

# 调控人多能干细胞来源心肌样细胞分化成熟的信号通路及其相关化合物研究进展

刘经纶<sup>1</sup> 秦丽颖<sup>1</sup> 廖凌子<sup>1</sup> 赵兴坤<sup>2</sup> 刘瑞敏<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>兰州大学口腔医学院, 兰州 730000; <sup>2</sup>兰州大学第二临床医学院, 兰州 730000;

<sup>3</sup>甘肃省人民医院口腔颌面外科, 兰州 730000)

**摘要** 由人多能干细胞分化而来的心肌细胞具备良好的基础研究与临床治疗前景,但其结构与功能的不成熟限制了其发展。功能化合物可以直接作用于人多能干细胞向心肌细胞分化成熟过程中的信号通路。添加功能化合物是一种简单、有效、可重复性好的方法。许多团队在促进人多能干细胞向心肌分化成熟的信号通路与功能化合物研究方面取得了实质性的科研进展,该文针对这两方面作出综述,以期后续实验提供指导。

**关键词** 人多能干细胞; 心肌分化成熟; 信号通路; 功能化合物

## Research Progress of Signaling Pathways and Related Compounds Regulating the Differentiation and Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Cardiomyocytes

LIU Jinglun<sup>1</sup>, QIN Liying<sup>1</sup>, LIAO Lingzi<sup>1</sup>, ZHAO Xingkun<sup>2</sup>, LIU Ruimin<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; <sup>2</sup>the Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; <sup>3</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, China)

**Abstract** Cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells have a good prospect for basic research and clinical treatment, but their development is limited by their immature structure and function. Functional compounds can directly act on the signaling pathway during the differentiation and maturation of human pluripotent stem cells into cardiomyocytes. Adding functional compounds is a simple, effective and reproducible method. Many groups have made substantial research progress on the signaling pathways and functional compounds that promote the differentiation and maturation of human pluripotent stem cells into myocardium. This paper reviews these two aspects in order to provide guidance for future experiments.

**Keywords** human pluripotent stem cells; cardiac differentiation and maturation; signal pathway; functional compounds

心肌梗死是常见的心血管疾病,其常常伴发心力衰竭,由于心肌细胞属于终末分化细胞,基本没有再生能力,治疗心肌梗死及其伴发的心力衰竭成为

一大难题,虽然心脏移植是治疗终末期心力衰竭的有效方法,但目前器官捐献者数量不足,严重限制了该方法的进一步应用。近些年来,研究人员致力于

收稿日期: 2021-04-02

接受日期: 2021-05-24

甘肃省自然科学基金(批准号: 2019-0405-JCC-0208)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13919259097, E-mail: liuruimin@lzu.edu.cn

Received: April 2, 2021

Accepted: May 24, 2021

This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.2019-0405-JCC-0208)

\*Corresponding author. Tel: +86-13919259097, E-mail: liuruimin@lzu.edu.cn

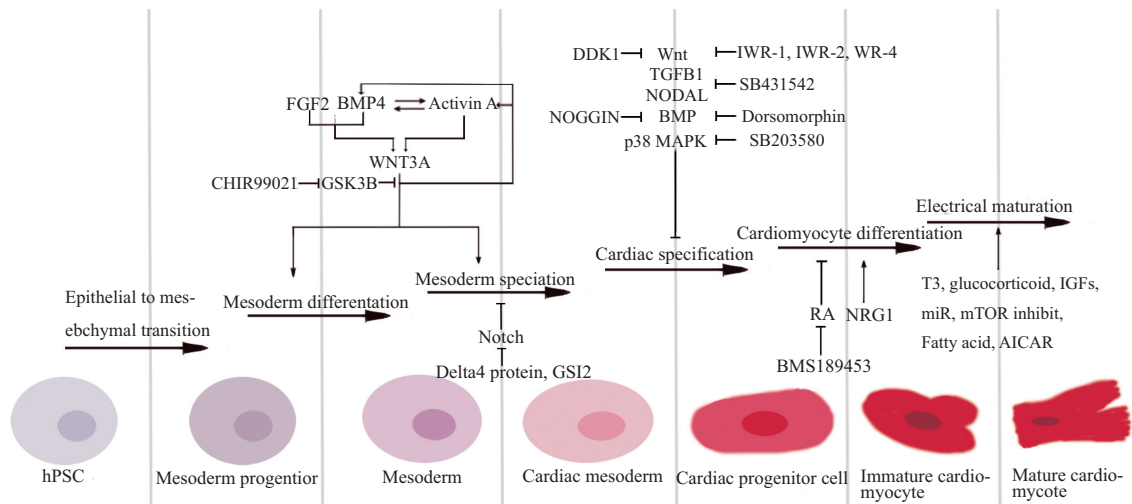


图1 hPSCs向成熟心肌细胞分化成熟过程中的信号通路与功能化合物

Fig.1 Signaling pathways and functional compounds in the process of hPSCs differentiation into mature cardiomyocytes

