

特约综述



本实验室致力于多能干细胞(PSC)向心肌细胞定向分化的生物学基础与临床应用的研究。多能干细胞可分化为心肌细胞, 具备用于心肌梗塞替代治疗的巨大潜能, 并可作为体外模型研究先天性心脏病相关的基因。我们建立了胚胎干细胞(ESC)与诱导型多能干细胞(iPSC)向心肌细胞分化、鉴定、筛选及标记的技术平台。本课题组研究内容涵盖几个方面: (1)以ESC诱导心肌细胞分化为体外模型, 结合模式动物研究与心脏发育及先天性心脏病相关的基因及机制; (2)探索信号分子对PSC定向分化调控的作用机理, 开发高效诱导分化体系; (3)制备疾病iPS细胞模型, 研究心血管疾病的发生机制和药物筛选; (4)干细胞在心血管再生医学临床的应用研究, 建立细胞移植治疗动物模型。

<http://webplus.xmu.edu.cn/s/30/t/383/a/126277/info.jspy>

人类多能干细胞源心肌细胞的研究进展与应用前景

李 晴 刘 靖 徐秀琴*

(厦门大学医学院基础医学部, 厦门大学医学院干细胞与再生医学研究所, 干细胞与心脏再生实验室, 厦门 361102)

摘要 人类多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSC)具有无限增殖的能力并可体外分化成心肌细胞, 可作为新型的细胞源用于心脏疾病的细胞替代疗法、药物检测及心脏发育生物学的基础研究。hPSC包括人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC)和诱导型人多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSC), 后者的出现不仅使干细胞个性化治疗成为可能, 同时规避了人胚胎干细胞应用的医学伦理问题, 具有较大的发展空间。尽管hPSC源心肌细胞的应用研究已取得极大进展, 但将这种心肌细胞应用于临床仍有许多技术问题需要解决。该文将综述hPSC源心肌细胞的技术进展, 探讨hPSC源心肌细胞的应用前景, 并对存在的问题和挑战也进行了讨论。

关键词 胚胎干细胞; 心肌分化; 再生; 药物筛选

Current Progress and Potential Application for Human Pluripotent Stem Cells-derived Cardiomyocytes

Li Qing, Liu Jing, Xu Xiuqin*

(Stem Cell & Cardiac Regeneration Lab, Institute of Stem Cell and Regenerative Medicine, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract Human pluripotent stem cells (hPSC) with the ability to differentiate into cardiomyocytes in

国家自然科学基金(批准号: 81270199、81201275)、国家高技术研究发展计划(863)(批准号: 2011AA020101)和中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 2010121107)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0592-2185276, E-mail: xuxq@xmu.edu.cn

This work is supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81270199, 81201275), the National High Technology Research and Development Program of China (Grant No.2011AA020101) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (Grant No.2010121107)

*Corresponding author. Tel: +86-592-2185276, E-mail: xuxq@xmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-2-26 17:17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130226.1717.007.html>

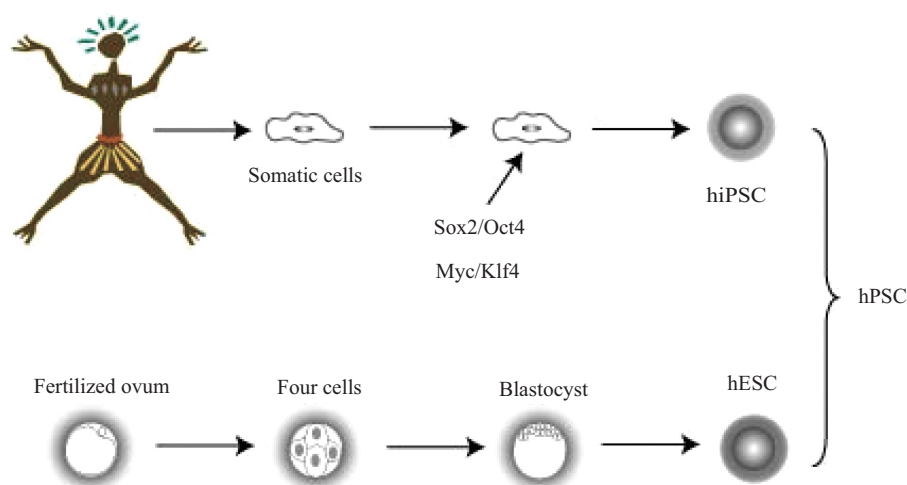
culture, open the possibility of generating a virtually unlimited supply of cardiomyocytes for clinical applications, drug discovery, and provide an *in vitro* model for heart development. The past decade sees significant progress in this field. The advent of induced pluripotent stem cell (iPSC) technology enables personalized cell therapies and negates ethical concerns surrounding human embryonic stem cells. Despite the great progress, the clinical use of hPSC-cardiomyocytes as regenerative medicine is still in its infancy, and many technical hurdles remain to be addressed. This review summarizes technical advances toward the generation of clinically relevant human cardiomyocytes from hPSC, including the methods of differentiation, enrichment, and scale-up. We also provide an update on the potential of hPSC-cardiomyocytes to be used as a reagent for clinical application, pharmaceutical drug development, and basic cardiovascular research. Furthermore, we highlight the key barriers that need to overcome before hPSC-mediated human heart repair becomes a reality.

