

电刺激提高分化心肌细胞成熟度并改善心肌梗死大鼠心脏功能

张丽莎¹ 熊挺淋¹ 杨燕² 张晓刚^{3*}

(¹南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院, 南充 637000; ²四川驰鼎盛通生物科技有限公司, 成都 610041;

³重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆 400016)

摘要 该研究探讨了电刺激对诱导多能干细胞的心脏分化影响, 并评估了分化心肌细胞对心肌梗死的治疗效果。电刺激和非电刺激促进诱导多能干细胞分化出功能性心肌细胞; qRT-PCR和细胞免疫荧光检测分化心肌细胞中心源性基因和功能成熟基因表达情况; 建立心肌梗死模型SD大鼠并将其随机分为心肌梗死组、电刺激组和对照组, 每组10只。心肌梗死组只结扎冠状动脉, 电刺激组和对照组分别在心肌梗死边界注射电刺激和无电刺激预处理的分化心肌细胞。超声心动图和有创血流动力学检测心功能; Masson染色评估梗死面积, 免疫组化检测梗死边缘区毛细血管密度。结果表明, 电刺激可提高分化心肌细胞的自发搏动, 并上调分化心肌细胞中心源性基因(*Nkx2-5*、*GATA4*、 α -MHC和*CX-43*)和功能成熟基因(*α -actinin*和*RYR2*)的表达($P<0.05$)。电刺激明显改善心肌梗死大鼠心功能, 减小梗死面积和增加梗死边缘区毛细血管密度($P<0.05$)。以上结果表明, 电刺激可提高诱导多能干细胞的心脏分化效率并促进分化心肌细胞的成熟; 经电刺激预处理的分化心肌细胞可明显改善心肌梗死大鼠心功能。

关键词 心肌梗死; 心肌细胞; 诱导多能干细胞; 电刺激; 心功能

Electrical Stimulation Increases the Maturity of Differentiated Cardiomyocytes and Improves Cardiac Function in Rats with Myocardial Infarction

ZHANG Lisha¹, XIONG Tinglin¹, YANG Yan², ZHANG Xiaogang^{3*}

(¹Nanchong Central Hospital, the Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China;

²Sichuan Chidingshengtong Biotechnology Co., Ltd, Chengdu 610041, China;

³Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study explored the effect of electrical stimulation on the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells and evaluated the therapeutic effect of differentiated cardiomyocytes on myocardial infarction. Electrical stimulation and non-electric stimulation promoted induced pluripotent stem cells to differentiate into functional cardiomyocytes. qRT-PCR and cellular immunofluorescence were used to detect the expression levels of cardiogenic genes and functionally mature genes in differentiated cardiomyocytes. SD rats with myocardial infarction were established and randomly divided into myocardial infarction group, electrical stimulation group and control group, with 10 rats in each group. In the myocardial infarction group, only the coronary arteries were ligated.

收稿日期: 2021-05-27 接受日期: 2021-07-14

四川省科学技术厅重点研发项目(批准号: 2019YFS0314)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13193118197, E-mail: zxcg0233@sina.cn

Received: May 27, 2021

Accepted: July 14, 2021

This work was supported by the Key Research and Development Projects of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (Grant No.2019YFS0314)

*Corresponding author. Tel: +86-13193118197, E-mail: zxcg0233@sina.cn

The electrical stimulation group and the control group were injected with differentiated cardiomyocytes pretreated with electrical stimulation and non-electrical stimulation at the border of myocardial infarction respectively. Echocardiography and invasive hemodynamics were used to detect cardiac function. Masson staining was used to evaluate the infarct area. Immunohistochemistry was used to detect the capillary density in the marginal area of infarction. The results showed that electrical stimulation could increase the spontaneous pulsation of differentiated cardiomyocytes, and up-regulate the expression of cardiogenic genes (*Nkx2-5*, *GATA4*, α -MHC and *CX-43*) and functionally mature genes (α -actinin and *RYR2*) of differentiated cardiomyocytes ($P < 0.05$). The electrical stimulation significantly improved the cardiac function of rats with myocardial infarction, while reduced the infarct area and increased the capillary density in the marginal area of the infarction ($P < 0.05$). The above results indicated that electrical stimulation could improve the efficiency of cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells and promote the maturation of differentiated cardiomyocytes. Differentiated cardiomyocytes pretreated by electrical stimulation could significantly improve the cardiac function of rats with myocardial infarction.

