

# 诱导性多能干细胞联合基因编辑技术在遗传性心脏病研究中的应用进展

张莹\*

(哈尔滨医科大学药学院药理学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**[摘要]** 遗传性心脏病是发生恶性心律失常和心源性猝死的主要原因,但目前对其发生机制的研究还处于起步阶段。基因编辑技术的发展使遗传性心脏病的根治成为可能。综述遗传性心脏病的分子机制、诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)及其分化的心肌细胞(iPSC-derived cardiomyocyte, iPSC-CM)与基因编辑技术的研究进展,重点介绍 iPSC, iPSC-CM 与基因编辑技术在建立遗传性心脏病的人源性细胞模型和探索治疗新方式方面的应用。

**[关键词]** 遗传性心脏病;诱导性多能干细胞;基因编辑

**[中图分类号]** Q812

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1001-5094(2023)12-0905-10

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2023.12.004

## Combined Application of Induced Pluripotent Stem Cells and Gene Editing Technology in the Research of Inherited Heart Disease

ZHANG Ying

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

**[Abstract]** Inherited heart disease is the main cause of malignant arrhythmia and sudden cardiac death, but little is known about its mechanism. Advances in gene editing technology have made it possible to cure inherited heart disease. Research progress in the molecular mechanism of inherited heart disease, induced pluripotent stem cell (iPSC), iPSC-derived cardiomyocyte (iPSC-CM) and gene editing technology were reviewed, with focus on the application of iPSC, iPSC-CM and gene editing technology in establishing human cell models of inherited heart disease and exploring new treatment options.

**[Key words]** inherited heart disease; induced pluripotent stem cell; gene editing

遗传性心脏病是一类由基因突变引起的心脏病,是发生恶性心律失常和心源性猝死的主要原因。《中国心血管健康与疾病报告 2020》显示,我国遗传性心脏病的新生儿检出率为 8.98%<sup>[1]</sup>,其中遗传因素为常染色体显性遗传的遗传概率介于 10%~50%。目前,遗传性心脏病的治疗手段包括药物治疗和手术治疗。常用的治疗药物包括β肾上腺素能受体阻滞剂、延长动作电位时程(action potential duration, APD)药、钙通道阻滞剂和肾素-血管

紧张素-醛固酮系统抑制剂。手术治疗包括室间隔心肌切除术、心内膜剥脱术、心脏移植手术等<sup>[2]</sup>。尽管上述治疗手段取得了一定的疗效,但是遗传性心脏病患病率和病死率仍然居高不下。因此,探究遗传性心脏病的病理生理学新机制和防治新靶点具有重要的社会意义。诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)及其分化的心肌细胞(iPSC-derived cardiomyocyte, iPSC-CM)模型具有来源广泛、不涉及胚胎干细胞相应的伦理问题、精确模拟宿主遗传背景等诸多优势。因此,近年来 iPSC 及 iPSC-CM 模型广泛用于研究遗传性心脏病的发病机制、遗传倾向、精准靶向治疗和药物筛选。本文将简介遗传性心脏病的分子致病机制、iPSC 和 iPSC-CM 以及规律间隔成簇短回文重复序列及其相关核酸酶 9 (clustered regularly interspaced short

**接受日期:** 2023-10-19

**项目资助:** 国家自然科学基金面上项目 (No. 81970320, No. 82370417)

**\* 通信作者:** 张莹, 教授;

**研究方向:** 心血管疾病的表观遗传学新机制;

**Tel:** 0451-86671354; **E-mail:** jennyng223@126.com

palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9) 基因编辑技术的研究进展, 重点阐述 iPSC, iPSC-CM 与 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在建立遗传性心脏病细胞模型和探索治疗新方式方面的应用。

## 1 遗传性心脏病致病机制

根据发病原因可将遗传性心脏病分为离子通道病和遗传性心肌病。心肌细胞膜上的离子通道对维持心肌细胞的电生理稳态具有重要作用, 由于离子通道编码基因突变导致其结构和功能改变的一类疾病称为离子通道病。目前已明确的遗传性心脏离子通道病包括长 Q-T 间期综合征 (long Q-T syndrome, LQTS)、Brugada 综合征 (Brugada syndrome, BrS)、短 Q-T 间期综合征 (short Q-T syndrome, SQTS) 和儿茶酚胺敏感的多形性室性心动过速 (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT) 等。遗传性心肌病包括遗传性肥厚型心肌病 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM)、扩张型心肌病 (dilated Cardiomyopathy, DCM) 以及其他未分类的心肌病<sup>[3]</sup>。

### 1.1 LQTS

LQTS 心电图表现为 Q-T 间期延长, 出现尖端扭转型室性心动过速, 严重者出现晕厥及心源性猝死<sup>[4]</sup>。遗传性 LQTS 是由基因缺陷引起的心肌细胞复极异常引起的。常染色体隐性遗传 LQTS 是由 *KCNQ1* 和 *KCNE1* 这 2 种基因突变引起的。常染色体显性遗传 LQTS 最常见的 3 种突变基因为 *KCNQ1*, *KCNH2* 和 *SCN5A*, 分别对应 LQTS1, LQTS2 和 LQTS3。Kapa 等<sup>[5]</sup> 在 388 例不相关的 LQTS 病例和 1 300 个健康对照之间, 对 LQTS 突变的类型、频率和位置进行比较; 结果发现 LQTS 病例组基因突变的发生率是对照组的 10 倍, 其中错义突变最常见, 分别占 *KCNQ1*, *KCNH2* 和 *SCN5A* 总突变的 78%, 67% 和 89%。此外, 常染色体显性遗传 LQTS 还存在 *ANK2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *CACNA1C* 和 *CAV3* 突变基因<sup>[6-7]</sup>。