Key words embryonic stem cells; cardiac differentiation; regeneration; drug discovery

心脏疾病是现代社会人类健康的第一杀手, 其中因冠状动脉堵塞引起的急性心肌梗死及继发性大量心肌细胞凋亡或坏死导致的不可逆性心脏结构和功能破坏是致死的主要原因。由于心肌细胞属于终末分化细胞, 几乎没有再生能力, 使得心肌梗死及其后续引起的心脏衰竭的治疗成为世界难题。心脏移植虽然是有效的治疗手段, 但器官捐献者的缺乏使这一治疗方案无法得到广泛实施。目前, 药物治疗不能使坏死的心肌细胞再生, 心脏辅助装置、基因治疗等手段对已坏死或无功能心肌组织也尚无办法, 而来源于干细胞的心肌细胞移植疗法有望成为治疗心脏衰竭最有潜力的方法。

人类多能干细胞(human pluripotent stem cells,

hPSC)是指具有无限增殖、多分化潜能的一类干细胞, 包括人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC)和诱导型人多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSC)(图1)。hESC是指从桑葚胚或附植前囊胚内细胞团分离出的多潜能细胞, 1998年由美国Thomson等^[1]首次体外成功分离培养建系。hiPSC是日本科学家Yamanaka实验室运用重编程诱导多能干细胞技术(induced pluripotent stem cells, iPS), 将4种转录因子Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4(或Oct4、Sox2、Nanog和Lin28)组合导入体细胞, 将分化的体细胞重编程, 转变为胚胎干细胞样细胞^[2]。iPS技术的优势在于利用病人的自体细胞作为种子细胞, 解决了细胞移植的免疫排斥问题, 使干细胞个



hPSC的来源包括胚胎干细胞和诱导型人多能干细胞。

hPSC is derived from human embryonic stem cell(hESC) or by reprogramming of human induced pluripotent stem cells(hiPSC).

图1 hPSC的来源

Fig.1 The sources of human pluripotent stem cells(hPSC)

性化治疗成为可能, 该技术的出现也大大推动了干细胞的临床应用。

目前, 人们已成功诱导了hPSC向心肌细胞的分化, 并对hPSC源心肌细胞的分子生物学特征及功能进行了深入研究^[3-4]。另外, 由于分化方法及规模化扩增技术的极大进展, hPSC源心肌细胞已成为临床心血管医学研究的前沿。在体外模型研究方面, hPSC源心肌细胞不仅可以移植到心血管疾病的动物模型中, 而且对于研发药物及研究心脏发育机制具有重要意义。以下我们将对这几个方面的研究动态和进展作一简要综述。

1 hPSC源心肌细胞技术进展

1.1 诱导hPSC向心肌细胞分化的方法

获得功能性hPSC源心肌细胞是开发hPSC在药物筛选、疾病模型以及细胞治疗领域应用的前提。诱导hPSC分化为心肌细胞的方法一般有三种: 拟胚体形成法、与内胚层细胞共培养法和加入特定诱导物定向分化法。

1.1.1 拟胚体形成法 拟胚体是胚胎干细胞在悬浮培养条件下形成的具有三维结构的细胞团, 细胞构成与发育中的胚胎相似, 包括内、中、外三种初始胚层^[5]。在分化培养基的作用下, 部分拟胚体分化为心肌样细胞, 产生节律性收缩^[6-7]。

目前, 多采用胶原酶消化或机械消化的方法使hPSC从饲养层细胞上脱落, 然后将其悬浮培养在分化培养基中, 诱导hPSC形成拟胚体^[8]。这种培养方法需要将细胞打散成单个细胞, 在诱导鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESC)向心肌细胞分化的实验中获得成功。但由于hPSC较脆弱, 在单细胞状态下成活率低, 这种方法不适用于从hPSC中获得拟胚体。为解决这一问题, 有研究者通过离心把分散的hPSC重新聚集在圆底的96孔板中^[9], 或使用V型细胞板并添加Rho相关激酶(Rho-associated kinase, ROCK)抑制剂来促进hPSC的存活^[10-11]。这些方法虽然可以提高细胞的成活率、较好地控制拟胚体的大小和均一性, 但并不适合规模化扩增培养。

虽然拟胚体的分化在某种程度上是随机的, 但一些因子却可以诱导它们向心肌细胞定向分化。研究发现一些小分子, 如维甲酸、DMSO、5-氮杂胞苷、维生素C、视黄醛X受体(retinoid X receptor, RXR)

激活剂及过氧化物酶增殖激活的受体(peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPAR- α)拮抗剂等均可诱导鼠拟胚体向心肌细胞分化^[12-16]。5-氮杂胞苷和维生素C能够促进hESC向心肌细胞分化^[4,17]。Cao等^[18]也证实, 维生素C通过促进心脏祖细胞的增殖, 可提高鼠及人的iPSC向心肌细胞的分化效率, 提高效率分别为7.3倍和30.2倍。另外, 一些生长因子及细胞因子, 如BMP(bone morphogenetic protein)、FGF(fibroblast growth factor)、oxytocin、cardiotrophin 1^[19-22]也可以促进mES向心肌细胞分化。通过高通量筛选技术, 研究者们还发现二氨基嘧啶及磺酰脲类化合物可以诱导鼠胚胎癌细胞系P19及胚胎干细胞系分化为心肌细胞^[23-24], 但是它们是否可以诱导hPSC向心肌细胞的定向分化尚未见报道。近年来, 随着心脏发育机制的逐步阐明, 研究者们可以通过控制信号通路诱导hPSC的定向分化。Lian等^[25]发现通过顺序抑制GSK3(glycogen synthase kinase 3)、 β -catenin的表达或者通过化合物瞬时抑制Wnt信号通路, 可高效诱导多种hPSC细胞系产生功能性心肌细胞, 纯度高达98%。

1.1.2 与内胚层细胞共培养法 另外一种方法是将ES细胞与内胚层细胞共培养来诱导其向心肌细胞分化。END2细胞来源于鼠胚胎瘤, 属于内脏内胚层样细胞系。早期研究表明, mESC与END2细胞共培养可诱导mESC向心肌细胞定向分化^[26-27]。这一方法同样适用于hESC的诱导分化, 并且有研究发现, 在这一过程中使用无血清培养基可提高诱导效率^[28]。但END2细胞来源于鼠, 这种方法可能导致源性成分引入hESC, 因此并非临床应用的理想方案。

