# 人诱导多功能干细胞分化的心肌细胞在心律失常 建模中的应用

郑泽群1 廉姜芳2\*

('宁波大学医学院, 宁波 315211; '宁波大学附属李惠利医院, 宁波 315211)

摘要 心律失常涉及多种心脏离子通道,理想的研究模型应能够表达各种通道,构成完整的动作电位,更好揭示心律失常复杂的机制。与成熟的人心脏电活动相比,异源表达体系或动物模型 不可避免地存在较大差异。自体来源的人诱导多功能干细胞分化的心肌细胞(human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs)建立的研究模型,在体外近乎完全地复制了心 脏电生理活动特性,为疾病的研究搭建了广阔的平台。该文概述了以hiPSC-CMs为工具建立的心 律失常模型,希望为相关研究提供一定的参考意义。

关键词 人诱导多功能干细胞;人诱导多功能干细胞分化的心肌细胞;心律失常;疾病模型

## Application of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Modeling of Arrhythmia

### ZHENG Zequn<sup>1</sup>, LIAN Jiangfang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China; <sup>2</sup>Lihuili Hospital Affiliated to Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract** Arrhythmia involves a variety of cardiac ion channels. The desirable research model should be able to characterize various channels that form a whole action potential, and then better reveal the complex mechanism under arrhythmia. Compared with mature human cardiac electrical activity, there are inevitably great differences in heterologous expression systems or animal models. The research models established by hiPSC-CMs (human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes) derived from individuals have almost completely replicated the characteristics of cardiac electrophysiological activities *in vitro*, which build up a broad platform for the study of diseases. This article provides an overview of the arrhythmia models established with hiPSC-CMs, hoping to offer some references for related work.

**Keywords** hiPSCs (human-induced pluripotent stem cells); hiPSC-CMs (human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes); arrhythmia; disease models

心律失常分为原发性和继发性,前者主要由内 源性电异常引起,多拥有遗传背景,后者主要继发于 心肌病、心肌梗死等。心律失常是急诊科入院的常 见原因,其中,严重的恶性心律失常往往是致命的, 及时、适当的治疗以确保最佳的预后十分重要。然 而,由于发病机制复杂,心律失常在临床上仍面临着 诊断、检测和风险分层等诸多方面的挑战<sup>[1]</sup>,例如心 房颤动(atrial fibrillation, AF)作为最常见的心律失常, 而在出现症状的患者中,药物治疗率也仅有50%<sup>[2]</sup>。 研究证实,动物模型或异源表达体系并无法在体外

收稿日期: 2020-03-08 接受日期: 2020-05-05

\*通讯作者。Tel: 13566305960, E-mail: hjmpin@163.com

Received: March 8, 2020 Accepted: May 5, 2020

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81870255)资助的课题

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81870255)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-13566305960, E-mail: hjmpin@163.com

URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5320

Table 1 nIPSC-CIVIS-based disease models						
疾病 Disease	基因 Gene	离子通道 Ion channel	表型 Phenotype	治疗策略 Therapeutic strategies	不足 Limitation	
LQT1	KCNQ1	Iks	Prolonged FPD, APD	Phenylboronic acid	Differences of Iks expression	
			EADs	β-blockers	Not easily characterized $I_{Ks}$	
			Reduced Iks	Iks activators		
LQT2	KCNH2	IKr	Reduced MDP	Re-trafficking of hERG	Differences of IKr expression	
			Prolonged FPD, APD	Activators	Immature phenotype	
			EADs	Chaperones		
LQT3	SCN5A	Ina	Prolonged APD, INa-L	Mexiletine	Not easily measured EADs	
			EADs	CRISPR/Cas9		
BrS	SCN5A	Ina	Abnormal Ca2+ transients	Gentamicin	Immature phenotype	
			Reduced dv/dtmax	PTC124	Complex mechanism	
			Reduced peak I <sub>Na</sub>			
CPVT	RyR2	Ica	Prolonged Ca2+ transients	β-blockers	Lack of T tube	
	CASQ2			INa inhibitors	Immature calcium handling	
AF	SCN5A	INas IK	Atrial-liked AP	INa inhibitors	Not easily to generate models	
	KCNA5,		Increased beat frequency	Ik inhibitors		
	Etc.		Prolonged If and ICaL			

表1 hiPSC-CMs构建的疾病模型 Table 1 hiPSC-CMs-based disease models

完全模拟人的心脏电活动(如小鼠的心率约为人的 10倍)<sup>[3]</sup>。随着基因编辑和干细胞技术的发展,人 诱导多功能干细胞(human-induced pluripotent stem cells, hiPSCs)成为研究心血管疾病的重要工具,随 后,以人诱导多功能干细胞分化的心肌细胞(humaninduced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs)建立的心律失常模型突破传统表达模 型的局限<sup>[4]</sup>,虽然在结构及电生理等方面仍不成熟, 但己能够很好地复制疾病表型。当前建立的心律 失常模型主要包括长QT综合征(long QT syndrome, LQTS)、Brugada综合征(Brugada syndrome, BrS)和 儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速(catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT)等<sup>[5]</sup> (表1)。这些模型提升了我们对心律失常潜在的病理 机制的认识,成为鉴定治疗策略的良好工具。