### 1.2 BrS

BrS 心电图表现为多形性室速和室颤, 常出现

晕厥反复发作甚至发生心源性猝死。BrS 是发生于常染色体的显性遗传性离子通道病, 目前已发现其致病基因包括 *SCN5A*, *SCN10A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *KCNH2*, *KCND2*, *KCND3*, *KCNE3*, *CACNA1C*, *CACNA2D1*, *CACNB2* 和 *HCN4* 等<sup>[8]</sup>。上述基因的突变最终破坏了动作电位早期阶段的离子平衡, 导致钠离子和钙离子内流减少或钾离子外流增加, 发生恶性心律失常。在上述基因中以 *SCN5A* 的突变最为常见, 对 BrS 患者的基因学检测发现其 *SCN5A* 基因突变占比达 15%~20%, 而在 BrS 家族史的人群中这一比例高达 40%<sup>[9]</sup>。

### 1.3 SQTS

SQTS 心电图表现为 Q-T 间期明显缩短, 常出现多形性室速及室颤, 严重者甚至发生晕厥、心脏骤停及心源性猝死。目前已发现其致病基因包括 *KCNH2*, *KANQ1*, *KCNJ2*, *CACNA1C*, *CACNB2b* 及 *SCN5A* 基因<sup>[10]</sup>。其中 *KCNH2*, *KCNQ1*, *KCNJ2* 基因编码心肌细胞膜上钾通道, *CACNA1C*, *CACNB2b*, *CACNA2D1* 基因编码心肌细胞膜上钙通道, *SCN5A* 基因编码心肌细胞膜上的钠通道  $\alpha$  亚单位, *SLC4A3* 基因编码  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交换体。上述基因的突变最终破坏了动作电位复极过程中  $I_{\text{Na}}$ ,  $I_{\text{Cl}}$ ,  $I_{\text{Ca}}$  内流和  $I_{\text{K}}$  外流之间的动态平衡, 从而发生 Q-T 间期缩短。

### 1.4 CPVT

CPVT 是好发于青少年的肾上腺素依赖的遗传性心脏离子通道病, 常在运动或情绪激动时发生双向、多形性室速, 甚至发生晕厥和恶性心律失常。CPVT 为常染色体显性遗传病, 目前已发现的致病基因包括 *RYR2*, *CASQ2*, *CALMI*, *TRDN* 和 *KCNJ2*<sup>[11]</sup>。上述基因的突变增加了离子通道对肾上腺素的敏感性并最终引起在交感神经兴奋下的肌浆网钙泄漏, 同时肌浆网储存和缓冲钙离子的能力下降, 心肌细胞内持续性钙离子浓度的增加引发迟后除极和触发冲动。

### 1.5 HCM

HCM 是一类具有遗传异质性的器质性心脏病, 人群发病率为 0.1%~0.2%, 心动超声表现为心室 [左心室和 (或) 右心室] 和室间隔不对称肥厚、

心室顺应性降低,当心脏收缩时出现左心室流出道梗阻则称为梗阻性肥厚型心肌病,是心源性猝死的常见原因。目前已发现的致病基因包括 *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1* 和 *ACTC1*<sup>[12]</sup>。上述基因突变在病理组织学中表现为心肌细胞异常肥大并且排列紊乱,肌束呈螺旋状并且收缩能力降低,成纤维细胞增殖并最终引起心肌纤维化,上述改变最终导致了心脏舒张期功能障碍和心律失常的易感性。

### 1.6 DCM

DCM 是一类具有遗传倾向的以左心室或双心室扩大同时伴收缩功能障碍和充血性心力衰竭的心肌病。先天性 DCM 的致病基因突变检出率高达 40%~60%<sup>[13]</sup>。DCM 的致病基因具有显著的异质性,可为常染色体显性遗传、线粒体遗传以及 X 连锁遗传。目前已发现的致病基因包括 *PLN*, *RBM20*, *TnT*, *FLNC*, *DMD*, *EMD*, *LMNA*, *MYH7*, *LMNA* 等编码细胞骨架、Z 带相关蛋白、核膜、离子通道、线粒体 DNA 和收缩蛋白等多种基因<sup>[14]</sup>。上述基因的突变最终引发心肌对生物机械性应激的易感性增加从而发生收缩和调节功能障碍。

## 2 iPSC, iPSC-CM 与 CRISPR/Cas9 技术的研究进展

### 2.1 iPSC 和 iPSC-CM

2006 年, Takahashi 等<sup>[15]</sup>首次通过病毒载体系统向小鼠成纤维细胞导入 *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* 和 *Klf4* 4 种基因,成功地将已分化成熟的小鼠正常体细胞去分化重编程为胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 样细胞,并命名为 iPSC。iPSC 在细胞形态、端粒酶活性、核型以及细胞表面标志物方面均与 ESC 相似,且 iPSC 具有全能性、安全性以及疾病特异性,因此被广泛应用于疾病和药物的研究领域。由于 *c-Myc* 是致癌基因, *Klf4* 也有一定的致癌性,携带这些基因的病毒转录到体细胞中可使其激活和表达从而导致癌变,因此研究人员一直致力于研究如何能减少 iPSC 癌变的发生。Stadtfield 等<sup>[16]</sup>应用腺病毒及质粒作为载体从而降低了 iPSC 的肿瘤发生率; Miyazaki 等<sup>[17]</sup>使用 3 种成熟的微核糖核苷

酸 (miR-200c, miR-302 和 miR-369) 直接转染小鼠和人类细胞得到了表达水平更高的 ESC 和 iPSC,显著降低了突变率和肿瘤发生率,这些研究为 iPSC 的临床研究提供了保证。由于 iPSC 来源的心肌细胞具有携带疾病特异基因的特点,研究人员将其应用于遗传性心脏病领域的研究中。例如,研究人员已经成功建立 LQTS, BrS, SQTS, CPVT, HCM 和 DCM 患者来源的 iPSC-CM 检测平台,并在此平台上探究遗传性心脏病的发病机制和治疗新方式。

