

人诱导多能干细胞用于心血管疾病治疗的研究进展

刘璐¹ 张荣智¹ 牛永慧¹ 周平² 王迎斌¹

(1. 兰州大学第二医院麻醉科, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学口腔医院颌面外科, 甘肃 兰州 730000)

【摘要】 现阶段中国心血管疾病高发, 传统治疗方式包括药物缓解和介入手术治疗, 仅减缓疾病进展而无法逆转已存在的组织损伤, 其治疗周期长、患者依从性低。故急需对此类疾病进行更深入的研究, 以提出更有效的治疗方案, 因此人诱导多能干细胞作为新的突破口为疾病治疗提供了思路。人诱导多能干细胞不仅可直接替代和间接修复受损的细胞, 补偿心脏收缩功能; 还能通过构建特定的疾病模型来作为个体基因组学、蛋白组学的研究平台, 从而深入剖析疾病的机制与进程, 实现疾病个体化预测、预防和治疗, 达到提高患者心脏泵血功能、延长生存期限的最终目的。现对人诱导多能干细胞用于心血管疾病治疗做一综述。

【关键词】 心血管疾病; 人诱导多能干细胞; 再生修复; 疾病建模; 药物筛选

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.11.011

Human Induced Pluripotent Stem Cells in Treatment of Cardiovascular Disease

LIU Lu¹, ZHANG Rongzhi¹, NIU Yonghui¹, ZHOU Ping², WANG Yingbin¹

(1. Department of Anesthesiology, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China; 2. Department of Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China)

【Abstract】 At present, the incidence of cardiovascular disease is high in China. Traditional treatment methods, including drug relief and interventional surgery, only slow down the progression of the disease but cannot reverse the existing tissue damage, with long treatment cycle and low patient compliance. So there is an urgent need to conduct in-depth research on these diseases to propose more effective treatment. Therefore, human induced pluripotent stem cells, as a new breakthrough, offer a new idea for disease treatment. Human induced pluripotent stem cells can not only directly replace and indirectly repair damaged cells, but also compensate for the cardiac systolic function. It can also build a particular disease model as a research platform for studying individual genomics and proteomics, so as to further analyze the mechanism and process of disease, achieve individualized disease prediction, prevention and treatment, and achieve the ultimate goal of improving the heart pumping function and extending the survival period of patients. This article briefly reviews the application of human induced pluripotent stem cells in the treatment of cardiovascular disease.

【Keywords】 Cardiovascular disease; Human induced pluripotent stem cells; Regenerative repair; Disease modeling; Drug screening

心血管疾病是全球范围内导致活动能力丧失最常见的病因之一, 目前中国约 3.3 亿人患病, 现有治疗方式仅延缓疾病进展, 难以逆转已存在的心血管损伤, 最终则进展为器官衰竭^[1]。因此如何逆转心血管损伤, 成为临床治疗领域的关键。干细胞凭借其干性优势成为焦点, 其中人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 可诱导分化成心血管细胞, 不仅能通过直接替代和旁分泌的方式治疗疾病, 还能通过体外培养构建各类心血管疾病模型, 为治疗提供理论依据。hiPSCs 及其分化细胞可在体替代修复受损细胞, 同时还能通过离体培养建立模型, 在心血管疾病治疗领域应用前景广阔 (见图 1)。因此作为高效且长期的研究平台, hiPSCs 在心血管疾

病的研究和治疗领域具有极大的应用潜力^[2]。现综述 hiPSCs 用于心血管疾病治疗的研究进展, 并讨论其应用所面临的挑战及解决策略, 展望未来发展, 为实现 hiPSCs 在心血管疾病的临床转化应用提供依据。