## 1 hiPSC-CMs

## 1.1 hiPSC-CMs来源

2007年,日本山中伸弥团队<sup>[6]</sup>首次报道了用 逆转录病毒作为载体,将转录因子OCT4、SOX2、 KlF4和c-MYC(OSKC)导入人成纤维细胞生成了具 有分化增殖能力的多能干细胞,称为hiPSCs,并且证 实了hiPSCs能够在体外分化形成3个胚层的不同衍 生物,这一成果革命性地改变了干细胞领域的研究。

心脏组织由三胚层的中胚层进一步分化而来,

中胚层和心脏的形成主要涉及3条蛋白质因子的信 号通路,分别为骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和Wnt信号通路,目前诱导hiPSCs分化成 心肌细胞主要模仿中胚层诱导的胚胎发育信号[7-8],且 通过调节Wnt信号通路即可生成较高纯度的心肌细 胞, Wnt通路的β-连环蛋白是调节基因表达的关键分 子,上游因子蛋白激酶糖原合成酶激酶3β(glycogen synthase kinase 3β, GSK-3β)通过将β-连环蛋白磷酸化 促使其被蛋白酶体降解,研究表明,GSK-3抑制剂诱 导的hiPSCs分化依赖于β-连环蛋白<sup>[9]</sup>。ZHANG等<sup>[10]</sup> 用携带OCT4、SOX2、NANOG和LIN28的慢病毒 转导生成的hiPSCs第一次成功分化出hiPSC-CMs, 并表征出心肌细胞的功能特性。多种体细胞可被诱 导生成hiPSC-CMs, 方法主要有以下3种: 胚状体分 化、单细胞培养和共培养<sup>[11]</sup>。hiPSC-CMs的生成涉 及复杂的重编程及分化过程,不同的物理条件、化 学因子等因素都可以影响它的生成效率,例如在调 节Wnt通路的基础上加入维生素C, 可通过组蛋白去 甲基化酶的JmjC酶介导H3K9去甲基化,影响hiPSCs 的生成[12]。不同体细胞来源的心肌细胞分化效率亦 不相同,目前尚无标准化的方法去定义最佳的生成 及纯化方法。

### 1.2 hiPSC-CMs功能评估

电活动是心肌细胞的重要特性,即能够产生动



Atrial-like: 心房样; Nodal-like: 结样; Ventricular-like: 心室样。 Atrial-like: atrial-like; Nodal-like: nodal-like; Ventricular-like: ventricular-like.

图1 人诱导多功能干细胞分化的心肌细胞记录到的不同形态的动作电位(根据参考文献[12]修改) Fig.1 Different morphologies of APs recorded from hiPSC-CMs (modified from reference [12])

作电位(action potential, AP)进而引发机械收缩,运用 相关实验工具对hiPSC-CMs功能测定是对心肌细胞 表征的重要方面,主要有膜片钳、微电极阵列、显 微荧光测钙等。

1.2.1 膜片钳 膜片钳技术被视为研究离子通道 的"金标准",它可以反映特定膜电流的各种AP参数, 包括静息膜电位(resting membrane potential, RMP)、 最大舒张电位(maximal diastolic potential, MDP)、 AP振幅(AP amplitude, APA)及最大上升速率(maximum upstroke velocity, dv/dt<sub>max</sub>)等。应用膜片钳技 术,对于离子电流的检测具有独特优势,钠离子通 道(I<sub>Na</sub>)、L型钙离子通道(I<sub>CaL</sub>)、延迟整流钾通道(I<sub>Kr</sub>、 I<sub>Ks</sub>)等7种离子通道被证实存在于hiPSC-CMs中,依 据记录到的AP不同特性,分为心房样、结样、心室 样AP<sup>[13]</sup>(图1), 而这些AP呈胎儿样, 所以基于AP形 状的划分是否正确尚需探讨。此外,虽然仍有部分 离子活动通道如Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交换体等并未被发现,已 表征的通道电流参数也与成熟心肌细胞存在差异, 但多种离子通道的表达的确弥补了其他模型的不 足。

1.2.2 微电极阵列(multi-electrode array, MEA) MEA 不仅可以同步记录多个细胞电活动,还可以反映细胞间的电信号和进行长时程测量,但由于获得的信号信息有限、分析难度大,基于计算机模型的自动化分析也有必要<sup>[14]</sup>。MEA记录到的场电位时程(field potential duration, FPD)反映了QT间期,能够在一定水平上体现各种通道的活动,但无法记录单通道电流和细胞内的瞬时电变化,并且由于hiPSC-CMs的不成熟,细胞间的电传导速度相对于成人心室肌细胞(60 cm/s)较慢(10~20 cm/s)<sup>[15]</sup>,所以获得的信息价值有限。因其高通量优势,2013年美国食品药品监督管理局提出了"综合体外心律失常测定法

