

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.05.0602

· 论 著 ·

血清剥夺促进成纤维细胞向内皮细胞转分化的体外研究

赵晓峰, 贺治青, 吴宗贵, 梁 春*
第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003

[摘要] **目的** 模拟体内急性心肌梗死缺血缺氧微环境, 探讨血清剥夺是否能激活心肌成纤维细胞向内皮细胞转分化。**方法** 取新鲜分离的 C57BL/6 新生小鼠心脏组织, 获取成纤维细胞进行培养, 用白血病抑制因子(LIF)促进成纤维细胞自我更新、长程维持干性和抑制其向终末分化。将第 3 代成纤维细胞分为: 对照组[DMEM+10%胎牛血清(FBS)培养]、血清剥夺 24 h 组(不含 FBS 的 DMEM 培养 24 h)、血清剥夺 48 h 组(不含 FBS 的 DMEM 培养 48 h)、血清剥夺 72 h 组(不含 FBS 的 DMEM 培养 72 h)。经过不同处理后, 采用 qPCR 法检测各组细胞谱系特异性基因的表达变化, 采用体外血管新生实验和 Dil-Ac-LDL 吞噬实验检测血清剥夺后成纤维细胞的功能学变化, 采用 ELISA 法检测血清剥夺后成纤维细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)的情况。**结果** 血清剥夺不同时间组成纤维细胞形成血管分叉的数目与对照组相比均增加($P<0.05$), 但均未发现诱导细胞吞噬 Dil-Ac-LDL 的现象。与对照组比较, 血清剥夺 48 h 组成纤维细胞中内皮特异性基因 *CD31* 和 *VE-cadherin* 的表达均升高($P<0.05$); 其中血清剥夺 48 h 组成纤维细胞中 *CD31* 的表达是对照组的 13.7 倍($P<0.05$), 血清剥夺 72 h 组是对照组的 2 倍($P<0.05$)。ELISA 检测结果显示, 血清剥夺 48 h 组成纤维细胞分泌的 VEGF 是对照组的 7 倍($P<0.05$), 血清剥夺 72 h 组是对照组的 3.7 倍($P<0.05$)。**结论** 血清剥夺可以激活心肌成纤维细胞向内皮细胞谱系的转分化。

[关键词] 成纤维细胞; 内皮细胞; 细胞转分化; 缺血性心脏病; 血管新生; 血清剥夺

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0602-07

Serum deprivation promoting transdifferentiation of fibroblasts into endothelial cells: an *in vitro* study

ZHAO Xiao-feng, HE Zhi-qing, WU Zong-gui, LIANG Chun*
Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To determine whether serum deprivation can induce transdifferentiation of cardiac fibroblasts into endothelial cells in the ischemic and hypoxic microenvironment of acute myocardial infarction. **Methods** Fibroblasts were separated and cultured from hearts of new born C57BL/6 mice, and leukemia inhibitory factor (LIF) was used to accelerate the self-renewal, keep plasticity and inhibit differentiation to the terminal fates. The fibroblasts were exposed to five different intervention conditions: control group (DMEM+10% fetal bovine serum [FBS]) and serum deprivation (DMEM without FBS) for 24 h, 48 h and 72 h groups. qPCR was used to detect the expression of cell lineage specific genes; the *in vitro* angiogenesis test and Dil-Ac-LDL phagocytic function test were used to observe function of fibroblasts; and ELISA assay was used to examine the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by fibroblasts. **Results** Compared with the control group, the number of capillaries-like bifurcation formed by fibroblasts was significantly increased at different serum deprivation time points ($P<0.05$), but no induced engulfment of Dil-Ac-LDL was noticed. Compared with the control group, the expressions of endothelial specific genes *CD31* and *VE-cadherin* in fibroblasts were significantly increased at 48 h of serum deprivation ($P<0.05$); the expression of *CD31* at 48 h of serum deprivation was 13.7 times that of the control group ($P<0.05$), and at 72 h of serum deprivation it was two times that of the control group ($P<0.05$). ELISA results showed that VEGF level at 48 h of serum deprivation was seven times that of the control group, and at 72 h of serum deprivation it was 3.7 times ($P<0.05$). **Conclusion** The serum

[收稿日期] 2017-02-24 [接受日期] 2017-04-16
[基金项目] 国家自然科学基金(9153910092,91539118,81473445,8151101216). Supported by National Natural Science Foundation of China (9153910092, 91539118, 81473445, 8151101216).
[作者简介] 赵晓峰, 硕士生. E-mail: 374648448@qq.com
* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-82885293, E-mail: chunliangliang@hotmail.com

deprivation can stimulate the transdifferentiation of cardiac fibroblasts into endothelial cell lineages.

