

诱导多能干细胞来源的心肌细胞对心肌梗死大鼠的心脏修复作用^{*}

张丽莎¹ 熊挺淋¹ 应梦慧² 杨燕³ 张晓刚⁴

(1. 南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院, 四川 南充 637000; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院, 四川 成都 610000;
3. 四川驰鼎盛通生物科技有限公司, 四川 成都 610041; 4. 重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨诱导多能干细胞来源的心肌细胞用于心肌梗死大鼠模型心肌修复的有效性, 并阐明其改善心脏功能的机制。**方法** 体外培养诱导多能干细胞并诱导分化为心肌细胞; 心肌梗死模型 SD 大鼠随机分为心肌梗死组和细胞移植两组, 正常 SD 大鼠为对照组, 每组 10 只。建模成功后, 心肌梗死组和细胞移植组分别在心肌梗死边界附近的 3 个点注射 30 μ L 的生理盐水和分化心肌细胞, 对照组行开胸手术, 不结扎冠状动脉; 在第 7、14 和 28 天时通过心脏彩超和有创血流动力学测量心功能; 第 28 天时 RT-PCR 检测组织衰老指标, Masson 染色法评估梗死面积的大小和免疫组化检测梗死边缘区毛细血管密度。**结果** 28 天时, 与心肌梗死组相比, 细胞移植组左室射血分数(LVEF)、左室舒张末期径(LVEDD)、左室收缩末期径(LVESD)、左室舒张末期压力(LVEDP)及最大负压左室内压力变化速率($\pm$ dp/dt)明显改善(均 $P < 0.05$); 细胞移植组的梗死面积明显小于心肌梗死组, 而毛细血管生成明显多于心肌梗死组($P < 0.05$); 心肌梗死组的基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、内皮细胞型纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)和白细胞介素-6(IL-6)的 mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$)。**结论** 移植诱导多能干细胞分化的心肌细胞可通过旁分泌作用改善心肌梗死大鼠模型的心脏功能。

【关键词】 诱导多能干细胞; 心肌细胞; 心肌梗死; 心脏功能; 细胞移植

【中图分类号】 R329.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 04. 006

Cardiac repair effect of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells in rats with myocardial infarction

ZHANG Lisha¹, XIONG Tinglin¹, YING Menghui², YANG Yan³, ZHANG Xiaogang⁴

(1. Nanchong Central Hospital, The Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China;
2. Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610000, China;
3. Sichuan Chiding Shengtong Biotechnology Co., Ltd, Chengdu 610041, China;
4. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To explore the effectiveness of induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for myocardial repair in rat models of myocardial infarction, and clarify the mechanism for improving cardiac function. **Methods** Induced pluripotent stem cells were cultured in vitro and differentiated into cardiomyocytes. SD rats with myocardial infarction model were randomly divided into myocardial infarction group and cell transplantation group, and normal SD rats were used as control group, with 10 rats in each group. After modeling, the myocardial infarction group and the cell transplantation group were injected 30 μ L normal saline and differentiated myocardial cells at 3 sites near the boundary of myocardial infarction, respectively. The control group underwent thoracotomy without coronary artery ligation. Cardiac function was measured by color echocardiography and invasive hemodynamics at days 7, 14, and 28. On day 28, the tissue senescence index was detected by RT-PCR, the infarct area was evaluated by Masson staining and

基金项目:四川省科学技术厅重点研发项目(2019YFS0314)

通信作者:熊挺淋,副教授,E-mail:xionginglin@163.com

引用本文:张丽莎,熊挺淋,应梦慧,等.诱导多能干细胞来源的心肌细胞对心肌梗死大鼠的心脏修复作用[J].西部医学,2022,34(4):498-503.

