

人胚胎干细胞和诱导型人多能干细胞分化的心肌细胞在药物心脏毒性筛选中的应用

王淑颜¹ 汪溪洁¹ 韩玲² 马璟^{1*}

(¹中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203;

²国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038)

摘要 心脏毒性是药物研发失败的主要原因之一,也是临床前安全评价研究的难题之一。人胚胎干细胞和诱导型人多能干细胞均具有无限增殖、自我更新和多向分化的特性,为体外心脏毒性筛选实验提供了细胞资源。人胚胎干细胞和诱导型人多能干细胞诱导分化的心肌细胞相似,具有相同的形态结构,且随着培养时间的推移,功能性K⁺、Na⁺、Ca²⁺通道密度逐渐增加、心肌特异性基因ANF、 α -MHC、MLC-2a的表达量增加,具有相似的动作电位时程和收缩性等特点,相当于幼稚型心肌细胞。将它们应用于已知作用药物的心脏毒性筛选,检测心肌细胞离子通道、动作电位、心脏损伤标志物、收缩功能的变化,获得与临床相似的结果。因此,建立人胚胎干细胞和诱导型人多能干细胞诱导分化心肌细胞的体外评价模型,大大减少了药物研发的时间和成本,克服了种属间的差异,推动了心脏毒性体外评价方法的发展。

关键词 人多能干细胞; 心肌细胞; 心脏毒性; 安全性评价

The Application of Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells Derived Cardiomyocytes on Cardiotoxicity Screening

Wang Shuyan¹, Wang Xijie¹, Han Ling², Ma Jing^{1*}

(¹Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation & Research State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China;

²Center for Drug Evaluation State Food and Drug Administration, Beijing 100038, China)

Abstract Cardiovascular toxicity is one of the main reasons of the failure of the drug development, which is also a difficult problem in preclinical safety evaluation experiment. The unlimited proliferation, self-renewal, multi-directional differentiation properties of human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) provide cell resources *in vitro* cardiac toxicity screening experiment. hESC and hiPSCs derived cardiomyocytes have been reported to share a high degree of similarity in morphology structure, and over time the density of functional potassium, sodium, calcium channels gradually increase, the key cardiac structural and functional genes ANF, α -MHC, MLC-2a robustly upregulate, electrophysiological and biochemical characteristics are similar. These characteristics are similar to that of immature cardiomyocytes. The applications of hESCs and hiPSCs in drug screening, including ion channels, action potentials, biomarkers of cardiotoxicity and contraction,

收稿日期: 2013-08-20 接受日期: 2013-10-11

“十二五”国家科技重大专项新药创制重大专项(批准号: 2012ZX09302002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-50801763, E-mail: jma@ncdser.com

Received: August 20, 2013 Accepted: October 11, 2013

This work was supported by the National Science and Technology Major Projects for New Drug Development (Grant No.2012ZX09302002)

*Corresponding author. Tel: +86-21-50801763, E-mail: jma@ncdser.com

网络出版时间: 2013-12-23 11:11 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0268.html>

and these demonstrated pharmacologic responses similar to those in clinical observations. Establishment of the model *in vitro* reduces the time and the cost, overcomes the problem of species specificity and promotes the development of cardiotoxicity.

Key words human pluripotent stem cells; cardiomyocytes; cardiotoxicity; safety assessment

新型药物的发现、开发和安全性评价是一个长期、艰巨且昂贵的过程, 缺乏经济、可靠、准确地模拟人类生理反应的实验方法一直以来都是药物研发过程中最大的障碍之一。药物研发过程中的高淘汰率也是一个很大的困扰, 超过40%的新化学实体, 在进入临床试验的第三阶段由于无效或不可预见的毒性而失败^[1]。药物研发早期, 高淘汰率的药物通常与体内次优筛选检测结果不准确有关^[2]。目前, 提高新药研发效率的障碍是使用非人类动物模型评价药物的靶器官毒性, 无法准确地预测、评价人体毒性。啮齿类动物实验经常被用来预测人类的心脏毒性, 该实验的明显缺点就是高成本、低通量和有限的人类相关性, 且其离子通道与人的具有差异性。用来来自于动物的心肌细胞进行体外实验, 也不能很好地解释人体实验中出现的结果。人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)和诱导型人多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)诱导分化的心肌细胞提供了克服这些障碍的可能性, 大大降低了新药研发的时间和成本。重要的是, hESC/hiPSCs诱导分化的心肌细胞显示出许多和正常体内心肌细胞相同的特征, 如形态结构、基因表达、功能性离子通道、受体表达及电生理特性^[3-4]。以上这些特征都支持使用hESC/hiPSCs诱导分化的心肌细胞进行药物心脏毒性检测。且随着hESC/hiPSCs技术的发展, 生成这样一种取之不竭的生物细胞资源已成为事实。因此, 在此综述中, 我们将对hESC/hiPSCs诱导分化的心肌细胞在心脏毒性筛选中的应用进行讨论。