Keywords myocardial infarction; cardiomyocytes; induced pluripotent stem cells; electrical stimulation; cardiac function

心肌梗死是全世界发病率和死亡率极高的疾病, 尽管药物和手术治疗可以在一定程度上改善心肌梗死后心脏的不良重塑, 但这些患者的总体预后仍然很差^[1], 并且患者对心肌梗死的治疗需求也很大。成年心肌细胞损伤后只能靠疤痕修复, 导致心功能下降, 因此干细胞疗法是修复或者替换受损心肌的一种颇具前景的策略。诱导多能干细胞在多能性方面与胚胎干细胞相似, 且不存在免疫排斥和伦理道德问题, 因此诱导多能干细胞分化的功能心肌细胞可用来进行心脏再生治疗^[2-4], 但诱导多能干细胞衍生的心肌细胞表现出的低效率和不成熟性限制了其在心脏再生领域中的应用, 功能不成熟的动作电位和 Ca^{2+} 通道可能导致移植后心律失常^[5-6]。内源性电场可在小鼠胚胎传导系统中检测到, 并在正常胚胎发育中发挥重要作用^[7]。然而分化的心肌细胞中起搏细胞比例低, 内源性电场可能会受到限制, 影响分化心肌细胞的成熟度, 同时外源性电刺激模拟心脏电刺激已被证实可以提高心脏祖细胞和胚胎干细胞的心脏分化潜能^[8-9], 这些研究均表明, 外源性电刺激在心脏发生和随后的成熟过程中发挥关键作用。因此结合以前的研究结果, 本研究旨在探讨外源性电刺激对诱导多能干细胞衍生的心肌细胞的生成和成熟度的影响, 并评估经电刺激预处理的分化心肌细胞对心肌梗死的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物

小鼠诱导多能干细胞购自中国科学院动物研

究所北京干细胞库。小鼠胚胎成纤维细胞为课题组自行制备^[10]。SPF级SD大鼠及SD新生乳鼠(不分雌雄)由重庆医科大学实验动物中心提供。本实验遵循南充市中心医院伦理委员会制定的相关规定[伦理审批号: 2020年审(148)号]。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM-H培养基购自Gibco公司; β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、10%胎牛血清、胰蛋白酶、II型胶原酶和水合氯醛购自Hyclone公司; DAPI、牛血清白蛋白、多聚甲醛、Masson三色染色试剂盒均购自Sigma公司; 多克隆抗血管假性血友病因子抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗、单克隆 α -actinin抗体及Tritc标记的IgG荧光二抗均购自Santa cruz公司; 丝裂霉素C和白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)购自上海欣百诺公司; 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Gold view和Triton X-100购自Genview公司; C-Pace电刺激器由IonOptix公司提供; 简易呼吸机由重庆医科大学神经病学重点实验室提供; BL-420多导电生理仪及生物机能实验系统为成都泰盟科技有限公司生产; 超声心动图(CX50)由PHILIPS公司提供; PowerLab系统由AD Instruments Inc.公司提供; Millar微型压力导管购自上海玉研科学仪器有限公司; RNAiso Plus逆转录试剂盒购自TaKaRa公司; S1000TM Thermal cycler逆转录系统由Bio-Rad公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 诱导多能干细胞培养和拟胚体制备 诱导

多能干细胞接种在事先经丝裂霉素C处理过的小鼠胚胎成纤维细胞上, 培养基为DMEM-H, 含10%胎牛血清、1 000 IU/mL LIF、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、0.1 mmol/L L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸, 1~2天换培养基1次; 用0.05%胰酶消化传代, 细胞重悬液接种在新的不含小鼠胚胎成纤维细胞饲养层细胞的培养板里, 0.5 h后吸取上清液, 并接种到新的小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上。收获后的诱导多能干细胞保存于液氮中备用。拟胚体的制备参照ZHANG等^[11]方法进行, 将拟胚体在体视学显微镜下吸出并接种在100 mm细菌培养皿中, 让其贴壁生长, 观察。细胞均置于37 °C、5% CO₂培养。

1.3.2 原代心肌细胞培养 新生SD乳鼠心脏放在预冷的无菌PBS液中, 去除心包, 将心脏剪成1 mm×1 mm×1 mm的组织碎块, 然后用II型胶原酶消化2次, 每次15 min, 再用0.1%胰酶消化3次, 每次6 min, 分别收集上述消化液并用含10%胎牛血清的DMEM-H培养基中和, 然后以10 000 r/min离心1 min, 培养基重悬细胞后置于培养皿中差异贴壁1 h分离培养心肌细胞, 培养基为DMEM-H, 含10%胎牛血清、0.1 mmol/L L-谷氨酰胺和1%非必需氨基酸。细胞置于37 °C、5% CO₂培养。每天记录心肌细胞搏动出现时间及搏动频率。

1.3.3 电刺激诱导心肌细胞分化 电刺激被用来模拟心脏的脉冲电信号, 并促进诱导多能干细胞向

心肌细胞分化。拟胚体形成3天后, 使用C-Pace电刺激器引入双极电刺激, 建立电场1 V/cm, 以5 Hz频率的双向方形脉冲模拟大鼠心脏内源性电信号。另外, 未加入电刺激的拟胚体为基线对照组。细胞均置于37 °C、5% CO₂培养。每天记录拟胚体搏动出现时间及搏动频率。

1.3.4 qRT-PCR qRT-PCR检测电刺激和非电刺激条件下分化心肌细胞中心源性基因和功能成熟基因表达情况, 原代心肌细胞作为参照。使用Trizol提取组织的总RNA, RNAiso Plus逆转录试剂盒以及S1000™ Thermal cycler逆转录系统用来合成cDNA。PCR过程使用25 μ L扩增体系, 条件为: 94 °C变性30 s, 退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环30次。内参(β -actin)及目的基因的引物序列、退火温度和产物大小见表1。PCR产物用2%琼脂糖做凝胶电泳分离, 然后用Gold view显色, 结果采用Quantity One凝胶电泳仪进行图像分析和数据处理。