为获得临床可用的高纯度心肌细胞, 我们系统分析了END2的调整培养基(conditioned medium, CM)并寻找其促心肌分化的机制。结果发现, 培养过END2细胞的调整培养基能够清除抑制ES分化的因子——胰岛素。此外, 一种由END2细胞代谢产生的小分子前列环素(PGI₂), 可有效诱导ES向心肌细胞分化; 进一步研究发现, 使用添加PGI₂无血清培养基的同时如添加p38 MAPK的抑制剂SB203580, 可更高效地获得心肌细胞。该方法在国际上首次实现了在无饲养层、无血清并且化学成份明确的条件下定向诱导ES细胞向心肌细胞分化, 使hESC源心肌细胞应用于临床成为可能^[29]。

1.1.3 定向诱导分化法 有些学者致力于研究在

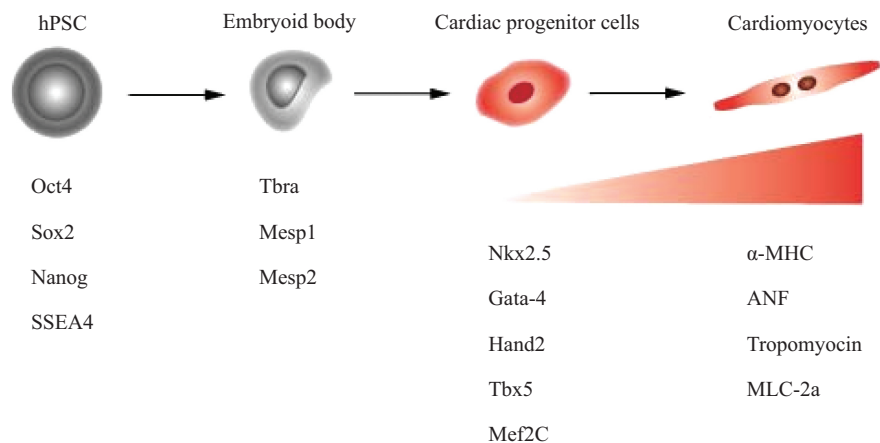
无拟胚体形成的情况下诱导iPSC定向分化为心肌细胞的方法。Laflamme等^[30]在无血清培养基中添加Activin和BMP4, 可获得30%的心肌细胞; 另一个课题组通过在此基础上添加FGF和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的方法也获得了来源于ES的心肌细胞^[31]。还有一些研究者通过分选KDR和C-KIT阳性细胞以获得ES分化过程中出现的多潜能心血管祖细胞。分选出的心血管祖细胞可分化成心肌细胞、血管内皮细胞及平滑肌细胞; 进一步采用细胞表面标志物PDGFR α 筛选可以获得更高纯度的心肌细胞^[32]。实验发现, 这种优化后的方法即使不经第一步心血管祖细胞的筛选, 也可获得纯度大于50%的心肌细胞。

尽管目前已有多种从hPSC获得心肌细胞的方法, 但很难对各种方法的优劣进行比较, 并且各种方法的重复性低。实际上, 由于各种hESC细胞系在遗传学及表观遗传学方面存在差异, 且不同实验室培养hESC的方法不同, 因此衍生出多种分化培养方法^[33-34]。最近有报道称, 一种新的心肌细胞分化方法可在hESC及iPSC中产生同样的效果。研究者把hESC分散成单个细胞诱导其形成拟胚体, 离心后培养于V型底的96孔板中, 能诱导多种hESC产生64%~89% Troponin I阳性的心肌细胞^[35]。但这一方法还有待于其它实

验室的验证。

1.2 hPSC源心肌细胞的分子表型及功能特征

在hPSC向心肌细胞的分化过程中, 可检测到多种转录因子的时序性表达。ES细胞带有Oct4、Nanog、SSEA4和Sox2等多潜能标志(图2), 进入分化进程后, 它们的表达迅速降低^[29]; 随后, 中胚层标志Tbra、Mesp1及Mesp2瞬时表达上升^[36]。早期心肌特异性转录因子Nkx2.5、Gata-4、Hand2、Tbx5和Mef2C的表达标志着心肌细胞开始生成; 到拟胚体发育的第12天, 心脏特异性标志物ANF、结构蛋白 α -MHC、MLC-2a及Tropomyosin开始表达, 并且随着分化时间的延长表达量逐渐升高^[37-38](图2)。免疫染色结果显示, hPSC可分化为多种心肌细胞, 包括心房细胞和心室细胞等。Pipette-aided细胞内记录及膜片钳分析也显示分化细胞中包含窦房结、心房细胞及心室细胞^[39-40]。有趣的是, 这些不同类型心肌细胞的分化比例取决于所选择的分化培养方法。例如, 通过形成拟胚体的方法诱导ES向心肌细胞分化, 得到的大多是心室细胞, 同时也有相当比例的窦房结细胞及心房细胞^[39]; 而通过与END2细胞共培养可获得80%的心室细胞^[40]。但不管应用哪种分化方法, hESC源心肌细胞均带有胚胎表型, 显示相对活跃的静息电位及相对低的动作电位升支速



hPSC带有Oct4、Nanog、SSEA4和Sox2等多潜能标志, 形成拟胚体后, 它们的表达迅速降低, 同时伴随着中胚层标志Tbra、Mesp1及Mesp2瞬时表达上升。Nkx2.5、Gata-4、Hand2、Tbx5和Mef2C的表达标志着心肌细胞生成的开始。随后, 心脏特异性标志物ANF、 α -MHC、MLC-2a及Tropomyosin开始表达, 并且随着分化时间的延长表达量逐渐升高。

hPSC expresses many key pluripotent markers such as Oct4, Nanog, SSEA4 and Sox2. Upon differentiation initiation, the expression of the markers like Oct-4, Nanog, SSEA4 and Sox2 were quickly down-regulated, followed by transient up-regulation of mesodermal markers such as Tbra, Mesp1 and Mesp2. The expression of the early cardiomyocyte-specific transcription factor Nkx2.5, Gata4, Hand2, Tbx5 and Mef2C marked the beginning of cardiomyogenesis. Then, the structural proteins ANF, α -MHC, MLC-2a and Tropomyosin were expressed, and the expression level increased with time.

