

## 人诱导性多潜能干细胞建立心肌细胞疾病模型的研究进展

崔 宁<sup>1</sup>, 李 蕾<sup>1</sup>, 崔 鸣<sup>1\*</sup>, 兰 峰<sup>2</sup>

(1. 北京大学第三医院 心内科, 北京 100191; 2. 首都医科大学附属北京安贞医院  
北京市心肺血管疾病研究所, 北京 100029)

**摘要:** 诱导性多潜能干细胞是干细胞研究领域里程碑式的发现,近 10 年发展迅速。通过体细胞获得诱导性多潜能干细胞,再进一步分化成心肌细胞,可建立不同的心肌细胞疾病模型,并用于疾病的机制研究、药物筛选和基因治疗等。本文对已成功构建的人诱导多潜能干细胞来源的心肌细胞疾病模型进行了介绍,并指出了其面临的问题及展望。

**关键词:** 诱导性多潜能干细胞;心肌细胞疾病模型;研究进展

中图分类号:Q28 文献标志码:A

## Research progress of establishing cardiomyocyte disease models by human induced pluripotent stem cells

CUI Ning<sup>1</sup>, LI Lei<sup>1</sup>, CUI Ming<sup>1\*</sup>, LAN Feng<sup>2</sup>

(1. Dept. of Cardiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191; 2. Beijing Anzhen Hospital,  
Capital Medical University, Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029)

**Abstract:** Induced pluripotent stem cell is a landmark in the stem cell study field, which has rapidly developed in the past 10 years. By obtaining induced pluripotent stem cells from somatic cell, and then differentiating into cardiomyocyte, various cardiomyocyte disease models could be established, which can be used for research of disease mechanisms, drug screening and gene therapy. This review introduces the successfully established cardiomyocyte disease models from human induced pluripotent stem cells, and points out the problems and prospects.

**Key words:** induced pluripotent stem cell; cardiomyocyte disease model; research progress

2006 年将 Oct3/4、Sox2、c-MYC 和 If4 4 种转录因子转染到小鼠成纤维细胞内,成功获得类似胚胎干细胞的诱导性多潜能干细胞<sup>[1]</sup>,是干细胞研究领域里程碑式的发现。随后研究人员又将人皮肤成纤维细胞进行重编程,获得人诱导性多潜能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)<sup>[2]</sup>,此后 10 年间 hiPSCs 技术飞速发展。hiPSCs 可由多种体细胞分化而来,包括皮肤成纤

维细胞及角质形成细胞、尿液上皮细胞和血细胞等,可通过定向诱导分化获得所需细胞类型。这些具有某一特定遗传背景的细胞可以用于建立疾病模型、药物筛选和细胞治疗等。建立疾病模型是 hiPSCs 的主要应用之一,尤其对心肌细胞这种难以获得的体细胞。本文将对 hiPSCs 构建的心肌细胞疾病模型进行综述,并指出了其面临的问题及展望。

## 1 心肌细胞的获得

最初的心肌细胞分化方法主要利用细胞因子调控相应细胞信号通路定向诱导分化。2009 年将 hiPSCs 分化为可跳动的、具有正常形态和电生理特性的心肌细胞<sup>[3]</sup>。此后多种成分及功能明确的化学小分子诱导分化的方法逐渐成熟,包括调控经典 Wnt 信号通路的 GSK3E 抑制剂和 Wnt 抑制剂“CDM3”分化体系<sup>[4]</sup>,可获得纯度 90%~95%的心肌细胞。后又通过去除培养基内的谷氨酸和葡萄糖成功制备出纯度超过 99%的心肌细胞<sup>[5]</sup>。通过以上方法获得的心肌细胞,能自主收缩,表达肌浆网蛋白和离子通道,并具有心肌特异的动作电位和钙瞬变特点,但仍缺乏典型成熟心肌细胞的表型。研究人员使用多种方法,包括延长培养时间、电机械刺激、心肌细胞特异性蛋白过表达和生物工程改良培养基质等<sup>[6]</sup>,促进心肌细胞成熟。为提高心肌细胞产量,改良了培养方式,如单层培养分化法、共培养分化法和动态悬浮培养等,克服了早期拟胚体分化心肌细胞产量低的问题<sup>[7]</sup>。上述方法提高了心肌细胞的纯度、成熟度和产量,为建立心肌细胞疾病模型提供了质和量的保障。

