Open Access
DOI:10.3724/zdxbyxb-2023-0402

·综　述·

基于诱导多能干细胞治疗急性心肌梗死的临床前研究进展

蔡松晏，戴青原

昆明医科大学第一附属医院心内科，云南 昆明 650032

［**摘　要**］ 诱导多能干细胞（iPSC）是通过导入外源基因或在培养基中加入化学物质等方法使体细胞去分化而获得。与胚胎干细胞类似，iPSC可以分化形成三种胚层细胞系。iPSC能通过二维分化方法（如单层细胞培养和共培养），或拟胚体诱导法和基于支架的三维细胞培养方法分化为心肌细胞。iPSC分化成心肌细胞的过程还需通过激活或抑制特定的信号通路（如Wnt、BMP、Notch信号通路）来模拟体内心脏发育过程。近年来，通过生物反应器进行细胞悬浮培养，已能产生足够数量的iPSC衍生的心肌细胞（iPSC-CM）。iPSC-CM在移植前需要通过代谢调节和细胞分选等方法进行纯化，以消除可能导致畸胎瘤形成的未分化iPSC。目前，iPSC-CM的主要移植方法为细胞悬液注射和细胞片移植。动物实验研究表明，将iPSC-CM移植到梗死心肌中能改善心脏功能。本文综述了上述关于iPSC-CM治疗急性心肌梗死的临床前相关研究，并讨论了iPSC-CM在临床应用中的局限性和挑战，以期为iPSC-CM的临床转化研究提供参考。

［**关键词**］ 诱导多能干细胞；心肌细胞；急性心肌梗死；再生医学；综述
［**中图分类号**］ R542.2　　［**文献标志码**］ A

Progress in preclinical research on induced pluripotent stem cell therapy for acute myocardial infarction

CAI Songyan, DAI Qingyuan (*Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China*)
Corresponding author: DAI Qingyuan, E-mail: dqy0823@163.com, https://orcid.org/0000-0002-4650-0663

［**Abstract**］ Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are obtained by introducing exogenous genes or adding chemicals to the culture medium to induce somatic cell

收稿日期（Received）：2023-08-29　　**接受日期（Accepted）：**2024-03-09　　**网络预发表日期（Online）：**2024-04-10
基金项目（Funding）：国家自然科学基金（82060072）
第一作者（First author）：蔡松晏，硕士研究生，主要从事冠心病临床及基础研究；E-mail：752485595@qq.com；https://orcid.org/0009-0000-1158-1195
通信作者（Corresponding author）：戴青原，主任医师，教授，博士生导师，主要从事冠心病临床及基础研究；E-mail：dqy0823@163.com；https://orcid.org/0000-0002-4650-0663

differentiation. Similarly to embryonic stem cells, iPSCs have the ability to differentiate into all three embryonic cell lines. iPSCs can differentiate into cardiac muscle cells through two-dimensional differentiation methods such as monolayer cell culture and co-culture, or through embryoid body and scaffold-based three-dimensional differentiation methods. In addition, the process of iPSCs differentiation into cardiac muscle cells also requires activation or inhibition of specific signaling pathways,such as Wnt, BMP, Notch signaling pathways to mimic the development of the heart *in vivo*. In recent years, suspension culturing in bioreactors has been shown to produce large number of iPSCs derived cardiac muscle cells (iPSC-CMs). Before transplantation, it is necessary to purify iPSC-CMs through metabolic regulation or cell sorting to eliminate undifferentiated iPSCs, which may lead to teratoma formation. The transplantation methods for iPSC-CMs are mainly injection of cell suspension and transplantation of cell patches into the infarcted myocardium. Animal studies have shown that transplantation of iPSC-CMs into the infarcted myocardium can improve cardiac function. This article reviews the progress in preclinical studies on iPSC-CMs therapy for acute myocardial infarction and discusses the limitations and challenges of its clinical application to provide references for further clinical research and application.

[**Key words**] Induced pluripotent stem cells; Cardiac muscle cells; Acute myocardial infarction; Regenerative medicine; Review

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2024, 53(2): 244-253.]

[**缩略语**] 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC);八聚体结合转录因子(octamer binding transcription factor,Oct);性别决定区Y框蛋白(sex determining region Y box,Sox);Kruppel样转录因子(Kruppel-like factor,Klf);人iPSC(human iPSC,hiPSC);iPSC衍生的心肌细胞(iPSC derived cardiac muscle cell,iPSC-CM);骨形态生成蛋白(bone morphogenetic protein,BMP);生长分化因子(growth differentiation factor,GDF);Wnt生成抑制剂(inhibitor of Wnt production,IWP);Wnt反应抑制剂(inhibitor of Wnt response,IWR);Notch细胞内结构域(Notch intracellular domain,NICD);免疫球蛋白κJ区重组信号结合蛋白(recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region,RBPJ);核小体组装蛋白1样蛋白(nucleosome assembly protein 1-like protein,NAP1L);hiPSC衍生的心肌细胞(hiPSC derived cardiac muscle cell,hiPSC-CM);腺苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP);荧光激活细胞分选法(fluorescence-activated cell sorting,FACS);阶段特异性胚胎抗原(stage-specific embryonic antigen,SSEA);磁激活细胞分选法(magnetically-activated cell sorting,MACS);信号调节蛋白(signal regulatory protein,SIRP);微RNA(microRNA,miRNA,miR);分化抗原(cluster of differentiation,CD);肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)

