

本文引用: 桑婉玥, 李耀东. 人诱导多能干细胞在心血管疾病中的应用及研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(12): 1020-1024. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.12.002.

· 专家论坛 ·

[文章编号] 1007-3949(2022)30-12-1020-05

人诱导多能干细胞在心血管疾病中的应用及研究进展

桑婉玥, 李耀东

(新疆医科大学第一附属医院心脏起搏电生理科 新疆心电生理与心脏重塑重点实验室, 新疆乌鲁木齐市 830054)

[专家简介] 李耀东, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心律失常的基础及临床研究, 任中华医学会心电生理和起搏分会第六、七、八届全国青年委员、中华医学会心电生理和起搏分会第八届委员会心电学组委员、中国医师协会心律学专业委员会中青年电生理工作委员会委员等, 担任《中华心律失常学杂志》第五届通讯编委、《EP-Europace 中文版》编委、《心血管病学进展杂志》编委、《心肺血管病杂志》青年编委。先后在国内外杂志发表论文30余篇, 其中SCI文章20余篇。主持国家自然科学基金3项, 其中面上项目2项, 新疆维吾尔自治区杰出青年基金1项, 参编专著4本, 研究成果获得省部级奖项3项, 获得中国国家发明专利2项, 澳大利亚发明专利1项。



[摘要] 心血管疾病(CVD)是循环系统疾病的统称, 尽管近几十年来CVD在临床研究和治疗方面已取得重大进展, 但其仍是全世界高发病率和死亡率的主要疾病。CVD进程中炎症、纤维化等促进了心肌细胞(CM)的凋亡, 成熟的CM缺乏损伤后修复及再生的能力, 这无疑阻碍了CVD治疗的进展。近年来, 人诱导多能干细胞(hiPSC)的发现推动了人类多种疾病的体外研究, 为CVD潜在分子机制的探索提供了新方向, hiPSC衍生的CM更是为心肌的修复提供了广阔前景。本文结合近年相关文献, 就hiPSC在CVD中的作用及研究现状作一综述。

[关键词] 人诱导多能干细胞; 心血管疾病; 干细胞治疗; 疾病模型

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Application and research progress of human induced pluripotent stem cell in cardiovascular disease

SANG Wanyue, LI Yaodong

(Cardiac Pacing and Electrophysiology Department of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang Key Laboratory of Cardiac Electrophysiology and Cardiac Remodeling, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

[ABSTRACT] Cardiovascular disease (CVD) is a collective term for circulatory system diseases. Although CVD has made great progress in clinical research and treatment in recent decades, it is still the main disease with high morbidity and mortality in the world. Inflammation, fibrosis, etc. in CVD process promote the apoptosis of cardiomyocyte (CM), and mature CM lacks the ability to repair and regenerate after injury, which undoubtedly hinders the progress of CVD treatment. In recent years, the discovery of human induced pluripotent stem cell (hiPSC) has promoted the *in vitro* research of various human diseases, and provided a new direction for exploring the potential molecular mechanism of CVD. CM derived from hiPSC has provided a broad prospect for myocardial repair. In this paper, the role and research status of hiPSC in CVD are reviewed based on the related literatures in recent years.

[KEY WORDS] human induced pluripotent stem cell; cardiovascular disease; stem cell therapy; disease model

[收稿日期] 2022-04-07

[修回日期] 2022-05-14

[基金项目] 国家自然科学基金(81873487)

[作者简介] 桑婉玥, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病病理生理研究, E-mail: 312666953@qq.com。通信作者李耀东, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脏电生理研究, E-mail: boylyd@163.com。

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是世界最常见的死亡原因,其特征是心脏或血管发生炎症、氧化应激、增生、肥厚甚至心室异常重构。其中,心肌细胞 (cardiomyocyte, CM) 凋亡是一个不可逆过程,还会促进心肌纤维化和瘢痕的形成,进一步加速了心力衰竭的进展。据 2015 年世界卫生组织统计,CVD 导致超过 1 770 万人死亡,占全球死亡总数的 31%^[1]。而目前的临床治疗仅局限于缓解 CVD 患者的症状,预防并发症以及降低急性期死亡率,不能促进 CM 的修复及再生。此外,目前研究发现遗传和环境因素同样有助于 CVD 的发展^[2],但具体机制仍未阐明。因此,基于这些研究现状,需要更有效的治疗手段以及更精准的疾病模型。人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cell, hiPSC) 的发现推动了人类多种疾病的体外研究,以下分别就 hiPSC 在多种 CVD 中构建疾病模型、细胞治疗、药物心脏毒性评价等方面的作用进行综述,并讨论其在上述方面的未来前景及挑战。