在人干细胞治疗的基础上治疗心肌梗死及心力衰竭,探索不同方式促进人多能干细胞分化为成熟心肌细胞,从而获得新的心肌细胞来源。

人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)包括人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)和人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)。人多能干细胞在经过上皮间充质转化、中胚层分化、特异性中胚层形成、特异性心肌细胞的发生、心肌细胞分化和电生理成熟后,便得到了人多能干细胞来源心肌样细胞(human pluripotent stem cell-cardiomyocytes, hPSC-CMs)<sup>[1]</sup>。hPSC-CMs在细胞治疗、疾病建模、药物筛选方面,展现出了良好的应用前景。hiPSC-CMs可以由患者体细胞重编程而来,使得个性化治疗心肌细胞疾病有了突破性的进展<sup>[2]</sup>,研究人员曾在2020年对两位患者在实施心脏搭桥手术的同时注射hiPSC-CMs,该研究为hiPSC-CMs首次应用于临床注射产品,而其目前实际的临床疗效仍有待考察<sup>[3-4]</sup>;hiPSC-CMs具有与患者相同的基因型,重编程以后仍然保留患者的疾病表型,并且干细胞具备增殖的能力,是非常理想的建模来源<sup>[5]</sup>;hPSC-CMs还可以表现患者个体的药物反应、评估药物的心脏毒性<sup>[3]</sup>。然而,hPSC-CMs与成熟的心肌细胞间在形态学<sup>[6]</sup>、排列方式<sup>[7]</sup>、收缩性<sup>[8-9]</sup>、电生理<sup>[10]</sup>、钙动力学<sup>[11-12]</sup>等方面有诸多差异,这限制了其在上述领域的应用。因此,促进hPSC-CMs成熟成为近年来重要的研究热点之一,在hPSCs向心肌分化的特定时间添加特定

功能化合物可以使功能化合物直接作用于细胞内的信号通路(图1),是促进hPSC-CMs成熟的一种简单、有效、可重复性好的方法,许多团队在该方面取得了实质性进展,本文将针对该方法的研究现状作出综述。

## 1 参与调控心肌分化成熟的信号通路途径

胚胎的心脏发育是一个动态有序的过程,从干细胞到中胚层细胞,再到心肌前体细胞,最终发育为成熟的心肌细胞<sup>[1]</sup>。而在这个过程中,主要有三种信号通路参与hPSCs的分化成熟,分别是Wnt(Wingless/Integrated)信号通路、BMP信号通路、Notch信号通路。它们主要通过启动旁分泌反馈回路发挥作用,并且具备高度的时间特异性<sup>[13]</sup>。

### 1.1 Wnt信号通路

Wnt信号通路在早期心脏前体细胞从富含Wnt/ $\beta$ -连环蛋白的原条中迁出时便开始发挥作用,对心肌分化成熟的调控贯穿于大部分过程<sup>[14]</sup>。Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路具备双相效应,早期激活可以促进中胚层前体细胞向中胚层细胞的分化,之后Wnt信号通路关闭可以促进中胚层细胞向心脏前体细胞的发育<sup>[15]</sup>。BMP4与激活素A可以联合应用于Wnt信号通路,促进hPSCs中胚层的形成及分化<sup>[15]</sup>;除此以外,作为GSK3 $\beta$ 抑制剂的CHIR99021也可以起到相同的效果,其可以使 $\beta$ -连环蛋白在细胞核内积聚,之后联合T细胞因子与淋巴结合增强子,促进相关基因的转录,从而促进前体心肌细胞的发生<sup>[16]</sup>。在特异

性心肌细胞的发生过程中, 研究人员进行了相关实验, 其实实验证实Dickkopf相关蛋白1(Dickkopf-related protein 1, DDK1)和IWR-1作为Wnt信号通路的抑制剂, 通过抑制相关蛋白与Wnt信号通路的相互作用, 进而对Wnt信号通路起抑制作用, 促进特异性心肌细胞的发生<sup>[15-18]</sup>。