1 干细胞的类型及特性

在个体发育过程中, 通常把那些具有自我复制能力并能在一定条件下分化形成一种以上类型细胞的多潜能细胞称为干细胞(stem cell)^[5]。1998年, Thomson等^[6-7]和Shamblott等^[8]首次分别从囊胚和原生胚层细胞分离出人的胚胎干细胞, 并建立了稳定的细胞系。2006年8月, 日本京都大学科学家Takahashi和Yamanaka^[9]首次在Cell杂志上报道, 他

们将*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*和*Klf4*这四个转录因子导入小鼠胚胎或皮肤纤维母细胞, 获得一种多能干细胞, 并称之为诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。2007年, 他们又报道了利用同样的技术将人的皮肤成纤维细胞诱导成为iPSCs^[10], 几乎与胚胎干细胞具有一样的多能性。这项研究成果被《Science》杂志列为2008年世界十大科技突破中的第2位。目前, 可以从神经祖细胞、干细胞、胃黏膜上皮细胞、人精原干细胞、头发角质细胞中获得iPSCs^[11]。iPSCs不仅在细胞形态、生长特性、干细胞标志物表达等方面与胚胎干细胞相似, 且在DNA甲基化方式、基因表达谱、染色质状态、形成嵌合体动物等方面也与胚胎干细胞几乎完全相同。

2 人胚胎干细胞诱导分化的心肌细胞

胚胎干细胞在一定环境下可自发分化为自发节律收缩的心肌细胞, 最常用的方法为悬滴培养聚合形成拟胚体法^[12]。从结构形态上看, 人胚胎干细胞诱导分化的心肌细胞(human embryonic stem cells derived cardiomyocytes, hESC-CM)早期阶段(诱导后20~40 d), 在相差显微镜下观察细胞呈圆形、较小(直径 $131 \pm 32 \mu\text{m}$ 、面积 $480 \pm 32 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$), 缺乏可识别的心肌细胞结构, 与胎儿心肌细胞表型相似, 肌纤维含量低、非聚合、随机分布、不规则。随着心肌细胞的逐渐成熟, 中期阶段(诱导后40~80 d), 肌小节结构逐步完善, 心肌细胞的收缩机制变得更有组织性, 细胞形态更趋向于成人形态^[13]。晚期阶段(诱导后80~120 d), 心肌细胞的形态逐渐成熟(直径 $284 \pm 15 \mu\text{m}$ 、面积 $1\,716 \pm 150 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$), 多核心肌细胞的比例是35.3%(成人心肌细胞中多核心肌细胞的比例是25%~57%)^[14], 且分化为心房、心室、起搏传导细胞等终末细胞。从分子水平看, 人胚胎干细胞向心肌细胞分化的过程中, 多能性基因*Oct-4*、*NANOG*、*SSEA*和*Sox2*的表达迅速下降, 中胚层标志*Tbra*、*Mesp1*及*Mesp2*的表达瞬时上升, 到拟胚体发育的第12 d, 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^[15]。从电生理方面来看, 随着培养时间的延长离子通道逐渐成熟。早期阶段心肌细胞可观察到原始节律动作电位, 如 $L\text{-Ca}^{2+}$ 通道和瞬时 K^{+} 外流通道; 中期阶段心肌细胞表达 K^{+} 电流、 Na^{+} 电流及起搏电流。动作电位上升支主要由 Na^{+} 内流形成, 在发育过程中随着心肌细胞 Na^{+} 通道密度增加, 动作电位上升支的上升速度由胎儿期8 V/s增加到成人期的150~350 V/s, hESC-CM动作电位上升支的速度在4~118 V/s范围内^[15-16]。hESC-CM收缩、舒张过程中均伴随着 Ca^{2+} 瞬变, 对早期阶段和晚期阶段hESC-CM Ca^{2+} 瞬变进行比较可知, Ca^{2+} 瞬变振幅峰值在早期阶段和晚期阶段基本没有发生变化(0.22 ± 0.02 vs 0.24 ± 0.02 F/ F_0 , $P=0.47$); 在晚期阶段最大的上升速度和衰减速度明显提高, Ca^{2+} 瞬变的达峰时间明显缩短(342 ± 2 ms vs 102 ± 1 ms, $P<0.0001$); Ca^{2+} 瞬变中 Ca^{2+} 的再摄取随着hESC-CM培养时间的延长也在不断地发生变化, 晚期阶段hESC-CM具有更快的 Ca^{2+} 瞬变动力学($T_{50\%舒张期}$ 446 ± 3 ms vs 227 ± 2 ms, $P<0.001$)^[14]。使用不同的细胞株可能会产生一定的差异, 这与不同的细胞培养、分化方法有关, 进一步强化了制定标准细胞培养、分化方法的必要性。