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 04. 006

the capillary density was detected by immunohistochemistry. **Results** At 28 days, compared with myocardial infarction group, left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), Left ventricular end systolic diameter (LVESD), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) and maximum, both the positive and negative left chamber pressure change rate ($\pm dP/dt$) were significantly improved ($P < 0.05$). The infarct area of the cell transplantation group was significantly smaller than that of the myocardial infarction group, and capillary angiogenesis was significantly higher than that of the myocardial infarction group ($P < 0.05$). The mRNA expression of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), endothelial cell-type plasminogen activator inhibitor (PAI-1) and interleukin-6 (IL-6) in the myocardial infarction group was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Transplantation of cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells can improve the cardiac function of rat models of myocardial infarction through paracrine action.

【Key words】 Induced pluripotent stem cells; Cardiomyocytes; Myocardial infarction; Cardiac function; Cell transplantation

心肌梗死是一种全球性的高发病率和死亡率的疾病^[1], 心肌梗死期间心肌细胞的永久丢失有助于进行性病理性的左心室重构, 最终导致心力衰竭。利用胚胎干细胞或诱导多能干细胞及其心脏衍生物的细胞疗法已被提出作为改善心肌梗死后心功能的有效治疗方法。胚胎干细胞和诱导多能干细胞是一种多潜能性干细胞, 能够产生足够数量的功能心肌细胞, 以实现“真正的”心脏再生。与胚胎干细胞不同, 诱导多能干细胞是由个体自身的体细胞产生的, 因此, 诱导多能干细胞分离具有较少的伦理问题, 移植后不存在免疫抑制, 且诱导多能干细胞还可以克服胚胎干细胞在心脏再生方面的一些局限性。诱导多能干细胞在体内和体外都可以分化为有功能的心肌细胞^[2-3]。一些研究^[4-6]报道了使用这些诱导多能干细胞来源的心肌细胞在动物心肌梗死模型中移植后心脏再生的功能益处, 移植后分化心肌细胞能够与宿主心肌整合, 改善左室功能。然而, 诱导多能干细胞分化研究仍处于初级阶段, 这些细胞改善心脏功能的机制尚不清楚。本文研究诱导多能干细胞分化的心肌细胞对大鼠心肌梗死模型心肌修复的效果, 希望阐明其改善心功能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞 SPF 级 SD 大鼠(不分雌雄)由重庆医科大学实验动物中心提供。绿色荧光蛋白(GFP)转染的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。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 实验试剂与仪器 DMEM 高糖培养基购自 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、胰蛋白酶和水合氯醛均购自 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 cTnT 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(LIF)购自上海欣百诺公司, 免疫组化试剂盒购自中杉金桥公司, Gold view 和 Triton X-100 购自 Genview 公司, 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, 超声心动图由飞利浦公司提供(CX50), 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 诱导多能干细胞培养 诱导多能干细胞复苏后接种在提前经丝裂霉素 C 处理过的小鼠胚胎成纤维细胞上^[7], 培养基为 DMEM 高糖, 包含 10% FBS、1000 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 d 换培养基一次; 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, 30 min 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, 传代后的部分细胞保存于液氮中备用。细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养。

1.4 诱导多能干细胞分化为心肌细胞 取对数生长长期的诱导多能干细胞, 0.05% 胰酶消化并分别制成单细胞悬液, 心肌细胞的分化方法参照文献^[1]进行, 将搏动的拟胚体制成单细胞悬液, 使用差异贴壁法分离心肌细胞, 分化心肌细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养。

1.5 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(LAD) 10 min, BL-420 多导电生理仪及生物机能实验系统记

录心电图。建模成功的心肌梗死 SD 大鼠随机分为心肌梗死组和细胞移植两组,对照组行开胸手术,不结扎冠状动脉,每组 10 只。心肌梗死组和细胞移植组分别在心肌梗死边界附近的 3 个点注射 30 μ L 的生理盐水和分化心肌细胞。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,扯去简易呼吸机,术后给予实验大鼠肌肉注射青霉素以预防感染。

1.6 超声心电图评价心功能 在实验前及细胞移植后第 7、14 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 LVEDD、LVESD、LVPW 和 IVS,并用 Simpson 法计算 LVEF。所有心脏超声检查由同一检查者完成。