1 hiPSC 概述

人多能干细胞是一类具有分化潜能、无限增殖以及三胚层 (外胚层、中胚层和内胚层) 分化能力的细胞,包括胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 和 hiPSC。ESC 来源于人类胚胎未分化的细胞团;而 hiPSC 类似于“人造 ESC”,可通过基因重编程技术将人皮肤成纤维细胞、外周血 B、T 淋巴细胞甚至脱落的肾小管上皮细胞转化生成 hiPSC^[3],这不仅解决了 ESC 分离时可能损伤胚胎的伦理问题,也提供了更便捷的多能干细胞来源途径。

随着干细胞生物学的发展,hiPSC 现已成为多种疾病构建模型和研究分子机制的特殊工具。相比于传统动物模型,hiPSC 模型优点主要如下:(1) hiPSC 的制备仅需供体少量体细胞 (8 ~ 16 mL 外周血),通过间质细胞分裂在适当条件下即可无限产生质量稳定的 CM;(2) 干细胞生物学最新研究进展表明,hiPSC 携带疾病突变基因以及其他修饰基因和遗传因素,极大可能促进体外研究中患者特异性疾病表型的重现,反映患者真实病理情况^[4];(3) hiPSC 衍生的 CM (hiPSC-CM) 具有与人原代 CM 更接近的收缩力、收缩频率及钙稳态^[5],且相较于动物分离培养的原代 CM 维持时间长,对研究心律失常电生理机制尤为适用。综合上述优势,hiPSC 可作为细胞水平上研究人类疾病可靠的候选模型,为疾病的深度研究拓宽了思路。

此外,hiPSC 可无限提供患者特异性遗传背景的功能细胞,这对于研究患者在自然环境中潜在的致病因素具有一定优势;hiPSC 还可诱导分化产生多种类型细胞 (如神经细胞和 CM),这使其成为强大的细胞模型库,有利于人类疾病、基因研究、药物筛选和个性化治疗的探索^[6]。但 hiPSC 在重编程的过程中会保留患者体细胞来源的表观遗传特征及基因组不稳定性,因此,需要密切监测和验证这些细胞的功能,以确保未来临床使用的安全性。

2 hiPSC 在心血管疾病中的应用研究

目前针对 CVD 的治疗虽已有药物治疗 (抗血小板聚集、降低心肌耗氧量等药物)、介入治疗 (冠状动脉支架植入、左心耳封堵等) 及外科治疗 (冠状动脉搭桥术、心脏瓣膜修补术等) 等,但上述治疗不仅伴随相应不良反应,如侵入性的导管消融可能导致心脏压塞和肺静脉狭窄,抗凝药物会导致异常出血,且治疗后仍有复发可能性,更无法促进 CM 的修复及再生。而 hiPSC 可以提供无限的 CM 来源,且与患者自身 CM 有相似的功能及电生理特性,这使得 hiPSC-CM 可能成为人 CM 的宝贵替代品。

2.1 hiPSC 与心肌梗死

自 2006 年发现 hiPSC 以来,人们始终在探索其在疾病中潜在的治疗作用,尤其是 hiPSC 心脏再生疗法的研究。Guan 等^[7]将 hiPSC-CM 直接注射入心肌梗死小鼠的心肌并观察 4 周后,发现接受 hiPSC-CM 移植的小鼠死亡率显著低于对照组,且心脏射血分数较对照组提高 23.69%,Masson 染色显示 hiPSC-CM 治疗组的心肌纤维化程度显著降低。随着 hiPSC 技术的不断发展,研究人员发现虽然直接将细胞悬浮液注入心肌可以成功修复小片受损区域,但容易导致移植细胞的聚集和坏死,且难以控制移植细胞的形状、大小和位置。因此,Gao 等^[8]进一步利用 hiPSC 技术培养了人心肌贴片,并顺利植入猪心肌梗死模型,观察 4 周后发现心肌梗死模型的左心室功能、梗死面积以及心肌肥大等情况均有改善,且心肌贴片改善了 CM 的存活率;在鼠、兔等小动物模型中,心肌贴片可显著增强心肌梗死区心肌的收缩功能,促进血管新生,抑制 3 个月内细胞移植物炎症反应等^[9]。除上述动物实验外,大阪大学于 2020 年 1 月已正式开展 hiPSC-CM 心肌贴片的 I 期临床试验,以评估其在缺血性心肌病患者心脏中的安全性和潜在疗效^[10]。虽然心肌贴片解决了心肌内直接注射细胞悬浮液的部分缺陷,但厚层贴

