

视黄酸通路的启示* ——从心脏发育到心肌谱系定向分化

雷 伟^{1,2)} 苗淑梅²⁾ 秦念慈²⁾ 丁 楠²⁾ 韩兴龙^{1,2)} 赵振奥^{1,2)**}

(¹⁾ 苏州大学附属第一医院心脏大血管外科, 苏州 215007; ²⁾ 苏州大学心血管病研究所, 苏州 215007)

摘要 多潜能干细胞具有无限增殖的能力, 并能够分化为心肌细胞, 因此在心脏再生方面拥有巨大潜力. 胚胎发育过程为干细胞定向分化提供了重要线索, 在过去的几年中, 通过操控心脏发育关键通路, 在心肌定向分化方面取得了重要进展, 但是现有的分化方法仍不能稳定地诱导心肌细胞, 表明现有的通路不能有效解决这些问题. 视黄酸(RA)通路在心脏发育过程中发挥重要作用, RA 缺失会导致心房变小、心室小梁减少、心肌壁增厚且细胞间连接松散. 在体外心肌定向分化过程中, RA 多用于促进多潜能干细胞向心房分化. 但从 RA 通路基因敲除小鼠的表型来看, 除了调控心肌亚型分化, RA 在多个发育阶段发挥重要作用. 深入解析 RA 在心肌分化各阶段的作用机制, 将有助于获得高质量的心肌细胞. 同时, 研究 RA 在心内膜和心外膜分化中的作用机制也有助于解释 RA 通路敲除小鼠的心脏异常. 总之, 从 RA 在胚胎发育中的作用来看, 需要更多的体外研究来揭示 RA 在心肌谱系分化中的作用. 本文综述了 RA 通路在心脏发育的心肌分化过程中的作用, 并探讨了需要解决的问题.

关键词 视黄酸, 心肌细胞, 多潜能干细胞, 定向分化

学科分类号 Q28

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0157

1 心脏病干细胞治疗现状

根据《中国心血管病报告 2015》, 2014 年心血管病死亡率仍居首位, 每 5 例死亡者中就有 2 例死于心血管病. 与 1990 年相比, 2013 年心血管病死亡的绝对数字增加了 46%, 其中, 缺血性心脏病死亡人数增加了 90.9%. 冠状动脉堵塞造成的缺血和随后的再灌注会引起不可逆的细胞损伤, 造成心肌细胞坏死, 心脏收缩功能下降. 由于成体心肌细胞缺乏再生能力, 无法修复坏死心肌, 细胞移植可能成为缺血性心脏病的有效治疗途径. 目前, 尽管间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)对心肌梗死病人功能改善有积极作用, 但其在体内分化为心肌细胞的能力有限, 长期效果不佳, 因此需要更为有效的种子细胞. 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是从囊胚内细胞团分离出来的一类细胞, 它具有无限增殖的能力, 并能够分化成机体内的各种细胞及组织, 包括心肌和血管内皮, 因此在心肌梗死治疗方面有非常广阔的应用前景.

2006 年诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)技术的出现, 绕开了胚胎干细胞的伦理问题和免疫排斥问题, 为干细胞应用和再生医学带来了新的希望^[1-3]. iPSC 和胚胎干细胞统称为多潜能干细胞, 它们具有相似的增殖能力和分化潜能, 并且分化机制相似, 在心脏修复方面具有很大的应用潜力. 研究多潜能干细胞的定向分化机制, 获得功能性的心肌细胞, 是心脏修复的关键.

2 心肌细胞的分化

胚胎心脏发育过程为 ESC 向心肌细胞的定向分化提供了重要线索, 因此操控心脏发育相关通路、模拟心脏发育过程, 是进行心肌细胞定向诱导

* 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20150320), 国家自然科学基金青年项目(81600218)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0512-67781961, E-mail: zhao22840718@163.com