### 2.2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

CRISPR/Cas9 系统作为基因编辑技术能够对 DNA 进行高精度编辑,从而改变或修复 DNA。CRISPR/Cas9 最初是细菌用于抵抗病毒入侵的天然防御机制。1987 年,1 个特殊的重复间隔序列——CRISPR 序列在大肠埃希菌的基因组中首次被发现。原核生物通过 CRISPR 序列在重复单元之间进行识别,发挥生物学功能。继而 CRISPR 区域的转录以及 Cas 蛋白将前 CRISPR 来源的 RNA (CRISPR-derived RNA, crRNA) 切割为成熟的 crRNA 成为 CRISPR/Cas9 系统抗病毒防御阶段的分子基础。2013 年, Mali 等<sup>[18]</sup>设计了 II 型细菌 CRISPR 系统,能够对目标位点进行多重编辑。2015 年, Jiang 等<sup>[19]</sup>通过靶向的、连续的多基因 CRISPR/Cas9 编辑策略实现了精确的基因缺失和插入修饰。随后 CRISPR/Cas9 系统相关新进展新突破不断涌现,例如,应用于 iPSC 的 CRISPR 可以在与疾病相关的基因中靶向性地引入突变<sup>[20]</sup>。通过 CRISPR/Cas9 技术敲除致病基因或插入有益基因为遗传性疾病甚至是癌症开辟了基因疗法的新领域,成为生命科学领域最有前景的技术之一。

### 2.3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在干细胞治疗中的应用

在干细胞治疗领域存在细胞替代疗法和基因纠正疗法,然而某些疾病通过单纯干细胞替代治疗并不能取得令人十分满意的效果,而通过工具病毒携带外源目的基因在治疗遗传病方面虽然具有较好的治疗效果,但由于其能够整合到干细胞的基因组中,而存在一定的致瘤风险。目前, CRISPR/Cas9 基因编辑技术通过对干细胞进行精准的基因敲入、敲除

和定向碱基修复, 广泛应用于致病基因的纠正、干细胞功能的增强、免疫细胞的定制、疾病模型的建立和药物的筛选等方面, 大大增加了干细胞治疗的安全性和有效性。例如应用 CRISPR/Cas9 技术对人类因子Ⅷ体内基因组编辑显著改善了小鼠的 A 型血友病症状<sup>[21]</sup>; 应用全基因组 CRISPR/Cas9 筛选技术发现了多个能够延缓人间充质干细胞衰老的关键基因; 通过 CRISPR/Cas9 编辑免疫细胞的受体基因, 能够使其对肿瘤细胞进行更有效的识别和攻击; 通过 CRISPR/Cas9 编辑人类 ESC 或 iPSC, 用于创建各种遗传性疾病的人源性模型, 从而为精准治疗和个体化治疗奠定基础; CRISPR/Cas9 技术可以通过编辑药物作用的靶基因, 评价药物治疗效果和副作用, 从而优化药物设计和开发。

### 3 应用 iPSC 与 CRISPR/Cas9 技术研究遗传性心脏病

#### 3.1 iPSC 与 CRISPR/Cas9 技术在 LQTS 研究中的应用

*KCNQ1* 基因编码钾通道蛋白 Kv7.1, 参与心肌细胞中缓慢激活延迟整流钾电流 (slow activating delayed rectifier potassium current,  $I_{Ks}$ ) 的形成。*KCNQ1* 是 LQTS 中最常见的突变基因之一。*KCNQ1* 突变导致 Kv7.1 通道功能异常, 从而引起心肌细胞复极过程延长, 发生 LQTS1。Wuriyanghai 等<sup>[22]</sup> 将携带有 *KCNQ1* (A344Aspl) 突变的 LQTS1 患者外周血单核细胞成功诱导重编程为 iPSC, 并诱导分化为 iPSC-CM, 获得具有 *KCNQ1* (A344Aspl) 突变的体外 LQTS1 疾病模型, 该模型显示出更长的 APD 和更复杂的异常剪接, 而 Kv7.1 钾离子通道激动剂 ML277 和 PBA 可以显著改善上述改变。Dotzler 等<sup>[23]</sup> 从 4 名 LQTS1 患者 (*KCNQ1*-Y171X, -V254M, -I567S 和 -A344Aspl) 中获得疾病特异性的 iPSC-CM, 通过双组分抑制和替代 *KCNQ1* 基因疗法成功缩短 APD 并消除 LQTS1 的病理特征。

*KCNH2* 基因编码心脏快速激活延迟整流钾通道 (rapid activating delayed rectifier potassium current,  $I_{Kr}$ ) 的  $\alpha$  亚基, 其发生突变能够引起 LQTS2。Chai 等<sup>[24]</sup> 将携带有 *KCNH2* (R752W) 突变的 5 位

LQTS2 患者体细胞分别重编程并诱导分化为 iPSC-CMs, 发现该 R752W-hiPSC-CMs 中  $I_{Kr}$  的电流密度显著降低, L 型钙电流 (L-type calcium current,  $I_{Ca-L}$ ) 的电流密度显著增加。全外显子组测序鉴定发现 *KCNK17* 和 GTP 结合蛋白 *REM2* 发生突变。采用 CRISPR/Cas9 技术纠正 *REM2* 突变能够使  $I_{Ca-L}$  电流密度和 APD 恢复正常。

*SCN5A* 基因编码钠通道蛋白, 其发生突变能够引起 LQTS3。Malan 等<sup>[25]</sup> 将 *SCN5A* 缺失的转基因鼠胚胎成纤维细胞重编程并分化为 iPSC-CM, 建立 LQTS3 小鼠疾病特异性心肌细胞模型, 同时该 LQTS3 特异性的 iPSC-CM 具有动作电位延长、早期后除极等典型的 LQTS3 病理特征。Spencer 等<sup>[26]</sup> 获得了携带有 *SCN5A* (N406K) 突变的 LQTS3 患者特异性的 iPSC-CM, 该心肌细胞具有 APD 和钙瞬变延长的典型特征, 同时应用钙离子拮抗剂硝苯地平能显著缩短 APD。