## 2 hiPSCs 心肌细胞疾病模型

在无血清、成分可控的培养基中,利用化学小分子将 hiPSCs 定向分化为心肌细胞,具有易操作、可重复和成本低等优点,已成为目前诱导分化心肌细胞的主要方法。患者体细胞诱导的 hiPSCs 再分化为心肌细胞,可建立患者特异性的疾病模型,获得的 hiPSCs 具有人整套遗传背景,与动物细胞模型相比,能更好的用于人类疾病研究。且 hiPSCs 具有某一个体特异的基因组,与胚胎干细胞相比,能更好的进行个体化疾病机制研究及药物筛选。目前已成功建立多种 hiPSCs 心肌细胞疾病模型,通过模型进行疾病机制研究、药物筛选和基因治疗等也取得了显著进展。

### 2.1 心脏离子通道疾病

心脏离子通道疾病是指由编码离子通道亚单位的基因突变和功能异常所致的钠、钾和钙等心脏离子通道功能失调引起的心律失常性疾病,包括长 QT 综合征、儿茶酚胺敏感性多形性室速和 Brugada 综

合征等几种主要类型,可分为先天性和获得性,本篇主要讨论先天性心脏离子通道疾病。

遗传性长 QT 综合征(long QT syndrome, LQT)因患者心电图 QT 间期延长得名,由复极相关离子通道基因突变所致,有发生室性恶性心律失常风险。目前已发现 13 种遗传性 LQT 亚型,hiPSCs 已成功建立 LQT 1、2、3 和 8 四型。1 型长 QT 综合征(LQT1)因 *KCNQ1* 基因突变引起,*KCNQ1* 是编码慢速延迟整流外向钾通道  $IK_{s\alpha}$  亚单位的基因,LQT1 模型的电生理检查发现其心肌细胞动作电位延长,且应用  $IK_s$  阻滞剂后无明显改变,证实其  $IK_s$  通道功能障碍<sup>[8]</sup>。2 型长 QT 综合征(LQT2)因 *KCNH2* 基因突变引起,*KCNH2* 是编码快速激活延迟整流钾通道  $IK_r$  的  $\alpha$  亚单位的基因,LQT2 模型的电生理检查发现其动作电位和场电位延长,使用  $\beta$  受体阻滞剂和钾通道开放剂进行干预可缩短动作电位<sup>[9]</sup>,并且通过对 *KCNH2* 突变基因进行基因纠正和基因敲减能成功纠正 LQT2 的电生理表型<sup>[10]</sup>。3 型长 QT 综合征(LQT3)是 *SCN5A* 基因突变钠内流失控引起的,*SCN5A* 是编码钠内流通道亚单位的基因,LQT3 模型的电生理检查证实 *SCN5A* 突变导致的钠通道异常为致病原因,并且钠通道抑制剂美西律能缩短动作电位,并呈剂量依赖性的减少早期后除极的发生<sup>[11]</sup>。8 型长 QT 综合征(LQT),又名 Timothy 综合征,因编码  $CaV1.2$  的 L 型钙通道基因 *CACNA1c* 突变所致,是一种罕见的多器官障碍疾病,临床典型特征为同时出现并指(趾)畸形与长 QT 综合征,LQT8 模型的电生理检测发现其动作电位异常、延迟后除极增加和钙内流过度等特点,化合物 Rescovitine 能促进  $CaV1.2$  通道失活,恢复其电生理特性<sup>[12]</sup>。上述 4 种成功构建的 LQT 心肌细胞模型,均从患者体细胞诱导为 iPSCs,再进一步分化为心肌细胞实现,拥有人的整套遗传背景及患者特异的基因突变,可用于个体化抗心律失常药物筛选及细胞水平基因治疗研究,其余 9 中 LQT 模型目前尚未建立,可能与其发病率低和细胞表型存活率低等相关。

儿茶酚胺敏感性多形性室速(catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT)以应激性双向性或多形性室速为特点。1 型 CPVT 为 *RYR2* 基因突变的常染色体显性遗传病,2 型 CPVT 为 *CASQ2* 基因突变的常染色体隐性遗传病。上述基

