



梁平, 浙江大学转化医学研究院教授, 浙江大学医学院附属第一医院双聘教授, 博士生导师, 杭州市钱江特聘专家, “国家青年千人计划”、“国家优青”项目、“浙江省千人计划”、“浙江省杰青”项目入选者。担任中国医师协会组织和细胞移植专业委员会副秘书长、中国病理生理学会心血管专业委员会青年委员、浙江省医学会组织修复与再生分会青年委员会副主任委员、浙江省医学会组织修复与再生分会心血管学组副组长。担任*American Journal of Stem Cells*、*Stem Journal*、*Gene Therapy*和中华细胞与干细胞杂志等的编委。主持科技部国家重点研发计划(课题组长)、国家自然科学基金、浙江省自然科学基金等科研项目。实验室专注于罕见性心血管疾病的基础和转化医学研究, 发表SCI论文31篇; SCI论文累计影响因子292, 被引用2 346次; 代表性论文发表在*Cell Stem Cell*、*Circulation*、*JACC*、*Circulation Research*等上。荣获第十四届东方心脏病学术会议(OCC2020)“东方新星奖”; 研究成果获*Circulation*年度最佳论文奖(*Circulation Best Paper Award in Basic Science*), 并多次被F1000推荐。

基于人诱导多能干细胞技术的致心律失常性 右室心肌病模型的研究进展

范航平^{1,2} 梁平^{1,2*}

¹浙江大学医学院附属第一医院卫生部多器官联合移植研究重点实验室, 杭州 310003;

²浙江大学转化医学研究院, 杭州 310029)

摘要 致心律失常性右室心肌病(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC)致病机制复杂, 具有家族遗传倾向, 多为常染色体显性遗传, 少部分患者为常染色体隐性遗传并伴有皮肤相关疾病。该心肌病主要表现为以右心室为主的室性心律不齐及纤维-脂肪组织替代, 随着病情发展会出现左心室受累症状。现有研究表明, 该疾病主要与桥粒蛋白编码基因突变有关, 另外一些非桥粒蛋白基因突变与疾病表型的关联性存疑。疾病检测手段的改进以及精确化实验模型的建立可为探究突变位点对心脏功能的影响提供研究基础, 利于阐明基因与疾病表型的相关性, 从而进行靶向治疗。建立合适的动物模型耗时且具有挑战性, 因此对这些突变的具体功能的认知仍然有限。在这种情况下, 携带特定的心肌病相关突变的人类诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)可被认作一种理想工具。该文就致心律失常性右室心肌病产生的分子机制, 包括突变基因、激素水平、运动状况在内的致病因素, 以及来源于患者体细胞的iPSCs研究模型三部分进行总结讨论, 旨在对该疾病的研究现状进行说明。

关键词 致心律失常性右室心肌病; 致病机制; 桥粒蛋白; 研究模型; 诱导多能干细胞

收稿日期: 2020-11-29 接受日期: 2021-01-11

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81870175)、国家重点研发计划(批准号: 2017YFA0103700)和国家自然科学基金优秀青年项目(批准号: 81922006)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86971872, E-mail: pingliang@zju.edu.cn

Received: November 29, 2020 Accepted: January 11, 2021

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.81870175), the National Key Research and Development Project (Grant No.2017YFA0103700) and the National Natural Science Foundation of China Youth Fund (Grant No.81922006)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86971872, E-mail: pingliang@zju.edu.cn

The Research Progress of Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Technology of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy

FAN Hangping^{1,2}, LIANG Ping^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Combined Multi-Organ Transplantation, Ministry of Public Health, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; ²Institute of Translational Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract ARVC (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy) is characterized by family hereditary tendency with complicated pathogenesis. It is mainly for autosomal dominant inheritance, and a few autosomal recessive inheritance patients have also been reported with skin-related diseases. This myocardial disease is characterized by ventricular arrhythmias and fibrous-adipose tissue replacement, mainly in the right ventricle, with progressive left ventricular involvement. Available studies suggest that the disease is mainly associated with mutations in genes encoding desmosomal proteins, some of other non-desmosomal proteins are of doubtful relevance to the disease manifestation. The improvement of cardiopathy-detection tools and the establishment of appropriate models can lay the foundation of exploring the influence of mutated loci on heart function and facilitate the elucidation of gene-phenotype correlations for targeted therapies. For now, building appropriate animal models is time-consuming and challenging, so functional knowledge of these mutations remains limited. In this case, human iPSCs (induced pluripotent stem cells) carrying specific cardiomyopathy-associated mutations can be considered as an ideal tool. This article summarizes and discusses the molecular mechanisms of ARVC, causative factors including mutated genes, hormone levels and exercise status, and research models of iPSCs derived from patient somatic cells, with the aim of shedding light on the current state of research in this disease.

Keywords arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; pathogenic mechanism; desmosome protein; research model; induced pluripotent stem cell

致心律失常性右室心肌病(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC)是一类器质性心脏病,具有家族遗传性,一般为常染色体显性遗传,少数为隐性遗传,存在复合或双基因杂合性突变,临床表现为室性心律失常、心力衰竭以及心源性猝死等症状。ARVC在人群中的发病率为1:2 000~1:5 000,家族性遗传占ARVC发病患者比重大,为50%~70%,男性患者居多,常于中青年时期即10~40岁发病,该病也是导致年轻运动员心源性猝死的主要原因之一^[1]。目前该疾病诊断按照2010年2月国际心脏病专家工作组修订结果执行,由于尚无治愈方法,因此相关治疗策略主要包括限制耐力运动和竞技性运动,针对心律失常及心力衰竭等临床症状进行相应药物针对性治疗,使用植入式心律转复除颤器和心内膜/心外膜导管消融术等^[2]。由于实验动物与人类相比组织结构存在差异且ARVC患者在心脏病变早期样本获取较难,且活检可能会有导致心脏穿孔的风险,因此寻找适当研究模型至关重要。在此,我们概述了ARVC致病机制,

并总结了现有的几类诱导多能干细胞衍生的心肌细胞(induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, iPSC-CMs)。