1.7 心脏有创血流动力学评估 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 1.4F 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 $\pm dP/dt$ 、LVEDP。

1.8 RT-PCR 检测各组 MMP-3、PAI-1 和 IL-6 mRNA 的表达水平 4 周后取出大鼠心脏,使用 Trizol 提取组织的总 RNA,RNAiso Plus 逆转录试剂盒以及 S1000TM 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:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 30 次。内参(β -actin)及目的基因的引物序列和退火温度见表 1。PCR 产物用 2% 琼脂糖做凝胶电泳分离条带,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。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequence

目的基因	基因序列(5'-3')	Tm($^{\circ}$ C)	引物大小(bp)
PAI-1	(F)gacacctcagcatgttcac	60	310
	(R)agggttgactaaacatgtcag		
MMP-3	(F)tttaaggaatcagttctggctata	60	418
	(R)cgatcttcttcacgggttga		
IL-6	(F)acacatgttctctgggaatcgt	57	402
	(R)aagtgcacatcggtgttcataca		
β -actin	(F)gagaccttcaacacccacgc	58	263
	(R)atgtcacgcacgatttccc		

1.9 梗死面积的检测 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红色,坏死心肌组织显示为蓝色。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 磷钨酸作用 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,最后显微镜下观察和图像采集。

1.10 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, 0.01 M 枸橼酸缓冲液中 95 $^{\circ}$ C 煮沸 15 min, 冷却后 PBS 冲洗,血清液封闭 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),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),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,最后显微镜下观察和图像采集。

1.11 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% 的牛血清白蛋白封闭 30 min 后,甩掉封闭液,用 PBS 稀释的单克隆一抗(1:100), 37 $^{\circ}$ 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), 37 $^{\circ}$ C 条件下作用 2 h, PBS 洗 3 次,最后用 DAPI 染细胞核,抗淬灭剂封片以及用荧光显微镜照相。

1.12 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($\bar{x} \pm s$)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。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分化心肌细胞特征及鉴定 体外自然分化情况下,诱导多能干细胞形成搏动的拟胚体,搏动的频率 20~40 次/min,分离培养分化心肌细胞,呈现出多边形、不规则形等普通心肌细胞形态,见图 1A。细胞免疫荧光鉴定提示分化心肌细胞中心肌特异性 cTnT 表达阳性(红色),细胞核用 DAPI 染色(蓝色),见图 1B。

2.2 心肌梗死建模成功判定 前降支结扎后,心肌梗死模型成功的标志为结扎处远端心肌组织变苍白,体表心电图提示 ST 段抬高大于 0.05 mV,见图 2。

心肌梗死组和细胞移植组大鼠死亡率比较差异无统计学意义($P>0.05$),最终每组 10 只大鼠完成实验。

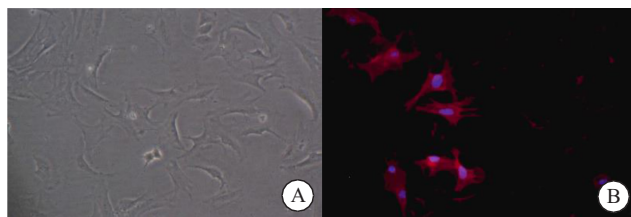


图 1 分化心肌细胞鉴定(200×)

Figure 1 Identification of differentiated cardiomyocytes

注: A. 分化心肌细胞形态; B. 分化心肌细胞中 cTnT 表达阳性(红色)