1.3.5 细胞免疫荧光 培养在载玻片上的细胞收获时用PBS洗涤3次, 然后用4%多聚甲醛在室温条件下固定30 min, 0.1% Triton X-100穿孔10 min, PBS洗3次, 然后加入1%的牛血清白蛋白室温下封闭30 min, 甩掉封闭液, 用PBS稀释的单克隆 α -actinin一抗(1:100)稀释, 37 °C条件下作用2 h, PBS洗3次, 再用PBS稀释的Tritc标记的IgG荧光二抗(1:100)稀释, 37 °C作用2 h, PBS洗3次, 最后用DAPI染细胞核, 抗淬灭剂封片以

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of RT-PCR

目的基因 Target gene	基因序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火温度/°C T _m /°C	产物大小/bp Primer size /bp
<i>Nkx2-5</i>	F: gac acc ctc agc atg ttc atc R: agg gtt gca cta aac atg tca g	60	310
<i>Cx-43</i>	F: ttt aaa gga aat cag ttc tgg gct ata R: cga tct tct tca cgg ttg ca	60	418
<i>GATA4</i>	F: aca cat gtt ctc tgg gaa atc gt R: aag tgc atc atc gtt gtt cat aca	57	288
<i>α-MHC</i>	F: agc ctc tgc tac tcc tct tcc tg R: cct tta tgg tca ceg tct ttc c	57	345
<i>Oct-4</i>	F: gtg aag ttg gag aag gtg gaa c R: tca cac ggt tct caa tgc tag t	60	355
<i>RYR2</i>	F: gag caa cgg agg act gtt ca R: tga cgt agt cgg aat ggc tg	55	134
<i>α-actinin</i>	F: cca tat aag ctg gaa ggg acg R: gta ctt ctc tgc cac atc aa	55	139
<i>β-actin</i>	F: gag acc ttc aac acc cca gc R: atg tca cgc acg att tcc c	58	263

及用荧光显微镜拍照。

1.3.6 大鼠心肌梗死模型建立和细胞移植 水合氯醛腹腔麻醉成年SD大鼠, 气管插管后通过简易呼吸机辅助通气。胸骨左缘剪断肋骨, 进入胸腔, 钝性分离心包并剪开, 体式镜下用结扎线结扎左前降支(left anterior descending branch, LAD) 10 min。心肌梗死建模成功的SD大鼠随机分为心肌梗死组、电刺激组、对照组, 每组10只。心肌梗死组只结扎冠状动脉, 电刺激组在心肌梗死边界附近的3个点注射30 μ L的经电刺激预处理的分化心肌细胞, 对照组在心肌梗死边界附近的3个点注射30 μ L的未经电刺激预处理的分化心肌细胞。细胞移植成功后, 逐层缝合胸腔及皮肤, 待小鼠恢复自主呼吸后, 撤去简易呼吸机, 术后给予实验大鼠肌肉注射青霉素以预防感染。

1.3.7 超声心动图评价心功能 在实验前及细胞移植后第7天、14天和28天使用飞利浦CX50超声仪进行超声心动图检查评估左室功能。标准的M型超声测量左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、左室壁厚度(left ventricular posterior wall, LVPW)和室间隔厚度(interventricular septum, IVS), 并用Simpson法计算左室射血分数(left ventricular ejection volume fraction, LVEF)。所有心脏超声检查由同一检查者完成。

1.3.8 心脏有创血流动力学检测 有创血流动力学检查前按照之前的方法对大鼠进行腹腔麻醉和机械通气, 将1.4 F的Millar微型压力导管经股动脉送入左室, 并连接压力传感器, 使用PowerLab系统记录血流动力学参数, 包括左室舒张末期压力(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)及最大正负左室内压力变化速率($\pm dP/dt$)。

1.3.9 Masson染色 28天时取出大鼠心脏, 用10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 然后将石蜡块切成5 μ m切片, 石蜡切片脱蜡水化步骤: 二甲苯30 min、无水乙醇20 min、95%酒精5 min、90%酒精5 min、80%酒精5 min、70%酒精5 min, PBS冲洗, Masson试剂盒内铁苏木素染色5 min, PBS冲洗, 酸性乙醇分化10 s, PBS冲洗后用Masson返蓝液返蓝3 min, PBS冲洗, Masson丽春红品红染色10 min, PBS冲洗, Masson磷钼酸作用5 min, 再用Masson苯胺蓝复染5 min, 1%冰