1 ARVC致病机制

ARVC症状早期多为亚表现型,难以通过常规影像学及心电图被诊断,经典的结构病理特征为右心室心肌组织被脂肪或纤维-脂肪组织替代,病变可从心外膜延伸到心内膜,主要累及肺漏斗前部、心尖部和后下壁之间的区域即“发育不良三角”,且病变存在累及左心室的情况^[3]。针对ARVC分子遗传机制进行的相关研究表明,目前有13个基因与ARVC相关^[4],其中桥粒蛋白基因突变携带者占全部患者半数以上,因此ARVC被普遍认为是一种桥粒蛋白相关编码基因突变导致的常染色体遗传疾病。ARVC患者多为常染色体显性遗传,少部分患者存在与一些皮肤类疾病如斑珠蛋白(plakoglobin, JUP/PG)基因突变引起的Naxos病^[5]和桥粒斑蛋白(desmo-

plakin, DSP)基因突变引起的Carvajal综合征^[6]相关的常染色体隐性遗传情况。

基于ARVC典型临床表现中的心脏室性心率不齐及心肌组织被纤维-脂肪组织替代^[3]情况, ARVC致病机制可分为两类, 一类是心脏收缩相关结构的串扰引起信号传导障碍, 另外一类是改变信号传递通路进而影响细胞凋亡等相关过程。

桥粒复合体是一种电子致密结构, 由细胞膜及支架蛋白组成, 一般充当细胞骨架中间丝锚点。在心脏中, 桥粒复合体位于控制心脏兴奋性、电耦合和细胞间黏附作用的闰盘结构内。闰盘主要由3个复合物: 桥粒、缝隙连接和黏附连接组成, 其中桥粒固定中间丝, 黏附连接锚定肌动蛋白丝, 两者共同维持细胞与细胞之间的黏附作用, 缝隙连接支持电耦合, 介导离子转移^[7]。闰盘内各个结构彼此协作从而形成蛋白质互作网络, 其中参与机械连接的结构可与维持电信号同步的相关结构串扰。研究表明, 降低新生小鼠心肌细胞中血小板亲和蛋白2(plakophilin 2, PKP2)表达, 将改变缝隙连接蛋白(connexins, Cxs)的表达及分布, 其中与高电导通道相关的Cx40和与低电导通道相关的Cx45表达量下降, 而缝隙连接的主要构成蛋白Cx43表达量虽无明显改变, 但其分布改变, 信号排列紊乱^[8]。缝隙连接完整性遭破坏, 将影响电信号传递, 进而导致传导速度减慢和波前传播不均匀^[9]。ZHANG等^[10]和CERRONE等^[11]利用RNA沉默技术分别下调DSP和Pkp2表达后发现, DSP的表达量下降导致细胞中电压门控钠离子通道Na_v1.5电流阈值降低, 缝隙连接蛋白Cx43表达减少, 细胞间电信号传导速度减慢^[10]; Pkp2表达缺失同样影响I_{Na}幅度及相关动力学, 进而对心肌细胞间电信号传导产生影响^[11]。

桥粒复合体不仅可以作为机械连接组织, 也可以参与调节细胞内信号网络^[12]。Wnt/β-catenin信号通路是一类与心肌细胞凋亡以及脂肪细胞形成相关的经典负调控通路。Wnt配体被激活将导致β-catenin移至细胞核与T细胞/淋巴增强因子(T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor, TCF/LEF)在核内结合, 抑制β-catenin与成脂转录相关增强子结合蛋白-α(CCAAT enhancer-binding proteins-α, C/EBP-α)和过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, PPAR-γ)的结合作用, 并维持前脂肪细胞的未分化状态, 进而刺激肌肉

细胞增殖^[13-14]; Wnt配体被抑制将导致细胞转化成脂肪细胞^[15]。在Dsp点突变的杂合小鼠中, 斑珠蛋白被错误地定位于细胞核, 且在核中抑制Wnt/β-catenin信号通路, 最终导致脂肪细胞生成、纤维细胞形成和心肌细胞凋亡^[16]。此外, 氧化应激激活的Hippo/YAP信号通路、机械应激及G蛋白偶联受体信号通路同样参与细胞增殖/凋亡调控过程^[17], 上调这些通路或机械压力强度也会进一步抑制Wnt/β-catenin信号通路。

此外, 关于室性心律失常和心肌纤维脂肪替代反应的发生机制还存在钙调节蛋白功能障碍^[18]、心脏组织完整性受损、PPAR-γ途径受抑进而导致关键调节因素核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)活性上调^[19]及其他一些非桥粒基因突变引起心脏功能的改变等观点。

2 ARVC致病因素

目前ARVC相关基因研究涉及面广, 尽管测序结果表明致病基因多为桥粒蛋白基因, 但仍存在桥粒外的基因突变引起心脏功能及结构异常的现象。现有研究大部分致力于探索基因型-表型相关性(表1)及环境因素对疾病的影响。

2.1 桥粒蛋白基因突变

桥粒蛋白复合物是心脏闰盘重要组成复合物, 可承受一定的机械压力。在细胞内, 桥粒复合体蛋白由跨膜蛋白和桥粒黏连蛋白组成。在人体细胞内, 跨膜蛋白由桥粒钙黏素蛋白家族中三种桥粒芯胶蛋白DSC1~3(desmocollin 1~3)和四种桥粒芯糖蛋白DSG1~4(desmoplakin 1~4)组成^[20], 而桥粒黏连蛋白由PKP2、JUP及DSP组成。鉴于桥粒蛋白复合物在细胞连接方面具有重要作用, 因此相关基因的突变会导致桥粒黏附受损, 影响细胞间连接及信号传递等功能, 进而对整体组织造成严重的后果。

2.1.1 PKP2 血小板亲和蛋白PKP属于狢狢蛋白家族成员, 由1个N-端头部结构域、10个不完整的氨基酸重复序列及1个小的C-端尾部结构域组成, 在细胞中存有四种剪接亚型, 其中人类心肌细胞主要由98 kDa的桥粒蛋白PKP2组成^[11]。PKP2在家族遗传性ARVC相关突变中占比高达70%^[21], 而非家族性ARVC多与PKP2无关, 两类患者ARVC疾病起源不同。在人体中, PKP2定位于12p11^[12], 突变多为碱基对插入/缺失导致的移码突变(40%), 其次为25%的无