(CiPA)"的计划,建议将MEA作为一种测量手段,结合hiPSC-CMs对药物进行临床前评估来预测尖端扭转型室性心动过速(torsade de pointes, TdP)发生风险<sup>[14,16-17]</sup>。该计划测试了28种药物并将它们按发生TdP的风险进行了分类(表2)。

1.2.3 显微荧光测钙技术 Ca<sup>2+</sup>变化与心肌细胞兴 奋--收缩耦联相关,故可通过测量心肌细胞内钙瞬 变直接反映电活动情况。基因编码的荧光指示剂 (GEVIs或GECIs)突破了检查的光毒性、荧光漂白 等局限<sup>[18]</sup>,将hiPSC-CMs与遗传编码电压(ArcLight) 和钙荧光指示剂(GCaMP5G)结合,能够通过稳定或 瞬时表达的指示剂获取和分析光学性的AP和细胞 内钙瞬变能力[19],与传统电压或钙敏感指示剂相比, 具有显著稳定性、优异的信噪比以及较小的细胞 毒性等优点。Ca<sup>2+</sup>探针Fluo-4AM在1 Hz和2 Hz频率 下都记录到了疾病特异性hiPSC-CMs上异常的钙瞬 变,且与重要钙调节蛋白磷酸化相对应,提示异常钙 调节可能是心律失常发生机制之一[20]。这种动态 的测量手段在揭示心律失常的病机方面具有一定的 价值,但是多数的荧光染料也只是允许监测细胞内 Ca2+的相对变化,并不能提供量化的绝对值。

## 2 hiPSC-CMs构建的心律失常模型 2.1 LQTS

LQTS是一种遗传性心律失常综合征,特征 是QT间期延长,会发生TdP和心源性猝死(sudden cardiac death, SCD)。目前,LQTS有15个亚型,其 中LQT1~3型约占80%,致病基因分别为*KCNQ1、 KCNH2*和*SCN5A*<sup>[21]</sup>。应用hiPSC-CMs,多种LQTS 的疾病模型己相继被建立,本文主要概述常见的 LQT1~3型。

2.1.1 LQT1 LQT1是最常见的先天性LQTS, 约

	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
高度风险	中度风险	低或无风险
High risk	Intermediate risk	No or low risk
Azimilide	Astemizole	Diltiazem
Bepridil	Chlorpromazine	Loratadine
Dofetilide	Cisapride	Metoprolol
Ibutilide	Clarithromycin	Mexiletine
Quinidine	Clozapine	Nifedipine
Vandetanib	Domperidone	Nitrendipine
Disopyramide	Droperidol	Ranolazine
D,l Sotalol	Terfenadine	Tamoxifen
	Pimozide	Verapamil
	Risperidone	
	Ondansetron	

	表2	CiPA计划下测定的28种药物的TdP发生风险
Table	2 1	dP risk of 28 compounds assessed by CiPA initiative

占40%~55%<sup>[22]</sup>, KCNQ1编码缓慢延迟整流钾通道 (I<sub>Ks</sub>)的α亚基,突变使复极化储备减少,QT间期延 长。WURIYANGHAI等<sup>[23]</sup>建立了一个携带KCNQ1-A344AspI突变的LQT1-hiPSC-CMs模型,鉴别出异 常的RNA剪接体, MEA分析显示出在异丙肾上腺 素作用下FPD显著延长,还记录到了早后除极(early after depolarizations, EADs), EADs是一种后发的膜 除极电位, 被认为是诱发LQTS患者致命性心律失常 (如TdP)的前兆<sup>[24]</sup>。此外,实验证明了I<sub>Ks</sub>通道激活剂 苯硼酸有效缩短了hiPSC-CMs的动作电位时程(action potential duration, APD)。IKs作为心肌的复极化 储备电流,在正常状况下对AP复极化影响较小,仅 在β-肾上腺素受体刺激作用下,才可能产生足够的 电流,因此,这种电流在人心肌细胞及异源表达模型 中并不容易被检测到, 而ZHANG等<sup>[25]</sup>在hiPSC-CMs 中的研究中发现, I<sub>Ks</sub>阻断剂敏感电流几乎瞬间激活, 这与经典的I<sub>ks</sub>特性存在显著差异,所以hiPSC-CMs 中是否存在I<sub>Ks</sub>电流及如何解释这种差异存在的问题 值得思考[26]。

2.1.2 LQT2 LQT2是全球次常见的LQTS,也是 我国最常见的LQTS,是由编码快速延迟整流钾通 道(I<sub>Kr</sub>)的*KCNH2*(hERG)突变导致,I<sub>Kr</sub>是构成心肌细 胞复极化的主要电流,突变导致I<sub>Kr</sub>电流部分或完全 减少。同LQT1一样,多种LQT2-hiPSC-CMs模型 被建立。ITZHAKI等<sup>[27]</sup>首先用LQT2患者的真皮 纤维母细胞建立了含*KCNH2*-A614V突变的模型, APD、FPD与健康对照模型相比明显延长,在应用 了I<sub>Kr</sub>特异性阻滞剂E-4031后延长更加显著,且诱发 了EADs;研究者们还尝试了可能的治疗药物,在应用硝苯地平和ATP敏感性钾通道开放剂吡那地尔后缩短了FPD及消除了EADs,表现出良好的治疗效应,而研究中的AP显示出-55 mV左右的MDP和较低的AP上升速率,所以观察到的效应是否具备临床价值需要更多可靠的实验数据支持。

