

研究论文

人诱导多能干细胞分化的心肌细胞电生理鉴定

张弘源^{1,2}, 张婷婷^{1,2}, Machuki Jeremiah Ong'achwa¹, 吴立娟^{1,2}, 孙红^{1,*}

徐州医科大学¹生理机能与损伤实验室; ²心血管病研究所, 徐州 221004

摘要: 本文旨在研究人诱导多能干细胞分化的心肌细胞(human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs)的电生理特性。采用时序性短暂激活/短暂抑制Wnt信号通路的方法将未分化的IMR90-4细胞系定向诱导分化为心肌细胞。用免疫荧光染色法和流式细胞术检测心肌肌钙蛋白T (cardiac troponin T, cTnT)蛋白表达, 计算hiPSC-CMs的分化率。用膜片钳技术记录hiPSC-CMs的动作电位, 根据动作电位的表现对心肌细胞进行分类, 并进一步分析电生理特征。结果显示, hiPSC-CMs的纯度大于95%。根据动作电位的表现, hiPSC-CMs可分为心房肌样细胞、心室肌样细胞和窦房结样细胞。其中, 心室肌样细胞的动作电位时程(action potential duration, APD)、动作电位幅度(action potential amplitude, APA)和最大去极化速率(dV/dt_{max})均大于心房肌样细胞和窦房结样细胞, 窦房结样细胞的 dV/dt_{max} 低于心室肌样细胞和心房肌样细胞。以上结果表明hiPSC-CMs纯度高, 并且分化出的三种不同类型的心肌细胞具有和成熟心肌细胞相似的动作电位特征。

关键词: 人诱导多能干细胞; 心肌细胞; 动作电位; 电生理

中图分类号: R337.5

Electrophysiological identification of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes

ZHANG Hong-Yuan^{1,2}, ZHANG Ting-Ting^{1,2}, Machuki Jeremiah Ong'achwa¹, WU Li-Juan^{1,2}, SUN Hong^{1,*}

¹Department of Physiology; ²Institute of Cardiovascular Disease Research, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

Abstract: The present study was aimed to characterize the electrophysiology of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs). IMR90-4 cells were induced to differentiate into cardiomyocytes by temporal modulation of regulators of canonical Wnt signaling. The protein expression of cardiac troponin T (cTnT) was detected by immunofluorescence staining and flow cytometry, and the differentiation rate of hiPSC-CMs was calculated. The action potentials (APs) of hiPSC-CMs were recorded by patch clamp and used to classify different types of cardiomyocytes. The electrophysiological characteristics of hiPSC-CMs were further analyzed. The results showed that the cTnT positive rate of hiPSC-CMs was above 95%. hiPSC-CMs were differentiated into 3 types of cardiomyocytes based on the properties of AP: ventricular-, atrial- and nodal-like cells. In comparison with the other two types of cells, the APs of ventricular-like cells exhibited longer duration, higher amplitude and higher dV/dt_{max} . The nodal-like cells had the lowest dV/dt_{max} among all the three types. These results indicate that hiPSC can be differentiated into the cardiomyocytes with high purity and the differentiated hiPSC-CMs have similar electrophysiological characteristics to adult cardiomyocytes.

Keywords: human induced pluripotent stem cell; cardiomyocyte; action potential; electrophysiology

人类多能干细胞 (human pluripotent stem cell, hPSC) [包括人类胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 和人类诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem

cell, hiPSC)] 的发现, 为再生医学以及转化医学研究开辟了新的道路。随着 hiPSC 研究技术的成熟与发展, 以及其定向分化愈加稳定和高效, 使得 hiPSC

Received 2017-09-11 Accepted 2018-01-11

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81461138036 and 81370329).