表1 ARVC相关致病基因概览
Table 1 Overview of ARVC-related pathogenic genes

基因 Gene	表达蛋白 Protein	类型 Type	基因定位 Gene localization	表达定位 Protein localization	变体 Variant	病状 Symptom
<i>PKP2</i>	Plakophilin-2	ARVC9	12p11	Desmosome	Frameshift mutation, nonsense mutation, missense mutation, splicing site mutation	ARVC
<i>DSP</i>	Desmoplakin	ARVC8	6p24.3	Desmosome	Frameshift mutation, nonsense mutation, missense mutation, splicing site mutation	Carvajal syndrome, ARVC
<i>JUP</i>	Plakoglobin	ARVC12	17q21	Desmosome	Frameshift mutation, nonsense mutation, missense mutation, splicing site mutation	Palmoplantar keratoderma, Naxos disease, ARVC
<i>DSC2</i>	Desmocollin-2	ARVC11	18q12.1	Desmosome	Frameshift mutation, nonsense mutation, missense mutation, splicing site mutation	ARVC (mainly in the right ventricle, left ventricular involvement frequency is high)
<i>DSG2</i>	Desmoglein-2	ARVC10	18q12.1	Desmosome	Frameshift mutation, nonsense mutation, missense mutation, splicing site mutation	ARVC (mainly in the right ventricle, left ventricular involvement frequency is high)
<i>TMEM43</i>	Transmembrane protein 43	ARVC5	3p23, 3p25.1	Nuclear envelope, endoplasmic reticulum membrane, myolemma, intervertebral disc	Missense mutation, splicing site mutation	ARVC (patients are prone to heart failure or sudden death and have slow progress of the R wave of electrocardiogram)
<i>RYR2</i>	Ryanodine receptor type 2	ARVC2	1q43	Calmodulin	Missense mutation	CPVT, ARVC
<i>DES</i>	Desmin	ARVC7	2q35	Intercalated disc	Missense mutation	Musculoskeletal disease, ARVC, DCM
<i>LMNA</i>	Lamin A/C	/	1q22	Nuclear envelope	Missense mutation, nonsense mutation	DCM, ARVC (doubtful)
<i>TTN</i>	Titin	ARVC4	2q32.1-q32.3	Sarcomere	Missense mutation	DCM, HCM, ARVC
<i>PLN</i>	Phospholamban	/	6q22.31	Calmodulin	Missense mutation, nonsense mutation, frameshift mutation	DCM, HCM, ARVC (doubtful)
<i>CTNNA3</i>	α T-catenin	ARVC13	10q21.3	Intercalated disc	Missense mutation, frameshift mutation	Low penetrance
<i>FLNC</i>	Filamin C	/	7q32.1	Myolemma	Missense mutation	HCM, ARVC (patients are prone to sudden death)
<i>SCN5A</i>	Nav1.5	/	3p22.2	Cardiac sodium channel	Nonsense mutation, frameshift mutation, missense mutation	QRS duration extended, Brugada syndrome, ARVC

义突变, 20%的错义突变及近15%的致病剪接位点突变^[22]。PKP2在桥粒蛋白复合体中与JUP、DSP和桥粒钙黏附素通过N-端结构域连接, 进而相互作用。该桥粒蛋白在闰盘存在信号节点, 涵盖维持细胞间的偶联、维持钠通道功能、调节转录及促进细胞间

的黏附四种功能^[23]。沉默*Pkp2*虽未导致钠离子通道蛋白丰度下降, 但可减小 I_{Na} 振幅^[24]进而对电信号传递产生影响, 导致疑似Brugada综合征症状产生; 该基因表达蛋白对于维持控制细胞内钙循环的基因转录也是必要的, *Pkp2*突变会导致心动过速从而产

生类似于儿茶酚胺能多形性室性心动过速(catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT)症状, 而ARVC和CPVT在一些研究中被认为是同类疾病的不同表型^[23]。*Pkp2*突变也会导致Cx43分布及含量产生改变, 并破坏桥粒结构完整性, 从而对可缝隙连接、桥粒体可承受机械力范围产生影响^[9]。但杂合子敲除小鼠与野生型同窝小鼠相比, 虽存在超微结构差异, 但无明显组织学结构改变^[9,11]。

2.1.2 DSP 桥粒斑蛋白是桥粒复合体最丰富的组分, 由位于6p24.3的*DSP*编码^[12], 其虽缺乏跨膜结构域, 但对维持心肌组织完整性至关重要。此基因隐性突变与Carvajal综合征相关, 并且大部分*DSP*突变患者发病较早, 在青少年甚至儿童时期便出现相应症状^[6,12]。*DSP*通过N-端与其他桥粒成分结合, 通过C-端与中间丝相结合。表达桥粒斑蛋白的基因出现异常会导致心肌细胞难以正常发育, 影响正常脂质代谢途径, 甚至使患者表现出严重的左室受累症状^[25]。*YANG*等^[26]发现, *DSP*存在4类变异: V30M、Q90R、W233X和R2834H。研究表明, 由于*DSP*蛋白N-端与桥粒连接蛋白连接位置相关, 因此该处突变会影响*DSP*定位, 过度突变会导致胚胎因心脏难以承受过大机械力而死亡; *DSP*的C-端突变小鼠表现为心肌细胞肥大、心脏功能下降、心肌细胞凋亡量及纤维细胞/脂肪细胞堆积量上升, 但无明显替代现象^[26]。此外, *Dsp*单倍体剂量不足也会在出现明显组织结构异常前导致Cx43定位错误, 使得电传导-复极化动力学参数发生明显改变^[27]。

2.1.3 JUP 斑珠蛋白*JUP*是桥粒及黏附连接的关键成分, 结构域内含有串联臂重复序列^[12], 与黏附连接的重要组成部分 β -catenin和Wnt/ β -catenin信号通路密切相关, 还与经典钙黏附素的胞质结构域相互作用^[20]。*JUP*突变所导致的常隐遗传性ARVC与掌跖角化病及Naxos病三联体遗传位点被定位于染色体17q21的D17S800和D17S1789之间的0.7 cm间隔内^[5], 突变使得转录因移码突变而提前终止, 所导致的胚胎高致死率及皮肤相关疾病可能与桥粒结构改变导致承受机械力性能降低相关^[5]。*JUP*在正常情况下可与 β -catenin发生拮抗作用, 当被错误定位于细胞核内时, 将抑制Wnt信号通路并诱导促脂肪基因的表达, 使得组织中脂肪细胞表达量增加, 导致ARVC相关表型的产生^[28]。