图2 hPSC向心肌分化的示意图及在分化过程中细胞分子标志物表达的变化

Fig.2 Schematic illustration of hPSC cardiac differentiation stages and associated markers

度。Sartiani等^[41]通过监控膜电流变化及离子通道基因的表达,发现hESC源心肌细胞培养3个月后才发育成熟,但也未发展到与成人心室细胞相当的成熟度。

1.3 hPSC源心肌细胞的规模化扩增和纯化

hPSC源心肌细胞能否进行规模化扩增及纯化对其在细胞治疗及药物研究领域的应用至关重要。

1.3.1 hPSC源心肌细胞的规模化扩增 现有的规模化细胞培养平台多用于能耐受胰酶消化、由单个细胞生长形成的非永生化细胞系,而hPSC最好的生长条件是在饲养层上克隆化生长,这是大多数生物反应器所不能满足的。将无滋养层培养技术及ROCK抑制剂用于hPSC培养,使hPSC能适应于生物反应器的培养条件,是未来的发展方向,但如何使其高效生长仍是一个挑战。

许多研究小组尝试在微载体上培养及扩增hESC。Phillips等^[42]将hESC接种于Hillex™磁珠上静止培养24 h,然后放在旋转瓶中不时搅拌。培养7 d后,细胞扩增了两倍;而通过在Cytodex™磁珠上包被基质胶^[43]或变性胶原^[44]的方法可以使细胞扩增7倍。Lock等^[45]在旋转培养瓶中使用基质胶包被的HyQSpheres™扩增hESC,基于基质胶中的FoxA2和Sox17可诱导细胞分化,这种方法能够获得80%的内胚层细胞,并且可以在8天内扩增细胞34~45倍。但由于仅建立了50 mL培养体系,并且未证明后续传代是否有效,因此还需进一步验证。Oh等^[46]分别用静止及振荡培养的方法,把hESC接种于用基质胶包被的纤维素珠子上。细胞可以通过胰酶及胶原酶消化的方法进行传代,并且两种细胞系可持续传代25次而保持核型不变。随后,这一小组在层黏连蛋白包被的TOSHO-10™上培养hESC,发现在这一培养体系中,直接加入心肌生成培养基就可获得心肌细胞^[47],但遗憾的是,所获得的心肌细胞比在搅拌培养条件下数量减少了一半。

最近报道了一种悬浮培养hESC的方法^[48],该方法因无需把hESC接种在底物上而具有良好的前景。该方法通过“研碎(trituration)”将大细胞团打散成小细胞团进行传代。实验证明,多种ES细胞系用这种方法培养可保持10周内未分化,但由于在传代过程中有细胞损失,细胞生长率较在饲养层上缓慢。培养20周后,有一个hES细胞系出现核型改变。同时,Amit等^[49]通过在生长培养中添加FGF和IL-6、Singh

等^[50]商业化的mTeSR1培养基,均证实了hESC可以在无载体条件下进行悬浮培养,但这些方法可否用于大规模化生物反应器扩增仍未可知。

1.3.2 hPSC源心肌细胞的纯化 获得均质、高纯度的hPSC源心肌细胞是开展下游体内与体外应用的先决条件。特别是用于细胞治疗的心肌细胞必须是无杂质、细胞状态均一的。重要的是,其中不能包含未分化的细胞,否则移植后可能产生畸胎瘤。早期人们通过人工挑选搏动区域的方法收集hESC源心肌细胞^[3],这种原始的方法显然不适用于规模化富集。另一种方法是通过Percoll梯度离心的方法收集拟胚体,然后悬浮培养这些“cardiac bodies”^[51]。如果进一步通过流式细胞仪分选 α -MHC阳性细胞,可使心肌细胞富集率达到60%。也有报道通过细胞表面标志物CD166^[52]、EMILIN2^[53]或者线粒体染料四甲基罗丹明乙酯^[54]进行细胞分选,可使阳性细胞富集率达到60%~99%。但该方法的不足之处是分选细胞的条件十分恶劣,且并未报道分选后细胞的存活比例。因此,通过细胞分选的方法纯化心肌细胞仍是一种低效的方法。

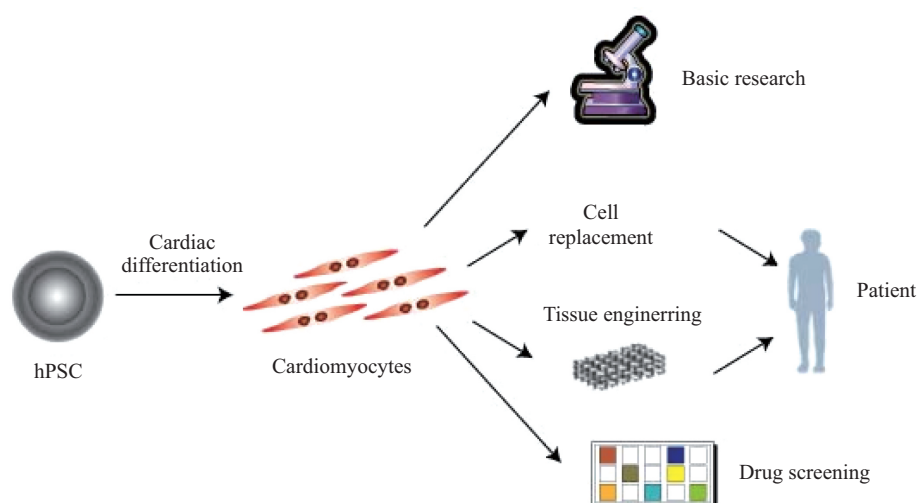
基于转基因表达的谱系筛选策略是富集hPSC源心肌细胞最有效的方法。该方法首先被成功运用于从mESC中富集心肌细胞^[55]。将 α -MHC启动子与编码新霉素抗性基因的cDNA融合,然后稳定转染mESC,在细胞分化过程中加入G418筛选,可获得高纯度的心肌细胞。我们率先将谱系筛选的方法成功应用于hESC,筛选后的细胞经细胞免疫染色鉴定,证明富集的心肌细胞纯度可达99%^[56]。与其它方法相比,谱系筛选方法最适于大规模扩增hESC源心肌细胞。虽然在hPSC中引入基因将给临床应用带来巨大的安全性考验,但选择一个合适的转基因及安全的插入位点可使风险大大降低。值得指出的是,这种高纯度的人源心肌细胞将是药物研发理想的细胞源。