基因突变导致hERG蛋白成熟障碍,减少了细 胞膜定位<sup>[22]</sup>。恢复hERG功能的策略主要包括hERG 的再转运、激活剂、拮抗剂等<sup>[28]</sup>。应用hiPSC-CMs在治疗研究中取得进展<sup>[20]</sup>。蛋白酶体抑制剂 ALLN(N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal)可使hERG更 多定位到细胞膜上, 增加Ikr电流<sup>[29]</sup>; 囊性纤维化跨 膜转导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)突变造成囊性纤维化, 纠 正CFTR通道转运障碍可以逆转其他通道转运缺陷 性疾病<sup>[30]</sup>, 鲁玛卡托(lumacaftor, LUM)促进了CFTR 通道再转运, MEHTA等<sup>[20]</sup>证实, LUM同样能够在 hiPSC-CMs中逆转hERG转运,且成功进行临床转 化<sup>[31]</sup>。然而,考虑到hiPSC-CMs的幼稚性和较少的 治疗样例,全面的临床前安全评估仍有必要。此外, Kv11.1通道(hERG编码)激活剂ICA-105574可减慢 通道失活<sup>[32]</sup>,但较高浓度的ICA可能过分纠正延长 的复极化形成短QT<sup>[33]</sup>,提示实验到临床翻译转化的 差异不容忽视。

2.1.3 LQT3 LQT3较LQT1和LQT2少见,是由编码电压门控钠通道α亚基的*SCN5A*突变所致,*SCN5A*突变抑制了钠通道失活使复极间期延长。MA等<sup>[34]</sup>建立的LQT3-hiPSC-CMs模型复制了显性突变的基

因表达,观察到APD延长,但并没有测到EADs。而 MALAN等<sup>[35]</sup>建立的模型检测到EADs的发生率很 高,在应用美西律后显著缩短了APD,成功表征了 LQT3。在一项对比研究中,携带*Scn5a*-1798insD的 小鼠心肌细胞发生了EADs,GS967降低了这些异常, 但在含*SCN5A*-1795insD的hiPSC-CMs中未观察到 同类特征<sup>[36]</sup>,这既要考虑到模型差异,也可能是由于 hiPSC-CMs幼稚性导致APD相对较短,所以即使晚 钠电流(I<sub>Na-L</sub>)增加,仍无法测到EADs发生。

众多证据显示, SCN5A-ΔKPQ突变是I<sub>Na-L</sub>增强 的基础, KRONCKE等<sup>[37]</sup>应用CRISPR/Cas9技术生成 含*SCN5A*-R1193Q突变的hiPSC-CMs, 对比ΔKPQ突 变,该细胞同含相同突变的HEK细胞、CHO细胞模 型一样,能够产生I<sub>Na-L</sub>,但是I<sub>Na-L</sub>的存在并不一定导致 QT间期延长,提示了心律时常复杂的发病机制。研 究表明,除LQT3外, *SCN5A*突变还与其他心律失常: BrS、窦房结功能障碍、室上性快速型心律失常等 相关<sup>[38]</sup>,这更加复杂化了LQT3的分子机制,也为该 病基于更多模型的研究提出了挑战。

## 2.2 BrS

BrS是SCD的常见原因之一,其心电图特征是 右胸导联ST段马鞍形抬高≥2 mm。当前,由于缺乏 适当的研究模型,对BrS的了解仍相对落后。据报 道,至少有19个基因参与了BrS的发生<sup>[39]</sup>,几乎20% 与*SCN5A*突变相关<sup>[38]</sup>;有研究确定了新的BrS敏感 性基因*RRAD*,并在表达其突变的hiPSC-CMs中概括 了BrS的特征,包括改变的Na<sup>+</sup>电流以及紊乱的细胞 骨架<sup>[40]</sup>。如前所述,*SCN5A*突变可以导致多种心律 失常,这种突变表现出多种综合征被称为"重叠综合 征","重叠综合征"的模型被DAVIS等<sup>[41]</sup>成功建立; 而LIANG等<sup>[42]</sup>的工作则更加出色,构建了仅表现为 BrS的BrS-hiPSC-CMs模型,与健康模型相比,内向 Na<sup>+</sup>电流密度和AP的dv/dt<sub>max</sub>降低,触发活动增加,共 聚焦显微镜观察到的异常Ca<sup>2+</sup>瞬变,对应了记录到 的AP改变,较全面分析了BrS心肌细胞表型。

