513252.
- 47 Li X, Yu X, Lin Q, Deng C, Shan Z, Yang M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(2): 295-303.
- 48 Huang YS, Li IH, Chueh SH, Hueng DY, Tai MC, Liang CM, et al. Mesenchymal stem cells from rat olfactory bulbs can differentiate into cells with cardiomyocyte characteristics. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9(12): E191-201.
- 49 Liu JL, Jiang L, Lin QX, Deng CY, Mai LP, Zhu JN, et al. MicroRNA 16 enhances differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a cardiac niche toward myogenic phenotypes *in vitro*. *Life Sci* 2012; 90(25/26): 1020-6.
- 50 Lee SY, Ham O, Cha MJ, Song BW, Choi E, Kim IK, et al. The promotion of cardiogenic differentiation of hMSCs by targeting epidermal growth factor receptor using microRNA-133a. *Biomaterials* 2013; 34(1): 92-9.
- 51 Cai B, Li J, Wang J, Luo X, Ai J, Liu Y, et al. MicroRNA-124

- regulates cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting STAT3 signaling. *Stem Cells* 2012; 30(8): 1746-55.
- 52 Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, *et al.* Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 2001; 105(7): 851-62.
- 53 van Tuyn J, Knaan-Shanzer S, van de Watering MJ, de Graaf M, van der Laarse A, Schalij MJ, *et al.* Activation of cardiac and smooth muscle-specific genes in primary human cells after forced expression of human myocardin. *Cardiovasc Res* 2005; 67(2): 245-55.
- 54 Deng B, Wang JX, Hu XX, Duan P, Wang L, Li Y, *et al.* Nkx2.5 enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in treatment heart failure in rats. *Life Sci* 2017; 182: 65-72.
- 55 Ruan Z, Zhu L, Yin Y, Chen G. Overexpressing NKx2.5 increases the differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biomed Pharmacother* 2016; 78: 110-5.
- 56 Lee WC, Sepulveda JL, Rubin JP, Marra KG. Cardiomyogenic differentiation potential of human adipose precursor cells. *Int J Cardiol* 2009; 133(3): 399-401.