《中国心血管健康与疾病报告2022》显示,截至2022年我国心血管疾病患病人数约3.3亿,位居所有疾病之首,其中冠心病患病人数达1139万[1]。冠状动脉的急性、持续性缺血缺氧可使该区域心肌细胞血流受限和广泛死亡,从而引起急性心肌梗死。由于人心肌细胞的再生能力有限,梗死的心肌组织最终被纤维化的瘢痕组织所取代,发生病理性重塑,导致心脏收缩能力较差,从

而发展为心力衰竭。目前,传统的治疗方法包括溶栓、经皮冠脉介入、冠脉旁路移植术和抗血栓治疗等,但这些方法通常只能控制症状,延缓心脏病理性重塑的进程,而不能挽救心肌的不可逆损伤,长期预后效果不佳。对于终末期缺血性心肌病,心脏移植是唯一治疗方法,但供体资源稀缺,难以满足临床需求。此外,心脏移植术后并发症严重影响患者的生活质量。近年来,iPSC领域的深入研究为急性心肌梗死的治疗提供了新的思路,成为心血管医学中的一个变革性发展。

多年来,iPSC的重编程方法总体上取得了很大的进展。2006年,Takahashi等[2]首次将Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc(OSKM)四种重编程因子导入小鼠成纤维细胞,成功诱导出iPSC。2007年,研究者分别将OSKM因子以及Oct4、Sox2、Nanog、Lin28等四种重编程因子导入人成纤维细胞,成功分离出hiPSC[3-4]。最初研究中使用逆转录病毒或慢病毒作为载体获得iPSC[2,5],但外源性基因可能会随机整合到宿主基因组DNA中,存在基因突变的风险。为了避免这类风险,一些研究者利用不能与宿主基因组整合的载体将重编程因子导入体细胞,如腺病毒[6]、质粒[7]、piggyBac转座子[8]以及仙台病毒等[9-10]。小分子物质具有很多优势,能自由通过细胞膜,容易合成和储存,更具成本效益;此外,其对特定蛋白的抑制和激活作用可逆,使用剂量和持续时间易控制,因此近年来研究者用小分子来替代重编程因子[11]。

iPSC在形态、基因和蛋白表达、表观遗传学修饰、细胞增殖能力、拟胚体和畸胎瘤形成能力和分化能力等方面与胚胎干细胞均极为相似[12]。与胚胎干细胞比较,iPSC还具有一些明显优势:可来自患者自身的体细胞,避免免疫排斥反应,不会带来伦理学问题。iPSC-CM具有促进心脏组织的再生和修复、逆转心脏重塑以及恢复心脏功能的潜力。2006年首次成功诱导出iPSC,至今不过十几年,研究者在这一领域进行了大量探索,并取得了突破性的进展,为iPSC-CM正式应用于临床提供了强有力的依据。然而,这项技术在心脏再生医学领域仍然面临许多风险和挑战。本文综述了iPSC-CM的生成、大规模培养、纯化、移植及其在急性心肌梗死动物模型中的应用等研究进展,以期为促进iPSC-CM在急性心肌梗死中的临床转化研究提供参考。

1 诱导多能干细胞衍生的心肌细胞的生成

iPSC分化为心肌细胞有二维和三维两种方案。二维方案中已经开发了单层细胞培养法和共培养法这两种主要方法。三维方案主要包括拟胚体诱导法和基于支架的三维细胞培养方法。

单层细胞培养法是一种将相对均一的单层iPSC在添加特定心源性生长因子的条件下进行分化培养的方法。该方法操作简便、可控性强、可重复性好、成本效益高、生长因子易于扩散、细胞诱导效率相对较高、心肌细胞纯度高[13-14]。Hudson等[15]通过添加可诱导心脏发育的生长因子,使iPSC向心肌细胞直接分化,结果显示该方法的诱导效率高于拟胚体诱导法。共培养法只需少量细胞,简单快速,且能获得足够数量和质量的心肌细胞,并可促进iPSC-CM结构和功能的成熟[16]。内脏内胚层是在胚胎发育早期阶段形成的胚外细胞层,分泌胚胎发育的关键因子,iPSC与内脏内胚层样细胞共培养,可以使iPSC分化形成心肌细胞[17]。Yoshida等[16]将iPSC-CM与间充质干细胞共培养,iPSC-CM显示出排列整齐的肌纤维,生成了A-带、H-带和I-带,能快速收缩和舒张,还可增强细胞间相互作用;此外,间充质干细胞分泌的可溶性因子和外泌体可上调心肌细胞特异性标志物。

相比上述二维方案,三维方案保留了组织微环境,为研究细胞功能提供了更真实的体内环境。拟胚体诱导法可通过悬浮培养、悬滴法、生物反应器培养和旋转瓶等方法形成拟胚体,后者能模拟体内胚胎发育过程,可以分化为内胚层、中胚层和外胚层的所有细胞群。通过拟胚体诱导生成的心肌细胞具有较高的可比性和可重复性,但由于拟胚体复杂的弥漫屏障,细胞外因子的渗透受到限制[18]。另一种常见的三维分化方法是使用支架,支架不仅可以发挥结构支撑作用,还参与调节心脏细胞的黏附、迁移、生长、分化等行为[13]。支架的分子组成是三维系统的关键特征。研究人员将心脏脱细胞化作为心肌组织工程的理想支架,细胞将生长在与天然心肌相同的微环境中。Lu等[19]用hiPSC衍生的多潜能心血管祖细胞重新填充脱细胞小鼠心脏,多潜能心血管祖细胞在原位迁移、增殖和分化成心肌细胞、平滑肌细胞和内皮细胞,从而重建脱细胞心