*Corresponding author. Tel: +86-516-83262618; E-mail: sunh@xzhmu.edu.cn

成为许多疾病的研究载体以及药筛工具^[1]。人诱导多能干细胞分化的心肌细胞 (human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs) 分化方法存在多样性, 有化学诱导, 例如维生素 C 诱导分化, 也有调控转录因子调节心肌特异性基因和蛋白的表达启动 iPSC 向心肌细胞的分化, 还有通过调控 TGF- β 或者 Wnt 信号通路将细胞诱导成心肌细胞等方法^[2,3]。目前普遍使用的这几种方法最终分化形成的心肌细胞种类具有不确定性, 三种类型的心肌细胞 (心室肌样、心房肌样、窦房结样细胞) 均可由 hiPSC 分化形成^[3]。通过对 hiPSC 分化出的不同亚型心肌细胞电生理特征进行研究, 可以对 hiPSC 分化过程进行判断, 明确不同亚型的电生理特点, 从而对单一类型心肌细胞的定向分化技术起到辅助作用。因此, 本研究用时序性激活/抑制 Wnt 通路的方法制备 hiPSC-CMs, 用流式细胞术以及免疫荧光染色法检测心肌特异性蛋白标记物, 计算 hiPSC-CMs 分化率, 并利用膜片钳技术研究 hiPSC-CMs 的电生理特性, 明确分化出的不同心肌细胞的类型及其电生理特点, 为 hiPSC-CMs 的定向分化技术提供参考。

1 方法与材料

1.1 实验材料 未分化的上皮细胞来源的 IMR90-4 细胞系购于美国 Wi-Cell 公司; 含胰岛素和不含胰岛素的 RPMI-B27 培养基购于美国 Life Technologies 公司; 糖原合成激酶 3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 抑制剂 CHIR99021 购于美国 Selleck 公司; C59 购于美国 Cellagen Technology 公司; 三碘甲状腺原氨酸购于美国 Sigma 公司; 兔多克隆抗心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 抗体、荧光驴抗兔 IgG 抗体 (二抗) 购于英国 Abcam 公司; 兔多克隆抗 cTnT、Control isotype IgG 流式抗体购于北京 Bioss 公司; 玻璃电极购于美国 Sutter Instrument 公司。

1.2 液体配制 动作电位电极外液 (mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1, 葡萄糖 10, HEPES 10, CaCl₂ 1.8 (NaOH 调节 pH 至 7.4); 动作电位电极内液 (mmol/L): KCl 150, MgCl₂ 1, HEPES 5, EGTA 10, Na₂ATP 5 (KOH 调节 pH 至 7.2)。

1.3 hiPSC 向心肌细胞的定向分化 hiPSC (IMR90-4) 培养所使用的培养皿用低生长因子基质胶 (BD Biosciences, 美国) 预处理, 在 E8 培养基 (Life

Technologies, 美国) 中培养细胞使其融合达 75%~80% 后用 versene (Life Technologies, 美国) 消化进行传代。传代使用 10 μ mol/L ROCK 抑制剂 Y27632 (Strattech Scientific Ltd., 英国) 促进细胞存活及贴壁, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。采用时序性短暂激活/短暂抑制 Wnt 信号通路的方法将未分化的 IMR90-4 细胞系定向诱导分化为心肌细胞^[4]。在分化的早期阶段, 当干细胞铺板达到 90% 汇合密度时, 使用 GSK-3 抑制剂 CHIR99021 (9 μ mol/L) 处理 2 d, 分化至第 3 天时使用 Wnt 通路阻滞剂 C59 (3 μ mol/L) 处理 2 d。在分化过程中隔天更换一次无血清、不含胰岛素、含葡萄糖 RPMI-B27 培养基。分化至第 11 天左右, 即有细胞开始跳动。由于心肌细胞和干细胞代谢方式的差异性, 于分化第 14 天 (此时绝大部分细胞可见明显收缩活动) 将培养基更换为含胰岛素、无葡萄糖 RPMI-B27 培养基, 此时培养基中的主要供能物质为心肌细胞能量代谢所必需的脂肪酸, 而其他非心肌细胞则失去能量供应而死亡^[5]。细胞分化 20 d 后加入三碘甲状腺原氨酸 (20 ng/mL), 培养至第 30 天, 心肌细胞发育成熟^[6], 可用于后续实验研究。

1.4 免疫荧光染色法检测 cTnT 表达 将含有 hiPSC-CMs 的细胞爬片用 4% 多聚甲醛固定于细胞培养皿中, PBS 洗脱后使用 Triton X-100 在室温下通透 30 min, 然后用驴血清封闭后抗 cTnT 抗体 (1:200) 孵育过夜, 第二天在室温下加入驴抗兔 IgG 二抗 (1:200) 孵育 1 h, 最后使用含有 DAPI 的封片剂核染色及封片。实验数据通过 Olympus X71 显微镜, Olympus DP72 数码相机以及 ImageJ 软件进行图片获取和分析。