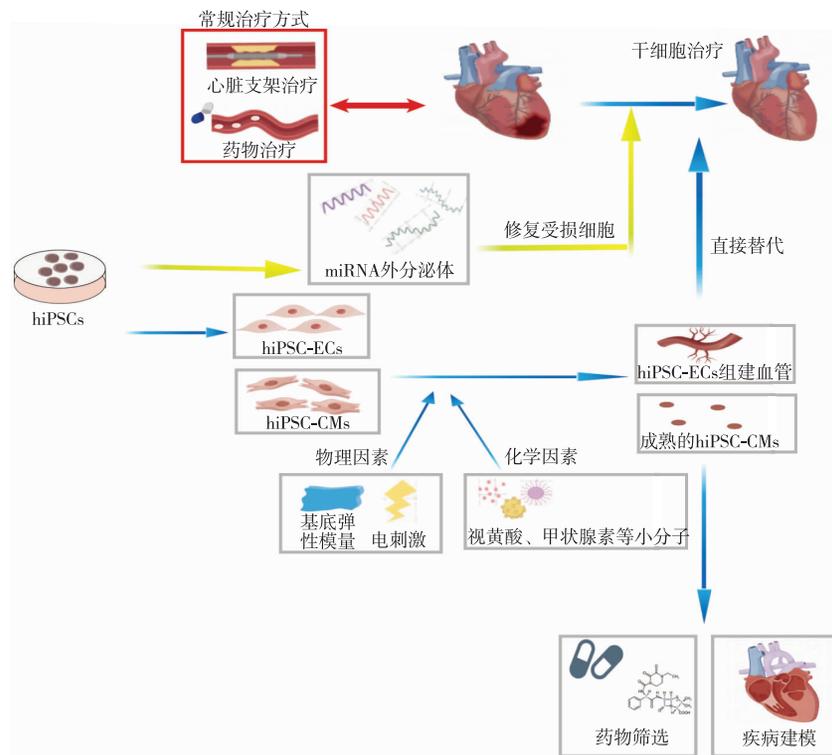
1 hiPSCs 向心血管细胞分化及成熟的过程

1.1 构建 hiPSCs 向心肌细胞分化成熟的体系

hiPSCs 是通过将体细胞的特异性基因进行重编程, 包括八聚体结合转录因子 4、性别决定区 Y 框蛋白 2、Kruppel 样因子 4 以及 Nanog 同源框基因, 从而具有多向分化能力、高增殖率和自我更新的能力^[3]。hiPSCs 向心肌细胞的分化最早由 Narazaki 等^[4]采用拟胚体法成功实现, 但拟胚体法诱导效率极低, 且产生的心肌细胞成熟度低; 后期 Burridge 等^[5]提出单层培养 hiPSCs

(主要为 RPM1/B27 组合),随后在特定阶段引入小分子调控分化方向,如 Wnt 通路抑制剂 IWR-1、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)抑制剂 DMH1,上述分化方法主要调节 BMP、Wnt/ β -catenin 等信号通路;接下来又提出去除胰岛素的 GiWi 小分子分化方案和 CDM3 分化方案,并证明抗坏血酸和白蛋白可作为 B27 的补充剂。而现阶段集中在对这些方案的微小改进上,如将转铁蛋白添加到 CDM3 基础培养基中以及使用带有 CDM3 的生物反应器或 RPM1/B27 系统,还提出在不同时间点调节 Wnt/ β -catenin 通路表达,以提高基于 RPM1/B27 的分化中心肌细胞的产量^[6]。诱导分化出的人诱导多能干细胞衍生心肌细胞(human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs)群体仍存在异质性需改进,可通过细胞表面标记物、线粒体特异性染料、荧光探针、葡萄糖剥夺以及特

异性微 RNA(microRNA, miRNA)对 hiPSC-CMs 进行分离纯化^[7]。心肌细胞包括有执行收缩功能的工作细胞以及执行传导系统的自律细胞,Blazeski 等^[8]发现现有的分化方案倾向于产生室壁样细胞,增加 BMP4、激活素 A 可促进心室谱系细胞生成;而通过优化视黄酸加入可诱导进入心房亚型^[9];Liu 等^[10]发现通过联合使用 BMP4 受体、视黄酸受体拮抗剂和成纤维细胞生长因子 21 受体激动剂或降低 Wnt 信号抑制可得到类窦房结的 hiPSC-CMs;Cai 等^[11]发现 CHIR-99021、BMP4、VEGF-165 及毛喉素组合添加可诱导出心脏瓣膜细胞。为得到更为成熟的心肌细胞,可通过添加 miRNA 和 let-7 等小分子及生物、物理刺激^[12-13],成熟的心肌细胞增殖能力降低、肌节结构更稳定、钙处理能力增强、线粒体增多及脂肪酸代谢增强,更适用于临床治疗。



注:hiPSC-ECs,人诱导多能干细胞衍生血管内皮细胞;hiPSC-CMs,人诱导多能干细胞衍生心肌细胞;miRNA,微 RNA。

图 1 hiPSCs 用于心血管疾病治疗

1.2 构建 hiPSCs 向血管内皮细胞分化成熟的体系

hiPSCs 向血管内皮细胞方向的分化方法包括基质细胞共培养、胚体分化以及 hiPSCs 单层分化。主要通过在不同阶段添加 BMP、碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子等小分子,从而改变 Wnt、TGF- β 信号通路表达,促进 hiPSCs 向内皮细胞的分化^[14]。后来又以二维饲养层结合化学成分的培养方法为基础,继而通过电穿孔和脂质转染方式递送化学合成修