脏。Edri等[20]从患者身上提取脂肪组织,然后分离细胞和细胞外基质,细胞被重编程为iPSC,细胞外基质则被加工成个性化水凝胶,iPSC均匀包裹在水凝胶中,成功分化出心肌细胞。此外,天然材料(如明胶、胶原蛋白、纤维蛋白、藻酸盐)[21-22]或合成材料(如聚己内酯、聚*L*-乳酸)[23-24]是三维支架构建中常用的生物材料,可以将天然材料和合成材料组成共聚物来改善支架性能。近年来,三维生物打印技术在心脏组织再生领域占据了关键地位,Noor等[25]成功打印出与患者的免疫学、细胞学、生物化学和解剖学特性相匹配的功能性血管化的可灌注心脏贴片。

体外iPSC分化成心肌细胞的过程还需通过激活或抑制特定的信号通路来模拟体内心脏发育,其中BMP、Wnt、Notch等信号通路发挥着重要作用[26-29]。控制这一过程的关键是生长因子使用的种类和时机。

BMP为转化生长因子β超家族的分泌性蛋白,进化上高度保守,在心血管发育和分化的各个阶段都起着重要作用。BMP亚家族可以细分为几个亚组,包括BMP-2/4、BMP-5/6/7/8、GDF-5/6/7和BMP-9/10[30-31]。iPSC分化为心肌细胞需经历四个阶段:多能干细胞、中胚层细胞、心脏前体细胞、自发搏动的功能性心肌细胞。研究表明,在多能干细胞阶段,BMP能刺激转录因子Oct4、Sox2、Nanog的表达,对干细胞的自我更新具有重要作用[32]。在拟胚体形成前加入BMP的天然抑制剂Noggin,可促进心肌分化,同时提高了心肌的分化效率[33]。BMP-4与成纤维细胞生长因子2协同可以诱导中胚层形成并抑制内胚层分化[34]。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Nkx2.5和GATA-4的表达,对心肌样细胞的分化和成熟起到关键的调控作用[35]。此外,研究表明,在iPSC分化培养过程中,BMP-4和Activin/Nodal信号通路的微小变化都会显著改变生心中胚层的比例[26]。

Wnt蛋白家族的功能较为复杂,根据其功能分为两大类,一类是通过经典Wnt信号转导通路发挥作用的蛋白,包括Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a、Wnt8、Wnt8b和Wnt10a;另一类是通过非经典Wnt信号转导通路发挥作用的蛋白,包括Wnt4、Wnt5a、Wnt6和Wnt11等。Wnt蛋白家族在心肌分化过程中起着重要作用。研究表明,经典Wnt信号转导通路在胚胎发育过程中起抑制作用[36],而非经典Wnt信号转导通路通过对经典Wnt信号转导通路的抑制从而促进心脏发育[37]。Wnt信号通路的抑制剂Dickkopf相关蛋白1能通过抑制经典Wnt信号通路促进心肌细胞的分化[38]。Hudson等[15]利用BMP-4和活化素A诱导原始条纹细胞,再利用小分子IWP-4或IWR-1抑制Wnt信号转导,促进了心肌细胞的分化。但有研究者得出了不同的结果,经典Wnt信号转导通路在胚胎心肌发育过程中既有抑制作用也有促进作用,其作用效果依赖于分化的时期,在分化早期有促进作用,而在分化晚期有抑制作用[39]。糖原合成酶激酶3β是经典Wnt通路的信号转导因子,Wnt信号通路的激活下调了糖原合成酶激酶3β的活性,从而抑制β-连环蛋白磷酸化降解并转移到细胞核中激活Wnt下游靶基因转录[40]。研究发现,在hiPSC分化的初始阶段,添加糖原合成酶激酶3β抑制剂CHIR99021激活经典Wnt信号通路,随后加入IWP-2,在没有外源生长因子的情况下能促进心肌细胞的分化[41]。Wnt11能抑制经典Wnt信号通路,在原始中胚侧叶形成低Wnt活性的区域,使该区域形成心肌细胞[42]。

Notch信号通路广泛存在于脊椎动物和非脊椎动物,在进化上高度保守,通过相邻细胞之间的相互作用调节细胞、组织、器官的分化和发育。在体外心肌细胞分化过程中,Notch信号通路激活可以抑制早期心肌细胞的分化,也能通过激活BMP信号通路/抑制Wnt信号通路使造血-血管细胞系分化为心肌细胞[43]。该通路包括四种Notch受体(Notch1~4)和五种配体(Jagged1、Jagged2、Delta-like 1、Delta-like 3和Delta-like 4)。跨膜Notch受体在细胞表面被Jagged和Delta配体家族的成员激活。受体被激活后,经γ-分泌酶裂解,释放NICD,该结构域转位入核,与RBPJ和Mastermind样蛋白结合形成三元复合物,招募组蛋白乙酰转移酶并激活Notch靶基因的转录,从而抑制细胞分化[44]。iPSC中RBPJ表达缺失可促进心肌生成,而细胞重新表达RBPJ可恢复对心肌分化的抑制[45]。NAP1L1过表达可增加iPSC分化过程中γ-分泌酶的活性及NICD、下游基因的表达,抑制心肌细胞的分化;相反,γ-分泌酶抑制剂DAPT可显著抑制NICD的产生,并消除过表达NAP1L1对中胚层诱导和心肌分化的抑制作用[46]。该研究