2 hPSC源心肌细胞的应用

hPSC源心肌细胞可用于心脏再生治疗、药物开发和心脏发育的基础研究等领域(图3)。

2.1 心脏再生的细胞治疗

心血管疾病是全世界发病率和死亡率最高的疾病之一。hPSC具有生产无限量心肌细胞的能力,在再生医学治疗心脏疾病方面展示了很好的应用前景。此外,iPS技术的发明更使利用自体细胞进行个



来源于hPSC的心肌细胞可用于心脏再生治疗、药物开发和心脏发育的基础研究等领域。

hPSC-derived cardiomyocytes can be used in the fields of cardiac regeneration therapy, drug pharmacopoeia and basic research on heart development.

图3 hPSC源心肌细胞的应用

Fig.3 The use of human pluripotent stem cells derived cardiomyocytes(hPSC-CM)

性化治疗成为可能。目前,在移植hPSC源心肌细胞治疗心血管疾病的动物模型中取得了一定进展,但尚未观察到非常显著的长期疗效。

初期研究中,Laflamme等^[57]利用Percoll梯度离心法富集来源于hESC的心肌细胞,热休克处理后将其移植到健康无胸腺大鼠的左心室壁中,虽然移植后有大量细胞死亡,但存活的细胞植入情况良好,并且大多数表达肌节标记蛋白MHC(myosin heavy chain)。在后续研究中发现,热休克结合促存活因子的cocktail能促进梗死区域的心肌重生;并且实验表明,移植后hESC源心肌细胞可明显触发血管性反应,移植区域伴有大量血管生长。有趣的是,这些新生血管中包含有大量来源于人类的血管,提示移植细胞中混有内皮始祖细胞。胸壁超声心动图及核磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)检测表明,移植4周后心室扩张及收缩壁厚度有所改善,但左心室射血分数未见明显增加。

van Laake等^[58]将 2×10^6 个带有GFP标记的hESC源心肌细胞移植至心梗NOD SCID鼠中。免疫组化结果显示,移植13周后移植长期植入,并且移植细胞存活良好。虽然最初移植的细胞中仅含有20%~25%的心肌细胞,但移植到体内后,可观察到心肌细胞逐渐富集并成熟。MRI数据表明,与未移植组

相比,移植组在移植4周后心功能得到明显改善,3个月后心功能改善不再显著。但最近有研究指出,将hESC源心肌细胞移植至慢性大鼠心肌梗模型,并不能改善心脏功能,甚至不能阻止心脏重塑的发生^[59]。

hESC源心肌细胞除了应用于治疗心肌梗死,还具备作为生物起搏器的潜能。Kehat等^[60]和Xue等^[61]将hESC源心肌细胞与大鼠心肌细胞共同培养,发现hESC源心肌细胞可在体内、外起搏不活跃的心室肌细胞,表现为拟胚体的节律性收缩与大鼠组织的电活动同步;细胞连接处connexin-43免疫染色阳性,进一步证实了两种细胞间的耦合性生长。通过三维电生理分析发现,将hESC源心肌细胞移植至房室传导阻滞的猪模型中,可起搏猪的心脏^[60]。这些研究表明, hESC源心肌细胞移植到动物心脏后可与受体心肌发生整合,说明hESC源心肌细胞有作为生物起搏器的医疗潜能。

2.2 药物开发领域的应用

hPSC源心肌细胞有望近期转化的应用是将其作为药物检测的体外细胞模型,尤其是将hPSC源心肌细胞用于评估药物对心肌细胞的毒性方面。以往药物研究结果显示,许多药物可导致致命性心律失常,也称为扭转型心动过速(torsades de pointes, TdP)^[62]。TdP的形成表现为心电图QT间期延长,即心室动作

电位的持续时间延长。大多数导致QT间期延长的药物可抑制hERG(human ether-a-go-go related gene)钾离子通道^[63]。hERG钾离子通道介导心肌膜电位复极化, hERG的抑制会延长动作电位持续时间, 导致心律失常。

目前大多药物研发者评价新药物的心脏毒性, 通常首先检测其在心肌细胞系中是否抑制hERG钾离子通道的表达。但由于hERG的抑制并不总是导致QT间期延长, 因此单一检测hERG离子通道的表达会产生许多假阳性结果。例如维拉帕米(verapamil)可阻断hERG通道, 但也能同时抑制L-型钙离子通道^[63]。由于维拉帕米对这两种通道蛋白的双重作用, 导致其对QT间期影响甚小, 甚至会缩短QT间期。因此, 药物研发者需要更可靠的研究模型以减少由单一hERG离子通道检测带来的假阳性结果, 而hPSC源心肌细胞因具备表达人心中几乎所有通道蛋白的特征而成为药物筛选的良好模型。由于hPSC源心肌细胞能够产生自发搏动, 研究者可通过微电极阵列(microelectrode arrays, MEA)检测动作电位的持续时间以便更全面地分析药物毒性。作者通过研究发现, 化合物E-4031和阿司咪唑(astemizole)可延长hESC源心肌细胞的QT间期^[38]。Tanaka等^[64]也在iPSC来源的心肌细胞中证实维拉帕米可缩短场电位的持续时间, 而E-4031的作用相反。Braam等^[65]也有类似的发现。