2.1.4 DSC 人体桥粒钙黏素蛋白家族中有三种

桥粒芯胶蛋白DSCs, 在心肌细胞中主要表达DSC2, 其编码基因*DSC2*位于18q12.1^[12]。目前难以创建该基因功能性敲除的转基因小鼠模型, 但在利用斑马鱼模型进行的研究中发现, *dsc2*突变导致心肌收缩异常, 表明桥粒芯胶蛋白DSC2对于维持正常的心肌结构和功能是必需的^[16]。

2.1.5 DSG 桥粒芯糖蛋白DSG同样属于桥粒钙黏素蛋白家族, 并与DSC2通过胞外结构域相互作用, 连接相邻心肌细胞。该家族中DSG1~4均具有4个胞外钙黏附素结构域和1个跨膜结构域, 其中人类心肌细胞中仅存在与心脏收缩相关的亚表型DSG2^[29], 该蛋白编码基因定位于18q12.1^[12]。通过全外显子组测序和Sanger测序发现, *DSG2*-p.F531C突变是引起ARVC的主要原因, 并且随基因剂量增加而加重室性心律过速症状^[30]。*DSG2*突变具有高外显性, 并累及左心室, 最早于2006年被鉴定。当*Dsg2*被全部敲除时, 出现致死情况, 使用心脏特异性缺失*Dsg2*模型进行实验后发现, 小鼠心肌细胞纤维化, 钙离子通道异常, 动作电位降低^[31-32]。*Dsg2*过表达时, 与钠离子通道相互作用, 使得传导速度减慢, Na^+ 电流密度降低^[33]。此外, 即便存在*DSG2*突变情况, 但由于桥粒芯糖蛋白对于心脏形态建成来说属于非必需蛋白, 因此开始无明显症状, 随着时间推移, 对于机械承受力需求增加, 此基因突变所产生的影响才会导致心脏功能异常, 因此一些携带*DSG2*突变的ARVC患者发病较晚^[34]。

2.2 非桥粒蛋白基因突变

尽管桥粒基因的突变是ARVC几种遗传亚型的基础, 但是仍存在桥粒外基因导致ARVC的情况, 由于难以探究非桥粒蛋白基因突变与疾病临床症状的直接联系, 因此很多非桥粒蛋白基因与ARVC疾病相关性处于推测阶段。

2.2.1 TMEM43 跨膜蛋白43(transmembrane protein 43, TMEM43)是一种分子量为43 kDa的膜蛋白, 该蛋白结构和功能目前尚未确定, 主要定位于核膜和内质网膜, 在多种组织中普遍表达, 生物间保守度高, 编码基因位于3p23^[12]。研究表明, *TMEM43*含有3个致病突变, 2个错义变体p.P111L及p.S358L, 1个剪接位点变体c.705+7G>A^[35], 其中p.S358L是ARVC5患者中的常见突变位点, 临床表型外显率高, 可能与PPAP- γ 调节的脂肪形成通路相关。*TMEM43*-S358L突变后引起细胞传导障碍的可

能机制是突变引起 α -catenin和JUP错误定位,导致闭合小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)表达下调,Cx43磷酸化状态改变,进而影响黏附连接和缝隙连接,减慢电信号传导速度。但该位点突变对小鼠心脏影响小,LI等^[19]认为这是一类功能增益性突变^[19]。*TMEM43-S358L*突变还可导致心肌组织和原代心肌NF- κ B高度激活,进而上调促纤维化基因转化因子- β 1(transforming growth factor beta-1, TGF- β 1)的表达,导致纤维细胞生成增加^[36]。

2.2.2 RYR2 心肌型兰尼定受体2(ryanodine receptor 2, RYR2)参与维持心肌细胞钙稳态和兴奋收缩偶联,有N-端区、中心区及包含通道孔结构的C-端区3个突变热点^[37]。*RYR2*位于1q43^[12],其突变首次在与CPVT相关的染色体显性表达形式中被发现^[38]。*RYR2*编码位于心肌细胞肌浆网膜上的钙离子通道,其氨基端在调控钙离子释放过程中起终止作用,其突变会影响N-端阴离子结合位点,破坏分子亚基间的相互作用,但并不影响组织学形态^[37]。尽管RYR2的N-端突变小鼠表现出心律失常、心肌细胞钙动力学异常等与ARVC临床表现相似的症状,但目前对该位点与ARVC相关性争议较大,多数人认为该位点突变导致的疾病属于CPVT,而非ARVC^[37]。

2.2.3 DES 结蛋白(desmin, DES)是存在于肌细胞、横纹肌细胞和心肌细胞细胞骨架中的一种结构中间丝,与各种细胞结构,如桥粒、Z带、腔粒、线粒体和细胞核有关。*DES*位于2q35,其突变常与骨骼肌病和心肌病的不同表型相关^[12,39]。*DES*分子由1个中心部位的 α -螺旋杆状结构域和两侧的N-/C-端球状结构域组成。*DES*突变多为错义变异,其中p.Glu401Asp突变可能使得DES二聚体及寡聚体组装形式发生改变,虽对骨骼肌或传导系统无显著影响,但会导致肌浆中肌原纤维形成,使得膜与细胞黏附性受损,进而引发左心室心率失常性心肌病^[39]。

2.2.4 LMNA 核纤层蛋白(lamin A/C, LMNA)是核纤层的主要组分,可维持细胞核内部稳定,保护染色质成分,还可接受传导力学信号,参与调控包括脂肪生成在内的多种信号通路^[40]。*LMNA*突变后可导致细胞核变型、机械承受能力受损等临床表现^[41]。*LMNA*位于1q22,与扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)相关^[12],目前未被广泛认可为ARVC致病基因。*LMNA*中的p.Arg399Cys突变会影响LMNA

与核孔复合体的直接作用,从而影响心脏稳定性,引起房颤,其具体机制仍在探索中^[40],而核纤层蛋白中位于lamin A处的 α -螺旋杆状结构域c.917T>G(p.L306R)突变会导致细胞核形状扭曲,引起右心室扩张型心肌病和早衰^[42]。