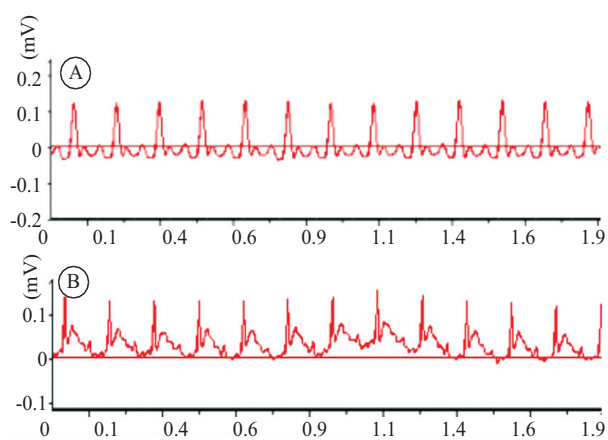


图 2 心肌梗死模型心电图

Figure 2 ECG of myocardial infarction model

注: A. 正常心电图; B. 心肌梗死心电图

2.3 3 组细胞移植后心功能比较 在细胞移植后第 7、14 和 28 天时通过心脏彩超和有创血流动力检查测量各组的心脏功能。第 28 天时,细胞移植组的 LVEF 较心肌梗死组明显升高, LVESD 和 LVEDD 显著小于心肌梗死组, LVEDP 明显低于心肌梗死组, $\pm dP/dt$ 较心肌梗死组明显改善, 差异均有统计学意

义(均 $P<0.05$)。在第 7 和 14 天时, 细胞移植组和心肌梗死组之间的 LVEF、LVESD、LVEDD、LVEDP 和 $\pm dP/dt$ 差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。3 组 LVPW 和 IVS 比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3 和表 2。

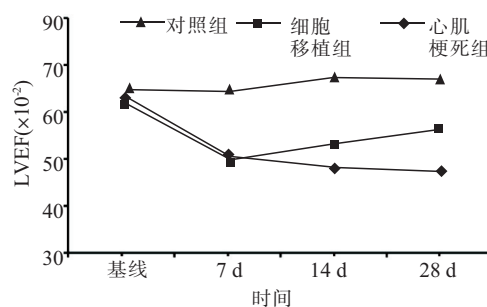


图 3 LVEF 比较

Figure 3 Comparison of LVEF

表 2 28 天时各组心功能比较($\bar{x} \pm s$)

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

心功能指标	细胞移植组	心肌梗死组	对照组
LVEDD(mm)	7.43 ± 0.64^{①}	8.61 ± 0.37	6.85 ± 0.51
LVESD(mm)	5.32 ± 0.84^{①}	6.85 ± 0.60	4.33 ± 0.44
LVPW(mm)	1.28 ± 0.14^{②}	1.12 ± 0.18	1.54 ± 0.20
IVS(mm)	1.22 ± 0.25^{②}	1.13 ± 0.22	1.49 ± 0.28
$\pm dP/dt$ (mmHg/s)	$\pm 54552 \pm 852^{①}$	$\pm 38689 \pm 727$	$\pm 62218 \pm 882$
LVEDP(mmHg)	8.68 ± 1.02^{①}	12.26 ± 2.39	7.57 ± 1.35

注: 与心肌梗死组比较, ① $P<0.05$, ② $P>0.05$

2.4 3 组 MMP-3、PAI-1 和 IL-6 mRNA 水平比较

RT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 心肌梗死组大鼠的 MMP-3、PAI-1 和 IL-6 mRNA 的转录水平显著升高($P<0.05$), 而细胞移植组大鼠的以上衰老基因的 mRNA 转录水平无明显改变($P>0.05$)。见图 4。