表明,下调NAP1L1可通过抑制γ-分泌酶调节的Notch信号通路,显著促进iPSC的中胚层诱导和心肌分化。

此外,为了代替昂贵的心脏发育所需的相关蛋白,研究者筛选了几种小分子化合物(如Wnt抑制剂IWR-1、IWP-2、CHIR99021等),可促使iPSC向心肌细胞分化[47]。

2 诱导多能干细胞衍生的心肌细胞的大规模培养

人左心室约有40亿个心肌细胞,当发生心肌梗死时,约有10亿个心肌细胞死亡;临床前研究表明,急性心肌梗死后需要移植大量心肌细胞才能达到治疗效果[48]。目前,通过标准的贴壁细胞培养虽然可以产生高纯度的心肌细胞,但其扩展能力有限,很难生产出足够数量的hiPSC-CM用于细胞治疗。因此,在iPSC-CM应用于临床之前,必须找到可以获得大量临床级心肌细胞的方法。悬浮细胞培养因其扩展能力强而成为大规模生产细胞的一个有吸引力的平台。Kwok等[49]通过简单及可重复的方法在短时间内培养了大量hiPSC:①将16×10^6个hiPSC细胞悬液接种到125 mL的旋转瓶中,7 d后生成了直径为(324±71) μm的hiPSC聚集体;②将这些细胞解离成单细胞悬液,接种到3000 mL的生物反应器中,7 d后产生直径为(198±58) μm的hiPSC聚集体。该方法将16×10^6个hiPSC在14 d内扩增为2×10^9个hiPSC,每天可增加8.93倍,可满足临床上细胞治疗的要求。Kempf等[50]在100 mL生物反应器中悬浮培养iPSC,利用糖原合成酶激酶3β抑制剂CHIR99021调节心肌细胞分化,可产生纯度高达85%的约4000万个主要为心室样表型的心肌细胞。该研究成功将iPSC的扩增和心肌细胞的产生整合到悬浮培养的生物反应器中,为扩展心肌细胞提供了一个简化的、符合现行药品生产管理规范要求的方法。随着生物反应器培养技术的发展,大规模生产iPSC-CM将成为可能。

3 诱导多能干细胞衍生的心肌细胞的纯化

iPSC-CM是一个异质性的细胞群,其中包含了未分化的iPSC以及分化生成的非心肌细胞,这些细胞群移植到宿主体内可能诱发畸胎瘤的形成[51]。因此,在进行移植前,需要纯化iPSC-CM。目前,纯化心肌细胞主要包括代谢调节、细胞分选等方法。

代谢调节是一种经济、有效的纯化iPSC-CM的方法。研究表明,在缺少葡萄糖而补充乳酸的培养基中,心肌细胞可以有效吸收和利用乳酸来维持ATP水平,心肌细胞存活率高,但非心肌细胞不能利用乳酸,细胞中ATP水平会突然下降,导致大量细胞死亡[52]。此外,谷氨酰胺是iPSC生长所必需的物质。通过在缺葡萄糖和谷氨酰胺的培养基中添加乳酸,可以用来纯化心肌细胞。FACS显示,在代谢选择的第2天和第5天,心肌肌钙蛋白T阳性细胞的比例分别超过93%和98%,表明这是一种较好的心肌细胞纯化方法[53]。另一种常用的纯化方法是细胞分选。使用FACS去除未分化的iPSC可以达到纯化心肌细胞的目的。Tang等[54]提出了一种针对hiPSC表面SSEA-5的单克隆抗体,其能与hiPSC上特异表达的新型抗原结合,再通过FACS分离SSEA-5阳性细胞,极大降低了畸胎瘤形成的风险。然而,仅使用SSEA-5并不足以去除所有残留的未分化细胞,研究者进一步将SSEA-5与另外两种多能表面标志物(CD9、CD90或CD50、CD200)结合从而实现完全去除未分化细胞。除了FACS,MACS也可以用于纯化心肌细胞。Dubois等[55]筛选出特异性表达在iPSC-CM上的SIRPα,用针对SIRPα的抗体进行细胞分选,可以富集心脏前体细胞和心肌细胞,产生纯度高达98%的心肌肌钙蛋白T阳性细胞群。与FACS比较,MACS可以在更短的时间内分选更多的细胞。然而,FACS和MACS都需要针对细胞表面蛋白的特异性抗体,抗体污染有可能在移植后出现免疫原性反应和局部炎症[56]。近年来,研究者研发了一种新的纯化方法,先把miR-208a-CD4转入异质细胞群,miR-208a-CD4与心肌细胞中miR-208a的相互作用能抑制CD4在心肌细胞中的表达,而非心肌细胞因不表达miR-208a导致CD4仍表达;再通过CD4磁珠将非心肌细胞筛选去除,同时通过抗生素标记筛选去除未转染的细胞[57]。该方法可以用于心肌细胞的大规模纯化,有效避免了抗体污染的问题,具有很大的临床应用潜力。