2.2.5 TTN 肌联蛋白(titin, TTN)突变会对心脏功能产生影响,该蛋白编码基因位于2q32.1-q32.3^[12],此位点突变通常会引起扩张型心肌病、肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)及心律失常型心肌病^[43]。肌联蛋白作为心肌细胞中最大的一个蛋白质,N-端嵌入肌节闰盘,弹性I带区作为一种分子弹簧,在肌节拉伸舒张期产生被动力,A带区与粗肌丝结合,C-端嵌入M带区。*TTN*突变多位于A带区,常累及左心室进而引发双心室型改变^[44],目前TTN与ARVC间的关系仍需进一步探究。

2.2.6 其他非桥粒蛋白基因突变 患者体内还存在多种与ARVC相关的非桥粒蛋白基因突变或其他转录因子活性的改变,如加速组织愈合的转化生长因子TGF- β 3,参与钙离子泵调节的磷脂蛋白(phospholamban, PLN),与组织完整性相关的连环蛋白(α T-catenin, CTNNA3),定位于肌膜、连接肌肉细胞及细胞外基质并参与相关信号通路的细丝蛋白(filamin C, FLNC)^[45]、影响心脏QRS持续时间的钠通道蛋白Nav1.5编码基因(sodium voltage-gated channel alpha subunit 5, *SCN5A*)等^[46]。尽管一些基因不直接导致疾病发生,但是可能改变其他基因表达情况或信号通路调控情况进而间接导致疾病发生,后续研究应继续搜寻样本进行测序分析,并设置适宜精准研究模型进行分析。

2.3 环境

2.3.1 体内激素环境 尽管ARVC通常以常染色体显性方式遗传,但ARVC患者数量存在性别差异,其中男性数量居多,且发病时间一般早于女性,因此存在患者血清性激素水平与心律失常相关的假说^[1]。在男性中,睾酮可调节脂肪细胞的生成,改善胰岛素敏感性和骨骼肌的肌肉质量,并且与心血管疾病相关^[47-48]。若长期外施雄激素可引起心肌病理性肥大、心肌氧化应激反应等现象^[47-48]。*AKDIS*等^[49]通过控制变量测定ARVC患者血清中性激素水平、性激素结合球蛋白等指标,发现与健康男性相比,男性ARVC患者的总睾酮和游离睾酮水平显著升高;女性患者的雌二醇水平与健康女

性相比降低。通过iPSC-CMs模型来研究性激素的作用后发现,性激素与ARVC相关并影响心肌细胞凋亡和脂肪细胞生成等过程^[48-49]。该研究结果肯定了雌二醇作为一种心脏保护激素的作用,且女性患者绝经后雌二醇水平下降进而加重病情这一现象可以对女性患者发病晚、病变程度低作进一步解释^[1,48-49]。

2.3.2 运动 ARVC是运动员猝死的重要原因之一,剧烈的运动或耐力运动可能使得突变基因携带者更易发展为患者。运动会促进血液流动,导致血流动力学超载,进而使得心脏组织所承受机械应力增加,心脏功能异常^[50]。一项由腺病毒介导的PKP2-R735X基因转染实验结果表明,耐力运动训练可导致小鼠右心室收缩功能受损,且心肌细胞间隙连接处Cx43定位异常^[51]。但并非所有类型的运动都是有害的,在一种急性心肌梗死小鼠模型中开展的实验表明,跑步机运动可恢复心肌细胞中大多数失调基因的转录水平,减少心肌细胞凋亡,对ARVC存在部分有益的表型效应^[50]。尽管CHEEDIPUDI等^[50]研究表明,跑步机运动可能有利于ARVC患者恢复^[50],但ARVC患者及突变基因携带者仍应避免剧烈运动,以规避风险。

3 利用诱导多能干细胞研究ARVC

具有遗传倾向的ARVC一般以心肌细胞坏死作为疾病标志,ARVC患者群体的基因测序结果表明突变存在群体性差异。鉴于活检存在心脏穿孔风险^[52],建立精准化研究模型有助于探究ARVC致病机制以及基因-疾病表型联系,区分致病突变与正常遗传突变,并可根据患者临床症状、测序结果等进行针对性研究,进而寻找靶向治疗方法。为表现ARVC疾病特征以研究该疾病病理生理机制,并确定潜在环境因素对ARVC患者产生的影响,现已建立几类转基因动物模型和iPSC细胞模型。

ARVC动物模型根据研究目的所选实验对象主要包括小鼠、斑马鱼等,根据作用靶点所建模型一般为基因敲除模型、沉默基因模型、过表达基因模型和基因敲入模型^[12]。尽管动物模型是一种有效的具有重复性的体内实验工具,有利于研究者对疾病进行全面认知,但一些动物模型存在目的基因全身性敲除困难的问题,目的基因未完全敲除,从而继续表达干扰实验结果,或所用实验动物与人类相比组

织结构存在差异,仅可对症状进行一定程度的模拟,使得研究不确定性增加。

干细胞具有分化成任意种类细胞的潜能,既可用于研究人体早期发育相关过程,也可作为细胞疗法研究的理想模型。尽管胚胎干细胞分化能力突出,但细胞获取过程中会对胚胎造成损伤,存在伦理争议。2007年,OKITA等^[55]和YU等^[56]筛选24类诱导体细胞多能性候选基因后证实*Oct3/4*、*Sox2*、*cMyc*、*Klf4*对干细胞重编程过程至关重要,并且这4类候选转录因子基因可使得真皮成纤维细胞重编程产生有正常核型,表现端粒酶活性的iPSC,这将避开伦理问题,允许产生针对患者和疾病的干细胞^[56]。截至目前,利用逆转录病毒载体,从ARVC患者的成纤维组织、脂肪组织等部位获取几类iPSC细胞系进行培养,结果表明该细胞系诱导表达的心肌细胞可使得桥粒蛋白的细胞表面定位减少,并形成更多脂肪细胞,因此这类源于患者的特异性细胞可以用作ARVC疾病研究的细胞模型^[39,52,57]。