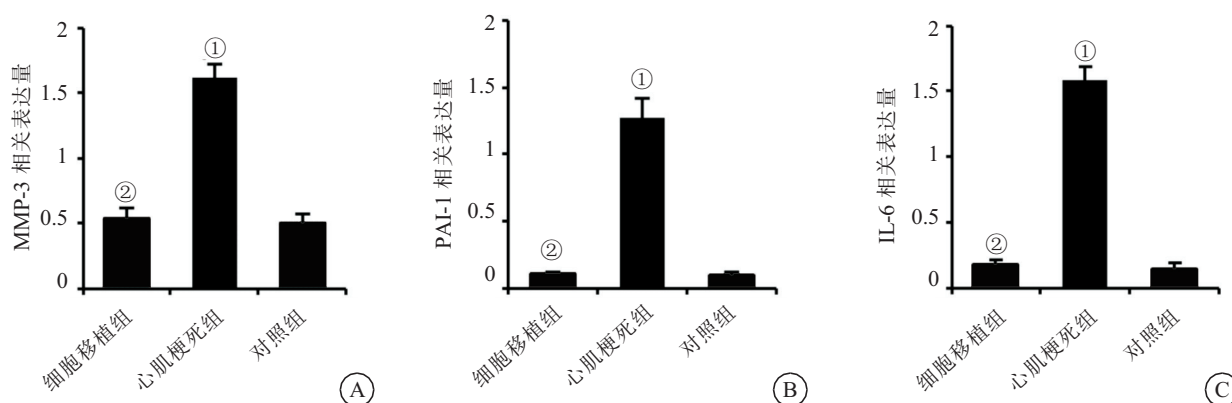


图 4 RT-PCR 评估衰老指标

Figure 4 Assessment of aging indicators by RT-PCR

注: 与对照组比较, ① $P<0.05$, ② $P>0.05$

2.5 3 组梗死面积的染色结果比较 第 28 天时,细胞移植组的梗死面积(2.29 ± 0.38) mm^2 明显小于心肌梗死组(1.36 ± 0.21) mm^2 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。



图 5 梗死面积比较(400×)

Figure 5 Comparison of infarct size

注: A. 对照组; B. 细胞移植组; C. 心肌梗死组

2.6 3 组梗死边缘区毛细血管密度结果 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。细胞移植组梗死边缘区的毛细血管密度(142.70 ± 21.24)/ mm^2 明显高于心肌梗死组(66.52 ± 11.85)/ mm^2 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6。

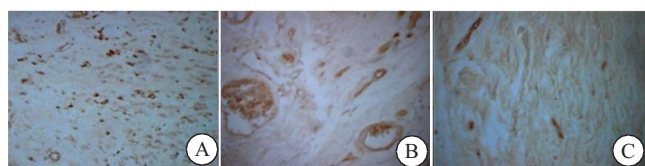


图 6 免疫组化检测毛细血管密度(400×)

Figure 6 Detection of capillary density by Immunohistochemical

注: A. 对照组; B. 细胞移植组; C. 心肌梗死组

3 讨论

目前主要有两种类型的干细胞具有心脏再生的潜力,一种是成体干细胞,另一种是胚胎干细胞和诱导多能干细胞的多潜能干细胞,但是这两种干细胞移植到宿主心脏后都存在畸胎瘤形成和异位分化的风险^[8-10]。为了解决这个问题,分化细胞,如干细胞分化来源的心肌细胞,是干细胞移植治疗的首选。最近的基础研究和临床研究^[11-14]表明,人类胚胎干细胞和诱导多能干细胞衍生的心肌细胞对左室重构具有重大治疗意义。此外,诱导多能干细胞分化的心肌细胞是由自体体细胞逆分化为干细胞,而后再产生的自体细胞,因此与胚胎干细胞等相比,在移植治疗上解决了伦理和免疫排斥问题。然而到目前为止,诱导多能干细胞分化的心肌细胞改善心脏功能的机制尚不清楚。在本研究中,我们发现分化心肌细胞移植后通过减小衰老指标的表达以及增加心肌梗死区域毛细血管密度等可以改善心肌梗死后大鼠心功能。这种作用与血管生成有关,并抑制了局部缺血心肌组织中天然心

肌细胞的凋亡,表明心功能改善的机制是由旁分泌作用介导的,对基于诱导多能干细胞的分化心肌细胞移植疗法具有重要的临床意义^[15-16]。

本研究将分化心肌细胞在心肌梗死后直接注入心肌组织中,细胞移植 4 周后,细胞移植组代表左室心功能的 LVEF、LVESD、LVEDD、LVEDP 和 $\pm \text{dP/dt}$ 指标较心肌梗死组均得到明显改善,梗死面积明显缩小,与之前的报道结果^[17-18]相似。分化心肌细胞体外搏动频率仅为 20~40 次/min,因此移植细胞不太可能直接促进心脏功能的改善。细胞移植 4 周后,梗死心脏组织周围的毛细血管密度明显增加,可间接证明移植细胞通过旁分泌作用促进血管生成并维持周围天然心肌细胞的存活率,最终促进心功能的改善。此外,在整个实验期间我们无在心脏任何区域观察到畸胎瘤。