醋酸作用1 min, 再次脱水并封片, 最后显微镜下进行观察和图像采集。

1.3.10 免疫组化 采用SP法中杉金桥公司免疫组化试剂盒进行染色操作。28天时取出大鼠心脏, 用10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 然后切片, 石蜡切片脱蜡水化步骤: 二甲苯30 min、无水乙醇20 min、95%酒精5 min、90%酒精5 min、80%酒精5 min、70%酒精5 min, PBS冲洗, 3% H_2O_2 中孵育10 min, PBS冲洗, 在0.01 mol/L枸橼酸缓冲液中95 $^{\circ}C$ 煮沸15 min, 冷却后PBS冲洗, 血清液在室温下封闭20 min后甩去封闭液, 加入兔多克隆抗血管假性血友病因子抗体(1:100)稀释, 室温下作用1 h, PBS冲洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:100)稀释, 室温下作用1 h, PBS冲洗, 加入链霉亲和素-过氧化物酶, 室温下作用30 min, PBS冲洗, DAB显色5 min, PBS冲洗10 min, 苏木精复染2 min, 酸性乙醇分化10 s, PBS冲洗, 再次脱水并封片, 最后显微镜下进行观察和图像采集。

1.3.11 统计学分析 使用SPSS 21.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用配对样本 t 检验, 多组间变量比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电刺激提高分化心肌细胞的自发搏动

原代心肌细胞体外培养情况下, 可见搏动频率为130次/min左右; 无电刺激条件下(对照组)第7天可见搏动的拟胚体出现, 实验期间搏动的频率为40次/min左右; 而电刺激情况下第4天即可见搏动的拟胚体出现, 实验期间搏动的频率90次/min左右, 虽然低于原代心肌细胞, 但明显高于非电刺激(对照组), 差异有统计学意义($P<0.05$)(图1A), 且随着培养时间的延长, 与非电刺激(对照组)相比, 电刺激下的拟胚体搏动率明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$)(图1B)。原代心肌细胞和分化心肌细胞(有/无电刺激情况下)均未见到强直收缩。

2.2 电刺激上调分化心肌细胞心源性基因的表达

本研究重点是在电刺激存在或者缺失条件下, 分化心肌细胞中干细胞和心脏基因的相对表达水平。qRT-PCR提示, 心脏基因在未分化的诱导多能干细胞中检测不到, 但在分化心肌细胞中被激活。电刺激诱导10天后, 与无电刺激比较, 电刺激诱导的

分化心肌细胞的心脏祖基因 *Nkx2-5*、*GATA4* 和心脏结构基因 *α -MHC*、*CX-43* 的相对表达量均明显升高, 而多潜能基因 *Oct-4* 的相对表达量明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图2)。

2.3 电刺激提高分化心肌细胞的成熟度

电刺激预处理15天后, 对心脏结构蛋白 α -actinin 的细胞免疫荧光提示, 分化心肌细胞中显示出心肌肌节样的特征性条纹(图3A), 而在没有经过电刺激预处理的分化心肌细胞中观察到了未成熟的结构(图3B)。qRT-PCR提示, 与无电刺激预处理的分化心肌细胞相比, 经电刺激预处理的分化心肌细胞中代表功能成熟的 α -actinin 和 *RYR2* 心脏基因表达水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 经电刺激预处理的分化心肌细胞中代表功能成熟的 α -actinin 和 *RYR2* 心脏基因表达水平较原发性心肌细胞略低, 但

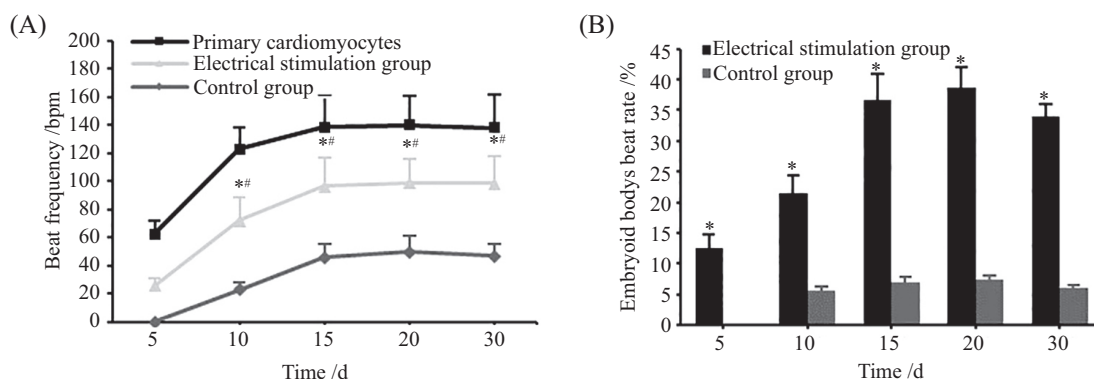
差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图3C)。

2.4 电刺激改善心肌梗死大鼠心功能

第28天时采用M型超声心动图和心脏有创血流动力学评估心功能, 经胸M型超声提示电刺激组的心脏室壁运动恢复(图4)。与心肌梗死组比较, 电刺激组和对照组的LVEF、LVESD、LVEDD、LVEDP 和 $\pm dP/dt$ 均得到明显改善, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 电刺激组的LVEF更高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。三组间的LVPW和IVS没有差异 ($P > 0.05$) (表2)。

2.5 电刺激减小心肌梗死面积

28天时, 采用Masson三色染色试剂盒染色分析梗死面积的大小, 正常心肌组织显示为紫色, 坏死心肌组织显示为蓝色。结果表明, 电刺激组的梗死面积 (1.22 ± 0.18) mm² 明显小于心肌梗死组 (2.98 ± 0.56) mm² 和