饰信使核糖核酸,通过激活 E26 转化特异性变异转录因子 2,使 hiPSCs 向血管内皮细胞方向分化效率增加^[15]。由于各机体组织血管差异性较大,故定向分化方法还不完善,目前应用最广泛的人诱导多能干细胞衍生血管内皮细胞(human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells, hiPSC-ECs)表型是脑微血管表型,其有助于构建血脑屏障^[16]。角膜样和脉络膜样血管的定向分化研究也较为深入,未来将有更多表

型被研究并应用于临床,从而为治疗血管疾病提供新的治疗策略。

2 hiPSCs 用于心血管疾病的研究

2.1 hiPSCs 用于再生修复治疗

2.1.1 直接替代受损细胞

早期通过将 hiPSC-CMs 悬液注射入啮齿类动物模型,发现能增强心脏收缩能力并提高心脏泵血功能,为更接近人类生理,建立了猪心肌梗死模型^[17],却发现心肌细胞存活率及修复再生能力减弱。一方面采用片状或斑片状的 hiPSC-CMs 聚集进行移植,使用胰岛素样生长因子 1、环孢素 A、热休克等方法预处理,提高抗凋亡能力,并通过水凝胶负载提高细胞负载量和成活率^[18];另一方面将 hiPSC-CMs 与 hiPSC-ECs 共培养体进行移植,均提高了移植物的存活率。虽然移植 hiPSC-CMs 存活率有所提高,但由于 hiPSC-CMs 成熟度较低,故 hiPSC-CMs 植入宿主心肌后易发生植入性心律失常(engraftment arrhythmia, EA)^[19]。EA 是一种短暂现象,在移植后不久出现,而几周后自发消退,但其一旦发生会对本身脆弱的心脏造成致命的打击,甚至发生心脏骤停。EA 被证明与植入后产生的时变、空间异质以及移植物-宿主电耦合相关,可通过减少心脏瘢痕组织以及提高 hiPSC-CMs 的电导率来解决^[20],同时 Marchiano 等^[21]通过基因编辑消除了去极化相关的基因,改善了 hiPSC-CMs 的自律性从而保证其应用的安全性。研究者解决存活率和心律失常问题后进行了 hiPSC-CMs 临床试验,但结果不甚理想,如何将 hiPSC-CMs 移植更好地用于临床治疗,还需很长的路要走,但其应用前景值得期待。

除治疗心肌梗死外,对于室性心动过速等多种心律失常的异常起搏细胞也可进行替代修复。心律失常是由于非起搏细胞出现了异常的电脉冲波引起,目前的治疗方法是植入电子设备,而电子设备固有的并发症使患者仍难以忍受。因此心脏生物起搏已被开

发成为一种无硬件的替代方案^[22]。起搏细胞现有的获得方式有两种,一种是通过生物、化学分子以及物理刺激的方式对 hiPSCs 进行诱导^[23],另一种是通过核转导或慢病毒转导对 hiPSCs 内起搏相关的基因进行编辑^[24],最终获得具有窦房结表型和功能的替代细胞进行移植。

血管修复方面,hiPSC-ECs 能形成稳定血管,替代损伤血管完成供血,已成功通过后肢缺血、心肌梗死、视网膜病变、颈动脉损伤和真皮伤口愈合等多个动物模型验证了 hiPSC-ECs 的功能^[25-26],尤其是对心脏血管损伤以及中枢损伤研究较多,这些研究证明其对组织中的实质细胞存在促修复作用。上述模型中 hiPSC-ECs 的原位修复能改善模型动物的预后,且移植后供体细胞与宿主血管具有较高的融合水平^[27],hiPSC-ECs 用于治疗管性疾病的前景同样值得被期待。