片的血液灌注有限,仍亟待解决。此外,hiPSC-CM移植后的免疫排斥反应同样需要引起重视。尽管近年已有学者在动物实验中提出部分解决方案,如移植 hiPSC-CM 前,静脉注射 hiPSC 衍生的间充质干细胞可提前诱导免疫调节作用,抑制 NK 细胞,调节 CD4 细胞因子的表达,从而提高 hiPSC-CM 的移植存活率^[11],但考虑到未来 hiPSC-CM 在人心肌内的用量更大,故仍需更多的临床前研究加以验证。

2.2 hiPSC 与心力衰竭

心力衰竭是多数 CVD 发展的终末阶段,随着 Covid-19 的国际大流行,ARS-CoV-2 感染导致的急性心肌损伤使得心力衰竭的发病率及死亡率显著上升^[12],而解决 CM 再生问题是其治疗的根本环节。目前,心力衰竭动物模型的干细胞治疗已被证明是安全且有效的。Liu 等^[13]对比了 hiPSC-CM 在扩张型心肌病患者及对照组中的疗效,发现疾病组细胞的收缩功能显著下降,与疾病表型一致;Lancaster 等^[14]将 hiPSC-CM 心肌贴片植入慢性心力衰竭大鼠模型,于植入 7 日后发现大鼠心肌电传导增强,3 周后发现植入组大鼠心肌中血管内皮生长因子、缝隙连接蛋白 43 和胰岛素生长因子 1 表达增加,且左心室舒张末期压力显著低于对照组,提示 hiPSC-CM 心肌贴片有效改善了心力衰竭大鼠的心功能。随着技术的飞速发展,除上述动物模型研究外,hiPSC-CM 的治疗已于 2021 年首次在国内应用于临床患者充血性心力衰竭的治疗,在术后院内随访过程中,患者心功能较前明显好转,术后半月射血分数提高 6%,无不良反应的发生。上述证据均提示 hiPSC-CM 可作为心脏再生治疗的新方法。hiPSC-CM 的治疗作用可能通过外泌体发挥功能,外源性引入的外泌体膜可与自体细胞表面的特定受体特异性结合,发挥其促进血管生成和增殖的作用,有助于修复损伤的 CM 以及对抗炎症和纤维化等进程^[15]。但 hiPSC 来源的 CM 可能是不同生长阶段的混合物,具有未成熟 CM 的多种典型特性,这与成熟 CM 在组织及代谢方面有些许差异^[16]。虽然科学家们已找到能够促进 hiPSC-CM 成熟的方法,如电刺激、延长培养时间等,且在细胞制剂上取得了成功,但将这些方法扩展到实际临床应用中仍具有挑战性。

2.3 hiPSC 与心律失常

hiPSC 现已成功用于建立多种遗传性特异性离子通道病模型,如 Brugada 综合征、致心律失常性右心室心肌病等^[17-18],且患者来源的 hiPSC-CM 可以体现患者特异性表型及电生理特征,这为进一步阐