4 诱导多能干细胞衍生的心肌细胞的移植

研究发现,注射iPSC-CM能改善大鼠、猪、猴等

心肌梗死动物模型的心脏功能[58-59]。将iPSC-CM直接注射到梗死心肌、经静脉或冠状动脉注射到患者体内的方法也已普遍应用[60]。但是,移植细胞的形状、大小和位置难以控制,心肌内注射的iPSC-CM可能会从注射部位转移并积聚至肺部,导致细胞存活率降低[61]。虽然生物支架已被用于许多组织和器官的再生,但很难在支架中形成致密的心肌组织,血管网络也难以构建,这使得无法给心肌细胞提供一个良好的代谢环境;此外,支架移植后常出现严重的炎症反应和心律失常,因此影响治疗结果[62]。为了克服这些问题,已有研究发现细胞片技术显示出对心肌梗死更有益的效果,在组织工程和再生医学领域有很大潜力[63]。研究采用基于聚*N*-异丙基丙烯酰胺制备的温度响应性细胞培养表面,发现降低培养温度可促进表面从疏水性快速转变为亲水性,依据温度响应细胞培养表面的固有特性可形成单层细胞片[64]。虽然细胞片移植具有较好的移植效果,并改善了心肌梗死后的心脏功能,但在梗死心肌缺氧的病理状态下,细胞片移植后由于缺氧或营养有限,细胞片可能会发生坏死,导致存活率下降。因此,Matsuo等[65]在每个心血管细胞片之间插入明胶水凝胶微球,应用明胶水凝胶微球技术堆叠心血管细胞片并成功地生成厚实可存活的心脏结构,实现移植到心脏的细胞长期存活。

5 诱导多能干细胞衍生的心肌细胞在急性心肌梗死动物模型中的应用

Carpenter等[66]将标记绿色荧光蛋白的iPSC-CM注射到急性心肌梗死大鼠中,这些心肌细胞能在注射部位长期存活,10周后出现大鼠心脏的重构程度减少。Guan等[67]在急性心肌梗死大鼠心肌内注射iPSC-CM,4周后心肌细胞在大鼠心脏中存活,并恢复了心肌功能。Kawamura等[68]将iPSC-CM片移植到急性心肌梗死猪中,证明iPSC分化的高纯度心肌细胞片可以促进由旁分泌作用引起的新生血管生成、抑制纤维化以及减弱心室重塑,从而改善心脏功能。Ishida等[69]发现移植hiPSC-CM可改善免疫抑制急性心肌梗死猪的心肌功能,且其改善梗死区域心肌收缩功能的效率优于其他体细胞来源的心肌细胞,在严重受损的心肌中临床效益更优。Ishigami等[63]将心脏组织片移植到急性心肌梗死猪中,减弱了模型动物的左心室重塑,改善了心脏功能。Shiba等[59]发现,在使用免疫抑制剂处理的前提下,hiPSC-CM移植后4、12周急性心肌梗死猴的心脏收缩功能得以改善。综上可见,梗死心肌中移植iPSC-CM可以改善模型动物的心脏功能。

6 诱导多能干细胞衍生的心肌细胞在临床应用中的挑战

虽然iPSC在临床应用方面有很大的潜力,但在临床应用前还有很多困难需要解决。首先,体细胞在重编程过程中仍面临着不完全重编程的问题;其次,重编程因子与宿主基因组发生整合也是一个挑战;再次,由于存在表观遗传记忆,iPSC的克隆特性可能具有多样性,这些都会增加细胞的免疫原性和致瘤性的风险[70-71]。虽然通过hiPSC与人白细胞抗原匹配可以抑制免疫排斥反应,但免疫排斥反应并不能被完全抑制,因此移植后必须使用免疫抑制剂。此外,移植细胞滞留率低、存活率低的问题仍有待解决。体外培养的iPSC-CM是不成熟的,其在形态、结构、代谢、电生理方面均更接近胎儿的心肌细胞,在进行体内移植时,不成熟的心肌细胞会增加心律失常的风险[72-73]。Funakoshi等[74]比较了iPSC来源的相对不成熟的第8天的心肌细胞与相对成熟的第20天的心肌细胞移植成功率,结果表明第20天的心肌细胞存活率更高。然而,心肌细胞的增殖能力会随着成熟度的增加而下降:在注射心肌细胞的6个月内,其在1个月内增殖良好,而在接下来的2个月内增殖逐渐放缓,此后失去了增殖能力,显示出成熟的心肌细胞结构。因此,在细胞移植之前,如何控制iPSC-CM的成熟水平需要进一步探索。

对于改善心肌功能的有效机制,目前还存在争议。Shiba等[75]研究表明,移植的心肌细胞能够与周围的宿主心肌形成缝隙连接,并实现1∶1的宿主移植物耦合,从而改善心脏功能。另外,较多研究表明心脏功能的改善可能是由于移植心肌细胞的旁分泌效应,而不是移植细胞对受损心肌的直接作用。Tachibana等[76]将iPSC-CM注射到急性心肌梗死小鼠心脏中,与移植后第2周比较,移植后第4周的心肌细胞存活率和心室射血分数更高,但研究者用生物发光成像追踪标有荧光素

酶的移植心肌细胞,结果发现移植后第4周的心肌细胞信号弱于第2周,这表明移植的细胞数减少。该研究进一步分析其旁分泌作用机制,发现iPSC-CM中抗凋亡因子(TNF-α)、促血管生成因子(粒细胞集落刺激因子、血管内皮生长因子、胎盘生长因子1)以及促细胞迁移因子(TNF-α、血管细胞黏附分子1、纤溶酶原激活物抑制物1、基质细胞衍生因子1α)明显上调,这些细胞因子可抑制细胞凋亡、促进血管生成以及增加细胞存活率,是受损心肌修复的基础。Gao等[77]通过测量左心室射血分数、室壁应力、心肌生物能等证明了iPSC-CM分泌的外泌体在急性心肌梗死猪中具有心脏保护作用,这些外泌体同样具有抗凋亡和促血管生成功能。