2.1.2 通过分泌物修复受损细胞

除了直接替代作用,干细胞产生的外泌体对心血管疾病同样具有治疗价值,hiPSCs 外泌体通过旁分泌调节靶细胞的增殖、凋亡、应激反应及分化^[28]。其中 miRNA 尤为关键,主要通过诱导信使 RNA 降解、直接结合其靶信使 RNA 抑制翻译,进而负调节靶基因表达,从而降低心血管细胞的凋亡和自噬,提高增殖和分化,对心肌梗死后的炎症阶段、再生阶段以及活性氧介导的心脏病均有影响^[29]。包括 hiPSCs 外泌体中的 miR-21、miR-210、miR-9-5p 和 miR-221 等,能通过抑制半胱天冬酶活化来影响细胞氧化应激,还能改变 Akt 通路达到保护受损细胞的作用^[30],同时分化后的 hiPSC-ECs 还能通过分泌的可溶性因子对中枢神经系统髓鞘损伤疾病进行修复^[31]。

2.2 hiPSCs 用于心血管疾病建模

hiPSCs 凭借多向分化的干性优势成为了体外疾病建模的重要来源,尤其在心血管疾病领域已取得巨大进展。hiPSCs 用于心血管疾病建模示意图见图 2。

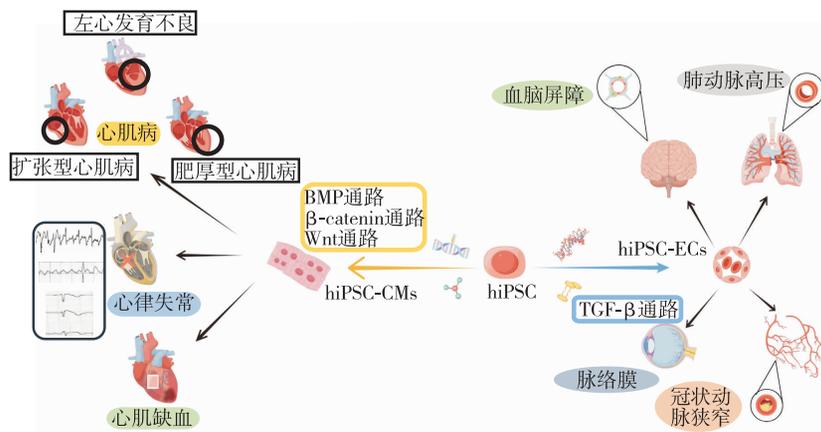


图 2 hiPSCs 与心血管疾病建模

2.2.1 hiPSC-CMs

通过 hiPSC-CMs 建立心血管疾病模型可揭示细胞基因型与表型之间的关系,是迈向精准医学的标志,如编码肉瘤蛋白成分的基因(如 TNNT2 和 MYH7)突变与家族性肥厚型心肌病和家族性扩张型心肌病相关,编码钾通道(KCNQ1 和 KCNH2)、钠通道(SCN5A)和钙通道(CACNA1C)的基因突变则是长 QT 综合征的常见病因。与传统的体外模型相比,hiPSC-CMs 建立的模型避免了动物模型存在的物种差异。hiPSC-CMs 来源包括环境干预、敲除特定疾病基因及直接编辑患者体细胞。

心律失常和心肌病是最常见的模型,其中心律失常模型较早研究。通过 hiPSC-CMs 建立的长 QT 综合征模型,并证明由 KCNQ1 和 KCNH2 突变引起心律失常导致去极化周期的延长是 hiPSC-CMs 最早的应用^[32]。后期陆续建立了多种模型,如利用儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速患者的 hiPSC-CMs 建立模型,发现肌质网上的雷诺丁受体存在 Ca^{2+} 瞬变异常,通过添加异丙肾上腺素、S107(雷诺丁受体稳定剂)和普萘洛尔等改善了疾病进展^[33];使用高浓度儿茶酚胺作用于 hiPSC-CMs 建立心律失常模型,证明 C 型利尿钠肽可通过促进磷酸二酯酶 2 介导的 cAMP 和 cGMP 信号通路降低心律失常的发生^[34];同时还通过富集易感基因的 hiPSC-CMs 来源的心房样心肌细胞发现了二甲双胍对心房颤动的良好疗效^[35];通过 Brugada 综合征患者来源的 hiPSC-CMs 证明, TBX5-G145R 突变导致电生理通路转录异常是发病的原因^[36]。心肌病方面,报道了通过将 TNNT2 点突变引入 hiPSC-CMs 建立扩张型心肌病模型,提出美托洛尔以及线粒体移植可通过促进心室肌收缩治疗扩张型心肌病改善疾病^[37];利用肥厚型心肌病家族来源体的 hiPSC-CMs 建立模型,研究发现由于 MYBPC3 突变为主因伴随 MYH7 作为遗传修饰因子导致了肥厚型心肌病患者表型差异^[38];Eguchi 等^[39]利用杜氏肌营养不良症患者 hiPSC-CMs 建立模型,发现端粒重复序列结合因子 2 能通过减轻端粒损耗从而改善细胞形态缺陷,可作为潜在的治疗靶点;近期还利用 iPSC-CMs 建立了左心发育不良综合征模型,并发现西地那非和环孢菌素 A 两种药物可通过提高线粒体功能减缓疾病进展^[40]。除新的治疗靶点的发现,一些复杂心肌病模型的建立也证明了 hiPSC-CMs 应用的稳定性。如通过 LMNA 基因突变引起的心肌病患者来源的 hiPSC-CMs 建立疾病模型,发现其与在体细胞核衰老、凋亡一致;通过将 TAZ 基因突变引入 hiPSC-CMs 建立的 Barth 综合征模型,以及引入 PTPN11 基因突变建立的皮肤综合征模型均表现出与患者心肌一致的病理表现。现有