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,最初的希望是这些移植细胞可以直接促进心脏功能的恢复。最近的研究^[15,19]表明,改善心脏功能的作用大多是通过间接作用,包括旁分泌、调节细胞外基质和细胞凋亡,这与本研究的结果非常相似。分化细胞移植后的低存活率也是需要进一步解决的问题^[20]。最近一项利用人诱导多能干细胞的分化心肌细胞在猪急性心肌梗死模型的移植治疗研究^[21]中表明,在细胞移植后 8 周,荧光原位杂交仅检测到少量分化心肌细胞,提示移植细胞的长期生存率较低。这种分化心肌细胞的低存活率可能是移植后同种异体免疫排斥的结果。作为直接细胞替代的替代方法,来源于诱导多能干细胞的分化心肌细胞释放的外泌体代表了一种新型的基于诱导多能干细胞的**心肌再生治疗^[22]。在直接移植分化心肌细胞缺乏足够细胞存活情况下,间充质干细胞衍生的外泌体在移植后可以促进更长的移植体生存期并增强移植细胞的治疗效果^[23]。因此诱导多能干细胞的分化心肌细胞分泌的外泌体在心脏再生中的有益作用是未来值得深入研究的方向。

尽管诱导多能干细胞在再生医学和细胞治疗领域有着巨大的潜力,但在其临床应用之前仍有几个主要问题需要解决。首先,使用病毒载体产生的诱导多能干细胞可能导致基因突变或者恶性转化。目前已有研究表明不需要任何基因修饰就能重编程诱导多能干细胞的方法,并获得高纯度的分化心肌细胞,这些方法包括小分子或者无病毒方法。其次,安全性评估,包括移植后心律失常和肿瘤等的发生情况是细胞治疗的重要研究方向。目前的研究主要集中在心脏分化上,而对分化心肌细胞与宿主心肌细胞表型是否一致,以及分化心肌细胞成熟度方面研究甚少。分化心肌细胞的不成熟电表现可能导致心律失常,在以

往的胚胎干细胞分化心肌细胞中已报道有心律失常的情况出现^[11,24]。与成熟的心肌细胞相比,诱导多能干细胞分化的心肌细胞也表现出不成熟的电生理特点^[25-26],然而在受损的心脏组织中移植入诱导多能干细胞分化的心肌细胞后发生心律失常的风险尚未见报道。因此未来的研究需要在体外鉴定分化心肌细胞的成熟度。

4 结论与启示

本研究结果表明,在大鼠心肌梗死模型中,诱导多能干细胞分化的心肌细胞移植治疗可以通过旁分泌作用减小梗死面积及增加梗死区域毛细血管的密度,从而改善心功能。但如何提高分化心肌细胞成熟度、如何提高移植效率、移植细胞长期存活率和移植后对宿主心脏电活动的影响需以后进一步研究。