因突变会造成细胞内钙超载和对交感刺激敏感。1型CPVT模型的电生理检查发现其肌浆网钙释放过多,儿茶酚胺刺激后出现不规则节律及延迟后除极,个体化药物筛选研究发现 $\beta$ 受体阻滞剂治疗持续性室性心律失常无效而氟卡尼有效的药物个体反应差异<sup>[13]</sup>,为个体化治疗提供了依据,新药筛选研究发现苯二酚卓类衍生物S107能稳定RyR2通道,抑制钙离子渗漏,纠正CPVT表型<sup>[14]</sup>,为新药的研发提供了依据。

Brugada综合征(Brugada syndrome, BrS),以心电图胸前导联ST段抬高为特点,有发生室性心律失常风险,BrS心肌细胞模型证实其为SCN5A基因突变,电生理检查证实其钠内流通道密度减低、动作电位最大上升速度下降、触发活动增加和钙运作异常,针对突变基因进行基因治疗后电生理功能显著改善<sup>[15]</sup>。

## 2.2 心肌病

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)以左室扩大、收缩功能障碍和心衰为主要表现。接近30%的扩张型心肌病原因不明,其中已检测到30种基因突变类型。DCM不同基因突变的心肌细胞模型揭示了其不同的发病机制。LMNA基因编码A型核纤层,参与核的形态及染色质的组装,该基因突变的DCM疾病模型发现衰老及凋亡细胞增多<sup>[16]</sup>。DES基因编码结蛋白,对稳定肌小节结构至关重要,该基因突变的DCM模型发现心肌细胞肌小节Z盘结构破坏<sup>[17]</sup>。为克服单层心肌细胞模型的缺陷,研究人员建立了TTN基因突变的DCM三维微组织模型,发现DCM心脏微组织收缩力不足正常对照的一半<sup>[18]</sup>。研究人员刺激RMA20基因突变的DCM模型 $\beta$ 肾上腺素受体后,发现细胞出现钙稳态失调,但若采用 $\beta$ 受体拮抗剂卡维地洛及L型钙通道阻滞剂维拉帕米提前进行干预,可明显改善钙稳态失调<sup>[19]</sup>,为药物治疗提供了依据。通过对PLN基因突变的DCM疾病模型进行异常基因敲减及正确基因过表达能成功逆转细胞表型<sup>[20]</sup>,实现了细胞学水平的基因治疗。

肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)以左室壁对称性增厚为特点,70%为家族性,目前已发现肥厚型心肌病突变位点超过1500个,最常见的为4个肌小节的基因:MYBPC3、MYH7、

TNNT2和TNNI3。研究发现MYH7基因突变的HCM模型HCM心肌细胞体积扩大、多核、肌纤维增加、肌小节紊乱、肥大相关基因表达上调、钙稳态失调和细胞内钙超载等异常表现,L型钙通道阻滞剂维拉帕米可恢复钙稳态、细胞形态和电生理表型<sup>[21]</sup>。肥厚型心肌病为环境因素与遗传因素共同作用形成的,为了明确环境因素的地位,研究人员用多种促肥大因子刺激HCM心肌细胞模型,发现内皮素1可导致心肌细胞肥大及肌纤维紊乱<sup>[22]</sup>,参与肥厚型心肌病的发病。

致心律失常性右室心肌病(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC)以右心室心肌被进行性纤维脂肪组织所替代为特点,临床常表现为右心室扩大、恶性心律失常,50%的个体有桥粒基因突变。研究人员用胰岛素、地塞米松和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤3种化合物生成脂肪,模拟成熟心肌细胞代谢环境,诱导PPAR- $\alpha$ 脂肪酸代谢通路,并使用罗格列酮及吡啶美辛诱导PPAR $\gamma$ 脂肪酸代谢旁路,建立了ARVC模型<sup>[23]</sup>,成功模拟了遗传及环境因素对细胞表型的共同作用,且研究发现糖原合成酶激酶-3 $\beta$ 抑制剂能减少细胞内脂质沉积<sup>[24]</sup>,为药物治疗提供了依据。