然而, 单一检测QT间期延长并不足以预测扭转型心动过速。例如, 许多化合物能延长动物和人的QT间期, 但并不引起扭转型心动过速^[66]; 相反地, 一些化合物能够引起扭转型心动过速, 却不延长QT间期。hPSC源心肌细胞模型可提供QT间期预测以外的更多信息。例如, 有研究通过膜片钳记录发现E-4031可诱导hESC源心肌细胞动作电位的早期除极, 这可能是引起扭转型心动过速的原因^[67-68]; 又有研究表明, 与兔或犬齿类动物的浦肯野纤维细胞相比, hESC源心肌细胞对奎尼丁(quinidine)和特非那定(terfenadine)更敏感。Jonsson等^[69]通过膜片钳技术分析心律不齐发生风险的附加参数, 包括逆使用依赖性和动作电位三角形化, 而hESC源心肌细胞模型获得的数据与来自兔浦肯野纤维细胞的数据相当。

虽然hPSC源心肌细胞模型在估测QT间期特性方面比其它传统方法更具优势, 但是hPSC源心肌细

胞呈胚胎样表型仍是一个问题。因此, 寻找更好的分化条件以获得成熟的成人样心室细胞, 或运用组织工程的方法产生类似于成人心脏的成熟、均质并且生理学特征一致的心肌组织是未来的发展方向。除预测心律不齐, hPSC源心肌细胞也可用于预测药物诱导的其它类型的心肌毒性, 例如许多化疗试剂对心脏功能的副作用等, 也有报道通过检测hESC源心肌细胞Troponin T的释放来评估阿霉素的毒性^[70]。

此外, 重编程患者体细胞技术使体外筛选治疗遗传性疾病的药物成为可能。两个小组分别把先天性QT间期延长病人的皮肤成纤维细胞重编程为iPSC^[71-72]。当带有突变基因的iPSC分化为心肌细胞时, 这些心肌细胞表现为QT间期延长, 可作为心脏病的体外表型。此外, 这些带有突变基因的iPSC源心肌细胞对心律不齐药物更敏感。这些研究为利用hPSC作为疾病模型或药物研发模型提供了很好的范例。

总之, 将hPSC源心肌细胞用于药物研发为研究者们提供了更多新的检测方法和疾病模型。自发搏动的细胞可用于筛选增强心脏收缩的药物, 也可以用于研究心肌肥大的机制并筛选治疗药物^[73]。

2.3 心脏发育研究领域的应用

心脏来源于中胚层, 是最早形成并行使功能的器官。心脏发生(cardiogenesis)的早期事件主要出现在胚胎原肠胚时期(gastrulation)。这一时期决定了中胚层细胞向心脏发育的命运, 并且心肌祖细胞开始向胚胎背部、前端部迁移。心脏发生的时间和空间的协调性提示, 这个过程存在着复杂的遗传调控程序, 细胞间的信号传导和基因的时序性表达精确控制着细胞的命运^[74]。大量关于心脏发育早期分子调控机制的研究对象是果蝇、线虫等无脊椎动物和斑马鱼、小鼠等脊椎动物。

来源于人类的hPSC源心肌细胞模型在研究心脏发生发育分子机制中有无可替代的价值。首先, 建立hPSC向心肌细胞分化的模型, 使得在体外研究人心肌细胞的电生理特性成为可能。研究者可以通过MEA来检测心肌细胞的电生理状况。MEA的芯片通常有60个电极可以同步记录信号, 可以直接在这个电极上培养组织或者细胞长达数月, 能够非常方便地监测细胞的电生理活动。另外, 以hPSC源心肌细胞作为体外模型, 有利于探寻影响人心肌细胞发生发育的关键因子、研究心肌细胞分化的调控

机制及相关信号通路。如我们通过分析hESC分化的心肌细胞转录谱,筛选并获得一批与心肌分化发育相关的候选基因^[38];进一步的研究工作结合斑马鱼(zebrafish)动物模型进行功能缺失(loss-of-function)分析,找出了一些与心脏发育相关的基因。我们近期发现其中一个基因——RNA结合蛋白24(RNA-binding motif protein 24, *Rbm24*)在心脏早期发育中具有重要作用。该基因通过调控一系列心脏相关基因的表达维持心脏的正常功能,在心脏细胞肌丝形成及维持心脏节律性收缩的过程中不可或缺^[75]。

3 结论及展望

从过去几年发表相关论文的数量来看, hPSC源心肌细胞及相关领域的发展日渐迅猛。其中iPS技术由于不受伦理道德约束,发展更加引起关注。

3.1 hPSC源心肌细胞的获取

近年来, hPSC源心肌细胞在诱导分化、扩增纯化以及分子表型和功能学研究方面取得了令人瞩目的进展,但仍有许多问题需要解决。例如,建立高效的分化方法和规模化扩增平台、提高心肌细胞成熟度以及定向分化成特异单一的心肌细胞亚型等。因此,需要进一步阐明调控细胞分化的遗传机制及表观遗传机制,同时完善诱导hPSC向心肌细胞分化的方法以及对hPSC源心肌细胞进行规模化扩增和纯化的技术。

3.2 hPSC源心肌细胞的应用

hPSC源心肌细胞在心脏再生治疗、药物开发及疾病模型等领域有广泛的应用前景。

目前, hPSC源心肌细胞移植在啮齿类动物心肌梗模型中并未观察到明显的长期疗效。在再生治疗方面,移植心肌祖细胞^[76]和工程化心脏组织^[77]将是未来研究的方向。目前,一些研究小组已成功地研发了组织工程方法,利用hESC源心肌细胞构建心脏组织^[78-79],并且证明内皮细胞与成纤维细胞的加入将促进血管化组织的产生。亦有研究显示,将hESC源心肌细胞构建成组织能够提高移植细胞的存活率,且有利于整合到移植体中^[80]。同时,作为临床前试验,未来的移植研究应在大型动物上进行,而最终将其应用于心脏病的治疗还有待于hPSC分化效率的进一步提高及周期短、投入低的规模化扩增技术的发展。

hPSC源心肌细胞作为药物检测的体外细胞模

型有着良好的应用前景,然而这有赖于与体内细胞表型类似、成熟、均质的hESC源心肌细胞的规模化生产。因此,关键在于怎样通过稳定的生产条件获得具有成人心室表型的心肌细胞。通过组织工程的方法获得心脏组织将可以提供一个更加接近生理条件的模型。