明疾病的分子机制提供了新方向。除 CM 的修复外,Matsa 等^[19]指出 hiPSC 还可用于离子通道病的治疗,如在 hiPSC 技术构建的体外长 Q-T 综合征模型中,沉默突变的等位基因可使 K⁺内流增加,缩短动作电位时程,从而达到治疗效果。目前 hiPSC-CM 对心律失常的治疗仅局限于细胞层面,极少涉及动物模型的治疗。虽然 hiPSC 和 ESC 之间再生潜力的差异尚不清楚,但 ESC 衍生的 CM(ESC-CM)在动物模型中预防心律失常的效果也可为 hiPSC-CM 提供参考。2014 年 Zhang 等^[20]将 hiPSC-CM 移植入猪心肌梗死模型 6 周后,发现宿主心肌中血管数量、缝隙连接显著增加,而交感神经数量减少,且程序性电刺激诱导的室性心律失常比例及心律失常评分显著降低,提示 hiPSC-CM 移植可显著降低室性心律失常的易感性;Chong 等^[21]将 ESC-CM 注入猪尾猕猴急性心肌缺血再灌注模型 3 个月后,发现移植细胞不仅在宿主心脏中存活,且能够与宿主心肌进行电耦合;此外,在豚鼠心肌梗死模型中,移植的 ESC-CM 不仅可与宿主组织电耦合,心肌同步收缩,还可保护损伤心脏发生心律失常^[22]。还有少量关于 hiPSC 分化为起搏样细胞的研究,旨在构建生物起搏器取代传统的电子起搏器,但分化的窦房结样细胞无法起到与原代细胞相同的起搏功能,故仍需进一步研究窦房结发育过程中的关键分子机制^[23]。以上研究均揭示了 hiPSC 在未来 CVD 治疗中的广阔前景,但目前 hiPSC 的临床应用仍面临许多挑战,如移植后心律失常、免疫排斥、低存活率等,此外,还需考虑 hiPSC-CM 在人类受损心肌中的最佳用量,这均需要大量的动物实验进一步探究。

3 hiPSC 作为个性化药物的筛选工具

传统的毒理学检测方法涉及规模庞大的动物研究,价格昂贵的同时耗时也长,且由于物种间的生理差异,动物研究并不能正确预测候选药物对人体器官的实际不良影响。尽管灵长类动物具有与人原代 CM 高度相关的细胞系统,但它们不仅使用有限,且受到伦理限制。由于 hiPSC-CM 与人类原代 CM 的高度相似性,大量研究人员将其作为药物开发、CVD 新药筛选以及药物心脏毒性检测的工具。与动物模型相比,hiPSC-CM 克服了种属差异,更好地体现了药物在人 CM 中的心脏毒性,其他优势还包括:(1)hiPSC-CM 已被纳入体外心律失常综合分析计划,通过评估给药后多个心脏离子通道的活性、电生理效应的硅重建、体外预测药物对 CM 的

影响及对潜在效果的临床评价,为研究多通道相互作用导致心律失常的药物提供了强大平台^[24]; (2) hiPSC-CM 包含其供体基因型的特征,使其可用于研究患者特异性突变或筛查突变靶向药物,更有利于心律失常的个性化治疗; (3) 细胞模型可进行大批量化合物的高通量筛选,且成本相对动物模型低,还可使用更成熟的电生理测量工具(如膜片钳、多电极阵列等)全面评估不同离子通道对药物刺激的反应、QT 间期及场电位持续时间等。但药物的筛选对 CM 的成熟有一定要求,不同成熟阶段的 CM 对心律失常药物的敏感性可能不同。研究表明,未成熟的 CM 比成熟的 CM 对药物更敏感^[25],这可能导致有益于 CVD 的治疗药物过早被排除;相反,假阴性结果可能会误导科研人员低估了药物的毒性作用。因此,在未来的研究中应以促进 hiPSC-CM 的成熟为重点方向,使其更为安全有效地运用于药物的筛选及心脏毒性检测。

4 小结与展望

随着我国人口老龄化及慢病生存期的延长,CVD 患病率居高不下的现状使研究人员对其的深入探索迫在眉睫。尽管临床研究已取得一定进展,但当前治疗仅局限于缓解患者症状、预防并发症及降低急性期死亡率,多数患者仍最终进展至心力衰竭,而心脏移植仍是终末期心力衰竭的唯一选择。hiPSC 技术目前被认为是能够更好复刻人原代 CM 表型、功能及钙稳态的细胞模型,其不仅克服了 ESC 相关的伦理问题,解决了动物模型中的种属差异,还可通过重编程体细胞从而量产携带患者致病基因及疾病表型的特定细胞,这将有助于 CVD 新治疗策略的拟定、药物心脏毒性的检测、遗传性疾病个性化药物的开发以及 CM 再生的纵向研究。但目前 hiPSC-CM 不成熟的功能及表型、各批次分化细胞间的差异、适用于临床治疗的最佳细胞类型以及最佳注射时间等安全性和潜在危险性仍需要通过长期观察及随访证实。未来研究中,随着上述问题的逐一破解以及精准医疗计划的引入和实施,hiPSC 很可能会成为 CVD 研究和医学发展的重要推动剂,引领人们探索更深入的疾病分子机制。