众多单基因疾病模型,而多基因和多表型复杂疾病还未建立稳定的疾病模型,后期可通过收集多个 hiPSC-CMs 体系建立成熟的模型。

2.2.2 hiPSC-ECs

通过 hiPSC-ECs 建立的体外微血管模型具有屏障功能、促进血管生成以及炎症介质分泌的功能,并发现通过改变外部微环境可促进特异表型形成。已建立的模型包括血脑屏障、肺动脉高压、烟雾病、川崎病等^[37]。最近还通过 hiPSC-ECs 的 ALDH2 基因突变建立的冠心病模型,发现恩格列净可通过抑制 Na^+/H^+ 交换蛋白 1,并激活 Akt 激酶/eNOS 途径来减少疾病的发生^[41]。由于内皮细胞表型复杂,成熟的疾病模型较少,因此 hiPSC-ECs 在疾病建模中的应用潜力还有待开发。

2.3 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术用于心血管疾病建模

单纯培养 hiPSC-CMs 建立的疾病模型有限,利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术修复或在野生型 hiPSC-CMs 中引入突变创建疾病模型更有潜力。目前不仅成功建立包括巴特综合征、扩张型心肌病和冠心病等模型,并应用于基础研究中^[42],还进一步通过基因编辑验证了许多疾病的基因靶点。如敲除 NOTCH1 基因,证明其在心室样心肌细胞的分化和增殖方面的重要性^[43];调节 hiPSC-CMs 中的 CaMK II δ 基因表达,证明其可通过消除氧化敏感的蛋氨酸残基预防缺血再灌注损伤^[44];敲除 4p14 上的基因 UCHL1,证明其作为缺氧诱导因子-1 α 的稳定剂能减轻缺血性心肌损伤^[45]。近期还利用 hiPSC-CMs 绘制出心脏单细胞染色质可及性图谱,研发出了“芯片心脏”,为 hiPSC-CMs 的广泛应用提供了巨大的数据库,并通过利用 hiPSC-CMs 的干细胞特性,再结合基因编辑,可产生更多、更有效的疾病研究平台^[46]。

2.4 hiPSCs 用于心血管疾病治疗药物

hiPSCs 建立的体外模型可用于药物毒性、有效性的测定以及不良反应预测,其在药物开发领域展现出巨大优势。除使用最常见的长 QT 综合征、肥厚型心肌病及扩张型心肌病进行药物开发外^[47],还通过 2 型糖尿病心肌损伤患者的 hiPSC-CMs 发现成纤维细胞生长因子 21 通过 AMPK/FoxO3 磷酸化和线粒体脱乙酰酶途径,降低由脂质引起的线粒体功能障碍和氧化应激,进而保护患者的心脏^[48];结合巴特综合征模型发现由 TAZ 基因突变引起活性氧过多产生^[49],可利用活性氧抑制剂减轻疾病引起的异常代谢。不仅可使用 hiPSCs 进行重点疾病的药物开发,还可利用模型对有心脏毒性药物进行个体化测试。使用患者的 hiPSC-CMs 已证