收稿日期: 2017-08-30, 接受日期: 2018-09-10

的最佳策略. 最初, 通过自发分化的胚状体(embryoid body, EB)贴壁培养, 可以获得心肌细胞, 但分化效率很低(约 1%), 并且只限于特定的 ESC 系. 后来, 在胚状体分化过程中加入调控心脏发育的细胞因子, 可以提高心肌细胞的分化效率. 目前, 尽管悬滴法、微孔法等可以使 EB 大小尽量一致, 但 EB 分化操作繁琐、实验重复性差的问题仍没有解决^[4]. 但非常值得肯定的是, 早期这些 EB 分化研究, 明确了 WNT3A、BMP4、Activin A 和 FGF2 等发育相关通路在心肌分化不同阶段的作用^[5]. 在 2002 年, Mummery 等^[6]通过贴壁培养的方法把人 ESC(hESC)与小鼠的内脏内胚层细胞系(END-2)共培养获得了分化的心肌细胞, 开启了 2D 诱导的先河, 证明了 2D 培养条件下, 诱导心肌细胞的可能性. 在这些前期研究的基础上, Laflamme 等^[7]通过加入 Activin A 和 BMP4 刺激 hESC, 首次实现了单层培养条件下, 定向诱导心肌细胞. 2012 年, Lian 等^[8]通过调节经典 WNT 通路的开启和关闭实现了心肌细胞的定向分化, 之后基于这一原理, 实现了在成分明确的培养基中进行心肌细胞的定向分化^[9-11], 为心肌细胞的临床应用奠定了基础.

目前, 尽管通过优化细胞因子和抑制剂的组合及浓度可以高效诱导心肌细胞, 但根据我们的实际操作和相关报道^[5, 12], 仍存在以下问题: a. 同一株 hESC 系, 分化效率不稳定; b. 在一株 hESC 系中, 优化的心肌诱导条件, 不能直接应用到另一株 hESC 系, 需要重新摸索条件; c. 所分化的细胞是心室细胞、心房细胞和起搏细胞的混合物, 在成分明确的培养基中, 尚不能实现高效的特定心肌亚型的定向分化; d. 所分化的心肌细胞成熟度不够, 并且成熟程度不均一, 存在肌丝排列不整齐等现象. 因此, 只针对 WNT、BMP4、Activin A 和 FGF2 几个经典通路进行优化, 可能难有突破. 对更多的信号通路进行探索, 将有助于这几个关键问题的解决.

3 RA 通路的概述

视黄酸(retinoic acid, all-trans-RA, RA)是来源于视黄醇(retinol, 又称维生素 A, vitamin A)的形态发生素, 在细胞生长、分化和器官发生过程中发挥重要作用. 视黄醇首先被 RBP4 结合, 经 STRA6 运到细胞质内, 之后经两步连续的脱氢反应形成 RA. RA 通过结合 RAR/RXR 二聚体中的

RAR 激活二聚体的转录因子活性, 调控靶基因的表达, 在不同的转录辅因子作用下, RA 既可以激活基因表达, 也可以抑制基因表达(图 1)^[13-15]. 尽管 9-cis-RA 可以通过结合 RXR 调控基因转录, 但体内 9-cis-RA 很难检测到, 研究发现 all-trans-RA 可以独立激活视黄酸通路^[16].

4 RA 信号通路在心脏发育中的作用

维生素 A 及其代谢产物统称为类维生素 A 类(retinoids)物质, 动物细胞不能产生类维生素 A 类物质, 只能以维生素 A 的形式摄入, 然后经视黄醛生成 RA. 在大鼠中, 母体维生素 A 不足会导致胚胎出现心室小梁形成异常, 心室肌细胞早熟分化等现象. 但哺乳动物中, 由于维生素 A 完全缺乏会导致雌性不育, 相关心脏发育数据很难得知. 而鹌鹑的胚胎发育模型可以实现维生素 A 完全缺乏, 在鹌鹑的胚胎发育过程中, 维生素 A 完全缺乏会导致早期心脏发育异常, 包括心腔过度扩张、心脏环化异常、流入道(inflow tract)发育异常等^[17]. 这些实验表明, 维生素 A 在心脏发育过程中发挥重要作用, 但维生素 A 是否通过形成 RA 发挥作用还需要其他证据.