## 1.2 BMP信号通路

BMP信号通路在调控干细胞分化为成熟心肌细胞的过程中主要是通过Smad信号途径起作用的。BMP可以维持胚胎干细胞处于未分化状态, 而在诱导胚胎干细胞分化时, 需要先短暂抑制BMP表达, 再刺激该信号通路上调心脏转录因子进而促进人多能干细胞向心肌细胞的分化<sup>[19]</sup>。BMP信号通路在促进中胚层的发生与分化方面有十分重要的作用, 其可以与Wnt3a信号通路和Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路发生相互作用, 诱导人胚胎干细胞产生原条/中胚层细胞<sup>[19]</sup>。除此之外, BMP信号通路还可以通过调节心脏前体细胞的标志性转录因子Csx/Nkx2.5、GATA-4的表达来调控心肌样细胞分化成熟的进程<sup>[20]</sup>。如同Wnt信号通路一样, BMP信号通路也是在激活与抑制的交替进行中实现对心肌分化成熟过程的有序调控。PATER等<sup>[21]</sup>通过实验发现了在心脏分化的终末阶段, Smad6a可以抑制BMP信号通路, 最终促进心室肌的分化。除此之外, 经SB431524与Dorsomorphin、Noggin处理之后, BMP信号通路也受到了抑制, 相对应地, 可以促进心肌细胞的终末分化成熟<sup>[22-23]</sup>。

## 1.3 Notch信号通路

Notch信号通路是在心肌分化成熟过程中的另外一条较为重要的通路, 在发生心肌梗死时, 该信号通路可以短暂地被激活, 进行部分修复<sup>[24]</sup>, 该通路可以参与中胚层细胞向心脏前体细胞的分化以及心肌前体细胞的扩增<sup>[21]</sup>, 其过表达可以促进心脏前体细胞向血管平滑肌细胞的分化<sup>[25]</sup>。Neuregulin可以激活Notch信号通路, 促进hPSC-CMs向心室样细胞的心源性分裂以及hPSC-CMs的成熟<sup>[26]</sup>; Notch信号通路的配体Jagged1的表达促进了Nkx2.5阳性心脏细胞前体和未成熟心肌细胞的扩增, 最后未成熟的心肌细胞趋于成熟<sup>[27]</sup>, 除此以外, Notch信号通路的其他相关分子Notch1、Notch4和Jagged2表达逐渐减少, 特别在细胞进入心脏中胚层阶段后即快速下降, 促进心肌细胞分化<sup>[28]</sup>。NISTRI等<sup>[24]</sup>敲除Notch1以及外源加入Delta4蛋白, 则可促进胚胎干细胞向中胚层、

心肌分化。总而言之, Notch信号通路主要调节心源性分裂, 在中胚层细胞与心脏前体细胞之间的相互作用的复杂网络中扮演重要角色。

## 2 促进hPSC-CMs分化成熟的功能化合物

在hPSC-CMs分化成熟的过程中, 在特定的时间添加特定的功能化合物可以加快分化成熟进程, 并且该过程操作简单, 可重复性高, 是目前应用最广泛的一种方法, 主要的功能化合物包括激素、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、微小RNA(microRNA, miR)、软脂酸、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抑制剂、AICAR等, 下面针对各种功能化合物的作用机理进行简单的概括。

### 2.1 激素

2.1.1 三碘甲状腺原氨酸 三碘甲状腺原氨酸(tri-iodothyronine, T3)是由甲状腺滤泡所分泌的一种激素, 其对于心脏的正常发育不可或缺。早在2013年, YANG等<sup>[29]</sup>就使用T3处理未成熟的IMR90-hiPSC-CMs, 其中, IMR90-hiPSC-CMs是BMP4与激活素A联合作用于BMP信号通路、Wnt信号通路等多个信号通路, 由IMR90-hiPSCs得到的; 在培养基中加入T3一周以后, 经过处理的细胞体积增大、极性更为明显、肌节长度增加; DNA合成减少, 细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂p21表达增加; 未成熟心肌细胞的每搏收缩力增加至原来的两倍; 在细胞器中体现为钙释放和再摄取速率的增加以及肌质网、ATP酶表达增加, 线粒体最大呼吸能力以及呼吸储备能力增加。三周以后, 未成熟的IMR90-hPSC-CMs逐渐趋于成熟。在2018年, NISHIMURA等<sup>[30]</sup>通过检测T3脱碘酶(type 3 iodothyronine deiodinase, D3)从侧面证明了T3在hiPSC-CMs成熟中的重要性, 与上文不同的是, 其将注意力集中在了由T3诱导的肌苷重链 $\alpha$ 和 $\beta$ 、肌质网 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶和受磷蛋白上, 加入D3以后, 明显减少了细胞内肌苷重链 $\alpha$ 和 $\beta$ 、肌质网 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶和受磷蛋白含量, 同时延缓了hPSC-CMs成熟的进程。