3 hiPSCs诱导分化的心肌细胞

目前, 毒理学研究需要高质量、统一、经过验证的hiPSCs诱导分化的心肌细胞(human induced pluripotent stem cells-cardiomyocytes, hiPSC-CM)来满足体外药物心脏毒性筛选的实验要求, 已经建立了从搏动的胚体中高效获得心肌细胞的方案^[17-18]。在基因表达水平上, Lundy等^[14]利用RT-PCR技术对心肌特异性基因(*MYH7*、*MYH6*、*HCN4*、*SCN5A*、*KCNJ2*、*CJAI*、*SERCA2A*)的表达进行比较, 发现iPSC-CM与成人心肌细胞的表达量相似。在电生理水平上, Ivashchenko等^[19]对hiPSC-CM的 Na^{+} 和 Ca^{2+} 通道的生物物理和药理学特性进行了评价, 随着细胞培养时间的推移, Na^{+} 和 $L\text{-Ca}^{2+}$ 通道的密度逐渐增加, 且表现出动作电位的异构性——可能反映了混合的细胞类型(心室、心房、起搏器), 其静息膜电位与成人心肌细胞越来越接近, 电生理反应也能保持很长一段时间(70 d)。在蛋白表达水平上, 胚状体60 d hiPSC-CM表达心肌特异性蛋白, 如肌钙蛋白-T、肌钙蛋白-I、 α -肌动蛋白等。对hiPSC-CM中的肌纤维结构进行分析, 可见分化发育良好的肌纤维呈束

状排列, Z线和A带均清晰可见, 细胞间连接发育良好^[20]。根据实验可知, hiPSC-CM能自发性搏动, 主要表现为三种类型的动作电位: 心室样、心房样、节律样, 且存在兴奋-收缩偶联。hiPSC-CM中存在与自然心肌细胞相似的信号传导通路, 如: MAPK信号通路和PI3K-AKT信号转导通路。

4 人胚胎干细胞和诱导型多能干细胞诱导分化的心肌细胞在药物心脏毒性筛选中的应用

从多方面看, hESC-CM和hiPSC-CM的药理学作用类似, 相当于幼稚型心肌细胞, 在电生理学领域未成熟, 传导速度仅为自然心室肌细胞的5%^[21]。因此, 获得均质、生理学药理学特征成熟的类似于成人样心室肌细胞是未来的发展方向。与hESC-CM相比, hiPSC-CM不使用胚胎细胞或卵细胞, 获得相对容易且不存在伦理学问题; hiPSC-CM可以是来自病人的体细胞, 建立体外疾病模型^[22-23], 提高预测药物心脏毒性的能力。hESC-CM和hiPSC-CM作为药物安全性评价的体外细胞模型, 具有周期短、实验成本低等优点, 越来越受到科研人员的关注, 目前主要应用于筛选药物或候选药物对离子通道、动作电位影响的鉴定, 心肌损伤标志物的建立, 心肌收缩功能的检测等。