【参考文献】

- [1] 国家心血管病医疗质量管理与控制中心冠心病专家工作组. 成人急性 ST 段抬高型心肌梗死医疗质量评价指标体系的中国专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(11): 849-856.
- [2] 毛庆, 庞毅恒, 卢永祥, 等. miR-148a 促进人诱导性多能干细胞向心肌样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(19): 2978-2984.
- [3] 闫颖, 刘锋, 侯晓杰, 等. 联合调控 Wnt 和 BMP 信号通路促进人源性诱导多能干细胞分化为心肌细胞的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2020, 34(10): 1313-1321.
- [4] 郑泽群, 廉姜芳. 人诱导多能干细胞分化的心肌细胞在心律失常建模中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(8): 1457-1464.
- [5] YE L, CHANG Y H, XIONG Q, *et al.* Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cell populations[J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(6): 750-761.
- [6] 谭瑶, 颜冰倩, 艾雪峰, 等. 有序 PLCL 电纺膜复合人诱导多能干细胞来源心肌细胞构建心肌补片的初步研究[J]. 组织工程与重建外科, 2020, 16(6): 442-450.
- [7] 魏含清, 裴轶劲, 王丹丹, 等. 持续低氧对小鼠胚胎成纤维细胞增殖及饲养层制备的影响[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(9): 1450-1456.
- [8] AHMED R P H, ASHRAF M, BUCCINI S, *et al.* Cardiac tumorigenic potential of induced pluripotent stem cells in an immunocompetent host with myocardial infarction[J]. Regen Med, 2011, 6(2): 171-178.
- [9] 鲁娣, 张巍, 李会娟, 等. 人畸胎瘤细胞株 PA-1 胚胎干细胞生物学特性的鉴定[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(24): 2836-2839.
- [10] LEWANDOWSKI J, ROZWADOWSKA N, KOLANOWSKI T J, *et al.* The impact of in vitro cell culture duration on the maturation of human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells of myogenic origin[J]. Cell Transplant, 2018, 27(7): 1047-1067.
- [11] CHONG J J, YANG X L, DON C W, *et al.* Human embryonic stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts[J]. Nature, 2014, 510(7504): 273-277.
- [12] SHIBA Y, GOMIBUCHI T, SETO T, *et al.* Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts[J]. Nature, 2016, 538(7625): 388-391.
- [13] LIU Y W, CHEN B, YANG X, *et al.* Human ESC-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates[J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(7): 597-605.
- [14] MENASCHE P, VANNEAUX V, FABREGUETTES J R, *et al.* Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience[J]. Eur Heart J, 2015, 36(12): 743-750.
- [15] PASHA Z, HAIDER H K, ASHRAF M. Efficient non-viral reprogramming of myoblasts to stemness with a single small molecule to generate cardiac progenitor cells[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23667.
- [16] KAJI K, NORRBY K, PACA A, *et al.* Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors[J]. Nature, 2009, 458(7239): 771-775.
- [17] JIANG X, YANG ZY, DONG M. Cardiac repair in a murine model of myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 297.
- [18] SUI Y, ZHANG W, TANG T, *et al.* Insulin-like growth factor-II overexpression accelerates parthenogenetic stem cell differentiation into cardiomyocytes and improves cardiac function after acute myocardial infarction in mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 86.
- [19] BI W, WANG J X, 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): 756-772.
- [20] MARTENS A, ROJAS S V, BARAKI H, *et al.* Substantial early loss of induced pluripotent stem cells following transplantation in myocardial infarction[J]. Artif Organs, 2014, 38(11): 978-984.
- [21] KAWAMURA M, MIYAGAWA S, FUKUSHIMA S, *et al.* Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart[J]. Circulation, 2013, 128: S87-S94.
- [22] ONG S G, LEE W H, YANG Z, *et al.* Mining exosomal microRNAs from human-induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes for cardiac regeneration[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1733: 127-136.
- [23] YOSHIDA S, MIYAGAWA S, FUKUSHIMA S, *et al.* Maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by soluble factors from human mesenchymal stem cells[J]. Mol Ther, 2018, 26(11): 2681-2695.
- [24] LIAO S Y, LIU Y, SIU C W, *et al.* Proarrhythmic risk of embryonic stem cell-derived cardiomyocyte transplantation in infarcted myocardium[J]. Hear Rhythm, 2010, 7(12): 1852-1859.
- [25] RONALDSON-BOUCHARD K, MA S P, YEAGER K, *et al.* Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells[J]. Nature, 2018, 556(7700): 239-243.
- [26] 杨礼, 宫艺其, 吴蕾, 等. 艾司洛尔对人诱导多能干细胞来源心肌细胞自发动作电位的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(10): 1208-1212.

(收稿日期: 2021-04-09; 修回日期: 2021-08-11; 编辑: 黎仕娟)