[Key words] fibroblasts; endothelial cells; cell transdifferentiation; ischemic heart disease; angiogenesis; serum deprivation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 602-608]

来自于循序分化的成体器官的细胞以往一直被认为是定型且表型不易发生改变^[1-2],然而近年来研究表明,基于细胞谱系-转录因子的显著作用,通过转分化将一种分化的细胞类型绕过多能干细胞的状态直接转化为另一种细胞类型是可行的^[3]。最初的转分化现象在两栖动物下肢的再生和蝴蝶幼虫变态发育中被观察到^[4-5],此后,生理情况下肠上皮化生和肿瘤发生中也发现转分化现象的存在^[6]。运用病毒转导谱系特异性转录因子或 Yamanaka 因子联合特定的培养条件可以将成纤维细胞(fibroblasts, Fbs)转分化为神经元、心肌细胞、血液祖细胞、肝细胞、胰腺 β 细胞、上皮干细胞等^[7-9]。过去数十年,新的技术和筛选途径被用来选择合适的用于谱系转变的转录因子。但以上转分化途径都依赖于病毒载体和基因材料,安全性隐患限制了其临床应用。因此,学者们开始使用不涉及病毒载体的小分子策略诱导体细胞转分化^[10-13]。但迄今为止仅有少量关于用小分子策略实现心肌 Fbs 向内皮细胞(endothelial cells, ECs)转分化的报道^[11,13],且都是孤立性的未被重复的研究。

急性心肌梗死后,心肌局部缺血缺氧引起的级联瀑式反应导致心肌细胞的丢失和心功能受损。心肌 Fbs 在损伤部位的增殖伴随 ECs 的招募和扩增^[14]。ECs 可以促进损伤部位的血管新生^[15]和损伤后修复^[16]。反应性纤维化和缺血后血管新生在损伤后早期发生,两者密切的时空交互作用被认为可以显著影响瘢痕负荷和功能修复,经历内皮间质转变^[17],同时 Fbs 分泌促进血管形成的分子反馈性促血管新生^[18-19]。但心肌 Fbs 被认为是一种终末分化的定型细胞^[20-21],因此目前还不清楚在急性心肌缺血损伤环境下,不依赖于外源性基因整合的 Fbs 是否能反方向地向 ECs 谱系转化,进而促进“功能性血管新生”。为进一步了解心肌 Fbs 向 ECs 转分化的可能性和分子机制,本研究通过体外干预心肌 Fbs,模拟体内急性心肌梗死缺血缺氧的微环境,观察血清剥夺细胞应激对心肌 Fbs 表型、功能及血管

新生的影响,为小分子的化学转分化在急性心肌缺血损伤时“治疗性血管新生”的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 所有动物研究均获得上海市实验动物管理办公室和上海市科学技术委员会批准。1~3 日龄的野生型 C57BL/6 小鼠购于中国科学院上海药物研究所,动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0017。

1.2 试剂与仪器 DMEM 培养基、胎牛血清(fetal calf serum, FBS)、胰酶-EDTA 购自美国 Gibco 公司;碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、I 型脱氧核糖核酸酶(DNase I)、中性蛋白酶(Dispase)、IV 型胶原酶购自美国 Sigma 公司;白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;血管内皮生长因子(VEGF) ELISA 检测试剂盒购自北京达科为生物技术有限公司。恒温 CO₂ 细胞培养箱(型号:HERA cell 150i, 美国 Thermo Fisher 公司);IX-70 倒置显微镜(型号:IX71-A12FL/PH, 日本 Olympus 公司);CFX Connect™ 定量 PCR 仪(型号:788BR01921, 美国 Bio-Rad 公司);Thermal Cycler PCR 仪(型号:TP600, 日本 TaKaRa 公司)。细胞培养皿、多孔板、超净台(型号:CA950-2, 上海净化仪器厂),台式离心机(型号:TGL-16C, 上海安亭科学仪器厂)。