Kashiwa 等<sup>[27]</sup> 发现携带有 *CACNA1C* (E1115K) 突变的 LQTS 患者特异性的 iPSC-CM 同时具有 LQTS, BrS 和轻度心功能障碍的重叠表型, 即 APD 延长、钙电流密度降低。晚钠电流抑制剂 (美西汀和 GS-458967) 能够特异性缩短 E1115K-iPSC-CMs 中的 APD, 并且应用 CRISPR/cas9 基因编辑技术纠正 E1115K 的错义突变也能挽救突变细胞的电生理表型。

#### 3.2 iPSC 与 CRISPR/Cas9 技术在 BrS 研究中的应用

*SCN5A* 基因编码心脏钠通道  $\alpha$  亚单位, 在心脏中表达 Nav1.5 钠通道蛋白, 是 BrS 最常见的遗传性致病基因。Ma 等<sup>[28]</sup> 发现携带有 *SCN5A* (A226V 和 R1629X) 双突变的 iPSC-CM 中存在严重的  $I_{Na}$  缺失和瞬间外向钾电流 (transient outward  $K^+$  current,  $I_{to}$ ) 升高, 提示心肌细胞复极化缺陷是 BrS 患者出现恶性心律失常的直接原因。Cai 等<sup>[29]</sup> 发现携带有 *SCN5A* (T1788fs) 突变的 iPSC-CM 中除了存在常见的  $I_{Na}$  缺失和 APD 缩短, 还伴随着 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的异常激活。其机制是 Nav1.5 能够与  $\beta$ -catenin 相互作用, 当 Nav1.5 的表达降低时导致  $\beta$ -catenin 在 T1788fs-iPSC-CM 中重新定位, 从而异常激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 阻断 *SCN5A*

的转录过程。抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可挽救该 T1788fs-iPSC-CM 模型中 Nav1.5 的表达缺陷和异常节律的表型。Lu 等<sup>[30]</sup>在携带有 SCN5A (R620H 和 R811H) 双突变的 iPSC-CM 和携带有 SCN5A 单碱基对 (4190  $\Delta$ A) 缺失突变的 iPSC-CM 中均发现抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可通过转录和转录后机制上调 BrS 患者的 iPSC-CM 中的 Nav1.5 表达水平。

心脏转录因子 TBX5 属于 T-box 转录因子家族, 在心脏的发育过程中发挥重要的调控作用, TBX5 基因突变可导致 Holt-Oram 综合征等多种先天性心脏病。Bersell 等<sup>[31]</sup>在携带有 TBX5 (G145R) 突变的 iPSC-CM 中发现多种电生理异常现象, 例如峰值降低和心脏晚期钠电流增强, 并且血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 受体介导的磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 信号通路的阻断是导致晚期钠电流增强的直接原因。同时通过 CRISPR/Cas9 进行 TBX5 突变基因纠正能够改善上述电生理异常。

CACNB2 是钙电压门控通道辅助亚基  $\beta_2$  的编码基因, 在心脏中表达 Cav3.2 钙通道蛋白。CACNB2 是 BrS 的致病基因之一, Zhong 等<sup>[32]</sup>在携带有 CACNB2 (S142F) 突变的 iPSC-CM 中发现 L 型钙通道功能缺失, 失活曲线右移, 复活速度加快。通过 CRISPR/Cas9 进行 CACNB2 突变基因纠正能够恢复 L 型钙通道功能。低浓度的  $\beta$  受体阻滞剂 (比索洛尔) 和奎尼丁可纠正 CACNB2 突变导致的这种电生理异常。

### 3.3 iPSC 与 CRISPR/Cas9 技术在 SQTS 研究中的应用

SQTS 的第 1 个遗传改变是在 KCNH2 基因中发现的, 该基因编码电压激活钾通道的 1 个成孔亚基, 参与心脏  $I_{Kr}$  的形成。El-Battrawy 等<sup>[33]</sup>将 1 名携带有 KCNH2 (N588K) 突变的 SQTS1 患者的皮肤成纤维细胞重编程并分化为 iPSC-CM, 该 N588K-iPSC-CM 出现  $I_{Kr}$  增加、APD 缩短、异常钙瞬变和异常节律活动等 SQTS 的典型特征。奎尼丁能够纠正卡巴胆碱在该 N588K-iPSC-CM 中引起的 APD 缩短和节律异常。Xu 等<sup>[34]</sup>也发现混合电压和频率依赖性的钠通道和钾通道阻滞剂 维那卡兰 (vernakalant) 在携带有 N588K 突变的

SQTS1 患者的 iPSC-CM 中能够增加钠钙交换电流 ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange current,  $I_{NCX}$ ) 和晚钠电流 (late sodium current,  $I_{NaL}$ ) 并延长 APD、降低异常节律。这表明维那卡兰有望成为 SQTS1 的潜在治疗药物。Gruber 等<sup>[35]</sup>使用光遗传学跨场刺激建立了基于 SQTS-iPSC-CM 的折返性心律失常组织模型, 并设计了 APD 调制光遗传学方案, 通过动态延长 APD 来抑制心律失常的发生。Guo 等<sup>[36]</sup>应用 CRISPR/Cas9 纠正 SQTS1 患者 iPSC-CM 细胞中的 KCNH2 (T618I) 突变后, APD 和心脏节律都恢复正常; 同时他们还发现不仅奎尼丁对 SQTS 的 KCNH2 (T618I) 突变有治疗作用, 短肽蝎子毒素 BmKKx2 也可以通过靶向 KCNH2 有效地恢复 Q-T 间期长度。