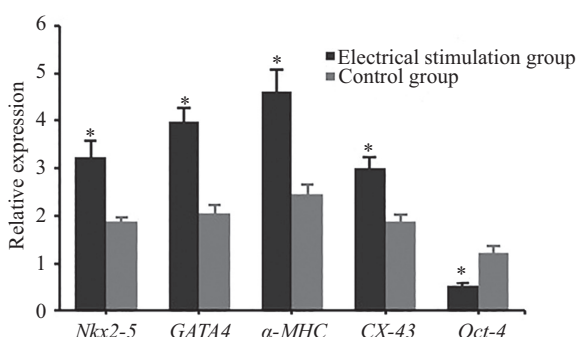


A: 分化心肌细胞与原代心肌细胞搏动频率比较, * $P < 0.05$, 与原代心肌细胞比较, # $P < 0.05$, 与对照组比较; B: 拟胚体搏动率比较, * $P < 0.05$, 与对照组比较。

A: Comparison of beat frequency between differentiated cardiomyocytes and primary cardiomyocytes, * $P < 0.05$ compared with primary cardiomyocytes, # $P < 0.05$ compared with control group; B: comparison of embryoid body beat rate, * $P < 0.05$ compared with control group.

图1 分化心肌细胞的自发搏动

Fig.1 Spontaneous pulsation of differentiated cardiomyocytes

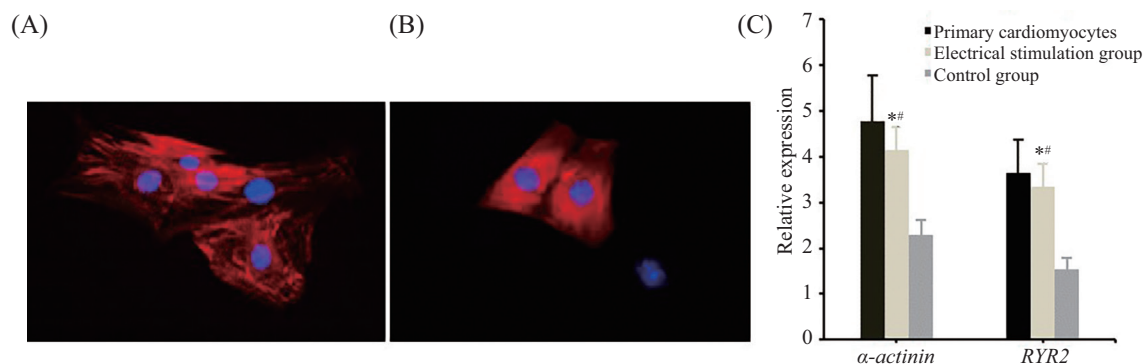


* $P < 0.05$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$ compared with control group.

图2 qRT-PCR检测心脏基因的表达

Fig.2 qRT-PCR to detect the expression of cardiogenic genes



A: 电刺激预处理后分化心肌细胞中 α -actinin染色; B: 无电刺激预处理的分化心肌细胞中 α -actinin染色; C: qRT-PCR检测功能成熟心脏基因的表达, $*P<0.05$, 与对照组比较, $^{\#}P>0.05$, 与原代心肌细胞比较。

A: α -actinin staining in differentiated cardiomyocytes after electrical stimulation preconditioning; B: α -actinin staining in differentiated cardiomyocytes after non-electrical stimulation preconditioning; C: qRT-PCR to detect the expression of functionally mature cardiogenic genes, $*P<0.05$ compared with control group, $^{\#}P<0.05$ compared with primary cardiomyocytes.

图3 电刺激提高分化心肌细胞的成熟度

Fig.3 Electrical stimulation increases the maturity of differentiated cardiomyocytes