1.3 Fbs 分离、培养及鉴定 腹腔麻醉 1~3 日龄 C57BL/6 新生小鼠,取新鲜心脏组织,并剪成约 1 mm³ 的组织碎块;加入 1 mL 混合消化酶(7.5 mg/mL DNase I、2 mg/mL Dispase、1.5 mg/mL IV 型胶原酶,按 1:1:1 比例配制),37 °C 水浴孵育 20 min。取上清 180 × g 离心 5 min,用含 10% FBS、10 ng/μL LIF 和 10 ng/μL bFGF 的 DMEM 培养液重悬细胞沉淀;同时,剩余组织沉淀加入 5 mL 新的混合消化酶,震荡混悬,

37℃水浴孵育10 min。取上清,离心、重悬,加入新的消化酶消化,重复上述操作3~4次,直至组织块成黏稠泥状终止消化。分离的细胞用培养液重悬后置于细胞培养箱中(37℃,5% CO₂)孵育过夜,第2天换液,PBS洗去未贴壁细胞,再加入含有10% FBS、10 ng/μL LIF、10 ng/μL bFGF的DMEM培养液继续培养,隔2~3 d换液1次,细胞生长至80%~85%融合时,传代继续培养。在倒置显微镜下观察Fbs形态,用qPCR法检测Fbs的标志物,鉴定Fbs的表型特点。

1.4 实验分组 取第3代Fbs,用0.25%胰酶消化接种至6孔板,培养至细胞融合度达85%左右,将细胞分为对照组(含10%FBS的DMEM培养液培养)和血清剥夺(不含FBS的单纯DMEM培养液培养)24 h组、血清剥夺48 h组、血清剥夺72 h组,以及血清剥夺48 h且全程不添加LIF组。

1.5 Fbs内皮表面标志物检测 取心肌Fbs抽提RNA并反转录为cDNA,采用CFX Connect™定量PCR仪和SYBR Green Master Mix试剂盒(Roche公司)行qPCR,以GAPDH为内参,检测谱系特异性基因CD31、血管内皮钙黏素(VE-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、胰岛因子1(islet-1)的相对表达量。引物序列:GAPDH上游5'-TGG ATT TGG ACG CAT TGG TC-3',下游5'-TTT GCA CTG GTA CGT GTT GAT-3';CD31上游5'-ACG CTG GTG CTC TAT GCA AG-3',下游5'-TCA GTT GCT GCC CAT TCA TCA-3';VE-cadherin上游5'-CAG GCT GGG TCC ACA ATT AGG-3',下游5'-TGC AGC GAG TTC CTC TAC CT-3';vimentin上游5'-CGG CTG CGA GAG AAA TTG C-3',下游CCA CTT TCC GTT CAA GGT CAA G-3';islet-1上游5'-ATG GCT AGG AAC GCC TAC TTC-3',下游5'-CCC AAG TTA AAC GGT CTT CAGT-3'。每组设3个复孔,实验重复3次。

1.6 Matrigel体外血管新生实验 采用体外血管新生试剂盒检测血清剥夺干预后Fbs的体外血管新生能力。将ECMatrix™溶液和稀释缓冲液置于0℃冰浴中,取100 μL制冷后的10×稀释缓冲液置于1 mL离心管中,加入900 μL ECMatrix™溶液,在4℃条件下混匀制备成ECMatrix™工作液,低温以避免ECMatrix™凝胶凝固。取96孔板,每

孔加入50 μL ECMatrix™工作液,37℃孵育60 min,使ECMatrix™凝胶凝固。混合消化酶消化(浓度同上)收集Fbs,血清剥夺或非血清剥夺细胞分别培养在含1×链霉素/青霉素的DMEM培养液或含1×链霉素/青霉素、10%FBS的DMEM培养液中。以10⁶/孔的细胞密度将Fbs细胞悬液铺于已凝固的凝胶上,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中孵育,观察细胞交联和管状结构形成情况,最长孵育15 h后细胞开始凋亡。在倒置荧光显微镜下拍照,随机选取低倍镜下(40×)6个视野,计数微血管分叉点数。