实阿霉素心脏毒性的个体倾向^[50],同时发现 SLC28A3 位点能对阿霉素引起的心脏损伤起保护作用^[51],进一步利用 hiPSCs 衍生的心房细胞,解释了关于酪氨酸激酶抑制剂心房毒性的机制^[52];将 hiPSC-CMs 应用于抗柯萨奇病毒引发的心肌炎的抗病毒药物筛选;使用 hiPSC-ECs 确定氟尿嘧啶可降低内皮细胞活力、破坏血管内皮形成;而抗癌药物酪氨酸激酶抑制剂具有心脏毒性也是通过癌症患者的 hiPSC-ECs 和 hiPSC-CMs 发现的;更为有趣的是,利用 hiPSC-ECs 证实大麻可造成血管损伤,木黄铜可作为保护剂使用^[53]。hiPSCs 有望成为预测个体患者对新药反应的重要工具,从而识别对药物高度敏感的患者,以推动药物的开发。未来的药物临床前毒性测试将集中在高风险药物的安全性评估上,尤其对有诱发心律失常风险的药物可通过使用 hiPSCs 来源的心血管细胞测试其安全性,可结合膜片钳技术、微电极阵列、钙离子指示剂染色和线粒体膜电位染色等技术,更有效地进行体外药理学测试。

3 hiPSCs 治疗心血管疾病存在的困难和解决方向

hiPSCs 在心血管疾病研究领域已取得显著成果,但仍存在制备成本高、低效重编程、致癌潜能及低存活率等问题,需进一步研究解决。如个体化 hiPSCs 的制备成本较高,部分特殊疾病(如脊髓损伤)恢复期限制,因此需建立 hiPSCs 供体库以更好地利用其可克隆性。而不同 hiPSCs 系之间不完全重编程导致的差异性^[54],可使用异基因单倍型匹配的 hiPSCs 分化细胞减少免疫检测和消除,或开发基因组编辑的 hiPSCs 系,制造缺乏主要组织相容性抗原 I 和 II 的通用供体细胞,以提高患者的耐受性,并解决时间及成本问题^[55]。对于低成熟度 hiPSCs 所存在的致癌性,可通过进一步促进其成熟分化为特定的表型,形成稳定的细胞模型体系来改善。如通过将局部微环境分子加入培养过程可作为有效的干预措施;而对于移植物低存活率的问题,可通过增加移植细胞量,或是使用生物凝胶作为负载体延长滞留时间,以及使用小分子激活细胞周期等方式进行改善^[56]。

4 未来与展望

hiPSCs 作为具有干性特征的细胞,不仅可诱导分化为心血管组织的各类细胞,进一步补充受损细胞造成的功能缺失,遏制心血管疾病的恶性发展;还能作为体外疾病建模的最佳来源进行机制及药物的研究,避免了常规动物模型中存在的种族差异,在心血管疾病治疗中具有很大优势。但由于 hiPSCs 分化技术有限,需进一步对其高成本、低成熟度的劣势进行改进,最优选则是与各类新型技术相结合。如与器官芯片技术结合制作的血脑屏障芯片为神经系统疾病提供

了有效的研究平台^[57],与 3D 打印技术相结合制作出促进 hiPSCs 向复杂表型分化的培养底物^[58],应用最为密切的 CRISPR-Cas9 基因编辑技术更是为 hiPSCs 在心血管疾病治疗领域的应用扩大范围。进一步深化 hiPSCs 的应用可加快其进入临床应用,随着 hiPSCs 在心血管系统疾病中研究的不断推进,有望在心血管疾病治疗领域发挥更大作用。