现有的ARVC相关研究已根据患者携带致病基因的不同建立了几类iPSC模型。如表2所示,把从携带PKP2突变的ARVC患者中所获得的细胞重编程为iPSCs后,通过鉴定可发现该类细胞模型在生长过程中均出现了不同程度的成脂表型。其中MA等^[57]使用的是患者脂源性间充质干细胞^[57],而其他研究者使用的模型供体细胞为真皮成纤维细胞^[49,52,58-59]。BERMÚDEZ-JIMÉNEZ等^[39]同样利用携带DES突变的ARVC患者脂源性间充质干细胞构建了相关细胞模型,该模型中细胞相互黏附、生长较慢,所诱导分化的心肌细胞呈现大而多角形的细胞质,细胞骨架厚实且组织结构未发生改变,但存在细胞质聚集体^[39]。核纤层蛋白LMNA的改变可导致右心室扩张^[42],ALASTALO等^[42]利用患者成纤维细胞所构建模型表名,诱导分化产生的细胞增殖能力低,存在明显核形态改变,着丝粒聚集在细胞核的中央区域,对DNA损伤的敏感性增加^[42]。针对编码钠离子通道复合体蛋白基因*SCN5A*,TERIELE等^[46]通过患者外周血中的单个核细胞,构建出细胞模型,该模型诱导分化出的心肌细胞成熟度较低,具有一定的收缩功能,但收缩方向混乱,产生 I_{Na} 较小。iPSC-CMs疾病相关模型一般有3类,一类是上述经患者体细胞重编程获得的干细胞直接进行心肌细胞分化,一类是利用基因编辑技术进行

表2 ARVC相关iPSC模型概览
Table 2 Overview of ARVC-related iPSC models

相关基因 Gene	供体细胞类型 Donor cell type	生长状况 Growth situation	参考文献 References
<i>PKP2</i>	Mesenchymal stem cell	The cells showed lipid phenotype with intact ultrastructure, decreased expression levels of <i>PKP2</i> and <i>JUP</i> genes, and no significant differences in Cx43	[57]
	Dermal fibroblasts	In the presence of excessive adipogenesis and apoptosis, JUP could not be properly anchored, and β -catenin activity was down-regulated	[52]
		Presence of varying degrees of distorted desmosome structure, increased susceptibility to apoptosis, and lipid droplet aggregation	[58]
		Presence of abnormal activation of PPAR- γ , metabolic disorders, excessive fatty acid oxidation and fat production	[49]
<i>DES</i>	Mesenchymal stem cell	The amplitude and maximum rise velocity of action potential decrease, sensitivity to adrenaline stimulation increases, and ARVC phenotype is characterized by structural and metabolic dysfunction	[59]
		Cells showed abnormal growth pattern and cell adhesion, reduced RNA expression, and aggregation. After differentiation into cardiomyocytes, they showed large and polygonal cytoplasm with thick and well-organized cytoskeleton	[39]
<i>LMNA</i>	Dermal fibroblasts	Cell proliferation was reduced, and there were obvious nuclear morphological changes, aggregation of centromeres in the central region of the nucleus, and increased susceptibility to DNA damage	[42]
<i>SCN5A</i>	Peripheral blood	Cells are not fully mature cardiomyocytes, contracting but with disorganized myonodules and different orientations, without proper mature insertion disc structures connecting adjacent cells, and producing less total I_{Na}	[46]

基因编辑, 矫正突变后将其作为对照组进行细胞分化, 还有一类是对来源于正常人的 iPSC 细胞株进行基因编辑, 敲入突变基因后, 使其定向分化为心肌细胞。分化所得心肌细胞可通过形态鉴定手段及电生理功能表型进行初步评价, 随后通过验证相应蛋白表达情况进行相应致病性分析, 进而可利用生物信息学手段进行差异基因富集分析等过程, 比较患者组和正常组诱导分化出的心肌细胞, 寻找内在致病分子机制, 进行药物筛选, 探寻相应治疗方案(图1)。

目前使用 iPSC 模型进行研究存在的共同缺点是所得细胞成熟度较低, 针对此问题, CHO 等^[61]发现将 iPSC 来源的心肌细胞移植到大鼠体内一个月后, 大鼠新生的心肌细胞在形态、结构和功能上与成人心肌细胞相似, 且表现出成人的致心律失常性右心室心肌病的疾病表型。通过这类分化出的心肌细胞可以帮助研究者在体内外的单细胞水平上进行相关研究, 从而进一步了解致病机制, 该实验结果对 iPSC 模型成熟度的提高同样具有一定的指

向性。

尽管来源于患者的 iPSC 可表现出与患者一致的突变表型, 但该模型多为体外培养, 细胞-细胞相互作用无法得到良好体现, 目前多应用于单基因研究^[57], 应根据研究目的进行动物模型或 iPSC 模型的选择, 从而对基因-表型相关性进行相关说明。

4 结语

致心律失常性右室心肌病发病率在全球范围内处于较低水平, 但危害程度高。ARVC 临床表现症状多样, 存在多种亚表型且致病因素复杂, 一般以常染色体显性形式遗传。未来研究应多关注样本与群体间的联系, 结合精准医学, 实施个性化的诊断和治疗, 对 ARVC 与其他类别心肌病加以区分。由于生物体复杂性, 细胞连接功能和信号通路调控存在互相影响, 因此 ARVC 诊断及研究不应局限于右心室。尽管目前存在一些编码桥粒蛋白基因外的突变所致表型被证明与 ARVC 临床症状相似, 但非桥粒蛋白编码基因与 ARVC 相关性仍存在较大争议,