1.7 检测Fbs吞噬Dil-Ac-LDL的能力 使用单纯无血清DMEM培养液稀释Dil-Ac-LDL至50 μg/mL,酶消化离心收集细胞,用适量DMEM培养液重悬,每孔加入1×10⁶的细胞至96孔板,加入稀释后的Dil-Ac-LDL工作液50 μL,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中孵育4 h。移除培养液,PBS洗涤3次,荧光显微镜下观察并拍照(激发波长549 nm,发射波长565 nm)。

1.8 检测Fbs分泌VEGF的能力 采用小鼠VEGF ELISA检测试剂盒检测血清剥夺后Fbs分泌VEGF的情况。首先制备标准曲线,后取细胞培养上清100 μL,加入到96孔板孔中,37℃孵育90 min,PBS洗涤3次,加入以适当比例稀释的生物素标记的人VEGF抗体工作液100 μL,37℃孵育60 min。PBS洗涤5次。每孔加入90 μL 四甲基联苯胺(TMB)缓冲液,避光孵育25 min,显色反应完成后立即加入100 μL TMB终止液终止反应。在终止反应30 min内,酶标仪波长选择450 nm为检测波长,603 nm为参考波长,检测光密度(D)值。根据标准曲线获得VEGF质量浓度。

1.9 统计学处理 应用SPSS 18.0软件进行数据分析。所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用Student's *t*检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 Fbs培养及鉴定 原代培养第3天可见Fbs呈突起的纺锤形和新月形结构,其中可见少量搏动的心肌细胞,互相拼凑成岛屿状,部分单个细胞呈圆形,贴壁不完全(图1A);传代后具有搏动

能力的心肌细胞消失, 剩余细胞均匀分布、贴壁良好, 细胞有突起, 部分相互交联, 当细胞密度达 85%~95% 融合时予传代培养。经过 2 次传代, 培养至 7~10 d, 第 3 代 Fbs 互相交联, 此时细胞主要为星形的扁平状结构, 伴少许纺锤形和新月形细胞(图 1B)。qPCR 鉴定结果(图 2)显示在血清剥夺干预前, 细胞表达 Fbs 特异性标志物 *vimentin*, 而不表达 ECs 特异性表面标志物 *CD31*、*VE-herin* 和心肌、内皮干/祖细胞特异性标志物 *isl-1*, 表明成功培养获得 Fbs。

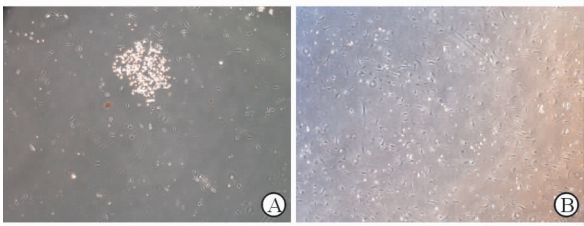


图 1 培养 3~10 d 时 Fbs 的形态特点

Fig 1 Morphology characteristics of fibroblasts (Fbs) after culturing for 3-10 d

A: Fbs grew in clusters; B: Fbs were either star-shaped or spindles and mutually crosslinked. Original magnification: $\times 40$