异源表达体系研究了许多的SCN5A突变,在所 有干细胞建立的模型中,明显都存在钠电流缺陷,这 种变化也与临床非常吻合<sup>[43]</sup>。在药物干预的研究中, 2个SCN5A突变(W156X和R1638X)导致翻译提前终 止,产生截短蛋白,建立的BrS-hiPSC-CMs模型尽管 表现出相似的MDP,但钠电流峰值降低<sup>[44]</sup>。庆大霉 素、PTC124在HEK293细胞中能够促进过早终止密 码子的翻译通读,从而恢复全长非截短蛋白的表达, 这种效应并未在hiPSC-CMs被观察到,研究者得出的 结论是:这些化合物的作用可能太小而无法产生任 何功能性影响<sup>[44]</sup>。在涉及复杂的基因背景下,研究 相关药物在这些模型中的作用不仅需要药物作用机 理,也要考虑疾病本身的复杂机制和建立的模型特 性。

## 2.3 CPVT

CPVT是一种罕见的高度恶性的遗传性心律失 常性疾病,主要由心肌兰尼碱受体2(ryanodine receptor 2, RyR2)或肌钙集蛋白2(calsequestrin 2, CASQ2) 突变所致,突变引起肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)过多钙释放导致细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度增高,进而激活 Na<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交换体短暂内向电流,引发延迟后除极导致 触发性心律失常<sup>[45-46]</sup>。CPVT涉及复杂的心肌细胞钙 调节网络,参与钙调节的蛋白因子(RyR2、钙泵、受 磷蛋白、肌钙蛋白等)在幼稚的hiPSC-CMs中表达有 所下降,且SR发育并不成熟,细胞外Ca<sup>2+</sup>内流引起SR 通过RyR2释放Ca<sup>2+</sup>产生耦联,这个过程Ca<sup>2+</sup>瞬变上升 和衰减要慢得多, 使兴奋--收缩耦联不良, 有学者认 为,这可能与hiPSC-CMs中缺少T型微管有关[47]。同 时,这种低成熟的钙调节网络也在一定程度上阻碍 了基于细胞模型治疗的实验。临床上,Ⅱ类抗心律失 常药物仅卡维地洛对CPVT有效, ACIMOVIC等<sup>[48]</sup>建 立的CPVT1-hiPSC-CMs模型发现美托洛尔并无法 阻止异常钙释放,与临床现状吻合,但也出现纳多洛 尔亦有效的现象<sup>[20]</sup>。所以,基于Ca<sup>2+</sup>泄漏的致病机制, 在进行药物干预实验时仍须结合多方面情况考虑, 比如Na<sup>+</sup>通道抑制剂能够治疗CPVT,但伊伐布雷定 既不能防止CPVT患者的hiPSC-CMs的心律失常,也 不能缓解异常钙瞬变<sup>[49]</sup>。

最近, ZHANG等<sup>[50]</sup>报道了携带双杂合突变 RyR2-A1855D和*SCN10A*-Q1362H的4个月大婴儿, 这个突破对于研究罕见的≥2个变异的CPVT发病 机理十分有用, 彰显了hiPSCs技术的优越性。由于 CPVT发作时常表现为致命的室性心动过速, 且多发 生在年轻群体中, 目前国内对于该病相关研究报道 仍有限, 所以CPVT模型建立对于病机及治疗的探讨 都意义非凡。

### 2.4 AF

AF是一种以折返为主要机制的无序、快速阵 发性或持续性心律失常,可出现心力衰竭、血栓栓 塞等高危并发症,其缺血性脑卒中的风险是非房颤 患者的4~5倍<sup>[51]</sup>,具有较高的致残率和致死率。全 基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)发现了30多个与AF相关的基因座<sup>[52]</sup>,其中包 括编码心肌钾通道的KCNQ1、KCNA5和编码钠通 道的SCN5A和SCN1B等。

来自肺静脉异位灶的高频电活动构成AF的触 发因素,突然的从窄到宽的解剖的过渡、组织细胞 的异质性等都参与了AF的发生,生成心房样心肌 细胞以及模拟特殊的解剖结构是利用hiPSCs为AF 建模的重要目标。目前,应用hiPSCs研究AF尚不深 入,但也取得了一些初步成果。大多数hiPSC-CMs 倾向于获得心室样而不是心房样细胞,多数研究已 经证实,视黄酸(retinoic acid, RA)调节心脏生成,且 外源性RA能诱导多种类型的多能干细胞生成心房 样细胞<sup>[53-56]</sup>,在LEMME等<sup>[56]</sup>和NAKANISHI等<sup>[53]</sup>的 研究中, RA可增加心房特定标志物的表达水平, 显 示出类心房样的AP参数,但无论是应用心房样心肌 细胞与成纤维细胞按比例构建2D模型,还是利用心 肌组织工程建立右心房工程心脏组织(rightatriumengineering heart tissue, RA-EHT)来模拟3D模型, 都 旨在复制心房内及心房与心室间的组织解剖学差 异,进而阐明复杂的电生理特性。解剖过渡、细胞 组成异质性破坏了电传导的完整性, RA-EHT对心房 选择性离子通道药物的反应也表明构建相似解剖结 构的重要性<sup>[56]</sup>,但诸如2D模型缺乏空间异质性、3D 模型不同细胞配比问题等局限,使电传导差异的机 制仍值得进一步深入研究。