心律失常是药物研发失败或撤市的主要原因之一, 心肌细胞膜上 K^{+} 、 Na^{+} 、 Ca^{2+} 的定向性和协调性运动产生心肌细胞的兴奋-收缩偶联, 任何影响这些离子通道的药物均可引起心律失常。hERG(I_{Kr})通道在动作电位复极时起着重要的作用, hERG(I_{Kr})通道抑制剂会引起QT间期延长、尖端扭转型室速^[24]。E-4031是一种hERG(I_{Kr})通道抑制剂, 给予hiPSC-CM E-4031($0.09\text{ }\mu\text{mol/L}$)后, 用xCELLigence RTCA Cardio系统监测发现, hiPSC-CM的搏动频率由 40 ± 1 次/min减低到 22 ± 3 次/min, 且5/6孔出现hiPSC-CM搏动不规则。同样, xCELLigence RTCA Cardio系统监测到 $L\text{-Ca}^{2+}$ 抑制剂氨氯地平($0.09\text{ }\mu\text{mol/L}$)增加hiPSC-CM搏动频率($43\pm2\sim55\pm7$ 次/min)并降低其搏动幅度; I_f 抑制剂扎替雷定($1.11\text{ }\mu\text{mol/L}$)降低hiPSC-CM搏动频率($44\pm4\sim18\pm5$ 次/min)且4/6孔出现搏动不规则^[25]。由此可见, hiPSC-CM对心律不齐药物比较敏感, 具有评价药物所致心律不齐毒性的潜力。心肌细胞动作电位(action potential, AP)的持续时间是由多个离

子通道和空间划分的功能单位决定的^[26]。最近,商业性人多能干细胞诱导分化的心肌细胞的出现,为评价人心肌细胞的AP参数提供了资源。Peng等^[27]利用膜片钳技术证明,在动作电位实验中,和兔、狗的浦肯野纤维[rabbit, canine Purkinje fibers (PFs)]相比,干细胞诱导分化的人心肌细胞(stem cell-derived human cardiomyocytes, SC-hCMs)提供了一个更加优良的药理学灵敏度。例如:比较hERG通道抑制剂Terfenadine、Quinidine、Cisapride、Sotalol、E-4031作用于SC-hCMs和兔、狗PFs复极90%动作电位时程(90% action potential duration APD₉₀)的变化(表1)^[28]。对于致尖端扭转型室速药物Terfenadine、Quinidine、Cisapride SC-hCMs的灵敏度高于兔、狗PFs, SC-hCMs对Sotalol的灵敏度高于狗PFs和兔PFs一样, E-4031在SC-hCMs的灵敏度通过10 nmol/L时动作电位时程的延长被观察到。另外, 100 nmol/L E-4031和100 nmol/L Cisapride在SC-hCMs实验中能观察到早后除极的发生,而在兔、狗PFs实验中未能观察到。和兔、狗PFs相比SC-hCMs具有以下优势:第一, SC-hCMs是人源性细胞, 有效地避免了种属

差异^[27]; 第二, SC-hCMs实验中化合物的用量少, 为难合成候选化合物的早期安全评价提供机会; 第三, SC-hCMs实验稳定、药效快、实验周期短, 节约时间和金钱。在另一研究中, Jonsson等^[25]使用微电极测量人胚胎干细胞诱导的心肌细胞的动作电位, 在相同的实验室、同样的实验装置和同样的实验条件下, 给予hERG通道阻滞剂E-4031后, 同样测得相似的兔浦肯野纤维细胞和人胚胎干细胞诱导的心室样心肌细胞早后除极发生率, 再次证明了SC-hCMs实验的灵敏性。

心肌损伤标志物筛选策略的建立, 促进了药物的大规模毒性筛选。2010年, Andersson等^[29]建立基于人胚胎干细胞诱导分化心肌细胞的心脏损伤标志物(cTnT、FABP3)的检测策略, 大大提高了毒物的筛选规模。肌钙蛋白T(cTnT)和脂肪酸结合蛋白3(FABP3或cFABP)^[30-31]是分析药物心脏毒性的两个关键的心脏生物标记物。通常, 它们也是心肌梗死的临床指标。心肌损伤时, 因心肌细胞通透性增加(可逆性损伤)和(或)cTnT从心肌纤维上降解下来(心肌坏死等不可逆性损伤时)而导致血清cTnT增高, 前

表1 hERG通道抑制剂引起的AP延长(根据参考文献[28]修改)