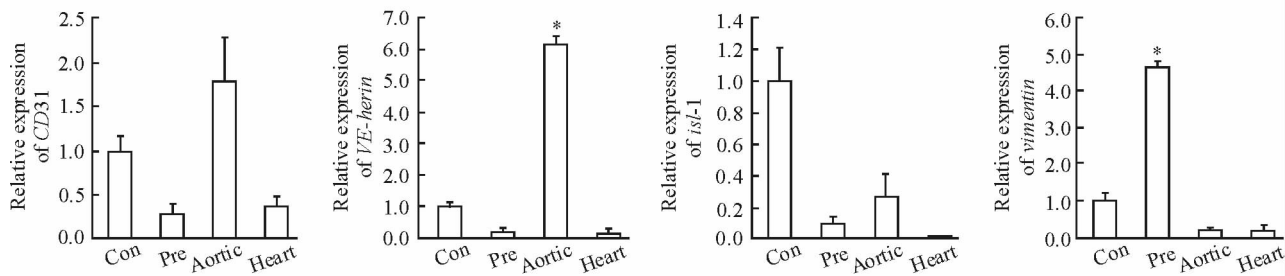


图 2 血清剥夺干预前 Fbs 的鉴定

Fig 2 Identification of fibroblasts (Fbs) before serum deprivation intervention

Con: Newborn C57BL/6 mouse derma; Pre: Newborn C57BL/6 mouse cardiac Fbs (passage 3); Aortic: Newborn C57BL/6 mouse aortic; Heart: Newborn C57BL/6 mouse heart tissue. * $P<0.05$ vs Con. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.2 各组 Fbs 体外血管新生比较 与对照组(0)比较, 各血清剥夺组 Fbs 形成血管分叉的数目均增加 ($P<0.05$)。与血清剥夺 24 h 组 (8.1 ± 1.3) 和血清剥夺 72 h 组 (12.3 ± 1.8) 相比, 血清剥夺 48 h 组 (20.0 ± 2.2) Fbs 的血管分

叉结构增加 ($P<0.05$) ; 此外, 与血清剥夺 48 h 且全程不添加 LIF 组(0)比较, 血清剥夺 48 h 组 Fbs 形成血管结构的能力也提高 ($P<0.05$)。表明血清剥夺可以提高小鼠心肌 Fbs 的体外微血管形成能力。见图 3。

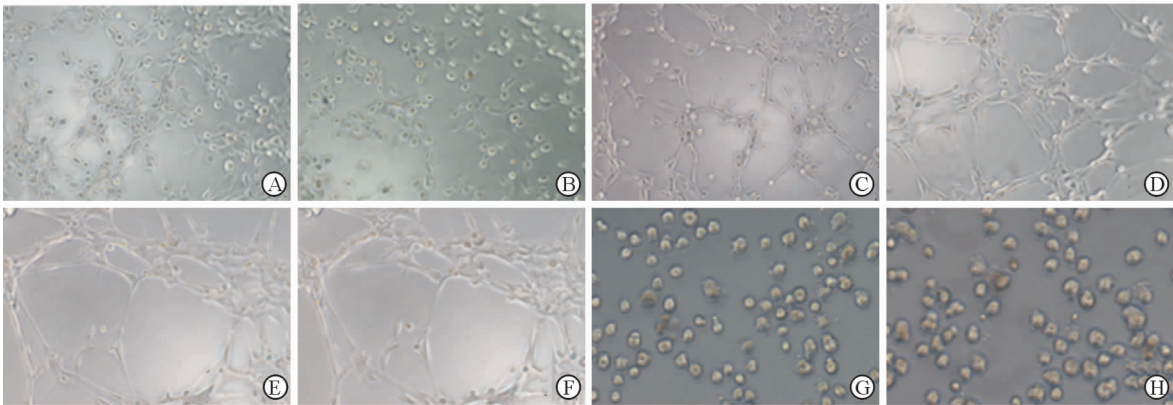


图 3 各组 Fbs 体外血管新生情况

Fig 3 Microvascular of fibroblasts (Fbs) in vitro in each group

A, B: Microvascular at 24 h of serum deprivation in vitro; C, D: Microvascular at 48 h of serum deprivation in vitro; E, F: Microvascular at 72 h of serum deprivation in vitro; G: Microvascular at 48 h of control group in vitro; H: Microvascular at 48 h of serum deprivation without LIF in vitro. LIF: Leukemia inhibitory factor. Original magnification: $\times 40$

2.3 Fbs 吞噬 Dil-Ac-LDL 功能实验结果 倒置荧光显微镜下观察发现,各组 Fbs 中均未观察到诱导细胞吞噬 Dil-Ac-LDL 的现象。

2.4 Fbs 内皮表面标志物的变化 与对照组相比,血清剥夺 48 h 组 Fbs 中内皮特异性基因 *CD31* 和 *VE-herin* 的表达均升高 ($P<0.05$);而血清剥夺 48 h 且全程不添加 LIF 组 Fbs 中 *CD31* 和 *VE-herin* 的表达无明显变化 ($P>0.05$,图 4),表明血清剥夺未能促进其向内皮转分化。进一步比较不同干预时间组 Fbs 中 *CD31* 的表达变化,可见血清剥夺 24 h 组 Fbs 中 *CD31* 的表达和对照组相比无明显变化,而血清剥夺 48 h 组是对照组的 13.7 倍 ($P<0.05$),血清剥夺 72 h 组是对照组的 2 倍 ($P<0.05$),见图 5。