1.5 流式细胞术检测 cTnT 表达 将 hiPSC-CMs 用胰酶消化后计数重悬, 加入 1% 甲醛室温下固定 30 min 后用 PBS 洗脱, 再用 0.1% Tween-20 孵育 30 min 后用 PBS 洗脱, 加入含 5% BSA 的 PBS 封闭 20 min, 分别在阳性对照组和样品组中加入 PE 标记的 Control isotype IgG 和抗 cTnT 一抗, 冰上孵育 30 min 并用 PBS 洗脱后, 将样品加入流式管中上机检测。实验数据通过 FACSCantoII (BD Biosciences 公司, 美国) 流式细胞仪采集, 用 FlowJo 软件进行分析。

1.6 hiPSC-CMs 膜片钳动作电位检测 将含有 1.5×10^4 hiPSC-CMs 的 15 mm 孔径培养皿用动作电位电极外液反复洗涤 3 次, 以去除培养基中的大分子蛋

白等杂质。用动作电位电极外液覆盖培养皿底壁数毫米深，选取单个、边缘清晰、细胞膜完整并且有自发搏动的心肌细胞作为记录细胞。记录电极选用硬质玻璃毛胚，经 P1000 微电极拉制仪 (Sutter Instrument 公司, 美国) 两次拉制而成。充电极内液后入液阻抗 3~5 M Ω 。使用 MP-225 微操纵器 (Sutter Instrument 公司, 美国) 将记录电极缓慢推向目标细胞。当电极入液后，补偿液接电位；当电极靠近细胞膜后，轻加负压于电极内，吸引数秒钟后，电极尖端与细胞膜表面形成 1 G Ω 以上的高阻封接，补偿电极电容。给电极内轻施脉冲式负压吸破细胞膜，补偿细胞膜电容，串联电阻补偿 50%~60%，稳定数分钟，封接仍然良好 (封接电阻无明显变化) 时切换到电流钳模式下，使用 free gap 模

式开始记录心肌细胞自发产生的动作电位，每个细胞记录 50 s。实验过程通过计算机软件 Patchmaster 控制，用 EPC10 (HEKA 公司, 德国) 放大器采集信号，用 Clampfit 9.0 以及 Origin 8 软件进行数据分析。

1.7 统计学处理 计量数据以 mean \pm SEM 表示，应用 GraphPad Prism 5.0 统计软件处理，多组间计量资料比较采用 one-way ANOVA，组间两两比较采用 Bonferroni 法。P < 0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hiPSC-CMs 的形态学分化纯度鉴定

流式细胞术结果显示，hiPSC-CMs 的 cTnT 阳性率为 95.7%，即心肌细胞的纯度大于 95% (图 1A)；免疫荧光染色结果显示，细胞表面出现心肌肌

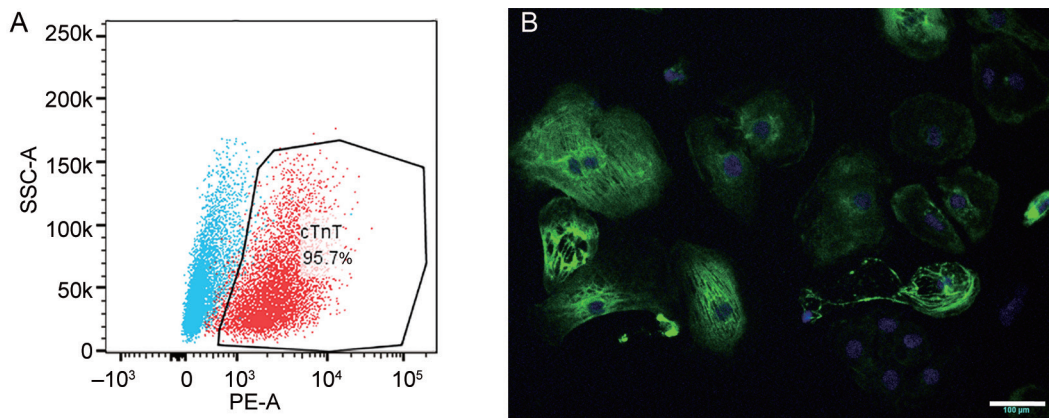


图 1. 人诱导多能干细胞分化的心肌细胞(hiPSC-CMs)分化率鉴定

Fig. 1. Identification of differentiation rate of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs). A: Cardiac troponin T (cTnT) positive rate detected by flow cytometry. B: cTnT expression detected by immunofluorescence staining. cTnT was stained with green, and nucleic acid was blue. Scale bar, 100 μ m.