在脊椎动物胚胎发育过程中, 不同物种或不同发育阶段过量注入 RA, 会导致不同程度的心脏发育异常, 如: 两侧心脏原基融合缺陷、心脏环化(heart looping)缺陷、心管后端变短而前端扩张等^[17]. 这些实验在一定程度上证明了 RA 通路在心脏发育过程中发挥作用, 但很难排除过量 RA 的毒性作用. 基因敲除技术为研究信号通路提供了有力工具, 随着 RA 通路基因敲除小鼠的建立, 才真正证明维生素 A 通过代谢产生 RA 影响心脏发育, 其中最关键的是 *Raldh2*(亦称 *Aldh1a2*). *Raldh2* 是负责维生素 A 第二步氧化、转化为 RA 的关键酶, 在原条和中胚层中高表达, 暗示着其在原条或中胚层形成过程中发挥重要作用. 通过对 *Raldh2* 进行基因敲除发现, *Raldh2* 敲除小鼠胚胎发育异常, 前后轴向缩短, 在妊娠中期(E10.5)致死. 从形态上, 胚胎心管形成正常, 但不能环化, 腔室单一且扩张, 心室心肌层薄, 细胞间接触松散; 从基因表达看, RA 通路下游基因表达异常, 表明 *Raldh2* 敲除影响了内源 RA 通路活化. 另外, 在母体中注射 RA 可以挽救 *Raldh2* 敲除胚胎的异常表型, 进一步证明了 RA 通路在心脏发育过程中的重要作用^[17-18]. 若进行瞬时的母体 RA 注射(E7.5~8.5d), 可以挽

