DOI:10.16016/j.1000-5404.201907075

心肌致密化不全患者特异性诱导多潜能干细胞及心肌样细胞的构建

刘奥怡,张 蕾,龚梦嘉,田 杰,吕铁伟 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院心血管内科,儿童发育疾病研究教育部重点试验室,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,儿科学重庆市重点试验室

[摘要] **目的** 构建心肌致密化不全(noncompaction of ventricular myocardium,NVM)患者来源的诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)及心肌样细胞(cardiomyocytes, CMs)。**方法** 用仙台病毒感染1名NVM患者(女性,16岁,2016年我科住院患者)和1名同期24岁健康男性志愿者的尿液细胞获得iPS细胞,进而将iPS细胞诱导分化为iPS-CMs。对iPS和iPS-CMs进行免疫荧光染色检测干细胞和心肌细胞标志物、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)活性检测、核型分析、拟胚体(embryoidbodies, EBs)形成和膜片钳试验检测,同时采用全外显子测序(whole exon sequencing, WES)对NVM患者血液、iPS及iPS-CMs进行遗传学背景的比较,并筛选出可能和NVM发生相关的突变基因。**结果** 成功获得NVM患者及正常人的尿液细胞和iPS,并分化为iPS-CMs。免疫荧光显示iPS表达干细胞标志Oct4、Sox2、Ssea4和TRA-1-81,iPS细胞具有高AP活性、具有正常核型、克隆能够在体外悬浮培养分化成3个胚层的细胞;iPS-CMs表达心肌细胞特异性标志物α-actinin和TNNT2,膜片钳结果显示iPS-CMs形成心肌细胞特异性钠电流及动作电位。WES结果显示患者血液、iPS及iPS-CMs三者具有相似的遗传谱,并发现可能与NVM发生相关的突变。**结论** 成功构建出NVM患者的iPS-CMs,为采用iPS技术开展NVM的研究提供有力的细胞模型。

[关键词] 心肌致密化不全;诱导多潜能干细胞;心肌样细胞;尿液细胞
[中图法分类号] R329-33; R329.24; R542.2 [文献标志码] A

Generation of induced pluripotent stem cells and cardiac myocyte-like cells from a patient with noncompaction of ventricular myocardium

LIU Aoyi, ZHANG Lei, GONG Mengjia, TIAN Jie, LYU Tiewei Department of Cardiology, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To obtain induced pluripotent stem cells (iPS) and cardiac myocyte-like cells (CMs) from a patient with noncompaction of ventricular myocardium (NVM). **Methods** Urine cells from a 16-year-old female patient with NVM and a 24-year-old healthy male volunteer were infected with Sendai virus to obtain iPS cells, which were further induced to differentiate into iPS-CMs. Both the iPS cells and iPS-CMs were identified by immunofluorescence staining, alkaline phosphatase activity, karyotype analysis, embryoid body (EBs) formation and cell patch-clamp experiment. Whole-exome sequencing of the blood sample, iPS cells and iPS-CMs from the NVM patient was performed for genetic comparison to identify gene mutations potentially related with NVM. **Results** We successfully obtained urine cells, iPS cells and iPS-CMs from the NVM patient and the healthy volunteer. Immunofluorescence assay showed that the iPS cells expressed pluripotent stem cell markers Oct4, Sox2, Ssea4 and TRA-1-81. iPS cells exhibited a high alkaline phosphatase activity with a normal karyotype, and could be induced to differentiate into 3 germ layers *in vitro*. Immunocytochemical staining revealed that iPS-CMs expressed cardiac myocyte-specific markers TNNT2 and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570218)
[通信作者] 吕铁伟,E-mail:ltw200145@163.com

α-actinin. Patch-clamp experiment demonstrated the presence of functional cardiac-specific voltage-gated Na^+ currents and action potentials in the iPS-CMs. Whole-exome sequencing showed similar genetic profiles between the blood samples, iPS cells and iPS-CMs of the NVM patient, and several gene mutations were found to have potential associations with NVM. **Conclusion** We successfully obtain iPS cells and iPS-CMs from the NVM patient, and these cells provide useful cell models for the study of NVM using iPS technology.

[**Key words**] noncompaction of ventricular myocardium; induced pluripotent stem cells; cardiac myocytes; urine cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81570218). Corresponding author: LYU Tiewei, E-mail: ltw200145@163.com.