7 结 语

iPSC-CM为急性心肌梗死的治疗开辟了一条新的道路,已取得了突破性的进展。组织工程技术在心肌细胞大规模培养中的广泛应用为心肌的再生治疗带来了无限可能。Kawamura等[78]在接受传统治疗后左心室射血分数仍小于35%且美国纽约心脏病协会心功能分级Ⅲ级及以上的3例心衰患者体内移植hiPSC-CM片,并给予移植后3个月的免疫抑制剂治疗,在1年的观察期内未观察到移植细胞相关不良事件,其中2例观察到左心室收缩力和心肌血流的改善。我国2例心力衰竭患者在进行冠状动脉搭桥术的同时接受了hiPSC-CM注射治疗,一例患者按计划接受了一个月的免疫抑制剂治疗,另一例患者则因免疫抑制剂的不良反应在一周后停止用药。2例患者临床症状均有改善,且未出现肿瘤等并发症[79]。Miyagawa等[80]为一例心肌梗死患者植入临床级别条件下生产的异体hiPSC-CM片,术后6个月,患者临床症状得到了改善,移植部位的室壁运动功能也得到恢复,未出现重大不良事件,且在患者心脏或其他器官中均未发现肿瘤。这项研究是成功移植hiPSC-CM治疗严重缺血性心肌病的首例报告。在iPSC-CM正式应用于临床之前,仍需要继续探究移植细胞改善心肌功能的有效机制、评估和选择适合移植的心肌细胞的成熟度,以及进一步研究如何避免移植后出现心律失常、致瘤性以及免疫排斥等问题。虽然目前已经探索出许多方法来提高心肌细胞的移植效率,但移植后的iPSC-CM存活率仍然较低。面对目前存在的各种困难和挑战,科学家们正在努力逐一加以解决,iPSC-CM的临床应用指日可待。

志谢 研究得到国家自然科学基金(82060072)支持

Acknowledgements This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82060072)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2024. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

参考文献(References)

[1] 马丽媛, 王增武, 樊 静, 等.《中国心血管健康与疾病报告2022》要点解读[J]. **中国全科医学**, 2023, 26(32): 3975-3994.
MA Liyuan, WANG Zengwu, FAN Jing, et al. Interpretation of report on cardiovascular health and diseases in China 2022[J]. **Chinese General Practice**, 2023, 26(32): 3975-3994. (in Chinese)

[2] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. **Cell**, 2006, 126(4): 663-676.

[3] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. **Cell**, 2007, 131(5): 861-872.

[4] 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): 1917-1920.

[5] MOORE J C. Generation of human-induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction[J]. **Methods Mol Biol**, 2013, 997: 35-43.

[6] ZHOU T, BENDA C, DUZINGER S, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine[J]. **J Am Soc Nephrol**, 2011, 22(7): 1221-1228.

[7] YU J, HU K, SMUGA-OTTO K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences[J]. **Science**, 2009, 324(5928): 797-801.

[8] WOLTJEN K, MICHAEL I P, MOHSENI P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. **Nature**, 2009, 458(7239): 766-770.

[9] LANZI G, FERRARO R M, MASNERI S, et al. Generation of 3 clones of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient affected by autosomal recessive osteopetrosis due to mutations in *TCIRG1*