在建立疾病模型方面,有研究表明,可用诱导hESC分化产生心肌细胞的方法来诱导iPSC分化成心肌细胞^[81-82]。重编程患有先天性心脏病患者的体细胞将为建立个性化体外研究疾病表型提供可能。目前两种先天QT间期延长的心脏病模型已经建立,在不久的将来,将有更多的心脏病模型被复制出来。此外,来自于患者的iPSC源病态细胞可用于寻找新的疾病诊断指标及治疗方案的研究。

综上所述, hPSC源心肌细胞的研究将对心血管医学的发展产生深远影响。虽然仍存在许多技术瓶颈,但干细胞研究的巨大前景必将推动相关领域的迅速发展。结合各领域已取得的成果,促进多学科交叉,跨越医学、发育生物学、组织工程学等学科间的障碍,将为干细胞的临床应用带来关键性的突破。

参考文献 (References)

- 1 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 2 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 3 Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, *et al.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 407-14.
- 4 Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002; 91(6): 501-8.
- 5 Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6(2): 88-95.
- 6 Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: An *in vitro* model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000; 85(6): 645-51.
- 7 Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87: 27-45.

- 8 Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: *In vitro* differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2007; 103(5): 389-98.
- 9 Ng ES, Davis RP, Azzola L, Stanley EG, Elefany AG. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* 2005; 106(5): 1601-3.
- 10 Ungrin MD, Joshi C, Nica A, Bauwens C, Zandstra PW. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One* 2008; 3(2): e1565.
- 11 Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, *et al.* A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; 25(6): 681-6.
- 12 Choi SC, Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Exp Mol Med* 2004; 36(6): 515-23.
- 13 Honda M, Hamazaki TS, Komazaki S, Kagechika H, Shudo K, Asashima M. RXR agonist enhances the differentiation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333(4): 1334-40.
- 14 Sharifpanah F, Wartenberg M, Hannig M, Piper HM, Sauer H. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists enhance cardiomyogenesis of mouse ES cells by utilization of a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Stem Cells* 2008; 26(1): 64-71.
- 15 Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, *et al.* Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 2003; 107(14): 1912-6.
- 16 Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, *et al.* Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(6): 1525-39.
- 17 Yoon BS, Yoo SJ, Lee JE, You S, Lee HT, Yoon HS. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation* 2006; 74(4): 149-59.
- 18 Cao N, Liu Z, Chen Z, Wang J, Chen T, Zhao X, *et al.* Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res* 2011; 21(1): 219-36.
- 19 Ateghang B, Wartenberg M, Gassmann M, Sauer H. Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1 α and intracellular reactive oxygen species. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 6): 1043-52.
- 20 Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, *et al.* Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 2002; 16(12): 1558-66.
- 21 Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, *et al.* Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 2004; 68(7): 691-702.
- 22 Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(14): 9550-5.
- 23 Sadek H, Hannack B, Choe E, Wang J, Latif S, Garry MG, *et al.* Cardiogenic small molecules that enhance myocardial repair by stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(16): 6063-8.
- 24 Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS, Schultz PG. Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *J Am Chem Soc* 2004; 126 (6): 1590-1.
- 25 Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, *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): E1848-57.
- 26 Mummery CL, van Achtenberg TA, van den Eijnden-van Raaij AJ, van Haaster L, Willemse A, de Laat SW, *et al.* Visceral-endoderm-like cell lines induce differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells. *Differentiation* 1991; 46(1): 51-60.
- 27 van den Eijnden-van Raaij AJ, van Achtenberg TA, van der Kruijsen CM, Piersma AH, Huylebroeck D, de Laat SW, *et al.* Differentiation of aggregated murine P19 embryonal carcinoma cells is induced by a novel visceral endoderm-specific FGF-like factor and inhibited by activin A. *Mech Dev* 1991; 33(2): 157-65.
- 28 Passier R, Oostwaard DW, Snapper J, Kloots J, Hassink RJ, Kuijk E, *et al.* Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 2005; 23(6): 772-80.
- 29 Xu XQ, Graichen R, Soo SY, Balakrishnan T, Rahmat SN, Sieh S, *et al.* Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Differentiation* 2008; 76(9): 958-70.
- 30 Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheili V, Fugate JA, Dupras SK, *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007; 25(9): 1015-24.
- 31 Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, *et al.* Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 2008; 453(7194): 524-8.
- 32 Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, *et al.* Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* 2011; 8(2): 228-40.
- 33 Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, *et al.* Characterization of human embryonic stem cell lines by the international stem cell initiative. *Nat Biotechnol* 2007; 25(7): 803-16.
- 34 Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, *et al.* Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2008; 26(3): 313-5.
- 35 Burrridge PW, Thompson S, Millrod MA, Weinberg S, Yuan X, Peters A, *et al.* A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that elimi-