CACNB2 也是 SQTS5 的致病基因之一, 其导致的 SQTS5 属于常染色体显性遗传。El-Battrawy 等<sup>[37]</sup>利用 CRISPR/Cas9 基因编辑的 iPSC 系, 发现 CACNB2 (S480L) 突变与 SQTS 的 APD 缩短、 $I_{Ca-L}$  电流密度和  $I_{Na}$  电流密度降低以及心律失常事件增加有关。同时 PI3K/ 蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 又称 Akt) 活性在 SQTS5 中显著降低, 而该信号通路的激动剂可以挽救这些病理表型的改变。Zhong 等<sup>[38]</sup>发现在 CACNB2 (S480L) 突变的 iPSC-CMs 中, CACNB2 基因启动子区甲基化增强引起 CACNB2 蛋白表达减少, 最终导致  $I_{Ca-L}$  电流密度降低, APD 缩短, 而应用 CRISPR/Cas9 纠正这一突变可以改善 SQTS5 的病理特征表型。

### 3.4 iPSC 与 CRISPR/Cas9 技术在 CPVT 研究中的应用

兰尼碱受体 (Ryanodine receptor 2, RYR2) 是引起 CPVT 最常见的常染色体显性遗传突变基因, 其突变率达到 60%, RYR2 的功能缺失能够引起肌浆网中的钙离子不受控制的泄漏, 使心肌细胞发生持续性去极化, 最终可能引发致命性心律失常。Kong 等<sup>[39]</sup>获得了携带有 RYR2 的单个错义杂合子突变的 2 种 iPSC 系。Colombani 等<sup>[40]</sup>从 1 名 11 岁 CPVT 患者的血细胞中获得了携带有 RYR2 的 N 端第 8 外显子的错义杂合突变的 iPSC 系, 该重编程的 CPVT-iPSC 系核型正常, 可正确表达多能性标记基因, 并具有分化为三胚层的能力, CPVT-iPSC 谱系的建立为 CPVT 的病理生理学机制研究和筛选治疗

药物提供了新的平台。Zhang 等<sup>[41]</sup>对携带有 *RYR2* (F2483I) 突变的 iPSC 进行了深入的钙信号机制探究,发现该细胞系具有异常单一的钙信号、较弱的钙储存能力、更高的钙诱导钙释放增益和对肾上腺素的高度敏感性。Wan 等<sup>[42]</sup>从一系列天然产物中成功鉴定出新型的 *RYR2* 稳定剂 Z16b,发现在携带有 *RYR2* (R2401H) 突变的 iPSC-CM 中,Z16b 可通过与 *RYR2* 相互作用,增强 *RYR2* 的 N 端和中心结构域的“压缩”状态,从而抑制携带杂合 *RYR2* (R2401H) 突变所导致的异常钙火花和钙释放事件,因此 Z16b 有望用于设计更安全、更有效的治疗 CPVT 的药物。Sasaki 等<sup>[43]</sup>获得了携带有 *RYR2* (I4587V) 突变的 iPSC,异丙肾上腺素能够使该 I4587V-iPSC-CM 发生严重的迟后除极,而给予 1,4-苯并噻唑类衍生物 S107 后能够显著抑制迟后除极的发生。该模型为研究 CPVT 机制和筛选药物提供了有前景的平台。

反式-2,3-烯酰基辅酶 A 还原酶样蛋白 (*trans*-2,3-enoyl-CoA reductase-like protein, TECRL) 是定在内质网的蛋白质,在维持心肌细胞钙稳态中发挥重要作用,其突变可引起常染色体隐性遗传性心律失常综合征。Liu 等<sup>[44]</sup>建立了 TECRL 突变型 iPSC-CM,为 CPVT 相关 TECRL 突变的进一步基因编辑和功能研究提供了细胞疾病模型。

钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 是重要的钙结合信使蛋白质,通过与 L 型钙通道和 *RYR2* 等蛋白质结合参与多个钙诱导的细胞进程。*CALM2* 是编码 CaM 的关键基因,Gao 等<sup>[45]</sup>获得了携带有 *CALM2* (E46K) 突变的 iPSC-CM,发现 E46K-CaM 与 *RYR2* 结合亲和力增加了 10 倍并最终发生异常电传导和钙信号。同时抗心律失常药物纳多洛尔和氟卡奈德能够抑制该 E46K-iPSC-CM 中异常钙波,具有治疗 E46K-CaM 型 CPVT 的潜力。

### 3.5 iPSC 与 CRISPR/Cas9 技术在 HCM 研究中的应用

肌球蛋白结合蛋白 C3 (myosin binding protein C3, *MYBPC3*) 是引起 HCM 的常见突变基因,该突变多导致密码子提前终止。Seeger 等<sup>[46]</sup>获得了携带有 *MYBPC3* 提前终止密码子 (premature termination codon, PTC) 突变的 iPSC-CM 并进一步探究其病理机制。研究发现 HCM iPSC-CMs 中钙

稳态失衡,钙衰变动力学延长,舒张期细胞内钙升高。

$\beta$ -肌球蛋白是驱动心肌细胞收缩的主要蛋白质,其  $\beta$ -肌球蛋白重链 7 (myosin heavy chain 7, *MYH7*) 基因突变与 HCM 的发生密切相关。Vander Roest 等<sup>[47]</sup>获得了携带有 *MYH7* (P710R) 突变的 iPSC-CM,发现与其他类型的基因突变相比,P710R 突变的 iPSC-CM 中肌球蛋白的运动速度和肌动蛋白激活的 ATP 酶活性均显著降低,并且出现心肌细胞肥大和细胞骨架重构。同时抑制细胞外调节蛋白激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 或 Akt 可以逆转 P710R 突变引起的心肌细胞肥大。为了确定早期 HCM 的触发因子,Hsieh 等<sup>[48]</sup>通过基因编辑的方式获得了单基因 *MYH7* (R723C) 突变的和双基因 *MYH7* (R723C) /*MYH6* (R725C) 突变的 iPSC-CM。上述编辑后的心肌细胞表现出与晚期 HCM 一致的表型特征,即细胞肥大、多核、钙稳态失衡、代谢改变和心律失常。同时 *MYH7*/*MYH6* 双突变的 iPSC-CM 发生细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 重塑,整合素表达水平改变以及细胞与 ECM 粘连中断。Escribá 等<sup>[49]</sup>应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术生成了具有致病性截断变异的 *MYBPC3* 基因 (p.Lys600Asnfs\*2) 的 iPSC-CM,该心肌细胞具有明显的兴奋-收缩偶联的改变。同时全外显子组测序发现了未知的 *MYH7* 基因变体 (p.Ile1927phe),该变体与 *MYBPC3* 中的截断变异联合发现时可以认为是 HCM 表达性的修饰因子。