基于家族性AF背后的分子机制,研究相关基因 在病机中扮演的角色很有必要,利用CRISPR/Cas9 敲除目的基因构建特定模型,对于研究AF是有益的, 如敲除*KCNA5*<sup>[55]</sup>和*PITX2*<sup>[54]</sup>,前者编码超快延迟整 流钾电流(I<sub>Kur</sub>),后者作为心房特异性转录因子,都被 证实引起家族性AF。BENZONI等<sup>[57]</sup>用3名经药物及 射频消融治疗无效的家族性AF患者的体细胞构建 的模型显示出:跳动频率增加、延长的APD、无差 别的MDP和APA,以及超极化激活的内向离子电流 (I<sub>t</sub>)和I<sub>cat</sub>增强,提示I<sub>t</sub>和I<sub>cat</sub>可能参与AF发生。hiPSCs 结合CRISPR/Cas9技术对于研究复杂的AF发病机制 有显著进步,当然,其复杂性也需要基于更多的模型 和数据的解读以形成系统、可复制的规律,这样才 能更好地攻克AF。

## 3 结语与展望

hiPSCs的产生变革了传统研究手段,因其避免 了伦理道德和免疫排斥这一重大问题,以独特的优 势为心脏疾病的研究提供了强大工具。

当前, hiPSCs技术已经在疾病建模和药物筛查 等方面做出了明显贡献。然而,这种脱离了人体内 环境的细胞研究在完全模拟人疾病的发生、发展过 程中仍存在一定的局限,因为众多因素影响了心肌 细胞结构成熟及电生理特性,例如温度、电解质、 pH值、氧浓度等,甚至体内的激素水平也会对心脏 电活动产生影响[58],加上建立的模型存在不足,比如 缺乏T管、较低的RMP(-20至-60mV)和离子通道电 流幅度,以及部分离子通道未完全表征等[59-60]。综上, 虽然hiPSC-CMs进一步成熟优化方法的研究也在不 断进行,如增加培养时间、改变培养基添加剂以及 电刺激等,但尚缺乏标准化的最优方法,因为在设计 重编程及诱导分化的过程中,基因修饰及表观遗传 的改变也是一个值得考虑的问题。此外,心脏作为 一个整体,心律失常的发生机制是十分复杂的,例如 为什么同一基因中的突变会导致不同类型的心律失 常? 又为什么携带相同突变的患者可能表现出完全 不同的表型? 单细胞模型虽然能够在一定程度上表 征出电活动的异常,但某些机制(如折返)却要考虑 细胞间的相互联系,加上机体复杂的调控机制,所以 从实验结果到临床翻译,仍须在继续研究后逐步缩 小这些差异和不确定性的前提下进行。

展望未来,相信在不断探索后,hiPSCs技术能够以更加成熟的姿态,不仅能够在解释疾病发生机制方面发挥作用,还能在诸如疾病的早期分子诊断、再生医疗等方面带来更多益处。

#### 参考文献 (References)

- NATTEL S, ANDRADE J, MACLE L, et al. New directions in cardiac arrhythmia management: present challenges and future solutions [J]. Can J Cardiol, 2014, 30(12): S420-30.
- [2] CALVO D, FILGUEIRAS-RAMA D, JALIFE J. Mechanisms and drug development in atrial fibrillation [J]. Pharmacol Rev, 2018, 70(3): 505-25.
- [3] SALA L, HEGYI B, BARTOLUCCI C, et al. Action potential contour contributes to species differences in repolarization response to beta-adrenergic stimulation [J]. Europace, 2018, 20(9): 1543-52.
- [4] GOEDEL A, MY I, SINNECKER D, et al. Perspectives and challenges of pluripotent stem cells in cardiac arrhythmia research [J]. Curr Cardiol Rep, 2017, 19(3): 23.
- [5] BRANDAO K O, TABEL V A, ATSMA D E, et al. Human plu-

ripotent stem cell models of cardiac disease: from mechanisms to therapies [J]. Dis Model Mech, 2017, 10(9): 1039-59.