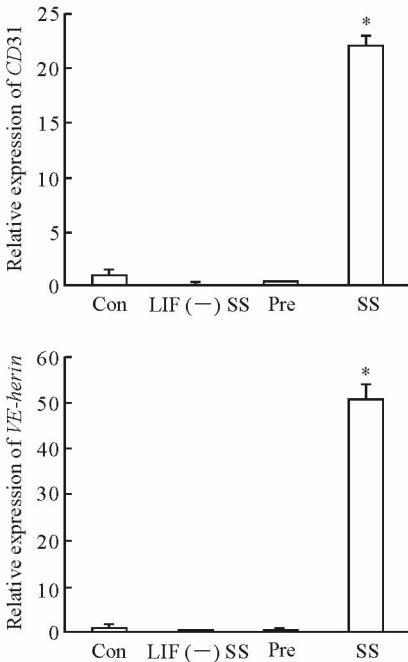


图 4 血清剥夺 48 h 后各组 Fbs 内皮表面标志物的表达
Fig 4 Expression of endothelial markers in fibroblasts (Fbs) after serum deprivation for 48 h

Con: Control; LIF (-) SS: Serum deprivation for 48 h without leukemia inhibitory factor (LIF); Pre: Pre-intervention cell group; SS: Serum deprivation for 48 h. * $P<0.05$ vs Con. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.5 血清剥夺后 Fbs 分泌 VEGF 的能力变化 血清剥夺 24 h 组 VEGF 的浓度与对照组相比差异无统计学意义 [(21.38±9.36) pg/mL vs (34.74±12.46) pg/mL, $P>0.05$];而血清剥夺 48 h 组 [(243.70±24.95) pg/mL]是对照组的 7 倍,血清剥夺 72 h 组 [(127.137±22.88) pg/mL]是对照组的 3.7 倍,差异均有统计学意义

($P<0.05$)。血清剥夺 48 h 组 Fbs 分泌的 VEGF 量最多,与其他时间点血清剥夺组相比差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

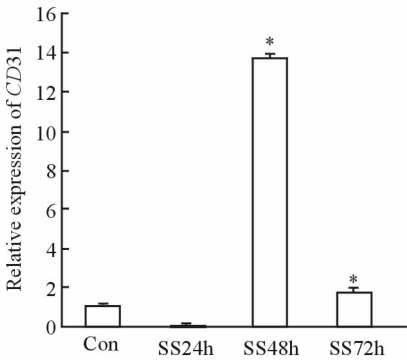


图 5 血清剥夺不同时间点 Fbs 中 *CD31* 的表达
Fig 5 Expression of *CD31* in fibroblasts (Fbs) after different times of serum deprivation

Con: Control; SS24h: Serum deprivation for 24 h; SS48h: Serum deprivation for 48 h; SS72h: Serum deprivation for 72 h. * $P<0.05$ vs Con. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

分化成熟的细胞在损伤修复进程中可以改变它们的细胞表型^[21]。本研究显示已分化的心肌 Fbs 保有一定程度的细胞谱系可塑性,即具有在细胞应激下向内皮样细胞表型转分化的固有潜能。目前,有关心肌常驻 Fbs 的细胞重编程已有报道。Wong 和 Cooke^[22]发现仅用 ETV2、FL II、GATA2 和 KLF4 这 4 种内皮转录因子即可将人新生包皮 Fbs 转分化为 ECs, Fbs 转染病毒载体编码的这 4 种转录因子的开放阅读框后, *KDR*、*CD31*、*CD144*、*FL II*、*GATA2* 和 *KIF4* 等内皮基因的表达显著上调。此外,其他重编程策略也证明人类和小鼠 Fbs 都可以被转分化为 ECs 样的表型^[23-25]。