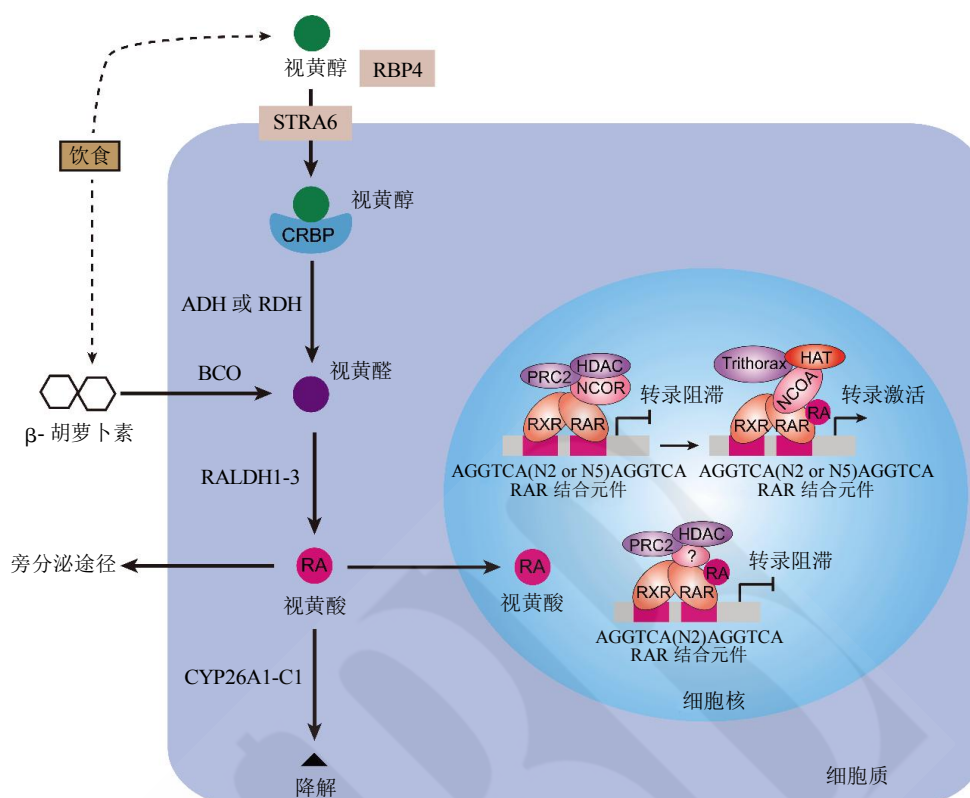


Fig. 1 Regulation of retinoid signaling pathway

图 1 RA 的形成及其作用机制

在 RA 形成过程中, 视黄醇(retinol)可以被视黄醇结合蛋白 RBP4 结合, 通过 STRA6 受体转运进细胞内, 在乙醇脱氢酶(ADH)或视黄醇脱氢酶(RDH)作用下转变为视黄醛(retinaldehyde), 视黄醛脱氢酶(RALDH1-RALDH3, ALDH1A1-ALDH1A3)催化视黄醛形成视黄酸(all-trans-RA), 细胞内的视黄酸结合蛋白(CRABP)可以参与运送 RA 进入细胞核, 结合到 RAR 反应元件(RARE), 调节(激活或抑制)基因转录, RA 也可以通过旁分泌的方式作用于附近的细胞, RA 的降解通过 CYP26A1-C1 完成^[14-15].

救 *Raldh2* 敲除胚胎的早期致死表型, 但到 E11.5~14.5d 时, 心室致密层仍然生长变慢, 这可能是由于心肌前体细胞的分化受到抑制所致^[19]. 这表明 RA 通路在不同的发育阶段发挥不同的作用.

此外, RAR 和 RXR 受体敲除的小鼠会表现出心室小梁形成异常、心室肌细胞早熟分化、流出道分隔缺陷等表型. 由于 RAR (RAR α 、RAR β 、RAR γ)和 RXR (RXR α 、RXR β 、RXR γ)受体间存在功能冗余现象, 单独敲除时表型较弱, 联合敲除时表型加重^[20-21]. 上述研究结果表明机体有一整套复杂的调控机制, 严格控制 RA 通路的活性, 从而维持胚胎正常发育.

总之, 维生素 A 缺乏实验和 RA 通路基因敲除小鼠模型表明, 维生素 A 通过代谢产生内源的 RA, 在胚胎心脏发育的不同阶段发挥重要作用.

5 RA 信号通路调节心脏发育的机制

在早期心脏发育过程中, RA 信号通路可通过

调节 *Hox* 基因家族、*Tbx5* 和 *Fgf8* 等基因表达发挥功能^[14]. 对于 *Hox* 家族, RA 可调控下游靶基因 *Hoxb1*、*Hoxa1* 和 *Hoxa3* 在第二心区不同区域的心脏前体细胞中表达, 参与心房和流出道下壁形成^[22]. *Pbx*、*Meis* 和 *Hox* 基因也在第二心区共表达, 在基因缺失的小鼠也具有相似的心脏表型, 其中 *Raldh2* 的表达受 HOX、PBX 和 MEIS 形成的复合物直接转录调控, RA 信号的维持主要通过 *Hox* 基因参与的自调节机制来完成^[23]. RA 还可激活第二心区后端和第一心区中心心脏前体细胞标志分子 *Tbx5* 的表达, 进而激活腔室特异基因 *Nppa* 和 *Nppb* 的表达, 特化第一心区中的 *Tbx5* 阳性细胞向心室和心房细胞分化^[24]. *Fgf8* 是调节第二心区信号的重要分子, 其转录起始位点上游存在结合 RA 受体的 RARE 位点. 小鼠 *Raldh2* 敲除胚胎研究显示, 内源性 RA 通过直接抑制 *Fgf8* 的转录来限制第二心区的大小^[25], 且 RA 对 *Fgf8* 表达的抑制是斑马鱼心脏正常发育所必需的^[26]. 但 CRISPR/Cas9 介导的

Fgf8 基因启动子区 RARE 序列敲除并不影响心脏发育和心脏中 *Fgf8* 的表达, 提示 *Fgf8* 基因组区域存在其他 DNA 元件可替代 RARE 来介导 RA 对 *Fgf8* 的抑制作用^[27].