- [6] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. Cell, 2007, 131(5): 861-72.
- [7] BURRIDGE P W, MATSA E, SHUKLA P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes [J]. Nat Methods, 2014, 11(8): 855-60.
- [8] LEWANDOWSKI J, KOLANOWSKI T J, KURPISZ M. Techniques for the induction of human pluripotent stem cell differentiation towards cardiomyocytes [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(5): 1658-74.
- [9] LIAN X, HSIAO C, WILSON G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(27): E1848-57.
- [10] ZHANG J H, WILSON G F, SOERENS A G, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells [J]. Circ Res, 2009, 104(4): E30-41.
- [11] 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 [J]. Circ Res, 2012, 111(3): 344-58.
- [12] YASSA M E, MANSOUR I A, SEWELAM N I, et al. The impact of growth factors on human induced pluripotent stem cells differentiation into cardiomyocytes [J]. Life sciences, 2018, 196: 38-47.
- [13] MA J, GUO L, FIENE S J, et al. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(5): H2006-17.
- [14] RAPHEL F, BOULAKIA M, ZEMZEMI N, et al. Identification of ion currents components generating field potential recorded in MEA from hiPSC-CM [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2018, 65(6): 1311-9.
- [15] VEERMAN C C, KOSMIDIS G, MUMMERY C L, et al. Immaturity of human stem-cell-derived cardiomyocytes in culture: fatal flaw or soluble problem [J]? Stem Cells Dev, 2015, 24(9): 1035-52.
- [16] WALLIS R, BENSON C, DARPO B, et al. CiPA challenges and opportunities from a non-clinical, clinical and regulatory perspectives. An overview of the safety pharmacology scientific discussion [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2018, 93: 15-25.
- [17] YANG X, PAPOIAN T. Moving beyond the comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay: use of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess contractile effects associated with drug-induced structural cardiotoxicity [J]. J Appl Toxicol, 2018, 38(9): 1166-76.
- [18] LIN M Z, SCHNITZER M J. Genetically encoded indicators of neuronal activity [J]. Nat Neurosci, 2016, 19(9): 1142-53.
- [19] SHINNAWI R, HUBER I, MAIZELS L, et al. Monitoring human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes with genetically encoded calcium and voltage fluorescent reporters [J]. Stem Cell Reports, 2015, 5(4): 582-96.
- [20] MEHTA A, RAMACHANDRA C J A, SINGH P, et al. Identification of a targeted and testable antiarrhythmic therapy for long-QT syndrome type 2 using a patient-specific cellular model [J]. Eur

Heart J, 2018, 39(16): 1446-55.

- [21] BOHNEN M S, PENG G, ROBEY S H, et al. Molecular pathophysiology of congenital long QT syndrome [J]. Physiol Rev, 2017, 97(1): 89-134.
- [22] SALA L, GNECCHI M, SCHWARTZ P J. Long QT syndrome modelling with cardiomyocytes derived from human-induced pluripotent stem cells [J]. Arrhythm Electrophysiol Rev, 2019, 8(2): 105-10.
- [23] WURIYANGHAI Y, MAKIYAMA T, SASAKI K, et al. Complex aberrant splicing in the induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with long QT syndrome carrying KCNQ1-A344Aspl mutation [J]. Heart Rhythm, 2018, 15(10): 1566-74.
- [24] MARBAN E. Cardiac channelopathies [J]. Nature, 2002, 415(6868): 213-8.
- [25] ZHANG M, D'ANIELLO C, VERKERK A O, et al. Recessive cardiac phenotypes in induced pluripotent stem cell models of Jervell and Lange-Nielsen syndrome: disease mechanisms and pharmacological rescue [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(50): E5383-92.
- [26] CHRIST T, HORVATH A, ESCHENHAGEN T. LQT1-phenotypes in hiPSC: are we measuring the right thing [J]? Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(16): E1968.
- [27] ITZHAKI I, MAIZELS L, HUBER I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells [J]. Nature, 2011, 471(7337): 225-9.
- [28] ZHANG K P, YANG B F, LI B X. Translational toxicology and rescue strategies of the hERG channel dysfunction: biochemical and molecular mechanistic aspects [J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(12): 1473-84.
- [29] MEHTA A, SEQUIERA G L, RAMACHANDRA C J, et al. Retrafficking of hERG reverses long QT syndrome 2 phenotype in human iPS-derived cardiomyocytes [J]. Cardiovasc Res, 2014, 102(3): 497-506.
- [30] SAMPSON H M, LAM H, CHEN P C, et al. Compounds that correct F508del-CFTR trafficking can also correct other protein trafficking diseases: an *in vitro* study using cell lines [J]. Orphanet J Rare Dis, 2013, 8: 11.
- [31] SCHWARTZ P J, GNECCHI M, DAGRADI F, et al. From patient-specific induced pluripotent stem cells to clinical translation in long QT syndrome Type 2 [J]. Eur Heart J, 2019, 40(23): 1832-6.
- [32] ZANGERL-PLESSL E M, BERGER M, DRESCHER M, et al. Toward a structural view of hERG activation by the smallmolecule activator ICA-105574 [J]. J Chem Inf Model, 2020, 60(1): 360-71.
- [33] PERRY M D, NG C A, MANGALA M M, et al. Pharmacological activation of IKr in models of long QT Type 2 risks overcorrection of repolarization [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(8): 1434-45.
- [34] MA D, WEI H, ZHAO Y, et al. Modeling type 3 long QT syndrome with cardiomyocytes derived from patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. Int J Cardiol, 2013, 168(6): 5277-86.
- [35] 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(2): 14.
- [36] PORTERO V, CASINI S, HOEKSTRA M, et al. Anti-arrhythmic potential of the late sodium current inhibitor GS-458967 in mu-

rine Scn5a-1798insD<sup>+/-</sup> and human SCN5A-1795insD<sup>+/-</sup> iPSCderived cardiomyocytes [J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(7): 829-38.