可以明确的是, 目前T3促进hPSC-CMs成熟主要是通过促进线粒体、肌节的发育成熟进而实现的, 但是经过检测发现, 线粒体的体积分数与线粒体中DNA的含量并没有增加, 推测这是由于呼吸链蛋白含量增加或者呼吸链活性增加导致的, 目前仍然没

有相关实验详细阐述T3对线粒体方面的影响,该方面仍具有较为广阔的研究前景。

**2.1.2 糖皮质激素** 糖皮质激素是肾上腺皮质激素的一种,目前在促进hPSC-CMs成熟的研究中,应用较为广泛的是地塞米松(Dexamethasone, Dex)。早期研究发现,Dex促进猪心肌细胞成熟的证据是在早产的幼猪中使用糖皮质激素治疗可显著改善心脏功能与促进心脏成熟<sup>[31]</sup>。之后,便开始将Dex应用于hPSCs,探索其对hPSC-CMs成熟的影响。在2015年,KOSMIDIS等<sup>[32]</sup>将未成熟的hESC-CMs在Matrigel培养基上进行培养并在细胞分化的第27天使用1  $\mu\text{mol/L}$ 的Dex处理,在经过处理之后,细胞的 $\text{Ca}^{2+}$ 处理能力增强、收缩能力增强、肌节的数量增加,在一定程度上促进了hESC-CMs的成熟。之后在2017年,PARIKH等<sup>[33]</sup>将未成熟的hiPSC-CMs在分化过程的第16天至第30天,同时使用100 nmol/L T3和1 000 nmol/L Dex在Matrigel培养表面进行共培养,实验结果证明该方法可以有效促进hiPSC-CMs横管的形成,改善细胞内钙释放的效果。PARIKH等<sup>[33]</sup>首次发现新形成的横管可以增加RyR受体的数量,明显促进钙致钙释放以及心室肌细胞样兴奋收缩耦合过程,该研究点明了横管形成的重要性以及为后续从分子层面促进横管形成奠定了相关基础。

同时,该研究也验证了GEORGIOS等<sup>[32]</sup>的猜想,联合使用T3与Dex确实可以促进L型钙通道的功能,以达到单独使用Dex时没有的效果。但是该研究并没有深入到基因层面,针对细胞代谢作出相应的检测,相信日后的工作会详细阐述在加入特定功能化合物之后基因表达及转录产物的变化情况,以便使促进成熟的过程更加清晰明了。另外,可以看出,单一的功能化合物对促进hPSC-CMs的能力有限,GENTILLON等<sup>[34]</sup>在2019年探究HIF-1 $\alpha$ 联合PPAR $\alpha$ 激活素对hiPSC-CMs成熟的影响时,使用了同时添加T3、地塞米松以及IGF-1的培养基进行实验,并取得了不错的实验成果。多种功能化合物的联合应用相信也是未来的重要工作方向之一。

## 2.2 IGFs

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)是调节心肌细胞增殖、发育和促进心脏功能成熟的重要因子。其通过胰岛素样生长因子受体-1(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R)和胰岛素受体(insulin receptor, INSR)调节心肌细胞成熟,这两

种酪氨酸激酶受体通过PI3K-AKT和RAF-MEK-ERK通路传递信号。使用胰岛素样生长因子处理乳鼠心肌细胞,可以使肌球蛋白轻链-2和肌钙蛋白的表达量上调,细胞大小扩大为原来的两倍,并且细胞内的蛋白质合成增加,从而有效促进心肌细胞的成熟<sup>[35]</sup>。将小鼠心肌细胞的INSR和IGF1R两个基因敲除后,1个月内小鼠出现早发性扩张性心肌病,肌节和线粒体形态紊乱,心功能下降等疾病,从反面强调了IGFs的重要性<sup>[36]</sup>。IGF-1通过增强核受体/转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ 的作用,上调脂肪酸氧化酶中链酰基辅酶A脱氢酶和肌肉型肉碱棕榈酰转移酶I的表达,影响心肌细胞成熟<sup>[37]</sup>。SHARMA等<sup>[38]</sup>利用VEGFR2/PDGFR抑制了TKLs的表达,在hiPSC-CMs的模型中IGF-1代偿性增加,提高了hiPSC-CMs的成活率,从侧面说明了IGF-1在心肌分化成熟过程中的重要意义。