在心脏发育晚期, RA 信号调节心内膜细胞的内皮-间质转化过程, 以使得心内膜垫正常融合和流出道分隔, 并参与心外膜的形成^[28]. *Raldh2* 是心外膜细胞中 *Wt1* 的直接靶基因, *Wt1* 通过 β -catenin 和 RA 信号通路介导调节上皮-间质转化, 使心外膜迁移分化为成纤维细胞和冠状血管平滑肌细胞^[29]. 在随后的心脏发育过程中, RA 信号通路可通过上调靶基因 *Tcf21* 的表达来抑制心外膜来源细胞分化成平滑肌细胞^[30]. 研究显示, 持续表达 *Wt1* 和 *Raldh2* 的心外膜来源细胞最先填充于心外膜下区域, 随后迁移到心室肌中, 分化形成平滑肌和内皮细胞. 在 VEGF 协同作用下, RA 可抑制平滑肌标志分子 CRP2、GATA-6、SRF 和 SM22A 的表达, 使得平滑肌细胞分化相对晚于内皮, 以利于冠状动脉壁内膜和外膜的正常形成^[31]. 而随着心外膜来源细胞分化形成冠状动脉平滑肌和内皮细胞, *Wt1* 和 *Raldh2* 的表达逐渐下降. 此外, RA 可刺激肝促红细胞生成素表达, 进而激活心外膜中 IGF2 的分泌, 刺激心肌增生^[32]. 心外膜分泌的红细胞生成素和 RA 参与调节 PI3K/ERK、FGF2-9 和 WNTs 等多种心肌增殖信号, 是心肌增殖所必需的诱导因素^[14]. 总之, RA 通过调节多条信号通路和转录因子, 调控心脏正常发育.

6 RA 通路在心肌谱系分化过程中的作用

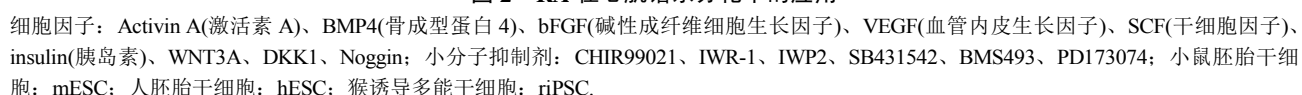
在鸡和小鼠胚胎的发育过程中, 注入过量的 RA 会导致心房增大而心室变小, 反之注入抑制 RA 合成的药物 disulfiram(视黄醛脱氢酶抑制剂), 会导致心房变小而心室增大^[24, 33]. 利用胚胎发育过程中 RA 对心房的诱导作用, Hidaka 等^[34]在 2003 年报道, 在小鼠 EB 分化过程中, 第 4~8d 加入 10^{-7} mol/L RA 会促进 ESC 向心房细胞的分化, 这与 RA 的体内诱导心房增大的结果是一致的. 而 EB 分化过程中 disulfiram 既不能显著增加心室肌的比例, 也不能抑制心房肌细胞的分化, 这与胚胎发育过程中注入 disulfiram 促进心室增大的效果是不一致的, 这有可能与体外分化过程中 RA 通路本底浓度有关, 在体外培养时 RA 主要来源于培养液和细胞自身合成, 培养液对 RA 有稀释作用, 而体

内很可能局部形成较高的 RA 浓度, 因此体内 disulfiram 效果更明显. 虽然这些实验证明了 RA 对心房的诱导作用, 但在 1997 年, Wobus 等^[35]发现小鼠 EB 分化第 5~15d 加入 10^{-8} 或 10^{-9} mol/L RA 会促进心室肌样细胞和浦肯野样细胞分化, 这表明不同时间或不同浓度的 RA 可能会有截然不同的诱导效果, 但还需要进一步证实.

在人的心肌分化体系中, 中国科学院生物物理研究所马跃研究组利用单层诱导体系发现, 在人 ESC 分化第 5~8d 加入 RA 会促进心房细胞的分化, 而 RA 通路抑制剂 BMS-189453 或 BMS493 会促进心室肌细胞分化^[36-37], 近期一些研究也表明 RA 会促进心房肌细胞和起搏肌细胞的分化^[38-40]. 并且马跃研究组在成分明确的培养基中, 实现了人和猴 iPSC 向心房和心室细胞的定向分化^[37, 41], 这证明了 RA 通路在人和猴之间的物种保守性. 近期 Keller 等^[40]发现人的心室肌和心房肌细胞来源于不同的中胚层亚群, 分化早期的 ALDH⁺ 中胚层细胞可以通过分泌 RA 促进心房肌细胞分化. 因此, 在分化第 3~5d 加入 RA 即可高效诱导心房肌细胞, 这为心房肌细胞的诱导提供了理论基础.