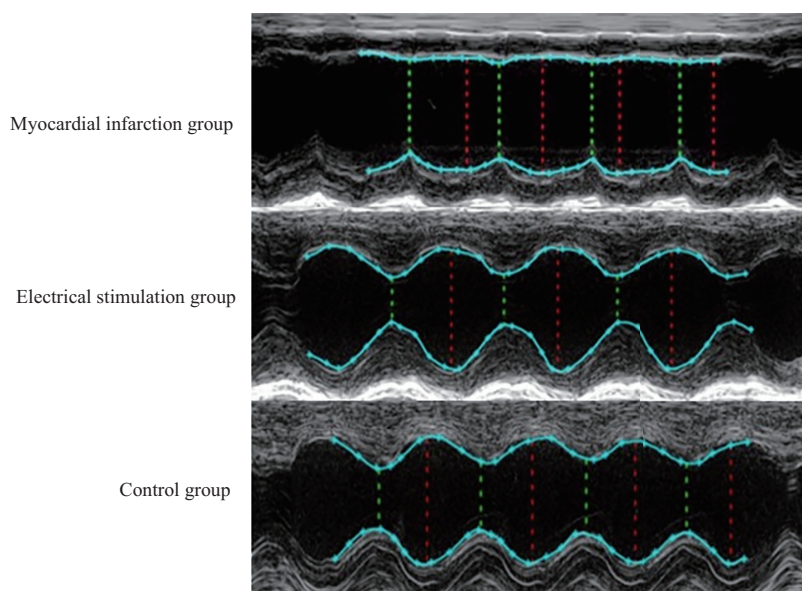


图4 M型超声显示各组室壁运动情况

Fig.4 M-mode ultrasound shows the wall motion of each group

表2 28天时各组心功能比较

Table 2 Comparison of cardiac function of each group at 28 days

心功能指标 Heart function index	电刺激组 Electrical stimulation group	心肌梗死组 Myocardial infarction group	对照组 Control group
LVEF /%	56.47 $\pm$ 8.65 $^{* \#}$	38.56 $\pm$ 6.82	46.50 $\pm$ 8.09 *
LVEDD /mm	6.43 $\pm$ 0.64 *	8.61 $\pm$ 0.37	6.85 $\pm$ 0.51 *
LVEDS /mm	5.32 $\pm$ 0.84 *	6.85 $\pm$ 0.60	5.83 $\pm$ 0.44 *
LVPW /mm	1.28 $\pm$ 0.14	1.12 $\pm$ 0.18	1.54 $\pm$ 0.20
IVS /mm	1.22 $\pm$ 0.25	1.13 $\pm$ 0.22	1.49 $\pm$ 0.28
$\pm dp/dt$ /mmHg $\cdot$ s $^{-1}$	$\pm 54\ 552 \pm 852^*$	$\pm 38\ 689 \pm 727$	$\pm 52\ 218 \pm 882^*$
LVEDP /mmHg	8.68 $\pm$ 1.02 *	12.26 $\pm$ 2.39	9.32 $\pm$ 1.40 *

$*P<0.05$, 与心肌梗死组比较; $^{\#}P<0.05$, 与对照组比较; $n=3$ 。

$*P<0.05$ compared with myocardial infarction group; $^{\#}P<0.05$ compared with control group; $n=3$.

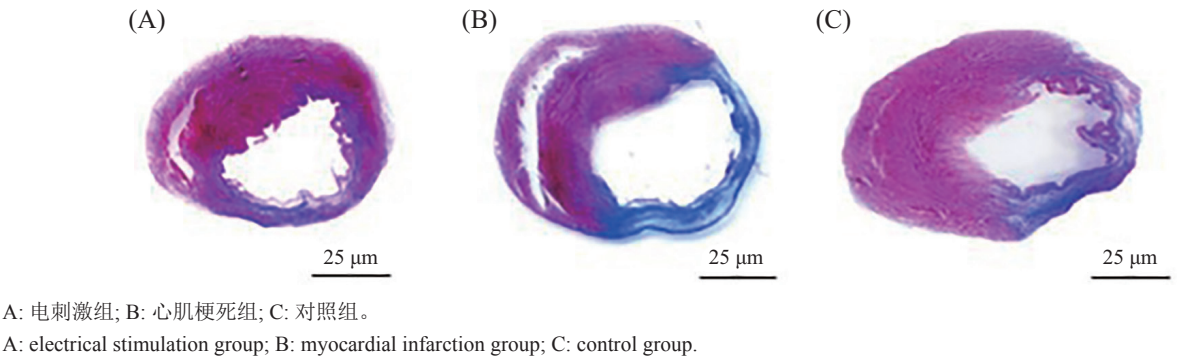


图5 心肌梗死面积比较
Fig.5 Comparison of myocardial infarct size

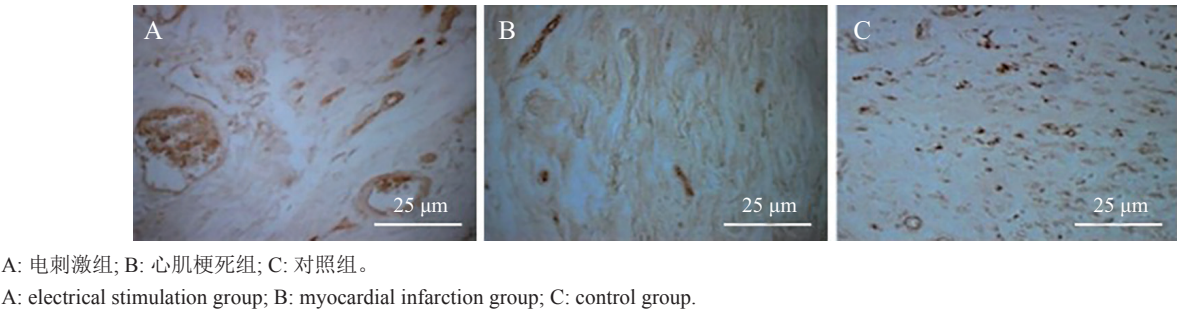


图6 免疫组化检测毛细血管密度
Fig.6 Detection of capillary density by immunohistochemical

对照组(2.51 ± 0.37) mm^2 , 差异有统计学意义($P < 0.05$) (图5)。

2.6 电刺激增加梗死边缘区毛细血管密度

28天时, 抗血管假性血友病因子免疫组化染色结果显示, 毛细血管显示为深棕色。电刺激组梗死边缘区的毛细血管密度(142.70 ± 21.24)根/ mm^2 明显高于心肌梗死组(66.52 ± 11.85)根/ mm^2 和对照组(118 ± 14.66)根/ mm^2 , 差异有统计学意义($P < 0.05$)(图6)。