gene[J]. **Stem Cell Res**, 2020, 42: 101660.
[10] WOODS S, BATES N, DUNN S L, et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells from anterior cruciate ligament[J]. **J Orthop Res**, 2020, 38(1): 92-104.
[11] HOU P, LI Y, ZHANG X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds[J]. **Science**, 2013, 341(6146): 651-654.
[12] KARAGIANNIS P, TAKAHASHI K, SAITO M, et al. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development[J]. **Physiol Rev**, 2019, 99(1): 79-114.
[13] LIPPI M, STADIOTTI I, POMPILIO G, et al. Human cell modeling for cardiovascular diseases[J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(17): 6388.
[14] AFJEH-DANA E, NASERZADEH P, MORADI E, et al. Stem cell differentiation into cardiomyocytes: current methods and emerging approaches[J]. **Stem Cell Rev Rep**, 2022, 18(8): 2566-2592.
[15] HUDSON J, TITMARSH D, HIDALGO A, et al. Primitive cardiac cells from human embryonic stem cells[J]. **Stem Cells Dev**, 2012, 21(9): 1513-1523.
[16] 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.
[17] PASSIER R, OOSTWAARD D W, SNAPPER J, et al. Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures[J]. **Stem Cells**, 2005, 23(6): 772-780.
[18] RYU N E, LEE S H, PARK H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells[J]. **Cells**, 2019, 8(12): 1620.
[19] LU T Y, LIN B, KIM J, et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells[J]. **Nat Commun**, 2013, 4: 2307.
[20] EDRI R, GAL I, NOOR N, et al. Personalized hydrogels for engineering diverse fully autologous tissue implants [J/OL]. **Adv Mater**, 2019, 31(1): e1803895.
[21] RUAN J L, TULLOCH N L, RAZUMOVA M V, et al. Mechanical stress conditioning and electrical stimulation promote contractility and force maturation of induced pluripotent stem cell-derived human cardiac tissue[J]. **Circulation**, 2016, 134(20): 1557-1567.
[22] ABBASGHOLIZADEH R, ISLAS J F, NAVRAN S, et al. A highly conductive 3D cardiac patch fabricated using cardiac myocytes reprogrammed from human adipogenic mesenchymal stem cells[J]. **Cardiovasc Eng Technol**, 2020, 11(2): 205-218.
[23] LIU Q, TIAN S, ZHAO C, et al. Porous nanofibrous poly (*L*-lactic acid) scaffolds supporting cardiovascular progenitor cells for cardiac tissue engineering[J]. **Acta Biomater**, 2015, 26: 105-114.
[24] LIU B H, YEH H Y, LIN Y C, et al. Spheroid formation and enhanced cardiomyogenic potential of adipose-derived stem cells grown on chitosan[J]. **Biores Open Access**, 2013, 2(1): 28-39.
[25] NOOR N, SHAPIRA A, EDRI R, et al. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts[J]. **Adv Sci (Weinh)**, 2019, 6(11): 1900344.
[26] 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, 8(2): 228-240.
[27] NAITO A T, SHIOJIMA I, AKAZAWA H, et al. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2006, 103(52): 19812-19817.
[28] 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, 23(5): 607-611.
[29] SAHARA M, SANTORO F, CHIEN K R. Programming and reprogramming a human heart cell[J]. **EMBO J**, 2015, 34(6): 710-738.
[30] KATAGIRI T, WATABLE T. Bone morphogenetic proteins[J]. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2016, 8(6): a021899.
[31] WANG R N, GREEN J, WANG Z, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in development and human diseases[J]. **Genes Dis**, 2014, 1(1): 87-105.
[32] QI X, LI T G, HAO J, et al. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2004, 101(16): 6027-6032.
[33] KAMI D, SHIOJIMA I, MAKINO H, et al. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis[J/OL]. **PLoS One**, 2008, 3(6): e2407.
[34] BERNARDO A S, FAIAL T, GARDNER L, et al. BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages[J]. **Cell Stem Cell**, 2011, 9(2): 144-155.
[35] VÄLIMÄKI M J, TÖLLI 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, 60(18): 7781-7798.
[36] SCHNEIDER V A, MERCOLA M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis[J]. **Genes Dev**, 2001, 15(3): 304-315.
[37] TADA M, SMITH J C. Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway[J]. **Development**, 2000, 127(10): 2227-2238.
[38] MUMMERY C L, ZHANG J, NG E S, et al. Differ-

entiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview[J]. **Circ Res**, 2012, 111(3): 344-358.

[39] EISENBERG L M, EISENBERG C A. Wnt signal transduction and the formation of the myocardium[J]. **Dev Biol**, 2006, 293(2): 305-315.

[40] LACO F, WOO T L, ZHONG Q, et al. Unraveling the inconsistencies of cardiac differentiation efficiency induced by the GSK3β inhibitor CHIR99021 in human pluripotent stem cells[J]. **Stem Cell Reports**, 2018, 10(6): 1851-1866.

[41] LIAN X, HSIAO C, WILSON G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling[J/OL]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2012, 109(27): E1848-1857.

[42] EISENBERG C A, EISENBERG L M. WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm[J]. **Dev Dyn**, 1999, 216(1): 45-58.

[43] MACGROGAN D, MÜNCH J, DE LA POMPA J L. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration[J]. **Nat Rev Cardiol**, 2018, 15(11): 685-704.

[44] JIANG H, BIAN W, SUI Y, et al. FBXO42 facilitates Notch signaling activation and global chromatin relaxation by promoting K63-linked polyubiquitination of RBPJ[J]. **Sci Adv**, 2022, 8(38): eabq4831.

[45] SCHROEDER T, FRASER S T, OGAWA M, et al. Recombination signal sequence-binding protein Jkappa alters mesodermal cell fate decisions by suppressing cardiomyogenesis[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003, 100(7): 4018-4023.

[46] GONG H, YAN Y, FANG B, et al. Knockdown of nucleosome assembly protein 1-like 1 induces mesoderm formation and cardiomyogenesis via notch signaling in murine-induced pluripotent stem cells[J]. **Stem Cells**, 2014, 32(7): 1759-1773.

[47] BURRIDGE P W, MATSA E, SHUKLA P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes [J]. **Nat Methods**, 2014, 11(8): 855-860.

[48] MURRY C E, REINECKE H, PABON L M. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair[J]. **J Am Coll Cardiol**, 2006, 47(9): 1777-1785.

[49] KWOK C K, UEDA Y, KADARI A, et al. Scalable stirred suspension culture for the generation of billions of human induced pluripotent stem cells using single-use bioreactors[J/OL]. **J Tissue Eng Regen Med**, 2018, 12(2): e1076-e1087.

[50] KEMPF H, OLMER R, KROPP C, et al. Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture [J]. **Stem Cell Reports**, 2014, 3(6): 1132-1146.

[51] HENTZE H, SOONG P L, WANG S T, et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies[J]. **Stem Cell Res**, 2009, 2(3): 198-210.

[52] TOHYAMA S, HATTORI F, SANO M, et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes[J]. **Cell Stem Cell**, 2013, 12(1): 127-137.

[53] TOHYAMA S, FUJITA J, HISHIKI T, et al. Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells[J]. **Cell Metab**, 2016, 23(4): 663-674.

[54] TANG C, LEE A S, VOLKMER J P, et al. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells[J]. **Nat Biotechnol**, 2011, 29(9): 829-834.

[55] DUBOIS N C, CRAFT A M, SHARMA P, et al. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells [J]. **Nat Biotechnol**, 2011, 29(11): 1011-1018.