Table 1 AP prolongation by hERG inhibitors (modified from reference [28])

	干细胞诱导分化的人心肌细胞			兔浦肯野纤维			狗浦肯野纤维		
	SC-hCM			Rabbit PFs			Canine PFs		
	μmol/L	N	APD ₉₀ (Δ%)	μmol/L	N	APD ₉₀ (Δ%)	μmol/L	N	APD ₉₀ (Δ%)
Terfenadine	Control ^a	4	327.2±50.8	Control	4	296.6±49.8	Control	2	290.4±21.4 ^b
	0.003	4	0.4±1.3	—	—	—	—	—	—
	0.01	4	8.4±1.3*	0.01	4	1.7±1.9	0.01	2	0.3±0.8 ^b
	0.03	4	21.3±2.9*	0.1	4	8.5±2.1*	0.1	2	5.6±11.4 ^b
	0.1	4	41.2±7.3*	1	4	18.5±3.4*	1	2	0.6±10.1 ^b
Quinidine	Control ^a	4	310.4±25.8	Control	5	291.2±57.8	Control	4	363.4±6.8
	0.1	4	5.2±1.3*	0.1	5	0.4±2.4	0.1	4	1.1±2.1
	0.3	4	25.7±5.9*	1	5	20.4±4.3*	1	4	12.6±3.1*
	1	4	46.8±7.1*	10	5	97.0±23.9*	10	4	-1.8±5.2
	3	4	79.9±6.1*	—	—	—	—	—	—
Cisapride	Control ^a	4	353.9±65.3	Control	4	302.3±23.7	Control	4	276.0±16.0
	0.003	4	3.0±2.7	0.01	4	1.6±3.5	0.1	4	17.6±2.6*
	0.01	4	12.0±4.8*	0.1	4	50.9±16.1*	1	4	36.6±7.8*
	0.03	4	30.4±6.2*	0.5	4	124.4±49.2*	10	4	46.1±18.1*
	0.1	4	21.0±26.5	—	—	—	—	—	—
Sotalol	Control ^a	5	300.3±36.4	Control	4	209.3±34.3	Control	6	296.1±48.7
	3	4	4.5±0.8*	1	4	5.1±1.9*	—	—	—
	10	4	12.2±1.4*	10	4	30.0±2.5*	—	—	—
	30	4	20.7±1.4*	50	4	60.5±1.2*	100	6	48.9±16.7*
	100	4	57.2±5.5*	—	—	—	—	—	—
E-4031	Control ^a	4	325.5±36.7	—	—	—	Control	4	280.6±13.5
	0.003	4	5.5±0.4*	—	—	—	0.001	4	1.6±2.6
	0.01	4	27.4±4.6*	—	—	—	0.01	4	12.9±6.0
	0.03	4	66.2±16.8*	—	—	—	0.1	4	44.6±9.4*
	0.1	4	EAD	—	—	—	—	—	—

^a代表对照组在毫秒级的数值变化, 其他数值是相对于对照组的变化; ^b代表平均数±方差, 其他的为平均数±标准误差; *P<0.05。

^astands for control values in ms, and all other values are percent change from control; ^bstands for mean±SD, and all others are mean±S.E.M. *P<0.05.

者呈迅速而短暂性升高, 后者呈持续性增高。因此, 血清cTnT浓度测定可反映心肌损伤的情况, 是心肌损伤的特异性标志^[32]。FABP3在心肌梗死早期高浓度释放, 可能是心肌损伤毒性检测中一个更加敏感的生物标志物^[33]。他们结合免疫细胞化学技术(immunocytochemistry)和表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)的方法, 利用耦合配体生物传感器芯片的高特异性来监测药物诱导性心脏毒性。给予人胚胎干细胞诱导分化的心肌细胞浓度为0.625~320 $\mu\text{mol/L}$ 心脏毒性化合物Doxorubicin 24 h后, 使用免疫细胞化学技术和表面等离子体共振的方法监测cTnT和FABP3的释放(图1)^[29]。免疫细胞化学技术和表面等离子体共振方法测得cTnT的释放量相似; 然而FABP3的释放量比cTnT高2.5倍, 且在给予低浓度的Doxorubicin时, 和cTnT相比FABP3呈现出一个稳定的增加信号。由此可见, 在体外和常用的心肌损伤标志物cTnT相比, 基于人胚胎干细胞诱导分化心肌细胞建立的标志物FABP3具有更高的敏感性。