舒张功能障碍 (diastolic dysfunction, DD) 在 HCM 患者中很常见,Wu 等<sup>[50]</sup>为了建立 HCM 患者 DD 的机制研究与药物开发平台,构建了携带有 *MYH7* (R663H), *MYBPC3* (V321M), *MYBPC3* (V219L) 和 *TNNT2* (R92W) 突变的 DD-HCM 患者特异性的 iPSC-CM。研究发现发生上述突变的 iPSC-CM 中心肌细胞舒张功能严重受损,具体表现为舒张时间延长,舒张速率降低,舒张肌节长度缩短。同时心肌细胞内发生钙稳态异常,即舒张期细胞内钙浓度升高和钙循环受阻。通过部分阻断钙电流或晚钠电流能够重塑钙稳态、挽救心肌细胞舒张功能和提高心肌细胞存活率。

### 3.6 iPSC 与 CRISPR/Cas9 技术在 DCM 研究中的应用

受磷蛋白 (phospholamban, PLN) 是定位在肌浆网中的单跨膜蛋白, 通过抑制肌浆网钙 ATPase (SERCA2a) 的活性调控钙离子循环。PLN 是遗传性 DCM 的致病基因, 其功能的降低可引起心肌细胞内钙稳态失衡并最终导致心衰。Jiang 等<sup>[51]</sup> 利用 CRISPR/Cas9 技术在 iPSC-CM 中敲除 PLN 60 天后, 该心肌细胞出现典型的心衰表型 [ 心肌细胞收缩力降低、线粒体损伤、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 蓄积、能量代谢和钙稳态失衡 ]。在上述细胞模型上应用抗心律失常药物雷诺嗪可显著改善细胞能量代谢和钙稳态。

RNA 结合基序蛋白 20 (RNA-binding motif protein 20, RBM20) 是一类心脏剪接因子, 其突变可导致恶性遗传性 DCM。Fenix 等<sup>[52]</sup> 在 iPSC 衍生的心脏工程组织中发现 RBM20 发生 R636S 错义突变后通过剪接依赖性和非依赖性 2 种途径复制了 DCM 表型。Nishiyama 等<sup>[53]</sup> 应用 CRISPR/Cas9 技术在 iPSC-CM 中纠正了 RBM20 基因所发生的 R636S 错义突变后, RBM20 恢复了正确的核定位, 心肌细胞中基因的选择性剪接也恢复正常。同时, 纯合子 (R636Q/R636Q) 小鼠出现严重的心功能障碍、心力衰竭和心源性猝死。通过腺相关病毒向这些小鼠全身递送 ABEmax-VRQR-SpCas9 后可显著改善小鼠心功能并延长寿命。这些发现表明, 基因突变的精确校正是治疗 DCM 的新方法。

肌钙蛋白 T (troponin T, TnT) 基因突变是导致家族性 DCM 的主要原因, Jung 等<sup>[54]</sup> 对携带有

TnT (R173W) 突变基因的患者特异性 iPSC-CM 进行深入分析, 发现此类细胞对 APD 和细胞内钙的刺激阈值显著降低, 应用钙离子脱敏剂后钙离子动力学和钙瞬变恢复正常。这一发现表明, 钙离子敏感性的调节有望成为 DCM 治疗的关键靶点, 而患者特异性 iPSC-CM 为 DCM 的新药研发和个体化治疗提供了理想的细胞模型。

丝蛋白 C (filamin C, FLNC) 截短突变 (FLNctv) 是遗传性 DCM 的普遍原因, Chen 等<sup>[55]</sup> 利用患者特异性 iPSC-CM 研究了 FLNctv 在 DCM 中的发病机制。研究发现来自 2 个不同 FLNctv 突变患者的 iPSC-CM 表现明显的心律失常和收缩障碍; 同时在 iPSC-CM 中发现 FLNC 缺乏可激活 PDGFRA 通路, 而抑制该途径是 FLNC 相关 DCM 的潜在治疗策略<sup>[55]</sup>。Qin 等<sup>[56]</sup> 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在胚胎干细胞系 H9 中成功构建了 FLNC 敲除细胞系 WAe009-A-70, 为探索 FLNC 基因在 DCM 中的作用提供了理想的机制研究和药物筛选平台。

## 4 总结与展望

iPSC 和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在遗传性心脏病的机制研究和药物筛选领域发挥着非常重要的作用。但目前 iPSC 技术仍处于起步阶段, 例如 iPSC 不能完全模拟疾病体内模型、存在潜在的致病风险和分化后的 iPSC 常混杂有分化与非分化表型。因此, 仍需在深入研究并优化 iPSC 的分化程序、构建 iPSC 心脏类器官和推动 iPSC 临床转化等方面不断努力以实现突破。

### 【参考文献】

- [1] 中国心血管健康与疾病报告 2022 要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2023, 28(4): 297-312.
- [2] Sun R R, Liu M, Lu L, et al. Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(3): 857-860.
- [3] Lieve K V V, Wilde A A M. Inherited ion channel diseases: a brief review[J]. *Europace*, 2016, 17(suppl\_2): ii1-ii 6.
- [4] Wilde A A M, Amin A S, Postema P G. Diagnosis, management and therapeutic strategies for congenital long QT syndrome[J]. *Heart*, 2022, 108(5): 332-338.
- [5] Kapa S, Tester D J, Salisbury B A, et al. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants[J]. *Circulation*, 2009, 120(18): 1752-1760.
- [6] Splawski I, Shen J, Timothy K W, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes: *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1*, and *KCNE2*[J]. *Circulation*, 2000, 102(10): 1178-1185.
- [7] Splawski I, Timothy K W, Sharpe L M, et al. CaV1. 2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including