虽然通过信号转导因子将 Fbs 转分化为 ECs 可作为一种潜在的治疗血管新生的 ECs 来源,但利用 Fbs 固有的细胞可塑性促进血管新生和潜在性减少瘢痕形成来修复损伤心肌,则是一种更新颖的转化策略。Fbs 保有这种特定的转分化为 ECs 的内在潜能并不令人惊讶。无论是在静息状态还是在损伤的心脏组织中, Fbs 都具有广泛的功能,其在发生、发展至成年过程中与 ECs 有着紧密的功能性关联^[14]。心肌梗死后,反应性纤维化和血管新生产生紧密的时空关联,缺血损伤局部的微环境也可能有利于转分化的发生。本研究通过血清剥夺诱导 Fbs

向 ECs 转化, 支持了 Fbs 和 ECs 存在紧密关联这一观点, 也证实了在应激条件下 Fbs 也可以发生转分化。此外, 本研究采用血清剥夺的细胞应激, 旨在模拟急性心肌梗死时局部组织缺血缺氧的微环境, 结果显示血清剥夺刺激可激活心肌 Fbs 转分化为 ECs。但相关的具体机制尚需要进一步探索。有研究发现, p53 及其上下游靶点等应激相关的基因和信号通路中的靶点可能会影响 Fbs 向 ECs 转分化^[11-12]。此外, Ubil 等^[11]发现在小鼠急性心肌梗死造模过程中, 心肌 Fbs(运用示踪技术)从间质向内皮谱系转变的过程除依赖 p53 的调控外, 也可能与心肌梗死细胞应激、局部微环境炎症反应及酸性环境等有关, 但具体机制还不清楚, 由此可推测损伤心肌局部微环境中的细胞因子、炎症介质、激素或外泌体等也可能调控 Fbs 转分化为 ECs, 从而影响血管新生和损伤修复, 表明 Fbs 可能是一种新颖和强有力的 ECs 形成来源。

间质内皮转化(MEndoT)是一种目前还不为人熟知的生理现象, 其在心肌损伤时可能发挥着重要的生理性作用^[8]; 功能上, MEndoT 可通过提供一种高效的策略快速提高心脏损伤区域的血管新生, 抑制或中断 MEndoT 可能会损害心肌梗死后血管新生和心脏功能的修复。研究发现, 非基因整合的方式——化学转分化可以用来加强 MEndoT 和促进损伤后血管新生, 提示 MEndoT 也许可以作为提高血管化和修复缺血组织的治疗性靶点^[8, 13, 26]。本研究分析显示血清剥夺的 Fbs 呈现类似于 ECs 的表型, 其表达 CD31 和 VE-herin 的能力显著提高, 在功能学上获得了 ECs 的一些特点, 其在体外形成微血管和分泌 VEGF 的能力较非血清剥夺干预细胞显著提高。然而, Dil-Ac-LDL 吞噬功能实验结果显示各组均未观察到诱导细胞吞噬 Dil-Ac-LDL 现象, 由此可推测血清剥夺后产生的诱导型 ECs 可能是一种幼稚的、功能不完全的细胞, 血清剥夺也可能抑制了诱导细胞的部分功能。但在血清剥夺后再加入 FBS, 观察和评估诱导细胞是否能维持内皮表型、诱导细胞传代后能否维持表型稳定及维持时间均有待进一步研究。综上, 血清剥夺导致小鼠心肌 Fbs 表达多种内皮特异性标志物, 其中分泌 VEGF 的能力显著增加, 并且在体外形成微血管样结构, 表明血清剥夺诱导了 Fbs 向内皮转分化。未来研究可通过阐

明血清剥夺诱导转分化的具体分子机制来调控 Fbs 向 ECs 的谱系转变, 促进血管新生和心肌损伤修复, 此外, 还可通过示踪技术来证明在体 Fbs 向内皮转分化的生理学进程和相应治疗的重要性和可行性。

综上所述, Fbs 具有转分化为 ECs 的潜能, 激活这种潜能并促进“治疗性血管新生”的同时减轻纤维化将是一种新颖的、有前景的心肌缺血损伤的治疗策略, 而完全使用小分子的不整合外源性基因的化学转分化将是再生医学的理想目标之一。

[参考文献]

[1] QIAN L, HUANG Y, SPENCER C, FOLEY A, VEDANTHAM V, LIU L, et al. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes [J]. *Nature*, 2012, 485: 593-598.