- [37] KRONCKE B M, YANG T, RODEN D M. Multiple mechanisms underlie increased cardiac late sodium current [J]. Heart Rhythm, 2019, 16(7): 1091-7.
- [38] DHARMAWAN T, NAKAJIMA T, IIZUKA T, et al. Enhanced closed-state inactivation of mutant cardiac sodium channels (SCN5A N1541D and R1632C) through different mechanisms [J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 130: 88-95.
- [39] SIEIRA J, BRUGADA P. The definition of the Brugada syndrome [J]. Eur Heart J, 2017, 38(40): 3029-34.
- [40] BELBACHIR N, PORTERO V, AL SAYED Z R, et al. RRAD mutation causes electrical and cytoskeletal defects in cardiomyocytes derived from a familial case of Brugada syndrome [J]. Eur Heart J, 2019, 40(37): 3081-94.
- [41] DAVIS R P, CASINI S, VAN DEN BERG C W, et al. Cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells recapitulate electrophysiological characteristics of an overlap syndrome of cardiac sodium channel disease [J]. Circulation, 2012, 125(25): 3079-91.
- [42] 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(19): 2086-96.
- [43] SENDFELD F, SELGA E, SCORNIK F S, et al. Experimental models of Brugada syndrome [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): E2123.
- [44] KOSMIDIS G, VEERMAN C C, CASINI S, et al. Readthroughpromoting drugs gentamicin and PTC124 fail to rescue Nav1.5 function of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes carrying nonsense mutations in the sodium channel gene SCN5A [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2016, 9(11): E4227.
- [45] LIEVE K V, VAN DER WERF C, WILDE A A. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia [J]. Circ J, 2016, 80(6): 1285-91.
- [46] BALTOGIANNIS G G, LYSITSAS D N, DI GIOVANNI G, et al. CPVT: arrhythmogenesis, therapeutic management, and future perspectives. A brief review of the literature [J]. Front Cardiovasc Med, 2019, 6: 92.
- [47] GARG P, GARG V, SHRESTHA R, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as models for cardiac channelopathies: A primer for non-electrophysiologists [J]. Circ Res, 2018, 123(2): 224-43.
- [48] ACIMOVIC I, REFAAT M M, MOREAU A, et al. Post-translational modifications and diastolic calcium leak associated to the novel RyR2-D3638A mutation lead to CPVT in patient-specific hiPSC-derived cardiomyocytes [J]. J Clin Med, 2018, 7(11): E423.
- [49] BUENO-LEVY H, WEISBROD D, YADIN D, et al. The hyper-

polarization-activated cyclic-nucleotide-gated channel blocker ivabradine does not prevent arrhythmias in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1566.

- [50] ZHANG Y, LI A, HUANG C L, et al. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an infant with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia carrying the double heterozygous mutations A1855D in RyR2 and Q1362H in SCN10A [J]. Stem Cell Res, 2019, 39: 101509.
- [51] 黄从新,张澍,黄德嘉,等. 心房颤动:目前的认识和治疗的 建议-2018[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志(HUANG C X, ZHANG S, HUANG D J, et al. Atrial fibrillation: current understanding and treatment recommendations-2018 [J]. Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology), 2018, 32(4): 315-68.
- [52] BAPAT A, ANDERSON C D, ELLINOR P T, et al. Genomic basis of atrial fibrillation [J]. Heart, 2018, 104(3): 201-6.
- [53] NAKANISHI H, LEE J K, MIWA K, et al. Geometrical patterning and constituent cell heterogeneity facilitate electrical conduction disturbances in a human induced pluripotent stem cell-based platform: an *in vitro* disease model of atrial arrhythmias [J]. Front Physiol, 2019, 10: 818.
- [54] MARCZENKE M, FELL J, PICCINI I, et al. Generation and cardiac subtype-specific differentiation of PITX2-deficient human iPS cell lines for exploring familial atrial fibrillation [J]. Stem Cell Res, 2017, 21: 26-8.
- [55] MARCZENKE M, PICCINI I, MENGARELLI I, et al. Cardiac subtype-specific modeling of Kv1.5 ion channel deficiency using human pluripotent stem cells [J]. Front Physiol, 2017, 8: 469.
- [56] LEMME M, ULMER B M, LEMOINE M D, et al. Atrial-like engineered heart tissue: an *in vitro* model of the human atrium [J]. Stem Cell Reports, 2018, 11(6): 1378-90.
- [57] BENZONI P, CAMPOSTRINI G, LANDI S, et al. Human iPSC modeling of a familial form of atrial fibrillation reveals a gain of function of If and ICaL in patient-derived cardiomyocytes [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(6): 1147-60.
- [58] AKDIS D, SAGUNER A M, SHAH K, et al. Sex hormones affect outcome in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/ dysplasia: from a stem cell derived cardiomyocyte-based model to clinical biomarkers of disease outcome [J]. Eur Heart J, 2017, 38(19): 1498-508.
- [59] KARAKIKES I, AMEEN M, TERMGLINCHAN V, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes [J]. Circ Res, 2015, 117(1): 80-8.
- [60] DENNING C, BORGDORFF V, CRUTCHLEY J, et al. Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells: from laboratory curiosity to industrial biomedical platform [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(7 Pt B): 1728-48.