- arrhythmia and autism[J]. *Cell*, 2004, 119(1): 19–31.
- [8] Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, *et al.* Cardiac channelopathies and sudden death: recent clinical and genetic advances[J/OL]. *Biology*, 2017, 6(1): 7[2023-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372000/>. DOI: 10.3390/biology6010007.
- [9] Kapplinger J D, Tester D J, Alders M, *et al.* An international compendium of mutations in the *SCN5A*-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing[J]. *Heart rhythm*, 2010, 7(1): 33–46.
- [10] Rudic B, Schimpf R, Borggrefe M. Short QT syndrome—review of diagnosis and treatment[J]. *Arrhythm Electrophysiol Rev*, 2014, 3(2): 76–79.
- [11] Walsh R, Adler A, Amin A S, *et al.* Evaluation of gene validity for CPVT and short QT syndrome in sudden arrhythmic death[J]. *European Heart J*, 2022, 43(15): 1500–1510.
- [12] Patel A P, Dron J S, Wang M, *et al.* Association of pathogenic DNA variants predisposing to cardiomyopathy with cardiovascular disease outcomes and all-cause mortality[J]. *JAMA Cardiol*, 2022, 7(7): 723–732.
- [13] Herman D S, Lam L, Taylor M R G, *et al.* Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(7): 619–628.
- [14] Lakdawala N K, Funke B H, Baxter S, *et al.* Genetic testing for dilated cardiomyopathy in clinical practice[J]. *J Card Fail*, 2012, 18(4): 296–303.
- [15] 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.
- [16] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 945–949.
- [17] Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, *et al.* Emerging methods for preparing iPSC cells[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(9): 773–779.
- [18] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [19] Jiang Y, Chen B, Duan C, *et al.* Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(7): 2506–2514.
- [20] Graul AI, Dulstat C, Cruces E, *等*. 2018 年全球新药研发报告——第 2 部分: 趋势与挑战 (V) [J]. *药学进展*, 2019, 43(9): 701–715.
- [21] Chen H, Shi M, Gilam A, *et al.* Hemophilia A ameliorated in mice by CRISPR-based *in vivo* genome editing of human Factor VIII[J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16838[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31727959/>. DOI: 10.1038/s41598-019-53198-y.
- [22] Wuriyanghai Y, Makiyama T, Sasaki K, *et al.* Complex aberrant splicing in the induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with long QT syndrome carrying *KCNQ1*-A344Aspl mutation[J]. *Heart Rhythm*, 2018, 15(10): 1566–1574.
- [23] Dotzler S M, Kim C S J, Gendron W A C, *et al.* Suppression-replacement *KCNQ1* gene therapy for type 1 long QT syndrome[J]. *Circulation*, 2021, 143(14): 1411–1425.
- [24] Chai S, Wan X, Ramirez-Navarro A, *et al.* Physiological genomics identifies genetic modifiers of long QT syndrome type 2 severity[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(3): 1043–1056.
- [25] Malan D, Friedrichs S, Fleischmann B K, *et al.* Cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical disease-specific features *in vitro*[J]. *Circ Res*, 2011, 109(8): 841–847.
- [26] Spencer C I, Baba S, Nakamura K, *et al.* Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(2): 269–281.
- [27] Kashiwa A, Makiyama T, Kohjitani H, *et al.* Disrupted CaV1. 2 selectivity causes overlapping long QT and Brugada syndrome phenotypes in the CACNA1C-E1115K iPSC cell model[J]. *Heart Rhythm*, 2023, 20(1): 89–99.
- [28] Ma D, Liu Z, Loh L J, *et al.* Identification of an I<sub>Na</sub>-dependent and I<sub>to</sub>-mediated proarrhythmic mechanism in cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells of a Brugada syndrome patient[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11246[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30050137/>. DOI: 10.1038/s41598-018-29574-5.
- [29] Cai D, Wang X, Sun Y, *et al.* Patient-specific iPSC-derived cardiomyocytes reveal aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in *SCN5A*-related Brugada syndrome[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 241[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37679791/>. DOI: 10.1186/s13287-023-03477-3.
- [30] Lu A, Gu R, Chu C, *et al.* Inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling upregulates Nav1. 5 channels in Brugada syndrome iPSC-derived