近年来, 多能干细胞诱导分化的心肌细胞的收缩功能越来越受到科学家们的重视, 他们应用微距阵电极系统和实时细胞分析系统通过监测心肌细胞的收缩功能评价药物的心脏毒性。2011年, Gou^[34]等报道利用单层搏动的iPSC-CM建立一个体外高通量筛选模型, 精确地检测药物引起的心脏功能异常

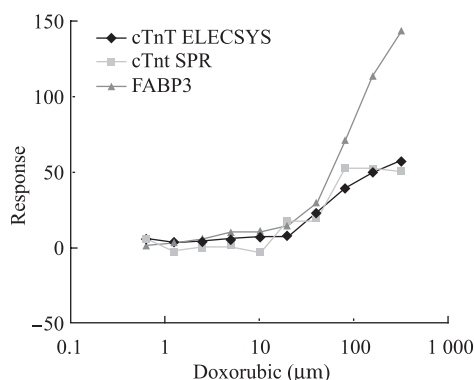
情况。即使用带有微电极阵列的96-孔板, 可以检测iPSC-CM同步收缩的频率、节律和幅度。采用该筛选模型评价了28种已知具有心脏毒性的化合物, 结果显示, 该模型可以灵敏地、精确地检测出化合物特异性的速率改变和/或幅度改变。该筛选模型的建立开拓了药物体外心脏毒性检测的新领域, 更加全面、特异性地检测药物的心脏毒性。此外, 随着科技的发展, 多能干细胞诱导分化的心肌细胞在心脏毒性筛选中的应用越来越广泛。2012年, Abassi等^[35]报道药物的心血管毒性可导致心肌细胞形态学损害和心肌细胞生存能力的缺失。Pointon等^[36]通过检测人胚胎干细胞诱导分化心肌细胞结构的完整性评估细胞生存能力来评价药物的心脏毒性。如: 活细胞荧光成像、线粒体膜电位、内质网的完整性、 Ca^{2+} 动员、膜的通透性。

5 结语

近年来, 从发表的论文数量来看, 人多能性干细胞的应用得到了极大的发展, 特别是人诱导性多能干细胞摆脱了伦理的束缚, 铺平了新药研发和毒性研究的道路。然而, 怎样才能通过稳定的生产条件获得大批量与在体心肌细胞表型相似、成熟、均质的干细胞源性心肌细胞才是关键。人多能干细胞诱导分化的心肌细胞应用于药物心脏毒性的筛选克服了种属差异, 减少了动物的使用, 更加符合“3R”原则, 推动了体外心脏毒性评价方法的发展。

参考文献 (References)

- 1 The bitterest pill. *Nature* 2006; 444(7119): 532-3.
- 2 Lawrence CL, Pollard CE, Hammond TG, Valentin JP. *In vitro* models of proarrhythmia. *Br J Pharmacol* 2008; 154(7): 1516-22.
- 3 Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ, *et al.* High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Electrophysiological properties of action potentials and ion currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(5): H2006-17.
- 4 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.
- 5 安克. 胚胎干细胞定向诱导分化为心肌细胞进展. *中国优生与遗传杂志*(An Ke. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*) 2008; 16(12): 2-4.
- 6 李晴, 刘靖, 徐秀琴. 人类多能干细胞源心肌细胞的研究进展与应用前景. *中国细胞生物学学报*(Li Qing, Liu Jing, Xu Xiuqin. *Current progress and potential application for human pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes*. *Chinese Journal*



hESC诱导分化的心肌细胞在给予浓度0.625~320 $\mu\text{mol/L}$ 的doxorubicin 24 h后, 利用SPR测量cTnT(■)和FABP3(▲)的释放到细胞培养基中的量。cTnT还用免疫细胞化学技术进行测量(◆)。The hESC-derived cardiomyocytes were exposed to doxorubicin for 24 h in the concentration range 0.625~320 $\mu\text{mol/L}$. The amount of cTnT (■) and FABP3 (▲) released into the cell culture medium was analyzed on the SPR instrument. The amount of cTnT was also measured by immunochemiluminescence (◆).