## 2.3 MicroRNA

miR是一类由内源基因编码的长度约22个核苷酸的非编码单链RNA分子,经研究发现,对hPSC-CMs分化成熟影响最大的两种是miR-1与miR-133a。对hESCs、hESC-CMs、胎儿和成人心室肌细胞中提取的microRNA进行分析,可以确定miR-1是心肌细胞成熟的潜在调节剂<sup>[39]</sup>,进一步的研究表明,miR-1的过度表达增加了Ito、IKs和IKr等离子通道的开放频率,减少了 $\text{I}_f$ 离子通道的开放频率,减少了hESC-CMs的动作电位持续时间和静息膜电位和最大舒张电位的超极化,以此来促进心肌细胞的成熟<sup>[40]</sup>。当miR-1过表达时,miR-1可以参与心室肌细胞的螺旋-环状-螺旋蛋白的合成,来抑制心脏的生长<sup>[41]</sup>。与miR-1不同的是,miR-133a主要通过靶向释放血清反应因子来促进肌样细胞的增殖,并且其主要促进的是骨骼肌的增殖分化,其在心肌分化成熟方面的作用还有待研究。此外,IVEY等<sup>[42]</sup>研究发现,miR-1与miR-133a在促进hESCs分化为心肌细胞方面两者具有拮抗作用,miR-1很可能通过抑制Notch信号通路中的Notch  $\delta$ (Dll-1)型配体促进hPSC-CMs的分化,而miR-133抑制hPSC-CMs的分化,两者相互作用,使心肌分化成熟的过程有序进行。

## 2.4 脂肪酸

心肌细胞成熟的一个标志是代谢底物从葡萄糖到脂肪酸的转换,如何促进hPSC-CMs较多地使用氧化磷酸化供能成为促进hPSC-CMs成熟的新思路之

一<sup>[43]</sup>。研究人员发现,在促进心肌成熟的培养基中添加脂肪酸,尤其是棕榈酸酯,可以有效促进心肌成熟相关基因的表达,并增强hiPSC-CMs的收缩力<sup>[44-45]</sup>。与前文不同的是,HORIKOSHI等<sup>[46]</sup>使用不同的实验方法和原理,利用成熟心肌细胞较多分解脂肪酸这一特性,将脂肪酸与乳酸分别加入到hiPSC-CMs的培养基中,结果显示在添加了脂肪酸的培养基中,细胞除了前文提到的基因及结构变化以外,线粒体数量增加,细胞的呼吸强度有了显著提升,这也从间接证明了加入脂肪酸的培养基中的细胞更多地以氧化磷酸化作为能量供应的方式,进一步证明了脂肪酸对心肌细胞成熟的促进作用,并且,HORIKOSHI等<sup>[46]</sup>使用了CHIR99021与Wnt信号通路抑制剂来实现对Wnt信号通路的调节,快速获得了未成熟的hPSC-CMs。在另一项研究中,将棕榈酸白蛋白复合物和可以促进脂肪酸穿越细胞膜的肉碱一起加入到hiPSC-CMs的培养基中,结果显示,两种化合物可以增强线粒体的呼吸储备能力,并且测序结果表明,经脂肪酸处理后,氧化磷酸化的有关基因表达增加,脂质合成的有关基因表达减少;信号通路分析表明,在加入脂肪酸以后,多种细胞内激酶发生磷酸化,促进了心肌细胞的成熟<sup>[47]</sup>。

## 2.5 mTOR抑制剂

mTOR主要与其他蛋白质形成两种复合物——mTORC1与mTORC2,进而在机体代谢中起关键作用,有研究证实,mTOR信号通路也是糖酵解和氧化磷酸化之间的代谢开关<sup>[48-49]</sup>。雷帕霉素主要抑制mTORC1,如果长时间小剂量添加雷帕霉素也可抑制mTORC2,除此之外,雷帕霉素与CHIR99021协同作用还可以通过抑制P53的翻译和线粒体活性氧的产生,抑制mTOR可以克服P53依赖的人多能干细胞凋亡,从而实现心肌细胞的高效分化。目前,只能从实验中证明mTOR对Wnt信号通路与BMP信号通路有影响,但是mTOR如何调控Wnt信号通路仍然需要进一步的探究<sup>[50-51]</sup>。同时,Torin1是mTOR信号通路的有效抑制剂之一,其可以瞬时抑制mTORC1与mTORC2复合物的产生,比雷帕霉素效果更强<sup>[52]</sup>。GARBERN等<sup>[53]</sup>探究了Torin1对hPSC-CMs成熟的影响,通过使用Torin1在不同的时间点抑制mTOR,结果证明,经Torin1处理的细胞相对最大收缩力和最大耗氧率增加,且其可以有效缩短到达动作电位峰值的时间,Torin1可以显著促进诸如*TNNI3*、