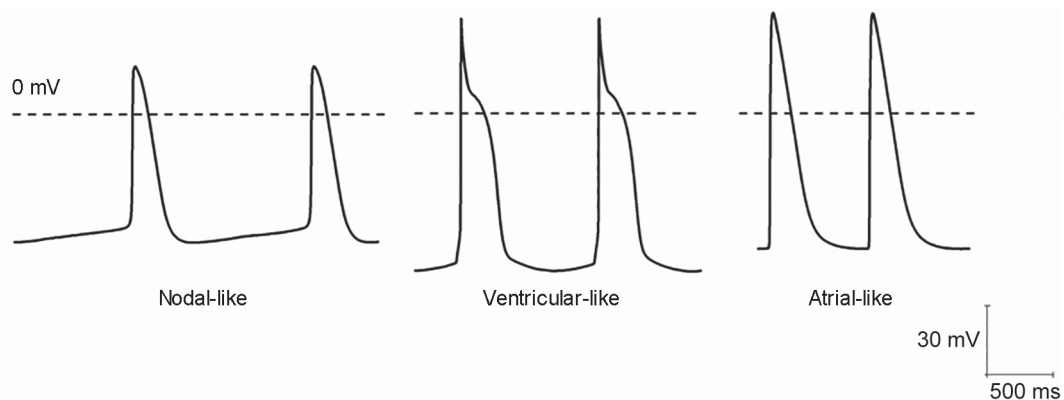


图 2. 心室肌样、心房肌样以及窦房结样细胞动作电位

Fig. 2. Representative action potentials (APs) of nodal-, ventricular- and atrial-like cells. APs were recorded from spontaneous beating cells in current-clamp mode.

节结构 (图 1B)。以上结果表明 hiPSC-CMs 的分化率符合后续实验的要求。

2.2 hiPSC-CMs 的动作电位特征

膜片钳结果显示, hiPSC-CMs 根据动作电位形态分为心房肌样细胞、心室肌样细胞和窦房结样细胞。其中窦房结样细胞有明显的 4 期自动去极化表现, 心室肌样细胞有明显的 2 期平台期, 心房肌样细胞则没有明显的 4 期自动去极化和 2 期平台期 (图 2)。

各类型心肌细胞的动作电位的分析结果显示, 窦房结样细胞的动作电位幅度 (action potential amplitude) 和最大去极化速率 (dV/dt_{max}) 低于心房肌样细胞与心室肌样细胞, 并且动作电位的去极化时间 (rise time) 大于心室肌样细胞与心房肌样细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。心室肌样细胞的去极化时间与心房肌样细胞无显著差异, 但其去

极化程度以及超射值比心房肌样细胞更大, 去极化的速率也高于心房肌样细胞, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

比较三种心肌细胞的动作电位时程, 结果显示心室肌样细胞的动作电位复极化至 10% 的时间 (APD10) 与窦房结样细胞和心房肌样细胞相比无统计学差异, 但由于平台期的存在, 心室肌样细胞复极化至 50% 和 90% 的时间 (APD50, APD90) 与心房肌样细胞和窦房结样细胞相比显著增加, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 3)。

3 讨论

随着 hiPSC 的热度日益增加, 其向具体心肌细胞亚型的分化方法成为了研究焦点, 最近 Lee 等^[7] 研究显示, 中胚层中通过激活视黄酸信号通路可以选择性地诱导 hPSC 向心房肌细胞分化, 并且增加

表 1. 不同类型心肌细胞动作电位参数

Table 1. Action potential parameters of different types of hiPSC-CMs

Types	RMP (mV)	APA (mV)	dV/dt_{max} (V/s)	OS (mV)	Rise time (ms)
Nodal-like ($n = 7$)	-53.49 ± 1.36	$75.78 \pm 4.29^{*#}$	$5.20 \pm 1.41^{*#}$	$22.29 \pm 3.20^*$	$56.85 \pm 16.46^{*#}$
Ventricular-like ($n = 21$)	-61.07 ± 0.93	$105.8 \pm 1.68^*$	$23.47 \pm 1.35^*$	$44.77 \pm 1.41^*$	11.73 ± 1.86
Atrial-like ($n = 20$)	-58.37 ± 1.40	88.12 ± 2.83	14.49 ± 1.20	29.75 ± 2.32	16.64 ± 1.26