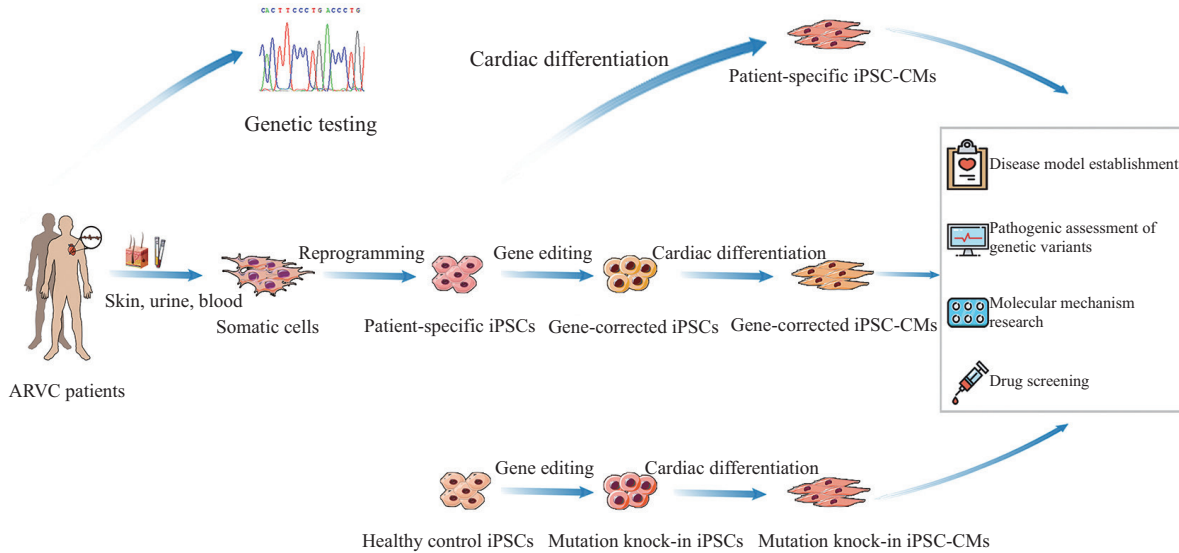


图1 iPSC-CMs模型应用
Fig.1 Application of iPSC-CMs models

后续应构建合适的研究模型探寻除桥粒蛋白基因突变外的其他致病基因。

现针对ARVC研究模型主要为动物模型和细胞模型,但两者均存在一定缺陷。在某些情况下,由于物种差异,无法使用动物模型完全模拟人类心肌病。在现有动物模型中,临床上ARVC5患者的高外显率的突变基因*TMEM43*-p.S358L经CRISPR/Cas9基因敲入S358L小鼠未引起心脏结构改变^[62],且其他一些编码桥粒蛋白基因全身性敲除时,容易导致桥粒结构改变进而引起小鼠心脏发育中出现破裂情况^[9,26]。对于细胞模型而言,人类iPSC衍生的心肌细胞是目前唯一可克服物种差异,用于特定遗传性心肌病直接功能分析的人类细胞模型。值得关注的是,自20世纪60年代GURDON等^[63]首次通过单个体细胞核移植技术克隆出非洲爪蟾以来,科研人员已开发出数种细胞分化方式及提高重编程效率方案,并且仍在不断探索中^[62,64]。除了直接重编程生成hiPSC外,还可以使用各类基因组编辑技术以及通过RNA干扰进行基因修饰^[62],进而将经基因编辑后的特定突变与其相应的同基因野生型对照直接进行比较,使其保持遗传背景一致并可被广泛应用。目前已开发的ARVC体外细胞模型类型较少,且iPSC衍生的心肌细胞还应与动物模型或离体人类心肌组织的离体研究相结合,以尽可能克服iPSC衍生的心肌细胞的单细胞培养、基因组不稳定、细胞成熟度不足等特定局限性,后续应探索更完善的细胞培养方案,使得

iPSC-CMs可以更利于阐明ARVC等心肌病的致病机制,为精准医学背景下药物开发、治疗方式的发展作出贡献。

参考文献 (References)

- [1] SVEN M, PETER V D M, J. PETER V T, et al. Sex differences in cardiomyopathies [J]. *Eur J Heart Fail*, 2014, 16(3): 238-47.
- [2] AKDIS D, BRUNCKHORST C, DURU F, et al. Arrhythmogenic cardiomyopathy: electrical and structural phenotypes [J]. *Arrhythm Electrophysiol Rev*, 2016, 5(2): 90-101.
- [3] GANDJBAKHCH E, REDHEUIL A, POUSETT F, et al. Clinical diagnosis, imaging, and genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(7): 784-804.
- [4] CORRADO D, LINK M S, CALKINS H. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(1): 61-72.
- [5] MCKOY G, PROTONOTARIOS N, CROSBY A, et al. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) [J]. *Lancet*, 2000, 355(9221): 2119-24.
- [6] BOLLING M C, JONKMAN M F. Skin and heart: une liaison dangereuse [J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(8): 658-68.
- [7] MACRAE C A, BIRCHMEIER W, THIERFELDER L. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: moving toward mechanism [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7): 1825-8.
- [8] PAUL M, WICHTER T, GERSS J, et al. Connexin expression patterns in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *Am J Cardiol*, 2013, 111(10): 1488-95.
- [9] OXFORD E M, MUSA H, MAASS K, et al. Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells [J]. *Circ Res*, 2007, 101(7): 703-11.