参考文献

- [1] Rikhtegar R, Pezeshkian M, Dolati S, et al. Stem cells as therapy for heart disease: iPSCs, ESCs, CSCs, and skeletal myoblasts [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:304-313.
- [2] Ernst P, Bidwell PA, Dora M, et al. Cardiac calcium regulation in human induced pluripotent stem cell cardiomyocytes: implications for disease modeling and maturation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:986107.
- [3] Gähwiler EKN, Motta SE, Martin M, et al. Human iPSCs and genome editing technologies for precision cardiovascular tissue engineering [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:639699.
- [4] Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells [J]. *Circulation*, 2008, 118(5):498-506.
- [5] Burrige PW, Matsa E, Shukla P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(8):855-860.
- [6] Lyra-Leite DM, Gutiérrez-Gutiérrez Ó, Wang M, et al. A review of protocols for human iPSC culture, cardiac differentiation, subtype-specification, maturation, and direct reprogramming [J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(3):101560.
- [7] Stiefbold M, Zhang H, Wan LQ. Engineered platforms for mimicking cardiac development and drug screening [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1):197.
- [8] Blazekski A, Zhu R, Hunter DW, et al. Electrophysiological and contractile function of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2012, 110(2-3):178-195.
- [9] Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, et al. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(1):56-68.
- [10] Liu F, Fang Y, Hou X, et al. Enrichment differentiation of human induced pluripotent stem cells into sinoatrial node-like cells by combined modulation of BMP, FGF, and RA signaling pathways [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):284.
- [11] Cai Z, Zhu M, Xu L, et al. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells to heart valve cells [J]. *Circulation*, 2024, 149(18):1435-1456.
- [12] Silva AC, Matthys OB, Joy DA, et al. Co-emergence of cardiac and gut tissues promotes cardiomyocyte maturation within human iPSC-derived organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(12):2137-2152. e6.
- [13] Wickramasinghe NM, Sachs D, Shewale B, et al. PPARdelta activation induces metabolic and contractile maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(4):559-576. e7.
- [14] Fan X, Cyganek L, Nitschke K, et al. Functional characterization of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15):8507.
- [15] Wang K, Lin RZ, Hong X, et al. Robust differentiation of human pluripotent stem cells into endothelial cells via temporal modulation of ETV2 with modified mRNA [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(30):eaba7606.
- [16] Foreman KL, Shusta EV, Palecek SP. Defined differentiation of human pluripotent stem cells to brain microvascular endothelial-like cells for modeling the blood-brain barrier [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2683:113-133.
- [17] Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sánchez A, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate the infarcted pig heart but induce ventricular tachyarrhythmias [J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 12(5):967-981.