值得注意的是, 在小鼠、人和猴的心肌定向分化体系中, RA 均能促进心房肌细胞的分化, 但 RA 通路抑制剂的效果并不相同, 我们分析可能有以下几方面原因: a. 胚胎干细胞的差异, 小鼠的 ESC 处于更为幼稚的状态, 相当于内细胞团阶段, 而人和猴的多潜能干细胞相当于着床后胚胎表胚层阶段; b. 分化体系不同, 小鼠 ESC 利用的 EB 分化方法, 而人和猴的多潜能干细胞利用 2D 培养方法; c. 抑制剂的作用原理不同, disulfiram 通过抑制视黄醛脱氢酶活性抑制 RA 合成, 而 BMS-189453 和 BMS493 直接抑制 RAR 受体. 其中 disulfiram 和 BMS-189453/BMS493 在人 ESC 定向分化过程中的作用, 还需要进一步验证.

此外, 近期研究发现在调控 WNT 通路的基础上, 在分化过程中进行 RA 和 CHIR99021(WNT 通路激活剂)联合处理会促进 TBX18⁺/WT1⁺ 心外膜样细胞的分化^[42-43]. 心外膜在心肌梗死后可以促进新血管的形成和心肌再生, 心外膜细胞的分化为心肌梗死的细胞治疗提供了新的手段. 总之, 这些结果证明了利用发育生物学线索指导细胞定向分化的可行性, 我们对现有的 RA 诱导心肌谱系的方法进行了系统总结(图 2).



心肌分化的最终目的是细胞移植, 当前多潜能干细胞分化的心肌细胞是一个混合体, 主要包括心室肌细胞、心房肌细胞和起搏肌细胞, 在细胞移植后会增加心律失常的风险. 目前在非人灵长类动物的实验中表明, 心肌细胞的移植会导致心律失常的发生^[44-45], 我们认为主要有两方面原因: a. 移植的心肌细胞不能有效与宿主细胞偶联; b. 心肌细胞的不均一性, 引起移植细胞自主跳动. 而纯心室肌细胞的移植有望阐明这一问题, 从而为临床级细胞的获得和细胞移植提供重要参考.

7 展 望

总之, RA 通路在心脏发育和心肌分化过程中发挥重要作用. 目前, 虽然证明了 RA 对心肌亚型分化的调控作用, 但从 *Raldh2* 敲除小鼠胚胎异常的表型来看, 仍不能解释心室扩张、心肌层薄、细胞间接触松散等表型. 目前对 RA 在心肌分化过程中的研究还远远不够, 深入研究 RA 对心肌细胞增殖与成熟的影响、以及对心内膜和心外膜分化的调控作用, 有望解释这些结构异常的表型. 从发育阶段上讲, RA 通路在胚胎发育多个阶段发挥作用, 随着成分明确的培养体系的建立, 使得系统研究 RA 在心肌分化各阶段的作用成为可能. 通过高通量测序技术, 深入 RA 的内在作用机制, 揭示 RA 通路在各分化阶段的作用机制, 将为心脏发育和心肌细胞分化提供新的见解. 有助于解决心肌分化效率低、亚型不均一、成熟度低等问题, 为临床级心肌细胞的制备提供理论依据.