*KCNJ2*等与心肌细胞成熟相关基因的表达。除此之外,Dex<sup>[54]</sup>、T3<sup>[55]</sup>均可以抑制mTOR信号,促进hPSC-CMs分化成熟。

## 2.6 AICAR

磷酸腺苷蛋白激酶(AMPK)是一种能量敏感蛋白激酶,其可以参与调节心肌细胞葡萄糖脂肪酸氧化和调节线粒体功能<sup>[56]</sup>。研究表明,干细胞主要通过有氧呼吸来提供能量,进而保证其各项生命活动的进行,当干细胞分化为特定的组织细胞时,其能量供应方式转变为氧化磷酸化,在该过程中同时会涉及到AMPK的改变<sup>[57]</sup>。AICAR是AMPK的有效激活剂之一,其可以增加AMPK在细胞中的活性<sup>[58]</sup>。YE等<sup>[59]</sup>在hiPSC-CMs的培养基中加入AICAR,经实验发现,AICAR主要是通过激活AMPK信号通路来起作用的,激活作用在其浓度为0.5 mmol/L时最强,并且其机制为增加磷酸化AMPK的表达,但不改变总AMPK蛋白水平;同时,经AICAR处理的hiPSC-CMs在线粒体氧化代谢、细胞结构和基因表达方面表现出比对照组更成熟的表型,其可以显著促进心肌细胞的成熟。

## 3 总结与展望

目前,促进hPSC-CMs分化成熟的信号通路主要是Wnt信号通路、BMP信号通路以及Notch信号通路,不同信号通路在特定时间激活与抑制交替进行,实现对hPSC-CMs分化成熟的有序调控。许多团队虽在该方面的研究取得了一定成果,但仍然没有一个针对多种信号通路清晰明确的综合阐述,并且针对不同的信号通路研究方法较为单一。针对不同基因、mRNA等小分子的分析,可以考虑使用与生物信息学、基因组学等多学科交叉的研究方式,进而加快研究进程,理清各个信号通路之间错综复杂的关系。同时,目前主要促进hPSC-CMs分化成熟的功能化合物包括三碘甲状腺原氨酸、糖皮质激素、胰岛素样生长因子、microRNA、脂肪酸、mTOR抑制剂以及AICAR等,而当前针对功能化合物作用的研究主要是集中于细胞形态结构的变化,在基因分子层面的探究相对较少,然而为了更加清晰明确地了解促进hPSC-CMs分化成熟的机制,有针对性地探索更为高效、简单、可重复性好的功能化合物来促进hPSC-CMs成熟,添加功能化合物后信号通路、分子转录的研究必不可少;除此之外,成分明确的多

种功能化合物联合应用体系以及人工合成开发更为高效的功能化合物也将是未来工作的主要趋势。随着技术的进步和发展,未来得到的hPSC-CMs会更加成熟,更能满足基础研究与临床治疗的需要。相信很快就可以在体外高效地获得成熟的hPSC-CMs,hPSC-CMs在临床治疗领域也会有更宝贵的医疗价值和更广阔的应用空间。