[参考文献]

- [1] ROTH G A, JOHNSON C, ABAJOBIR A, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(1): 1-25.
- [2] PARROTTA E I, LUCCHINO V, SCARAMUZZINO L, et al. Modeling cardiac disease mechanisms using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: progress, promises and challenges[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4354.
- [3] OH J E, JUNG C, YOON Y S. Human induced pluripotent stem cell-derived vascular cells: recent progress and future directions[J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2021, 8(11): 148.
- [4] ABOU-SALEH H, ZOUEIN F A, EL-YAZBI A, et al. The march of pluripotent stem cells in cardiovascular regenerative medicine[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 201.
- [5] BEDUT S, SEMINATORE-NOLE C, LAMAMY V, et al. High-throughput drug profiling with voltage-and calcium-sensitive fluorescent probes in human iPSC-derived cardiomyocytes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 311(1): H44-H53.
- [6] SHI Y, INOUE H, WU J C, et al. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(2): 115-130.
- [7] GUAN X, XU W, ZHANG H, et al. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial function and reverses ventricular remodeling in infarcted rat hearts[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 73.
- [8] GAO L, GREGORICH Z R, ZHU W, et al. Large cardiac muscle patches engineered from human induced-pluripotent stem cell-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine[J]. *Circulation*, 2018, 137(16): 1712-1730.
- [9] GUO R, MORIMATSU M, FENG T, et al. Stem cell-derived cell sheet transplantation for heart tissue repair in myocardial infarction[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 19.
- [10] FAN D, WU H, PAN K, et al. Regenerating damaged myocardium: a review of stem-cell therapies for heart failure[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3125.
- [11] SUN S J, LAI W H, JIANG Y, et al. Immunomodulation by systemic administration of human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells to enhance the therapeutic efficacy of cell-based therapy for treatment of myocardial infarction[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1641-1654.
- [12] CHEN T, WU D, CHEN H, et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study[J]. *BMJ*, 2020, 368: m1091.
- [13] LIU J, SUN N, BRUCE M A, et al. Atomic force mechanobiology of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37559.

- [14] LANCASTER J J, SANCHEZ P, REPETTI G G, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte patch in rats with heart failure [J]. *Ann Thorac Surg*, 2019, 108(4): 1169-1177.
- [15] YANG P C. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived exosomes for precision medicine in heart failure [J]. *Circ Res*, 2018, 122(5): 661-663.
- [16] LIANG W, GASPARYAN L, ALQARAWI W, et al. Disease modeling of cardiac arrhythmias using human induced pluripotent stem cells [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(4): 313-333.
- [17] EL-BATRAWY I, ALBERS S, CYGANEK L, et al. A cellular model of Brugada syndrome with SCN10A variants using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Europace*, 2019, 21(9): 1410-1421.
- [18] QI Y Y, LU J Z, ZHANG L, et al. An induced pluripotent stem cell line (EHTJUi004-A) generated from a neonate with c. 4683_4684delCT; p. Leu1563fs mutation in the gene DSP causing familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia (ARVD) [J]. *Stem Cell Res*, 2021, 53: 102369.
- [19] MATSA E, DIXON J E, MEDWAY C, et al. Allele-specific RNA interference rescues the long-QT syndrome phenotype in human-induced pluripotency stem cell cardiomyocytes [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(16): 1078-1087.
- [20] ZHANG F, SONG G, LI X, et al. Transplantation of iPSC ameliorates neural remodeling and reduces ventricular arrhythmias in a post-infarcted swine model [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(3): 531-539.
- [21] 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): 273-277.
- [22] SHIBA Y, FERNANDES S, ZHU W Z, et al. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts [J]. *Nature*, 2012, 489(7415): 322-325.
- [23] GORABI A M, HAJIGHASEMI S, TAFTI H A, et al. TBX18 transcription factor overexpression in human-induced pluripotent stem cells increases their differentiation into pacemaker-like cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1534-1546.
- [24] COLATSKY T, FERMINI B, GINTANT G, et al. The comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay (CiPA) initiative: update on progress [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2016, 81: 15-20.
- [25] DA R A, CAMPBELL K, MIRONOV S, et al. hiPSC-CM monolayer maturation state determines drug responsiveness in high throughput pro-arrhythmia screen [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13834.
- (此文编辑 曾学清)