[2] SONG K, NAM Y J, LUO X, QI X, TAN W, HUANG G N. et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors [J]. *Nature*, 2012, 485: 599-604.

[3] CAIAZZO M, GIANNELLI S, VALENTE P, LIGNANI G, CARISSIMO A, SALESS A, et al. Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors [J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4: 25-36.

[4] BROCKES J P, KUMAR A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 566-574.

[5] HADORN E. Transdetermination in cells[J]. *Sci Am*, 1968, 219: 110-114.

[6] SLACK J M. Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 369-378.

[7] FU Y, HUANG C, XU X, GU H, YE Y, JIANG C, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails[J]. *Cell Res*, 2015, 25: 1013-1024.

[8] XIE X, SUN A, HUANG Z, ZHU W, WANG S, ZOU Y, et al. Another possible cell source for cardiac regenerative medicine: reprogramming adult fibroblasts to cardiomyocytes and endothelial progenitor cells[J]. *Medical Hypotheses*, 2010, 76: 365-367.

- [9] ZHOU Q, BROWN J, KANAREK A, RAJAGOPAL J, MELTON D A. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells[J]. Nature, 2008, 455: 627-632.
- [10] LIU K, YU C, XIE M, LI K, DING S. Chemical modulation of cell fate in stem cell therapeutics and regenerative medicine[J]. Cell Chem Biol, 2016, 23: 893-916.
- [11] UBIL E, DUAN J, PILLAI I C, ROSA-GARRIDO M, WU Y, BARGIACCHI F, et al. Mesenchymal-endothelial transition contributes to cardiac neovascularization[J]. Nature, 2014, 514: 585-590.
- [12] BRUMM A J, NUNEZ S, DOROUNDCHI M, KAWAGUCHI R, DUAN J, PELLEGRINI M, et al. Astrocytes can adopt endothelial cell fates in a p53-dependent manner[J/OL]. Mol Neurobiol, 2016. doi: 10.1007/s12035-016-9974-3.
- [13] SAYED N, WONG W T, OSPINO F, MENG S, LEE J, JHA A, et al. Transdifferentiation of human fibroblasts to endothelial cells role of innate immunity [J]. Circulation, 2015, 131: 300-309.
- [14] CHRISTIA P, BUJAK M, GONZALEZ-QUESADA C, CHEN W, DOBACZEWSKI M, REDDY A, et al. Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction[J]. J Histochem Cytochem, 2013, 61: 555-570.
- [15] COHN J, FERRARI R, SHARPE N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35: 569-582.
- [16] KOCHER A A, SCHUSTER M D, SZABOLCS M J, TAKUMA S, BURKHOFF D, WANG J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function[J]. Nat Med, 2001, 7: 430-436.
- [17] SOUDERS C A, BOWERS S L, BAUDINO T A. Cardiac fibroblast: the renaissance cell[J]. Circ Res, 2009, 105: 1164-1176.
- [18] ZEISBERG E M, TARNAVSKI O, ZEISBERG M, DORFMAN A L, McMULLEN J R, GUSTAFSSON E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13: 952-961.
- [19] CHINTALGATTU V, NAIR D M, KATWA L C. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR[J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35: 277-286.
- [20] ZHAO L, EGHBALI M. Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1538: 273-282.
- [21] TOSH D, SLACK J M. How cells change their phenotype[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3: 187-194.
- [22] WONG W T, COOKE J P. Therapeutic transdifferentiation of human fibroblasts into endothelial cells using forced expression of lineage-specific transcription factors[J/OL]. J Tissue Eng, 2016, 7: 2041731416628329. doi: 10.1177/2041731416628329.
- [23] NIU W, ZANG T, ZOU Y, FANG S, SMITH D, BACHOO R, et al. *In vivo* reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15: 1164-1175.
- [24] TORPER O, PFISTERER U, WOLF D, PEREIRA M, LAU S, JAKOBASSON J, et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: 7038-7043.
- [25] ROUAUX C, ARLOTAA P. Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons *in vivo* [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15: 214-221.
- [26] XU A, CHENG L. Chemical transdifferentiation: closer to regenerative medicine[J]. Front Med, 2016, 10: 152-165.

[本文编辑] 曾奇峰