### 参考文献 (References)

- [1] 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, doi: 10.1016/j.stem.2011.12.013.
- [2] 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[J]. *中国细胞生物学学报*(LI Q, LIU J, XU X Q. Research progress and application prospect of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Chin J Cell Biol*), 2013, doi: <http://dspace.xmu.edu.cn:8080/dspace/handle/2288/18355>.
- [3] ELENA M, DIVYA R, EMILY D, et al. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation [J]. *Eur Heart J*, 2011, doi: 10.1093/eurheartj/ehr073.
- [4] MALLAPATY S. Revealed: two men in China were first to receive pioneering stem-cell treatment for heart-disease [J]. *Nature*, 2020, doi: 10.1038/d41586-020-01285-w.
- [5] 邢红艳, 张艺哲, 王美婷, 等. 人诱导多能干细胞分化的心肌细胞在疾病模型和药物筛选中的应用[J]. *中国医药工业杂志*(XING H Y, ZHANG Y Z, WANG M T, et al. Application of human induced pluripotent stem cell differentiated cardiomyocytes in disease models and drug screening [J]. *J Chin Med Ind*), 2019, doi: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.08.002.
- [6] DAI N, LI D, SHI Q, et al. Influence of vascular endothelial growth factor on endothelial components in human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2012, doi: CNKI:SUN:XYYS.0.2012-03-043.
- [7] LIECHTY K W, MACKENZIE T C, SHAABAN A F, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep [J]. *Nat Med*, 2000, doi: 10.1038/81395.
- [8] LEI B, XIN J, MARTIN-PUIG S, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages [J]. *Nature*, 2009, doi: 10.1038/nature08191.
- [9] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, doi: 2007, 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [10] XU C, POLICE S, RAO N, et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells [J]. *Circ Res*, 2002, doi: 10.1161/01.RES.0000035254.80718.91.
- [11] GAY M S, LI Y, XIONG F, et al. Dexamethasone treatment of newborn rats decreases cardiomyocyte endowment in the developing heart through epigenetic modifications [J]. *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0125033.
- [12] CHAN G, MOONEY D J. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response [J]. *Trends Biotechnol*, 2008, doi: 10.1016/j.tibtech.2008.03.011.
- [13] BURRIDGE P W, THOMPSON S, MILLROD M A, et al. A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability [J]. *PLoS One*, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0018293.
- [14] YUE Q, WAGSTAFF L, YANG X, et al. Wnt3a-mediated chemorepulsion controls movement patterns of cardiac progenitors and requires RhoA function [J]. *Development*, 2008, doi: 10.1242/dev.015321.
- [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, doi: 10.1073/pnas.1200250109.
- [16] LACO F, WOO T L, ZHONG Q, et al. Unraveling the inconsistencies of cardiac differentiation efficiency induced by the GSK3 $\beta$  inhibitor CHIR99021 in human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, doi: 10.1073/pnas.1200250109.
- [17] ANNA G, EGIDIO T, MARA P, et al. Cardio-respiratory international classification of functioning, disability and health sets for inpatient rehabilitation: from theory to practice [J]. *Eur J Phys Rehabil Med*, 2020, doi: 10.23736/S1973-9087.19.05384-X.
- [18] MUMMERY C L, ZHANG J, NG E S, ET AL. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview [J]. *Circ Res*, 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.
- [19] JAIN R, LI D, GUPTA M, et al. Integration of BMP and Wnt signaling by Hopx specifies commitment of cardiomyoblasts [J]. *Science*, 2015, doi: 10.1126/science.aaa6071.
- [20] VLIMKI M J, TLLI M A, KINNUNEN S M, et al. Discovery of small molecules targeting the synergy of cardiac transcription factors GATA4 and NKX2-5 [J]. *J Med Chem*, 2017, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00816.
- [21] PATER E D, CIAMPRICOTTI M, PRILLER F, et al. Bmp signaling exerts opposite effects on cardiac differentiation [J]. *Circ Res*, 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261172.
- [22] KATTMAN S J, WITTY A D, GAGLIARDI M, et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, doi: 10.1016/j.stem.2010.12.008.
- [23] YUASA S, ITABASHI Y, KOSHIMIZU U, et al. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, doi: 10.1038/nbt1093.
- [24] NISTRI S, SASSOLI C, BANI D J F I P. Notch signaling in ischemic damage and fibrosis: evidence and clues from the heart [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00187.
- [25] CHEN L, ASHRAF M, WANG Y, et al. The role of notch 1 activation in cardiosphere derived cell differentiation [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, doi: 10.1089/scd.2011.0463.
- [26] ZHU W Z, XIE Y, MOYES K W, et al. Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells [J]. *Circ Res*, 2010, doi: 10.1161/circresaha.110.223917.