- nates interline variability. *PLoS One* 2011; 6(4): e18293.
- 36 Bondue A, Blanpain C. Mesp1: A key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circ Res* 2010; 107(12): 1414-27.
 - 37 Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 2002; 91(3): 189-201.
 - 38 Xu XQ, Soo SY, Sun W, Zweigerdt R. Global expression profile of highly enriched cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(9): 2163-74.
 - 39 He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: Action potential characterization. *Circ Res* 2003; 93(1): 32-9.
 - 40 Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: Role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003; 107(21): 2733-40.
 - 41 Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: A molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells* 2007; 25(5): 1136-44.
 - 42 Phillips BW, Hentze H, Rust WL, Chen QP, Chipperfield H, Tan EK, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. *Stem Cells Dev* 2007; 16(4): 561-78.
 - 43 Nie Y, Bergendahl V, Hei DJ, Jones JM, Palecek SP. Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Prog* 2009; 25(1): 20-31.
 - 44 Fernandes AM, Marinho PA, Sartore RC, Paulsen BS, Mariante RM, Castilho LR, *et al.* Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(6): 515-22.
 - 45 Lock LT, Tzanakakis ES. Expansion and differentiation of human embryonic stem cells to endoderm progeny in a microcarrier stirred-suspension culture. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(8): 2051-63.
 - 46 Oh SK, Chen AK, Mok Y, Chen X, Lim UM, Chin A, *et al.* Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2009; 2(3): 219-30.
 - 47 Lecina M, Ting S, Choo A, Reuveny S, Oh S. Scalable platform for human embryonic stem cell differentiation to cardiomyocytes in suspended microcarrier cultures. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16(6): 1609-19.
 - 48 Steiner D, Khaner H, Cohen M, Even-Ram S, Gil Y, Itsykson P, *et al.* Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nat Biotechnol* 2010; 28(4): 361-4.
 - 49 Amit M, Chebath J, Margulets V, Laevsky I, Miropolsky Y, Shariki K, *et al.* Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2010; 6(2): 248-59.
 - 50 Singh H, Mok P, Balakrishnan T, Rahmat SN, Zweigerdt R. Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2010; 4(3): 165-79.
 - 51 Xu C, Police S, Hassanipour M, Gold JD. Cardiac bodies: A novel culture method for enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2006; 15(5): 631-9.
 - 52 Rust W, Balakrishnan T, Zweigerdt R. Cardiomyocyte enrichment from human embryonic stem cell cultures by selection of ALCAM surface expression. *Regen Med* 2009; 4(2): 225-37.
 - 53 van Hoof D, Dormeyer W, Braam SR, Passier R, Monshouwer-Kloots J, Ward-van Oostwaard D, *et al.* Identification of cell surface proteins for antibody-based selection of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Proteome Res* 2010; 9(3): 1610-8.
 - 54 Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh YS, Yuasa S, *et al.* Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 2010; 7(1): 61-6.
 - 55 Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98(1): 216-24.
 - 56 Xu XQ, Zweigerdt R, Soo SY, Ngoh ZX, Tham SC, Wang ST, *et al.* Highly enriched cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Cytotherapy* 2008; 10(4): 376-89.
 - 57 Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S, *et al.* Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 2005; 167(3): 663-71.
 - 58 van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J, Verkleij AJ, Lips DJ, Freund C, *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res* 2007; 1(1): 9-24.
 - 59 Fernandes S, Naumova AV, Zhu WZ, Laflamme MA, Gold J, Murry CE. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling after chronic infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49(6): 941-9.
 - 60 Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, *et al.* Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22(10): 1282-9.
 - 61 Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marban E, *et al.* Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: Insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 2005; 111(1): 11-20.
 - 62 Fermini B, Fossa AA. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(6): 439-47.
 - 63 Hoffmann P, Warner B. Are hERG channel inhibition and QT interval prolongation all there is in drug-induced torsadogenesis? A review of emerging trends. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006; 53(2): 87-105.
 - 64 Tanaka T, Tohyama S, Murata M, Nomura F, Kaneko T, Chen H, *et al.* *In vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385(4): 497-502.
 - 65 Braam SR, Tertoolen L, van de Stolpe A, Meyer T, Passier R, Mummery CL. Prediction of drug-induced cardiotoxicity using

- human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 2010; 4(2): 107-16.
- 66 Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, *et al.* Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: Evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003; 58(1): 32-45.
- 67 Caspi O, Itzhaki I, Kehat I, Gepstein A, Arbel G, Huber I, *et al.* *In vitro* electrophysiological drug testing using human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev* 2009; 18(1): 161-72.
- 68 Peng S, Lacerda AE, Kirsch GE, Brown AM, Bruening-Wright A. The action potential and comparative pharmacology of stem cell-derived human cardiomyocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; 61(3): 277-86.
- 69 Jonsson MK, Duker G, Tropp C, Andersson B, Sartipy P, Vos MA, *et al.* Quantified proarrhythmic potential of selected human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 2010; 4(3): 189-200.
- 70 Andersson H, Steel D, Asp J, Dahlenborg K, Jonsson M, Jeppsson A, *et al.* Assaying cardiac biomarkers for toxicity testing using biosensing and cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *J Biotechnol* 2010; 150(1): 175-81.
- 71 Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, *et al.* Modeling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7337): 225-9.
- 72 Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flugel L, *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2010; 363(15): 1397-409.
- 73 Foldes G, Mioulane M, Wright JS, Liu AQ, Novak P, Merkely B, *et al.* Modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte growth: A testbed for studying human cardiac hypertrophy? *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50(2): 367-76.
- 74 Brand T. Heart development: Molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 2003; 258(1): 1-19.
- 75 Poon KL, Tan KT, Wei YY, Ng CP, Colman A, Korzh V, *et al.* RNA-binding protein RBM24 is required for sarcomere assembly and heart contractility. *Cardiovasc Res* 2012; 94(3): 418-27.
- 76 Blin G, Nury D, Stefanovic S, Neri T, Guillevic O, Brinon B, *et al.* A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 1125-39.
- 77 Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, *et al.* Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 2006; 12(4): 452-8.
- 78 Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, *et al.* Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2007; 100(2): 263-72.
- 79 Stevens KR, Pabon L, Muskheli V, Murry CE. Scaffold-free human cardiac tissue patch created from embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(6): 1211-22.
- 80 Tulloch NL, Muskheli V, Razumova MV, Korte FS, Regnier M, Hauch KD, *et al.* Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circ Res* 2011; 109(1): 47-59.
- 81 Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, *et al.* Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009; 104(4): e30-41.
- 82 Mehta A, Chung YY, Ng A, Iskandar F, Atan S, Wei H, *et al.* Pharmacological response of human cardiomyocytes derived from virus-free induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res* 2011; 91(4): 577-86.