3 讨论

心脏是一个带有心肌细胞的泵器官, 在心脏早期和成年期间, 心肌细胞经常暴露在自发电刺激下, 之前的研究表明, 外部电刺激亦可以模拟天然心脏组织细胞的电特性, 并促进心肌细胞分化^[12]。诱导多能干细胞已成为心血管再生医学方面的一种有前途的干细胞, 并且已证实诱导多能干细胞在体外能够定向分化为心肌细胞^[11]。然而目前很少有报道关注电刺激在诱导多能干细胞向心肌细胞分化中的作用及其潜在机制, 同时在心肌梗死的分化心肌细胞移植治疗中, 移植细胞的不成熟性对心脏的影响亦

不清楚。本研究结果表明, 外源性电刺激促进诱导多能干细胞的心肌细胞分化潜能和分化心肌细胞的功能成熟, 经电刺激预处理的分化心肌细胞移植后可显著改善心肌梗死大鼠的心脏功能, 这与先前的电刺激对胚胎干细胞的研究结果一致^[13]。

目前, 体外的研究大多数是基于激活心肌发生的信号通路来增强诱导多能干细胞定向分化为心肌细胞, 比如骨形成蛋白4和碱性成纤维细胞生长因子, 以及小分子Wnt抑制剂和GSK抑制剂已被证实可以促进胚胎干细胞和诱导多能干细胞的心肌发生过程^[14-16]。除了可溶性因子, 生物脉冲可以决定心脏发生的空间模式, 并有助于胚胎发育过程中的组织形态形成^[17]。本研究在诱导多能干细胞分化的心肌细胞中设计一种不含其他可溶性生长因子, 而加入外源性电刺激的仿生系统, 以模拟天然心脏的电环境, 结果表明, 引入电刺激条件下, 第4天即可见搏动的拟胚体出现(已知自发搏动代表功能性心肌细胞特点), 搏动的频率为90次/min左右, 虽然稍低于原代心肌细胞, 但明显高于无电刺激组, 且拟胚体搏动频率明显提高, 且在整个实验期间均未见分化心肌细胞强直收缩, 表明分化心肌细胞具有电生

理可塑性。电刺激诱导上调了分化心肌细胞的心脏祖基因 *Nkx2-5*、*GATA4* 和心脏结构基因 *α -MHC*、*CX-43* 的相对表达量, 而下调了多潜能基因 *Oct-4* 的相对表达量, 这些基因表达结果提示电刺激是诱导多能干细胞的有效诱导剂。产生和维持功能成熟的心肌细胞对诱导多能干细胞临床应用至关重要^[18-20], 在本研究中, 电刺激预处理后, 分化心肌细胞中显示出心肌肌节样的特征性条纹(肌节被称为心肌细胞收缩的基本单位), 以及代表功能成熟的 *α -actinin* 和 *RYR2* 心脏基因表达水平明显上调。因此, 电刺激有利于分化出具有更强收缩力和更高心脏基因表达水平的心肌细胞。之前的心脏祖细胞和胚胎干细胞电刺激诱导实验中观察到细胞外 Ca^{2+} 内流增加^[12,14], 表明电压依赖的离子通道在响应电刺激和随后的离子运动时是开放的。同时维拉帕米钙通道阻滞剂的加入可显著降低诱导多能干细胞中 *GATA4* 和 *TBX5* 等心脏基因的表达^[21], 提示钙通道的开放是对电刺激的早期反应, 这些结果间接证明了在电刺激预处理下, 促进分化心肌细胞功能成熟的可能机制是钙通道的激活。

体内移植实验结果表明, 移植电刺激预处理的分化心肌细胞可显著改善心肌梗死大鼠心脏功能, 而分化心肌细胞移植治疗改善心脏功能的具体机制尚不清楚, 根据体外分化和成熟研究推测, 经电刺激预处理的诱导多能干细胞可以产生比对照组更多的功能成熟心肌细胞, 移植后可补充梗死区域丢失的心肌细胞, 此外, 移植细胞还可以减少不良瘢痕的生长以及抑制不良心脏重塑, 最终改善心功能^[22-24]。然而研究也发现, 细胞移植改善心脏功能的作用大多是通过间接作用, 包括旁分泌、细胞外基质调节和细胞凋亡下调^[25-27], 本研究结果也表明, 电刺激预处理的分化心肌细胞减小梗死面积的同时可增加梗死边缘区毛细血管密度, 间接证明旁分泌和细胞凋亡下调的存在。

然而, 分化心肌细胞用于移植治疗时存在的致心律失常风险是临床应用的主要挑战, 当植入细胞的电生理特点与宿主心脏不同步时, 可通过折返或移植细胞自律性诱发各种心律失常^[28-29], 最近的临床前研究表明, 植入胚胎干细胞或者诱导多能干细胞分化的心肌细胞后, 短暂的、非致死性的室性心动过速的发生率增加, 但这种作用在2周后显著削弱, 因为此时植入的心肌细胞显示出与宿主的心脏