## 2.3 其他心血管疾病

除了以上研究较多的离子通道疾病及心肌病,hiPSCs可用来建立其他心脏受累的遗传性疾病模型,如Pompe病、Danon病、Fabry病、Leopard综合征、Jervell-Lange-Nielsen综合征、Barth综合征、Klinefelter综合征、MERRF综合征、Williams-Beuren综合征、左心发育不良综合征和杜氏肌营养不良症等,可以用来建立遗传及环境因素共同作用形成的心血管疾病,如病毒性心肌炎、阿霉素心肌病和糖尿病心肌病等。

## 3 挑战与展望

综上所述,建立疾病模型,有助于疾病机制研究、药物筛选和基因治疗等。但hiPSCs疾病模型仍然面临以下问题:第一,对于环境因素及遗传因素共同作用的疾病,环境因素难以在心肌细胞水平全部实现;第二,对同时累及多种细胞类型的心血管疾病,需构建组织或器官水平模型,已有一些组织工程方法实现了组织的构建,且可以通过hiPSCs获得上

皮细胞和平滑肌细胞等非心肌细胞<sup>[25]</sup>,但模拟真正的心脏仍难实现;第三,目前获得的心肌细胞主要由心室肌样细胞组成,同时也包含少量心房肌和窦房结样细胞,获得高纯度的亚型特异性心肌细胞难以实现;第四,虽有多种促成熟方法,但心肌细胞成熟度仍偏低,表达谱类似胎儿心肌细胞;第五,从 hiPS-

Cs 获得心肌细胞有多种分化方法,但对心肌细胞的质量评估缺乏统一标准。尽管目前 hiPSCs 建立心脏疾病模型尚有问题亟待解决,但相信随着基因编辑及组织工程等技术的飞速发展,不久就能构建出具有三维结构的、表型成熟的和亚型特异的心肌细胞模型,更好地用于基础研究与临床应用。

## 参考文献:

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676.
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131: 861-872.
- [3] Zwi L, Caspi O, Arbel G, *et al.* Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells [J]. *Circulation*, 2009, 120: 1513-1523.
- [4] BurrIDGE PW, Matsa E, Shukla P, *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes [J]. *Nat Methods*, 2014, 11: 855-860.
- [5] Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, *et al.* Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells [J]. *Cell Metab*, 2016, 23: 663-674.
- [6] Veerman CC, Kosmidis G, Mummery CL, *et al.* Immaturity of human stem-cell-derived cardiomyocytes in culture: fatal flaw or soluble problem? [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 1035-1052.
- [7] Talkhabi M, Aghdami N, Baharvand H. Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: A state-of-art [J]. *Life Sci*, 2016, 145: 98-113.
- [8] Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, *et al.* Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95: 419-429.
- [9] Matsa E, Rajamohan D, Dick E, *et al.* Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32: 952-962.
- [10] Matsa E, Dixon JE, Medway C, *et al.* Allele-specific RNA interference rescues the long-QT syndrome phenotype in human-induced pluripotency stem cell cardiomyocytes [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35: 1078-1087.
- [11] Malan D, Zhang M, Stallmeyer B, *et al.* Human iPS cell model of type 3 long QT syndrome recapitulates drug-based phenotype correction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2016, 111: 14-24.
- [12] Yazawa M, Hsueh B, Jia X, *et al.* Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome [J]. *Nature*, 2011, 471: 230-234.
- [13] Fatima A, Xu G, Shao K, *et al.* In vitro modeling of ryanodine receptor 2 dysfunction using human induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28: 579-592.
- [14] Sasaki K, Makiyama T, Yoshida Y, *et al.* Patient-specific human induced pluripotent stem cell model assessed with electrical pacing validates S107 as a potential therapeutic agent for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0164795, doi: 10.1371.
- [15] Liang P, Sallam K, Wu H, *et al.* Patient-specific and genome-edited induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes elucidate single-cell phenotype of brugada syndrome [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68: 2086-2096.
- [16] Ho JC, Zhou T, Lai WH, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from 3 distinct laminopathies bearing heterogeneous mutations in lamin A/C [J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3: 380-390.
- [17] Tse HF, Ho JC, Choi SW, *et al.* Patient-specific induced-pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes recapitulate the pathogenic phenotypes of dilated cardiomyopathy due to a novel DES mutation identified by whole exome sequencing [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22: 1395-1403.
- [18] Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, *et al.* HEART DISEASE. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy [J]. *Science*, 2015, 349: 982-986.
- [19] Wyles SP, Hrstka SC, Reyes S, *et al.* Pharmacological



modulation of calcium homeostasis in familial dilated cardiomyopathy: an in vitro analysis from an RBM20 patient-derived iPSC model [J]. Clin Transl Sci, 2016, 9: 158-167.