参 考 文 献

- [1] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, **318**(5858): 1917-1920
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, **131**(5): 861-872
- [3] Park I H, Zhao R, West J A, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, **451**(7175): 141-146
- [4] Mummery C L, Zhang J, Ng E S, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circulation Research*, 2012, **111**(3): 344-358
- [5] Zhang M, Schulte J S, Heinick A, *et al.* Universal cardiac induction of human pluripotent stem cells in two and three-dimensional formats: implications for *in vitro* maturation. *Stem Cells*, 2015, **33**(5): 1456-1469
- [6] Mummery C, Ward D, Van Den Brink C E, *et al.* Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Journal of Anatomy*, 2002, **200**(Pt 3): 233-242
- [7] Laflamme M A, Chen K Y, Naumova A V, *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotechnology*, 2007, **25**(9): 1015-1024
- [8] Lian X, Hsiao C, Wilson G, *et al.* Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells *via* temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(27): E1848-1857
- [9] BurrIDGE P W, Matsa E, Shukla P, *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature Methods*, 2014, **11**(8): 855-860
- [10] Lian X, Bao X, Zilberter M, *et al.* Chemically defined, albumin-free human cardiomyocyte generation. *Nature Methods*, 2015, **12** (7): 595-596
- [11] Tan Y, Han P, Gu Q, *et al.* Generation of clinical-grade functional cardiomyocytes from human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018, **12**(1): 153-163
- [12] Loh K M, Chen A, Koh P W, *et al.* Mapping the pairwise choices leading from pluripotency to human bone, heart, and other mesoderm cell types. *Cell*, 2016, **166**(2): 451-467
- [13] Niederreither K, Dolle P. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nature Reviews Genetics*, 2008, **9**(7): 541-553
- [14] Stefanovic S, Zaffran S. Mechanisms of retinoic acid signaling during cardiogenesis. *Mechanisms of Development*, 2017, **143**: 9-19
- [15] Cunningham T J, Duester G. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, **16**(2): 110-123
- [16] Mic F A, Molotkov A, Benbrook D M, *et al.* Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(12): 7135-7140
- [17] Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, *et al.* Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development*, 2001, **128**(7): 1019-1031
- [18] Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, *et al.* Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet*, 1999, **21**(4): 444-448
- [19] Lin S C, Dolle P, Ryckebusch L, *et al.* Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(20): 9234-9239
- [20] Kastner P, Grondona J M, Mark M, *et al.* Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*, 1994, **78**(6): 987-1003
- [21] Merki E, Zamora M, Raya A, *et al.* Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(51): 18455-18460

- [22] Bertrand N, Roux M, Ryckebusch L, *et al.* Hox genes define distinct progenitor sub-domains within the second heart field. *Developmental Biology*, 2011, **353**(2): 266–274
- [23] Vitobello A, Ferretti E, Lampe X, *et al.* Hox and Pbx factors control retinoic acid synthesis during hindbrain segmentation. *Dev Cell*, 2011, **20**(4): 469–482
- [24] Xavier-Neto J, Neville C M, Shapiro M D, *et al.* A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development*, 1999, **126**(12): 2677–2687
- [25] Ryckebusch L, Wang Z, Bertrand N, *et al.* Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(8): 2913–2918
- [26] Sorrell M R, Waxman J S. Restraint of Fgf8 signaling by retinoic acid signaling is required for proper heart and forelimb formation. *Developmental Biology*, 2011, **358**(1): 44–55
- [27] Kumar S, Cunningham T J, Duester G. Nuclear receptor corepressors Ncor1 and Ncor2 (Smrt) are required for retinoic acid-dependent repression of Fgf8 during somitogenesis. *Developmental Biology*, 2016, **418**(1): 204–215
- [28] Xavier-Neto J, Sousa Costa A M, Figueira A C, *et al.* Signaling through retinoic acid receptors in cardiac development: doing the right things at the right times. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, **1849**(2): 94–111
- [29] Von Gise A, Zhou B, Honor L B, *et al.* WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through beta-catenin and retinoic acid signaling pathways. *Developmental Biology*, 2011, **356**(2): 421–431
- [30] Braitsch C M, Combs M D, Quaggin S E, *et al.* Pod1/Tcf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart. *Developmental Biology*, 2012, **368**(2): 345–357
- [31] Azambuja A P, Portillo-Sanchez V, Rodrigues M V, *et al.* Retinoic acid and VEGF delay smooth muscle relative to endothelial differentiation to coordinate inner and outer coronary vessel wall morphogenesis. *Circulation Research*, 2010, **107**(2): 204–216
- [32] Brade T, Kumar S, Cunningham T J, *et al.* Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial Igf2. *Development*, 2011, **138**(1): 139–148
- [33] Yutzey K E, Rhee J T, Bader D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. *Development*, 1994, **120**(4): 871–883
- [34] Hidaka K, Lee J K, Kim H S, *et al.* Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB Journal*, 2003, **17**(6): 740–742
- [35] Wobus A M, Kaomei G, Shan J, *et al.* Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1997, **29**(6): 1525–1539
- [36] Zhang Q, Jiang J, Han P, *et al.* Direct differentiation of atrial and ventricular myocytes from human embryonic stem cells by alternating retinoid signals. *Cell Research*, 2011, **21**(4): 579–587
- [37] Pei F, Jiang J, Bai S, *et al.* Chemical-defined and albumin-free generation of human atrial and ventricular myocytes from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 2017, **19**: 94–103
- [38] Protze S I, Liu J, Nussinovitch U, *et al.* Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nature Biotechnology*, 2017, **35**(1): 56–68
- [39] Devalla H D, Schwach V, Ford J W, *et al.* Atrial-like cardiomyocytes from human pluripotent stem cells are a robust preclinical model for assessing atrial-selective pharmacology. *EMBO Molecular Medicine*, 2015, **7**(4): 394–410
- [40] Lee J H, Protze S I, Laksman Z, *et al.* Human pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes develop from distinct mesoderm populations. *Cell Stem Cell*, 2017, **21** (2): 179–194 e174
- [41] Zhang X, Cao H, Bai S, *et al.* Differentiation and characterization of rhesus monkey atrial and ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 2017, **20**: 21–29
- [42] Zhao J, Cao H, Tian L, *et al.* Efficient differentiation of TBX18+/WT1+ epicardial-like cells from human pluripotent stem cells using small molecular compounds. *Stem Cells and Development*, 2017, **26**(7): 528–540
- [43] Iyer D, Gambardella L, Bernard W G, *et al.* Robust derivation of epicardium and its differentiated smooth muscle cell progeny from human pluripotent stem cells. *Development*, 2015, **142** (8): 1528–1541
- [44] Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, *et al.* Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*, 2016, **538**(7625): 388–391
- [45] Chong J J, Yang X, Don C W, *et al.* Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*, 2014, **510**(7504): 273–277