Mean \pm SEM. $^*P < 0.05$ vs atrial-like cells; $^{\#}P < 0.05$ vs ventricular-like cells. RMP: Resting membrane potential; APA: Action potential amplitude; dV/dt_{max} : Maximal rate of depolarization; OS: Overshoot.

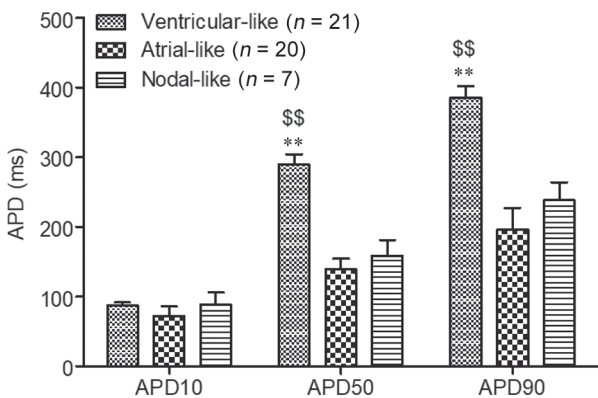


图 3. 不同类型心肌细胞的动作电位时程

Fig. 3. Action potential durations of different types of cardiomyocytes recorded by patch clamp. APD10, action potential duration at 10% of repolarization; APD50, action potential duration at 50% of repolarization; APD90, action potential duration at 90% of repolarization. Mean \pm SEM. $^{**}P < 0.01$ vs atrial-like cells; $^{SS}P < 0.01$ vs nodal-like cells.

CD253a 表达的细胞能提高心室肌细胞的分化。Lee 等通过定向诱导分化出的心室和心房肌样细胞的动作电位时程与本研究结果相近。本研究检测了 hiPSC 分化的不同类型心肌细胞的电生理特性, 结果表明 hiPSC 成功分化为心肌细胞, 并且不同类型细胞的电生理特征与成熟人类心肌细胞的特性相似^[8,9]。心房肌样细胞、心室肌样细胞以及窦房结样细胞的动作电位特点也与其他文献中报道的 hiPSC 和 hESC 分化的心肌细胞动作电位的特性一致^[10-12]。但由于细胞分化或者培养方法的不同, 可能对细胞的形态产生影响^[13]。心室肌样细胞的动作电位时程、去极化幅度以及静息电位在各个课题组的研究报道中有所差异^[14]。由于动作电位是由不同离子通道参与形成, 因此本研究结果中动作电位的表现提示 hiPSC-CMs 基本表达了正常心肌细胞上的参与动作电位形成的各种类型的离子通道, 如心室肌中参与 0 期去极化的 I_{Na} 、1 期快速复极的 I_{to} 、

2期平台期的 I_{Ca-L} 、 I_{ks} 等。而且Paci等^[15]发现hiPSC-CMs对各种选择性通道阻滞剂的反应性与成人人类心室肌细胞相似。因此hiPSC-CMs可以在细胞水平上用于药物毒性的筛查以及致心律失常风险的评估。

本研究结果均来自hiPSC-CMs自发搏动产生的动作电位，但目前对于hiPSC-CMs的自动节律机制还没有明确的定论。从动作电位的形态来看，除了窦房结样细胞有4期的自动去极化表现外，心室与心房肌样细胞的4期均处于静息期，而hiPSC-CMs的自动节律是否由其中的窦房结样细胞引起尚不明确。有研究认为 I_f 电流产生的缓慢去极化作用使细胞膜电压不断上升到达L型 Ca^{2+} 通道开放的阈电压，从而激活L型 Ca^{2+} 通道的开放，产生 Ca^{2+} 电流，使细胞外的 Ca^{2+} 内流而诱发动作电位与自动节律^[16]。L型 Ca^{2+} 通道是心肌细胞兴奋收缩耦联中的重要通道， Ca^{2+} 通过L型 Ca^{2+} 通道进入细胞并触发肌浆网内 Ca^{2+} 池的释放，从而使心肌细胞有足够的 Ca^{2+} 进行收缩。但是Kim等发现阻断 I_f 电流后对hiPSC-CMs的自动节律没有任何影响，并且在hiPSC-CMs上很难检测到 I_f 电流。但是hiPSC-CMs有自发性的肌浆网 Ca^{2+} 释放，可进一步激活Na- Ca^{2+} 交换体(sodium calcium exchange, NCX)，从而提供激活动作电位去极化的电流^[16]。此途径可能是引起hiPSC-CMs细胞自动节律的一种机制。