[56] DUNN T B, NOREEN H, GILLINGHAM K, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation[J]. **Am J Transplant**, 2011, 11(10): 2132-2143.

[57] TSUJISAKA Y, HATANI T, OKUBO C, et al. Purification of human iPSC-derived cells at large scale using microRNA switch and magnetic-activated cell sorting [J]. **Stem Cell Reports**, 2022, 17(7): 1772-1785.

[58] KAWAGUCHI S, SOMA Y, NAKAJIMA K, et al. Intramyocardial transplantation of human iPS cell-derived cardiac spheroids improves cardiac function in heart failure animals[J]. **JACC Basic Transl Sci**, 2021, 6(3): 239-254.

[59] 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.

[60] YU H, LU K, ZHU J, et al. Stem cell therapy for ischemic heart diseases[J]. **Br Med Bull**, 2017, 121 (1): 135-154.

[61] 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.

[62] TAKAHASHI H, OKANO T. Thermally-triggered fabrication of cell sheets for tissue engineering and regenerative medicine[J]. **Adv Drug Deliv Rev**, 2019, 138: 276-292.

[63] ISHIGAMI M, MASUMOTO H, IKUNO T, et al. Human iPS cell-derived cardiac tissue sheets for functional restoration of infarcted porcine hearts[J/OL]. **PLoS One**, 2018, 13(8): e0201650.

[64] NAGASE K, YAMATO M, KANAZAWA H, et al. Poly(*N*-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications [J]. **Biomaterials**, 2018, 153: 27-48.

[65] MATSUO T, MASUMOTO H, TAJIMA S, et al. Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluri-

potent stem cells[J]. **Sci Rep**, 2015, 5: 16842.
[66] CARPENTER L, CARR C, YANG C T, et al. Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells generates cardiac cells that provide protection following myocardial infarction in the rat[J]. **Stem Cells Dev**, 2012, 21(6): 977-986.
[67] 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.
[68] 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 Suppl 1): S29-S37.
[69] ISHIDA M, MIYAGAWA S, SAITO A, et al. Transplantation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes is superior to somatic stem cell therapy for restoring cardiac function and oxygen consumption in a porcine model of myocardial infarction [J]. **Transplantation**, 2019, 103(2): 291-298.
[70] KAWAMURA A, MIYAGAWA S, FUKUSHIMA S, et al. Teratocarcinomas arising from allogeneic induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue constructs provoked host immune rejection in mice[J]. **Sci Rep**, 2016, 6: 19464.
[71] LIANG G, ZHANG Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application[J]. **Cell Stem Cell**, 2013, 13(2): 149-159.
[72] 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.
[73] GUO Y, PU W T. Cardiomyocyte maturation: new phase in development[J]. **Circ Res**, 2020, 126(8): 1086-1106.
[74] FUNAKOSHI S, MIKI K, TAKAKI T, et al. Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes[J]. **Sci Rep**, 2016, 6: 19111.
[75] 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.
[76] TACHIBANA A, SANTOSO M R, MAHMOUDI M, et al. Paracrine effects of the pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes salvage the injured myocardium [J/OL]. **Circ Res**, 2017, 121(6): e22-e36.
[77] GAO L, WANG L, WEI Y, et al. Exosomes secreted by hiPSC-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine[J]. **Sci Transl Med**, 2020, 12(561): eaay1318.
[78] KAWAMURA T, ITO Y, ITO E, et al. Safety confirmation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte patch transplantation for ischemic cardiomyopathy: first three case reports[J]. **Front Cardiovasc Med**, 2023, 10: 1182209.
[79] MALLAPATY S. Revealed: two men in China were first to receive pioneering stem-cell treatment for heart disease[J]. **Nature**, 2020, 581(7808): 249-250.
[80] MIYAGAWA S, KAINUMA S, KAWAMURA T, et al. Case report: transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte patches for ischemic cardiomyopathy[J]. **Front Cardiovasc Med**, 2022, 9: 950829.

［本文编辑　沈　敏　沈　洁］

· 学术动态 ·

冷冻干燥淋巴结载药系统可提升CAR-T细胞疗效

2024年3月6日，浙江大学药学院顾臻教授、李洪军研究员联合浙江大学医学院附属第一医院赵鹏主任医师团队在《自然·材料》（*Nature Materials*）上发表了最新研究成果“Lyophilized lymph nodes for improved delivery of chimeric antigen receptor T cells”（DOI：10.1038/s41563-024-01825-z）。该研究提出一种肌体组织工程化递药策略，使用冷冻干燥技术保留患者来源淋巴结的基质结构和关键免疫调节因子存储和递送CAR-T细胞，增强CAR-T细胞的杀伤活性和持久性。

与传统人工合成的水凝胶细胞递送载体比较，冻干淋巴结可为CAR-T细胞提供更有利的免疫增强微环境。相比负载于传统的水凝胶中，CAR-T细胞在冷冻淋巴结中的扩增数提升了3.5倍，并且产生了更多的中枢记忆型T细胞。在细胞模型和动物模型中，基于冻干淋巴结的载药系统显著提升了瘤内活化的CAR-T细胞数，促进肿瘤杀伤因子的产生，相比人工合成的透明质酸凝胶载体展现了更好的抑瘤效果。

浙江大学佳齐、吴伟博士研究生和陈栋主任医师为论文第一作者。研究得到国家重点研发计划、国家自然科学基金等支持。