- [27] MOHAMED N, MÉLANIE M, ISABELLE P, et al. The Notch pathway controls fibrotic and regenerative repair in the adult heart [J]. *Eur Heart J*, 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehs269.
- [28] NEMIR M, CROQUELOIS A, PEDRAZZINI T, et al. Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling [J]. *Circ Res*, 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000226497.52052.2a.
- [29] YANG X, RODRIGUEZ M, PABON L, et al. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.04.005.
- [30] NISHIMURA K, TAKEDA M, YAMASHITA J K, et al. Type 3 iodothyronine deiodinase is expressed in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes [J]. *Life Sci*, 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.037.
- [31] KIM M Y, EIBY Y A, LUMBERS E R, et al. Effects of glucocorticoid exposure on growth and structural maturation of the heart of the preterm piglet [J]. *PLoS One*, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0093407.
- [32] KOSMIDIS G, BELLIN M, RIBEIRO M C, ET al. Altered calcium handling and increased contraction force in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes following short term dexamethasone exposure [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.026.
- [33] PARIKH S S, BLACKWELL D J, GOMEZ-HURTADO N, et al. Thyroid and glucocorticoid hormones promote functional t-tubule development in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311920.
- [34] GENTILLON C, LI D, DUAN M, et al. Targeting HIF-1 $\alpha$  in combination with PPAR $\alpha$  activation and postnatal factors promotes the metabolic maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.003.
- [35] ITO H, HIROE M, HIRATA Y, et al. Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes [J]. *Circulation*, 1993, doi: 10.1006/jmcc.1994.1096.
- [36] LAUSTSEN P G, RUSSELL S J, CUI L, et al. Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, doi: 10.1128/MCB.01110-06.
- [37] MONTESSUIT C, PALMA T, VIGLINO C, et al. Effects of insulin-like growth factor-I on the maturation of metabolism in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Pflügers Arch*, 2006, doi: 10.1007/s00424-006-0059-4.
- [38] SHARMA A, BURRIDGE P W, MCKEITHAN W L, et al. High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity with human induced pluripotent stem cells [J]. *Sci Transl Med*, 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf2584.
- [39] FU J D, RUSHING S N, LIEU D K, et al. Distinct roles of microRNA-1 and -499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *PLoS One*, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0027417.
- [40] VAN ROOIJ E, SUTHERLAND L B, QI X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. *Science*, 2007, doi: 10.1126/science.1139089.
- [41] KUPPUSAMY K T, SPERBER H, RUOHOLA-BAKER H. MicroRNA regulation and role in stem cell maintenance, cardiac differentiation and hypertrophy [J]. *Curr Mol Med*, 2013, doi: 10.2174/1566524011313050007.
- [42] IVEY K N, MUTH A, ARNOLD J, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.01.016.
- [43] HU D, LINDERS A, YAMAK A, et al. Metabolic maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by inhibition of HIF1 $\alpha$  and LDHA [J]. *Circ Res*, 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313249.
- [44] DRANWEL F M, BOCCARDO S, PRUMMER M. Disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Rep*, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.055.
- [45] MILLS R J, TITMARSH D M, KOENIG X, et al. Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, doi: 10.1073/pnas.1707316114.
- [46] HORIKOSHI Y, YAN Y, TERASHVILI M, et al. Fatty acid-treated induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes exhibit adult cardiomyocyte-like energy metabolism phenotypes [J]. *Cells*, 2019, doi: 10.3390/cells8091095.
- [47] YANG X, RODRIGUEZ M L, LEONARD A, et al. Fatty acids enhance the maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2019, doi: 10.1016/j.stemcr.2019.08.013.
- [48] LU C L, QIN L, LIU H C, et al. Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition-a Warburg-reversing effect [J]. *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0121046.
- [49] SABATINI D M. Twenty-five years of mTOR: uncovering the link from nutrients to growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, doi: 10.1073/pnas.1716173114.
- [50] SARBASSOV D D, ALI S M, SENGUPTA S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB [J]. *Mol Cell*, 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.029.
- [51] QIU X, LIU Y, ZHANG Y, et al. Rapamycin and CHIR99021 coordinate robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via reducing p53-dependent apoptosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, doi: 10.1161/JAHA.116.005295.
- [52] THOREEN C C, KANG S A, CHANG J W, et al. Correction: An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1 [J]. *J Biol Chem*, 2020, doi: 10.1074/jbc.AAC120.012837.
- [53] 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, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044205.
- [54] WANG H, KUBICA N, ELLISEN L W, et al. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1 [J]. *J Bio Chem*, 2006, doi: 10.1074/jbc.M610023200.
- [55] YAU W W, SINGH B K, LESMANA R, et al. Thyroid hormone

- (T3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy [J]. *Autophagy*, 2018, doi: 10.1080/15548627.2018.1511263.
- [56] MILLS R J, HUDSON J E. Bioengineering adult human heart tissue: how close are we [J]? *APL Bioeng*, 2019, doi: 10.1063/1.5070106.
- [57] SHUM L C, WHITE N S, MILLS B N, et al. Energy metabolism in mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, doi: 10.1089/scd.2015.0193.
- [58] DENNING C, BORGDORFF V, CRUTCHLEY J, et al. Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells: from laboratory curiosity to industrial biomedical platform [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.014.
- [59] 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, doi: 10.3389/fcell.2021.644667.