图1 FABP3和cTnT的比较和分析^[29]

Fig.1 Comparison of FABP3 and cTnT assays^[29]

- of Cell Biology) 2013; 35(3): 251-61.
- 7 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.
 - 8 Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13726-31.
 - 9 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
 - 10 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.
 - 11 林晓龙, 姜 桦, 陈 彤. 诱导性多能干细胞的研究进展及应用前景. *中国医药生物技术*(Lin Xiaolong, Jiang Hua, Chen Tong. *Chin Med Biotechnol*) 2010; 5(1): 49-52.
 - 12 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.
 - 13 Snir M, Kehat I, Gepstein A, Coleman R, Itskovitz-Eldor J, Livne E, *et al.* Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(6): H2355-63.
 - 14 Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2013; 22(14): 1991-2002.
 - 15 Dick E, Rajamohan D, Ronksley J, Denning C. Evaluating the utility of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells for drug screening. *Biochem Soc Trans* 2010; 38(4): 1037-45.
 - 16 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.
 - 17 Xu H, Yi BA, Wu H, Bock C, Gu H, Lui KO, *et al.* Highly efficient derivation of ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells with a distinct epigenetic signature. *Cell Res* 2012; 22(1): 142-54.
 - 18 Shinozawa T, Furukawa H, Sato E, Takami K. A novel purification method of murine embryonic stem cell and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by simple manual dissociation. *J Biomol Screen* 2012; 17(5): 683-91.
 - 19 Ivashchenko CY, Pipes GC, Lozinskaya IM, Lin Z, Xu X, Needle S, *et al.* Human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes exhibit temporal changes in phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305(6): H913-22.
 - 20 高 飞, 蔡 军, 杨新春. 体外定向诱导人工诱导多功能干细胞向心肌细胞分化. *心血管病学进展*(Gao Fei, Cai Jun, Yang Xinchun. *Differentiating induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes. Adv Cardiovasc Dis*) 2012; 33(2): 179-81.
 - 21 Zwi L, Caspi O, Arbel G, Huber I, Gepstein A, Park IH, *et al.* Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2009; 120(15): 1513-23.
 - 22 Yamanaka S. Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible. *Cell Stem Cell* 2010; 7(1): 1-2.
 - 23 Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 2010; 465(7299): 808-12.
 - 24 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.
 - 25 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.
 - 26 Zaza A. Control of the cardiac action potential: the role of repolarization dynamics. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48(1): 106-11.
 - 27 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.
 - 28 Lu HR, Marien R, Saels A, De Clerck F. Species plays an important role in drug-induced prolongation of action potential duration and early after depolarizations in isolated Purkinje fibers. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001; 12(1): 93-102.
 - 29 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.
 - 30 Nakata T, Hashimoto A, Hase M, Tsuchihashi K, Shimamoto K. Human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic and prognostic marker in acute coronary syndrome. *Cardiology* 2003; 99(2): 96-104.
 - 31 O'Brien PJ. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 2008; 245(3): 206-218.
 - 32 李 华, 马 璟, 陈长勋. 心肌损伤生物标志物在毒理学实验中的应用进展. *中国新药杂志*(Li Hua, Ma Jing, Chen Changxun. *Progress in application of biomarkers of myocardial injury in toxicity study. Chinese Journal of New Drugs*) 2011; 20(15): 1392-95.
 - 33 O'Donoghue M, de Lemos JA, Morrow DA, Murphy SA, Buros JL, Cannon CP, *et al.* Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2006; 114(6): 550-7.
 - 34 Guo L, Abrams RM, Babiarz JE, Cohen JD, Kameoka S, Sanders MJ, *et al.* Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicol Sci* 2011; 123(1): 281-9.
 - 35 Abassi YA, Xi B, Li N, Ouyang W, Seiler A, Watzele M, *et al.* Dynamic monitoring of beating periodicity of stem cell-derived cardiomyocytes as a predictive tool for preclinical safety assessment. *Br J Pharmacol* 2012; 165(5): 1424-41.
 - 36 Pointon A, Abi-Gerges N, Cross MJ, Sidaway JE. Sidaway phenotypic profiling of structural cardiotoxins *in vitro* reveals dependency on multiple mechanisms of toxicity. *Toxicol Sci* 2013; 132(2): 317-26.