Du等^[17]通过Optical mapping观察心肌细胞动作电位时程，结果显示hiPSC-CMs的细胞密度会影响动作电位时程，从而影响对于细胞分化种类的判断。本研究在细胞固定密度(1.5×10^4 /皿)的条件下通过膜片钳记录动作电位的形态，可以根据动作电位4期是否有自动去极化区分工作细胞与自律细胞，再根据复极有无平台期区分心室肌与心房肌。进一步比较细胞间动作电位时程的差异，从动作电位的时程可以看出心室肌样细胞由于平台期的存在，其APD50以及APD90均比心房肌样和窦房结样细胞的时程长。因此利用动作电位的时程特性可以在hiPSC-CMs未完全分化成熟的情况下判断心肌细胞的种类，这对于了解细胞分化情况，以及选择细胞种类的定向分化有很大的参考价值。

参考文献

- 1 Yang X, Pabon L, Murry CE. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 2014; 114(3): 511–523.
- 2 Cao N, Liu Z, Chen Z, Wang J, Chen T, Zhao X, Ma Y, Qin L, Kang J, Wei B, Wang L, Jin Y, Yang HT. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res* 2012; 22(1): 219–236.
- 3 Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res* 2012; 111(3): 344–358.
- 4 Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 2013; 8(1): 162–175.
- 5 Sharma A, Li G, Rajarajan K, Hamaguchi R, Burrig PW, Wu SM. Derivation of highly purified cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells using small molecule-modulated differentiation and subsequent glucose starvation. *J Vis Exp* 2015; 97: 52628.
- 6 Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, Sniadecki NJ, Ruohola-Baker H, Murry CE. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 72: 296–304.
- 7 Lee JH, Protze SI, Laksman Z, Backx PH, Keller GM. Human pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes develop from distinct mesoderm populations. *Cell Stem Cell* 2017; 21(2): 179–194.e4.
- 8 Conrath CE, Opthof T. Ventricular repolarization: an overview of (patho)physiology, sympathetic effects and genetic aspects. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92(3): 269–307.
- 9 Sanchez C, Bueno-Orovio A, Wettwer E, Loose S, Simon J, Ravens U, Pueyo E, Rodriguez B. Inter-subject variability in human atrial action potential in sinus rhythm versus chronic atrial fibrillation. *PLoS One* 2014; 9(8): e105897.
- 10 Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ, Kolaja KL, Swanson BJ, January CT. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(5): H2006–H2017.
- 11 He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 2003; 93(1): 32–39.
- 12 Jonsson MK, Duker G, Tropp C, Andersson B, Sartipy P, Vos MA, van Veen TA. Quantified proarrhythmic potential of selected human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 2010; 4(3): 189–200.
- 13 Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC. Human

- induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ Res* 2015; 117(1): 80–88.
- 14 Priori SG, Napolitano C, Di Pasquale E, Condorelli G. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in studies of inherited arrhythmias. *J Clin Invest* 2013; 123(1): 84–91.
- 15 Paci M, Hyttinen J, Rodriguez B, Severi S. Human induced pluripotent stem cell-derived versus adult cardiomyocytes: an in silico electrophysiological study on effects of ionic current block. *Br J Pharmacol* 2015; 172(21): 5147–5160.
- 16 Kim JJ, Yang L, Lin B, Zhu X, Sun B, Kaplan AD, Bett GC, Rasmusson RL, London B, Salama G. Mechanism of automaticity in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 81: 81–93.
- 17 Du DT, Hellen N, Kane C, Terracciano CM. Action potential morphology of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes does not predict cardiac chamber specificity and is dependent on cell density. *Biophys J* 2015; 108(1): 1–4.