Functions of Retinoic Acid in Heart Development and Cardiac Lineage Differentiation*

LEI Wei^{1,2)}, MIAO Shu-Mei²⁾, QIN Nian-Ci²⁾, DING Nan²⁾, HAN Xing-Long^{1,2)}, ZHAO Zhen-Ao^{1,2)**}

⁽¹⁾ Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215007, China;

⁽²⁾ Institute for Cardiovascular Science, Soochow University, Suzhou 215007, China)

Abstract Pluripotent stem cells (PSCs) hold unlimited proliferation ability and the potential to generate cardiomyocytes, providing new sources of cells for heart regeneration. Development biology provides important clues for directed differentiation. During the past few years, great progresses on cardiomyocyte differentiation have been made by manipulating cardiac developmental pathways. However, the protocol for directed cardiomyocyte differentiation is not reproducible between cell lines, indicating that current pathways are not efficient enough. Retinoic acid (RA) pathway deficiency in embryo results in severe heart development abnormalities, including impaired atria development, reduced trabeculae, thickened myocardium and loosely attached cells in ventricle. During directed cardiomyocyte differentiation, RA were mainly used for atrial cardiomyocytes induction from pluripotent stem cells. However, based on the phenotypes of RA pathway knockout mice, the function of RA is not limited to cardiac subtypes specification. Exploring the mechanisms of RA on different stages of cardiac differentiation will contribute to directed differentiation of cardiomyocyte. Meanwhile, clarifying the mechanisms of RA in endocardial and epicardial differentiation will explain the impaired heart development of RA deficiency. In conclusion, according to the functions of RA in heart development, more *in vitro* studies on cardiac lineages differentiation should be performed to uncover the mechanisms of RA. Here, we reviewed the functions of RA in cardiac development and cardiomyocyte differentiation, and discussed the issues need to be solved further.

Key words retinoic acid, cardiomyocyte, pluripotent stem cells, directed differentiation

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0157

* This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20150320) and The National Natural Science Foundation of China (81600218).

**Corresponding author.

Tel: 86-512-67781961, E-mail: zhao22840718@163.com

Received: August 30, 2017 Accepted: September 10, 2018