- cardiomyocytes[J/OL]. *Physiol Rep*, 2023, 11(10): e15696[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37226398/>. DOI: 10.14814/phy2.15696.
- [31] Bersell K R, Yang T, Mosley J D, *et al*. Transcriptional dysregulation underlies both monogenic arrhythmia syndrome and common modifiers of cardiac repolarization[J]. *Circulation*, 2023, 147(10): 824–840.
- [32] Zhong R, Schimanski T, Zhang F, *et al*. A preclinical study on brugada syndrome with a *CACNB2* variant using human cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8313[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35955449/>. DOI: 10.3390/ijms23158313.
- [33] El-Battrawy I, Lan H, Cyganek L, *et al*. Modeling short QT syndrome using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes[J/OL]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(7): e007394[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29574456/>. DOI: 10.1161/JAHA.117.007394.
- [34] Xu Q, Huang X, Meng Z, *et al*. Antiarrhythmic effects of vernakalant in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with short QT syndrome type 1[J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2022, 9(4): 112. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35448088/>. DOI: 10.3390/jcdd9040112.
- [35] Gruber A, Edri O, Huber I, *et al*. Optogenetic modulation of cardiac action potential properties may prevent arrhythmogenesis in short and long QT syndromes[J/OL]. *JCI Insight*, 2021, 6(11): e147470[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34100384/>. DOI: 10.1172/jci.insight.147470
- [36] Guo F, Sun Y, Wang X, *et al*. Patient-specific and gene-corrected induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes elucidate single-cell phenotype of short QT syndrome[J]. *Circ Res*, 2019, 124(1): 66–78.
- [37] El-Battrawy I, Lan H, Cyganek L, *et al*. Deciphering the pathogenic role of a variant with uncertain significance for short QT and Brugada syndromes using gene-edited human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and preclinical drug screening[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(12): e646[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34954893/>. DOI: 10.1002/ctm2.646.
- [38] Zhong R J, Zhang F, Yang Z, *et al*. Epigenetic mechanism of L-type calcium channel  $\beta$ -subunit downregulation in short QT human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes with *CACNB2* mutation[J]. *Europace*, 2022, 24(12): 2028–2036.
- [39] Kong X H, Belbachir N, Zeng W S, *et al*. Generation of two induced pluripotent stem cell lines from catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia patients carrying *RYR2* mutations[J/OL]. *Stem Cell Res*, 2023, 69: 103111[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37210947/>. DOI: 10.1016/j.scr.2023.103111.
- [40] Colombani S, Bernardin A A, Vincenti M, *et al*. Generation of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia patient-specific induced pluripotent stem cell line[J/OL]. *Stem Cell Res*, 2022, 60: 102727[2023-10-19]. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2022.102727>.
- [41] Zhang X H, Haviland S, Wei H, *et al*.  $Ca^{2+}$  signaling in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPS-CM) from normal and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)-afflicted subjects[J]. *Cell Calcium*, 2013, 54(2): 57–70.
- [42] Wan J, Wang G, Qin F, *et al*. Z16b, a natural compound from *Ganoderma cochlear* is a novel RyR2 stabilizer preventing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(9): 2340–2350.
- [43] Sasaki K, Makiyama T, Yoshida Y, *et al*. Patient-specific human induced pluripotent stem cell model assessed with electrical pacing validates S107 as a potential therapeutic agent for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164795[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27764147/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0164795.
- [44] Liu W, Liu T, Xiao T, *et al*. Generation of an induced pluripotent stem cell line from a Chinese Han child with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia[J/OL]. *Stem Cell Res*, 2022, 62: 102811[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35679758/>. DOI: 10.1016/j.scr.2022.102811.
- [45] Gao J, Makiyama T, Yamamoto Y, *et al*. Novel calmodulin variant p. E46K associated with severe catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia produces robust arrhythmogenicity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes[J/OL]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2023, 16(3): e011387[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36866681/>. DOI: 10.1161/CIRCEP.122.011387.
- [46] Seeger T, Shrestha R, Lam C K, *et al*. A premature termination codon mutation in *MYBPC3* causes hypertrophic cardiomyopathy via

- chronic activation of nonsense-mediated decay[J]. *Circulation*, 2019, 139(6): 799-811.
- [47] Vander Roest A S, Liu C, Morck M M, *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy  $\beta$ -cardiac myosin mutation (P710R) leads to hypercontractility by disrupting super relaxed state[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(24): e2025030118[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34117120/>. DOI: 10.1073/pnas.2025030118.
- [48] Hsieh J, Becklin K L, Givens S, *et al.* Myosin heavy chain converter domain mutations drive early-stage changes in extracellular matrix dynamics in hypertrophic cardiomyopathy[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 894635[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35784482/>. DOI: 10.3389/fcell.2022.894635.
- [49] Escribá R, Larrañaga-Moreira J M, Richaud-Patin Y, *et al.* iPSC-based modeling of variable clinical presentation in hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2023, 133(2): 108-119.
- [50] Wu H, Yang H, Rhee J W, *et al.* Modelling diastolic dysfunction in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from hypertrophic cardiomyopathy patients[J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(45): 3685-3695.
- [51] Jiang Y, Li X, Guo T, *et al.* Ranolazine rescues the heart failure phenotype of PLN-deficient human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes[J]. *Stem Cell Reports*, 2022, 17(4): 804-819.
- [52] Fenix A M, Miyaoka Y, Bertero A, *et al.* Gain-of-function cardiomyopathic mutations in *RBM20* rewire splicing regulation and re-distribute ribonucleoprotein granules within processing bodies[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6324[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34732726/>. DOI: 10.1038/s41467-021-26623-y.
- [53] Nishiyama T, Zhang Y, Cui M, *et al.* Precise genomic editing of pathogenic mutations in *RBM20* rescues dilated cardiomyopathy[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(672): eade1633[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36417486/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.ade1633.
- [54] Jung P, Seibert F, Fakuade F E, *et al.* Increased cytosolic calcium buffering contributes to a cellular arrhythmogenic substrate in iPSC-cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy[J/OL]. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117(1): 5[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35499658/>. DOI: 10.1007/s00395-022-00912-z.
- [55] Chen S N, Lam C K, Wan Y W, *et al.* Activation of PDGFRA signaling contributes to filamin C-related arrhythmogenic cardiomyopathy[J/OL]. *Sci Adv*, 2022, 8(8): eabk0052[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35196083/>. DOI: 10.1126/sciadv.abk0052.
- [56] Qin Z, Sun L, Sun X, *et al.* A CRISPR/Cas9 strategy for the generation of a FLNC knockout hESC line (WAe009-A-70) to model dilated cardiomyopathy and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy[J/OL]. *Stem Cell Res*, 2021, 56: 102562[2023-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34634758/>. DOI: 10.1016/j.scr.2021.102562.



**【专家介绍】**张莹：哈尔滨医科大学药学院教授、博导，心血管药物研究教育部重点实验室副主任。中国药理学会抗炎免疫药理专业委员会委员。研究方向为心血管疾病的表观遗传学新机制；建立基于 hiPSC 技术的遗传性心脏病的细胞模型及药物筛选平台。相关文章发表在 *Nat Med*, *Circulation*, *Circ Res*, *J Am Coll Cardiol*, *Nat Commun* 等杂志上，获得国家发明专利授权等多项成果。主持国家自然科学基金青年和面上项目 5 项。