收缩同步^[6,30]。因此在未来的研究中, 需要优化电刺激频率, 以符合宿主心脏组织的电生理特点。

本研究结果表明, 电刺激可以上调诱导多能干细胞分化心肌细胞的心脏基因表达并促进分化心肌细胞的成熟。电刺激预处理的分化心肌细胞移植可通过更多功能成熟的心肌细胞的旁分泌作用减小梗死面积以及增加梗死区域毛细血管的密度, 从而改善心功能。

参考文献 (References)

- [1] HARRINGTON D H, STUEBEN F, LENAHAHAN C M. ST-elevation myocardial infarction and non-st-elevation myocardial infarction: medical and surgical interventions [J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2019, 31(1): 49-64.
- [2] 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.
- [3] BALAFKAN N, MOSTAFAVI S, SCHUBERT M, et al. A method for differentiating human induced pluripotent stem cells toward functional cardiomyocytes in 96-well microplates [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 18498.
- [4] LIU F, FANG Y, HOU X, et al. Enrichment differentiation of human induced pluripotent stem cells into sinoatrial node-like cells by combined modulation of BMP, FGF, and RA signaling pathways [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 284.
- [5] BURRIDGE P W, KELLER G, GOLD J D, et al. Production of *de novo* cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(1): 16-28.
- [6] CHONG J J, YANG X, DON C W, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts [J]. Nature, 2014, 510(7504): 273-7.
- [7] CAMERON I L, HARDMAN W E, WINTERS W D, et al. Environmental magnetic fields: influences on early embryogenesis [J]. J Cell Biochem, 1993, 51(4): 417-25.
- [8] LLUCIA-VALLDEPERAS A, SANCHEZ B, SOLER-BOTIJA C, et al. Physiological conditioning by electric field stimulation promotes cardiomyogenic gene expression in human cardiomyocyte progenitor cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(4): 93.
- [9] SERENA E, FIGALLO E, TANDON N, et al. Electrical stimulation of human embryonic stem cells: cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(20): 3611-9.
- [10] 胡三强, 王妍妍, 马永宾, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养及饲养层制备[J]. 中国组织工程研究(HU S Q, WANG Y Y, MA Y B, et al. Isolation and culture of mouse embryonic fibroblasts and preparation of feeder layers [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research), 2014, 18(45): 7306-11.
- [11] ZHANG J, 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.
- [12] SAUER H, RAHIMI G, HESCHELER J, et al. Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem

- cells [J]. *J Cell Biochem*, 1999, 75(4): 710-23.
- [13] CHAN Y C, TING S, LEE Y K, et al. Electrical stimulation promotes maturation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2013, 6(6): 989-99.
- [14] BURRIDGE P W, MATSA E, SHUKLA P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 855-60.
- [15] 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.
- [16] ZHU W Z, VAN BIBER B, LAFLAMME M A. Methods for the derivation and use of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 767: 419-31.
- [17] THAVANDIRAN N, NUNES S S, XIAO Y, et al. Topological and electrical control of cardiac differentiation and assembly [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(1): 14.
- [18] YANG X, PABON L, MURRY C E. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 511-23.
- [19] YE L, ZHANG X, ZHOU Q, et al. Activation of AMPK promotes maturation of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 644667.
- [20] GARBERN J C, HELMAN A, SEREDA R, et al. Inhibition of mTOR signaling enhances maturation of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells via p53-induced quiescence [J]. *Circulation*, 2020, 141(4): 285-300.
- [21] MA R L, LIANG J L, HUANG W, et al. Electrical stimulation enhances cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells for myocardial infarction therapy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28(5): 371-84.
- [22] JAMEEL M N, ZHANG J. Stem cell therapy for ischemic heart disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(12): 1879-97.
- [23] KAWAMURA M, MIYAGAWA S, MIKI K, et al. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model [J]. *Circulation*, 2012, 126(11): S29-37.
- [24] NELSON T J, MARTINEZ-FERNANDEZ A, YAMADA S, et al. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells [J]. *Circulation*, 2009, 120(5): 408-16.
- [25] PASHA Z, HAIDER H K, ASHRAF M. Efficient non-viral reprogramming of myoblasts to stemness a single small molecule to generate cardiac progenitor cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23667.
- [26] BI W, WANG J, JIANG Y, et al. Neurotrophin-3 contributes to benefits of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells against reperfused myocardial infarction [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(5): 756-72.
- [27] PARK S J, KIM R Y, PARK B W, et al. Dual stem cell therapy synergistically improves cardiac function and vascular regeneration following myocardial infarction [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3123.
- [28] CHEN H S, KIM C, MERCOLA M. Electrophysiological challenges of cell-based myocardial repair [J]. *Circulation*, 2009, 120(24): 2496-508.
- [29] KEHAT I, KHIMOVICH L, CASPI O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(10): 1282-9.
- [30] SHIBA Y, GOMIBUCHI T, SETO T, et al. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts [J]. *Nature*, 2016, 538(7625): 388-91.