- [10] ZHANG Q, DENG C, RAO F, et al. Silencing of desmoplakin decreases connexin43/Nav1.5 expression and sodium current in HL-1 cardiomyocytes [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(3): 780-8.
- [11] CERRONE M, NOORMAN M, LIN X, et al. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(4): 460-8.
- [12] PADRÓN-BARTHE L, DOMÍNGUEZ F, GARCIA-PAVIA P, et al. Animal models of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: what have we learned and where do we go? Insight for therapeutics [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112(5): 50.
- [13] CHRISTODOULIDES C, LAGATHU C, SETHI J K, et al. Adipogenesis and WNT signalling [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(1): 16-24.
- [14] TAO H, YANG J J, SHI K H, et al. Wnt signaling pathway in cardiac fibrosis: new insights and directions [J]. *Metabolism*, 2016, 65(2): 30-40.
- [15] GARCIA-GRAS E, LOMBARDI R, GIOCONDO M J, et al. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7): 2012-21.
- [16] LOMBARDI R, CARBREIRA-HANSEN M D A, BELL A, et al. Nuclear plakoglobin is essential for differentiation of cardiac progenitor cells to adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2011, 109(12): 1342-53.
- [17] CHEN S N, GURHA P, LOMBARDI R, et al. The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 454-68.
- [18] OHNO S. The genetic background of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *J Arrhythm*, 2016, 32(5): 398-403.
- [19] LI X, YUAN T, CHEN D, et al. Cardioprotective effects of puerarin-V on isoproterenol-induced myocardial infarction mice is associated with regulation of PPAR- γ /NF- κ B pathway [J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3322.
- [20] AL-JASSAR C, BIKKER H, OVERDUIN M, et al. Mechanistic basis of desmosome-targeted diseases [J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(21): 4006-22.
- [21] VAN-TINTELEN J P, ENTIUS M M, BHUIYUAN Z A, et al. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2006, 113(13): 1650-8.
- [22] ALCALDE M, CAMPUZANO O, SARQUELLA-BRUGADA G, et al. Clinical interpretation of genetic variants in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *Clin Res Cardiol*, 2015, 104(4): 288-303.
- [23] CERRONE M, MONTNACH J, LIN X, et al. Plakophilin-2 is required for transcription of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 106.
- [24] CERRONE M, DELMAR M. Desmosomes and the sodium channel complex: implications for arrhythmogenic cardiomyopathy and brugada syndrome [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(5): 184-90.
- [25] CHEN L, SONG J, CHEN X, et al. A novel genotype-based clinicopathology classification of arrhythmogenic cardiomyopathy provides novel insights into disease progression [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(21): 1690-703.
- [26] YANG Z, BOWLES N E, SCHERER S E, et al. Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2006, 99(6): 646-55.
- [27] GOMES J, FINLAY M, AHMED A K, et al. Electrophysiological abnormalities precede overt structural changes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to mutations in desmoplakin-a combined murine and human study [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(15): 1942-53.
- [28] HEUSER A, PLOVIE E R, ELLINOR P T, et al. Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(6): 1081-8.
- [29] AWAD M M, DALAL D, CHO E, et al. *DSG2* mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy [J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(1): 136-42.
- [30] LIN Y, HUANG J, ZHAO T, et al. Compound and heterozygous mutations of *DSG2* identified by whole exome sequencing in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia with ventricular tachycardia [J]. *J Electrocardiol*, 2018, 51(5): 837-43.
- [31] SYRRIS P, WARD D, ASIMAKI A, et al. Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease [J]. *Eur Heart J*, 2007, 28(5): 581-8.
- [32] GAERTNER A, KLAUKE B, STORK I, et al. *In vitro* functional analyses of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-associated desmoglein-2-missense variations [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47097.
- [33] ZHAO G, QIU Y, ZHANG H M, et al. Intercalated discs: cellular adhesion and signaling in heart health and diseases [J]. *Heart Fail Rev*, 2019, 24(1): 115-32.
- [34] CHRISTENSEN A H, ANDERSEN C B, WASSILEW K, et al. Rare non-coding *Desmoglein-2* variant contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 131: 164-70.
- [35] LAZZARINI E, JONGBLOED J D, PILICHOU K, et al. The arvd/c genetic variants database: 2014 update [J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(4): 403-10.
- [36] ZHENG G, JIANG C, LI Y, et al. TMEM43-S358L mutation enhances NF- κ B-TGF β signal cascade in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy [J]. *Protein Cell*, 2019, 10(2): 104-19.
- [37] OKUDAIRA N, KUWAHARA M, HIRATA Y, et al. A knock-in mouse model of N-terminal R420W mutation of cardiac ryanodine receptor exhibits arrhythmogenesis with abnormal calcium dynamics in cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3): 665-8.
- [38] TISO N, STEPHAN D A, NAVA A, et al. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2) [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(3): 189-94.
- [39] BERMÚDEZ-JIMÉNEZ F J, CARRIEL V, BRODEHL A, et al. Novel desmin mutation p.Glu401Asp impairs filament formation, disrupts cell membrane integrity, and causes severe arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy/dysplasia [J]. *Circulation*, 2018, 137(15): 1595-610.
- [40] HAN M, ZHAO M, CHENG C, et al. Lamin A mutation impairs interaction with nucleoporin NUP155 and disrupts nucleocytoplasmic transport in atrial fibrillation [J]. *Hum Mutat*, 2019,

- 40(3): 310-25.
- [41] QUARTA G, SYRRIS P, ASHWORTH M, et al. Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(9): 1128-36.
- [42] ALASTALO T P, WEST G, LI S P, et al. *LMNA* mutation c.917T>G (p.L306R) leads to deleterious hyper-assembly of Lamin A/C and associates with severe right ventricular cardiomyopathy and premature aging [J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(7): 694-703.
- [43] HERMAN D S, LAM L, TAYLOR M R G, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(7): 619-28.
- [44] LEWINTER M M, GRANZIER H L. Cardiac titin and heart disease [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(3): 207-12.
- [45] BEGAY R L, GRAW S L, SINAGRA G, et al. *Filamin C* truncation mutations are associated with arrhythmogenic dilated cardiomyopathy and changes in the cell-cell adhesion structures [J]. *JACC Clin Electrophysiol*, 2018, 4(4): 504-14.
- [46] TE-RIELE A S, AGULLO-PASCUAL E, JAMES C A, et al. Multilevel analyses of *SCN5A* mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(1): 102-11.
- [47] MAUVAIS-JARVIS F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2011, 22(1): 24-33.
- [48] HERRING M J, OSKUI P M, HALE S L, et al. Testosterone and the cardiovascular system: a comprehensive review of the basic science literature [J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(4): e000271.
- [49] 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.
- [50] CHEEDIPUDI S M, HU J, FAN S, et al. Exercise restores dysregulated gene expression in a mouse model of arrhythmogenic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(6): 1199-213.
- [51] CRUZ F M, SANZ-ROSA D, ROCHE-MOLINA M, et al. Exercise triggers ARVC phenotype in mice expressing a disease-causing mutated version of human plakophilin-2 [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(14): 1438-50.
- [52] KIM C, WONGYAN J, WEN J, et al. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs [J]. *Nature*, 2013, 494(7435): 105-10.
- [53] WILMUT I, SCHNIEKE A E, MCWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-3.
- [54] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7.
- [55] OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-7.
- [56] YU J, VODYANIK M A, SMUGA-OTTO K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20.
- [57] MA D, WEI H, LU J, et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(15): 1122-33.
- [58] 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(6): 557-68.
- [59] EL-BATTRAWY I, ZHAO Z, LAN H, et al. Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *Europace*, 2018, 20(F11): 46-56.
- [60] CHO G S, LEE D I, TAMPAKAKIS E, et al. Neonatal transplantation confers maturation of PSC-derived cardiomyocytes conducive to modeling cardiomyopathy [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(2): 571-82.
- [61] STROUD M J, FANG X, ZHANG J, et al. Luma is not essential for murine cardiac development and function [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(3): 378-88.
- [62] BRODEHL A, EBBINGHAUS H, DEUTSCH M A, et al. Human induced pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes as models for genetic cardiomyopathies [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4381.
- [63] GURDON J B, ELSDALE T R, FISCHBERG M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei [J]. *Nature*, 1958, 182(4627): 64-5.
- [64] TALKHABI M, AGHDAMI N, BAHARVAND H. Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: a state-of-art [J]. *Life Sci*, 2016, 145: 98-113.