- [18] Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(9):1015-1024.
- [19] Gibbs CE, Marchianó S, Zhang K, et al. Graft-host coupling changes can lead to engraftment arrhythmia: a computational study [J]. *J Physiol*, 2023, 601(13):2733-2749.
- [20] Fassina D, Costa CM, Longobardi S, et al. Modelling the interaction between stem cells derived cardiomyocytes patches and host myocardium to aid non-arrhythmic engineered heart tissue design [J]. *PLoS Comput Biol*, 2022, 18(4):e1010030.
- [21] Marchiano S, Nakamura K, Reinecke H, et al. Gene editing to prevent ventricular arrhythmias associated with cardiomyocyte cell therapy [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(4):396-414. e9.
- [22] Liu CM, Chen YC, Hu YF. Harnessing cell reprogramming for cardiac biological pacing [J]. *Biomed Sci*, 2023, 30(1):74.
- [23] Zhang W, Wang F, Yin L, et al. Cadherin-5 facilitated the differentiation of human induced pluripotent stem cells into sinoatrial node-like pacemaker cells by regulating β -catenin [J]. *J Cell Physiol*, 2024, 239(1):212-226.
- [24] Farraha M, Rao R, Igoor S, et al. Recombinant adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of *hTBX18* generates pacemaker cells from ventricular cardiomyocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16):9230.
- [25] Ng XY, Peh GSL, Yam GH, et al. Corneal endothelial-like cells derived from induced pluripotent stem cells for cell therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15):12433.
- [26] Cheng YC, Hsieh ML, Lin CJ, et al. Combined treatment of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and endothelial cells regenerate the infarcted heart in mice and non-human primates [J]. *Circulation*, 2023, 148(18):1395-1409.
- [27] Lee SJ, Park C, Lee JY, et al. Generation of pure lymphatic endothelial cells from human pluripotent stem cells and their therapeutic effects on wound repair [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:11019.
- [28] Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes [J]. *Blood*, 2012, 119(3):646-648.
- [29] Cha MJ, Jang JK, Ham O, et al. MicroRNA-145 suppresses ROS-induced Ca^{2+} overload of cardiomyocytes by targeting CaMK II δ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(4):720-726.
- [30] Rosa S, Praça C, Pitrez PR, et al. Functional characterization of iPSC-derived arterial- and venous-like endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):3826.
- [31] Ma D, Zhang H, Yin L, et al. Human iPSC-derived endothelial cells promote CNS remyelination via BDNF and mTORC1 pathway [J]. *Glia*, 2024, 72(1):133-155.
- [32] Matsa E, Dixon JE, 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.
- [33] Terrenoire C, Wang K, Tung KWC, et al. Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics [J]. *J Gen Physiol*, 2013, 141(1):61-72.
- [34] Cachorro E, Günscht M, Schubert M, et al. CNP promotes antiarrhythmic effects via phosphodiesterase 2 [J]. *Circ Res*, 2023, 132(4):400-414.
- [35] Lal JC, Mao C, Zhou Y, et al. Transcriptomics-based network medicine approach identifies metformin as a repurposable drug for atrial fibrillation [J]. *Cell Rep Med*, 2022, 3(10):100749.
- [36] Bersell KR, Yang T, Mosley JD, et al. Transcriptional dysregulation underlies both monogenic arrhythmia syndrome and common modifiers of cardiac repolarization [J]. *Circulation*, 2023, 147(10):824-840.
- [37] Zhang A, Liu Y, Pan J, et al. Delivery of mitochondria confers cardioprotection through mitochondria replenishment and metabolic compliance [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(5):1468-1479.
- [38] Escribó R, Larrañaga-Moreira JM, Richaud-Patin Y, et al. iPSC-based modeling of variable clinical presentation in hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2023, 133(2):108-119.
- [39] Eguchi A, Gonzalez AFGS, Torres-Bigio SI, et al. TRF2 rescues telomere attrition and prolongs cell survival in Duchenne muscular dystrophy cardiomyocytes derived from human iPSCs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(6):e2209967120.
- [40] Tripathi D, Reddy S. iPSC model of congenital heart disease predicts disease outcome [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(5):659-660.
- [41] Guo H, Yu X, Liu Y, et al. SGLT2 inhibitor ameliorates endothelial dysfunction associated with the common ALDH2 alcohol flushing variant [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(680):eabp9952.
- [42] Liu N, Olson EN. CRISPR modeling and correction of cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2022, 130(12):1827-1850.
- [43] Ye S, Wang C, Xu Z, et al. Impaired human cardiac cell development due to NOTCH1 deficiency [J]. *Circ Res*, 2023, 132(2):187-204.
- [44] Lebek S, Chemello F, Caravia XM, et al. Ablation of CaMK II δ oxidation by CRISPR-Cas9 base editing as a therapy for cardiac disease [J]. *Science*, 2023, 379(6628):179-185.
- [45] Geng B, Wang X, Park KH, et al. UCHL1 protects against ischemic heart injury via activating HIF-1 α signal pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 52:102295.
- [46] Mourad O, Yee R, Li M, et al. Modeling heart diseases on a chip: advantages and future opportunities [J]. *Circ Res*, 2023, 132(4):483-497.
- [47] Liu X, Wang S, Guo X, et al. Increased reactive oxygen species-mediated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activation contributes to calcium handling abnormalities and impaired contraction in Barth syndrome [J]. *Circulation*, 2021, 143(19):1894-1911.
- [48] Jin L, Geng L, Ying L, et al. FGF21-sirtuin 3 axis confers the protective effects of exercise against diabetic cardiomyopathy by governing mitochondrial integrity [J]. *Circulation*, 2022, 146(20):1537-1557.
- [49] Wang G, McCain ML, Yang L, et al. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies [J]. *Nat Med*, 2014, 20(6):616-623.
- [50] Burridge PW, Li YF, Matsa E, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Nat Med*, 2016, 22(5):547-556.
- [51] Magdy T, Jouni M, Kuo HH, et al. Identification of drug transporter genomic variants and inhibitors that protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Circulation*, 2022, 145(4):279-294.
- [52] Shafaattalab S, Lin E, Christidi E, et al. Ibrutinib displays atrial-specific toxicity in human stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 12(5):996-1006.
- [53] Wei TT, Chandy M, Nishiga M, et al. Cannabinoid receptor 1 antagonist genistein attenuates marijuana-induced vascular inflammation [J]. *Cell*, 2022, 185(10):1676-1693. e23.
- [54] Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, et al. Epigenetic variation between human induced pluripotent stem cell lines is an indicator of differentiation capacity [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(3):341-354.
- [55] Deuse T, Hu X, Gravina A, et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3):252-258.
- [56] Rhee JW, Wu JC. Cardiac cell cycle activation as a strategy to improve iPSC-derived cardiomyocyte therapy [J]. *Circ Res*, 2018, 122(1):14-16.
- [57] Yan L, Moriarty RA, Stroka KM. Recent progress and new challenges in modeling of human pluripotent stem cell-derived blood-brain barrier [J]. *Theranostics*, 2021, 11(20):10148-10170.
- [58] Meijer EM, Giles R, van Dijk CGM, et al. Effect of mechanical stimuli on the phenotypic plasticity of induced pluripotent stem-cell-derived vascular smooth muscle cells in a 3D hydrogel [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2023, 6(12):5716-5729.