[20] Karakikes I, Stillitano F, Nonnenmacher M, *et al.* Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6955-6964.

[21] Lan F, Lee AS, Liang P, *et al.* Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2013, 12: 101-113.

[22] Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, *et al.* Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability

in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3: e001263.

[23] Kim C, Wong J, Wen J, *et al.* Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs [J]. Nature, 2013, 494: 105-110.

[24] Caspi O, Huber I, Gepstein A, *et al.* Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2013, 6: 557-568.

[25] Patsch C, Challet-Meylan L, Thoma EC, *et al.* Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17: 994-1003.

## 新闻点击

### 戒烟:断然停止比逐渐减少有效

据英国《BBC 新闻》(BBC NEWS)2016-03-18 报道,英国牛津大学的一项研究发现,一口气中断抽烟习惯的人,其成功概率比逐步减少抽烟的人高了许多。如果您想戒烟的话,这项研究结果或许可以作为参考。

大多数专家主张,人们应该断然戒除抽烟的习惯,但大多数人似乎比较倾向于慢慢减少烟量,最后才完全戒除烟瘾。

为了了解哪种方法较有效,牛津大学的研究人员针对 697 名想戒烟的人进行研究。这些人被分为两组,第一组是“突然中断”组,他们设定一个戒烟日期,并从当天起完全不再抽烟;而第二组则为“逐渐中断”组,他们也设定一个戒烟日期,但从当天前 2 周起逐渐减少烟量,最终完全不再抽烟。

这两组受测者都可获得专家的建议和支持,也可以使用尼古丁贴片(nicotine patch)或其他替代疗法,例如尼古丁口香糖等。

在戒烟日过了之后,研究人员在接下来的 4 周和 6 个月之后,每周评估受测者的戒烟成效。研究人员除了询问之外,也测量他们呼出的一氧化碳含量,以客观地了解其是否坚持戒烟。

结果发现,在 4 周之后,“逐渐中断”组中有 39% 的人没有再抽烟,相比,“突然中断”组中有 49% 的人不再抽烟,这表示该组的成功率多了 25%。而在 6 个月之后,“逐渐中断”组中有 15% 没有再抽烟,“突然中断”组中保持不抽烟的人约 22%。

研究人员也发现,比较多的人偏好逐渐减少烟量,但无论他们怎么想的,使用断然停止方法的人,戒烟成功率还是比较高。

### 年轻成人大脑的阿尔茨海默病风险

据美国 WebMD 医学新闻网(2015-10-27)报道,有篇小型研究指出,阿尔茨海默病遗传风险增加的年轻成人,可能在其大脑处理空间定位方面已经显示出差异。

研究人员用先进的核磁共振造影技术来研究大脑中内嗅皮质部位,它含有所谓“网格细胞”,它们对于空间定位很重要,当阿尔茨海默病发病时,空间定位经常先出错。

事实上,研究人员发现,完整无缺的网格细胞越少,邻近大脑区域的海马越活跃。

研究人员表示,现在还不知道大脑的差异是否是阿尔茨海默病的预兆。波昂的德国神经退化疾病中心资深研究人员 Nikolai Axmacher 博士认为,这一点还需要进一步研究来调查。

但他表示,希望这个研究结果能使研究人员更加了解导致阿尔茨海默病这种最常见痴呆症的最初过程。

其他研究人员认为,这个结果很重要,因为每个人都想要找出可靠的生物征兆,以了解一个人在晚年的阿尔茨海默病风险。

研究人员已经知道所谓“齿菌斑”这种异常蛋白质在阿尔茨海默病的症状出现之前 20 年就存在了;这篇最新的研究结果更加证明,这个疾病是长达数十年的“持续”。