心肌致密化不全(noncompaction of ventricular myocardium,NVM)是一种由于心脏发育早期心肌致密化过程迟滞或停顿而导致的心肌病[1],大量文献报道该病的发生与遗传有关,其第一个遗传机制被鉴定为X连锁TAZ基因中的突变,随后发现了与NVM相关的越来越多的基因[2-3]。由于伦理限制,这些基因仅在细胞和动物模型层面进行了验证,未能在人体组织中进行验证,因此它们难以准确的解释人类NVM的发生机制。寻找符合人体组织的替代品成为了探索NVM发生机制的焦点和难点。

2006年日本学者将4种转录因子(Oct4, Sox2, Klf4和c-Myc)克隆入反转录病毒载体并引入小鼠成纤维细胞中[4],成功诱导出与胚胎干细胞相似的iPS细胞,该方法开辟iPS研究之先河。随后该试验室利用人皮肤成纤维细胞为体细胞来源,成功获得了人源iPS细胞[5]。近年来诱导多能干细胞技术在基础研究方面得到了快速的发展[6-8]。一些研究报道iPS所分化的心肌细胞可以用作再生医学中的"种子"细胞,用于治疗心血管疾病[9]。皮肤成纤维细胞是iPS最初的体细胞来源,该细胞的获得需要有创操作,在儿童心血管疾病研究中具有限制性。尿液细胞是近年来新发现的iPS体细胞来源,获取方便、无创,并具有很高的诱导效率[10],成为了近期研究的热点。

因此,本研究以人尿液为研究对象,采用仙台病毒(Oct4, Sox2, Klf4和c-Myc; OSKM)将人尿液细胞重编程为iPS,进一步诱导分化为iPS-CMs,并用全外显子测序技术对患者血液、iPS和iPS-CMs的基因背景进行对比分析,为NVM的遗传学机制研究提供有力细胞模型。

1 材料与方法

1.1 研究对象

①NVM患者1名,女,16岁,2016年在我科住院诊断为心肌致密化不全;②24岁健康男性志愿者1名作为对照。本研究通过了重庆医科大学伦理委员会的审查,参与者在试验开始前均签署了知情同意书。

1.2 主要试剂、仪器

荧光倒置显微镜(尼康,日本);凝胶成像分析仪(Bio-Rad,美国);6、12、96孔板(康宁,中国);人iPS基础培养基、基础培养基添加剂(PSC)和尿液细胞分离及扩增基础培养基、基础培养基添加剂(赛贝生物,北京);仙台病毒(Life Technologies,美国);乙二胺四乙酸(EDTA)、二甲基亚砜(DMSO)、碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒(Solarbio,北京);基质胶(Corning,美国);Oct4兔抗人一抗、SSEA4小鼠抗人一抗、Sox2小鼠抗人一抗(Thermo Fisher Scientific,中国);α-actinin兔抗人一抗、TNNT2小鼠抗人一抗(Abcam,中国);Cy-3-抗山羊小鼠和Cy-3山羊抗兔二抗(塞维利亚,中国);人心肌分化基础培养基、基础培养基添加剂1、2和3(赛贝生物,北京);心肌细胞纯化培养基(赛贝生物,北京);牛血清白蛋白(Solarbio,北京);4%多聚甲醛(谷歌,中国);磷酸缓冲盐(PBS,Hyclone,中国);抗荧光淬灭剂(碧云天,中国);4′6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI; Roche,中国);RPMI-1640培养基(Gibco,美国);丁酸钠(Selleck,中国);Knockout SR(Gibco,美国);Thiazovivn(TZV,Selleck,中国)。

1.3 方法

1.3.1 尿液细胞分离扩增 用250 mL无菌蓝口瓶收集参与者的无菌尿液(200 mL),将尿液分装到4个无菌50 mL离心管中,300×*g*离心5 min后弃去上清液,用2 mL尿液细胞分离培养基重悬细胞沉淀,然后接种到预包被基质胶(基质胶原液∶PBS=1∶400)的12孔板中培养,每2~3天半量更换新鲜培养基。尿液细胞大量贴壁后,用尿液细胞扩增完全培养基培养,每2~3天换液。当细胞扩增到80%融合后,按1∶1~1∶3传代于6孔板中。

1.3.2 尿液细胞重编程为诱导多潜能干细胞 对96孔板中尿液细胞(细胞数:1.3×10^4~1.4×10^4)进行仙台病毒(Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc; OSKM)感染,感染前排除支原体污染。病毒感染液含10 μL仙台病毒和100 μL尿液细胞扩增完全培养基(包含浓度为0.5~1 mmol/L的丁酸钠)。感染病毒3~4 d后,以1∶1~1∶6的比例传代至预铺板的6孔板中,传代时采用

加入丁酸钠和 ROCK 抑制剂(浓度为 5 μmol/L)的尿液扩增完全培养基。传代后第 2 天,更换为仅含丁酸钠的尿液扩增完全培养基。约传代后第 4 天更换为重编程培养基,待有含 4~5 个细胞的克隆团出现后,将培养基更换为 PSC 培养基,之后保持每天更换 PSC 培养基。待典型的 iPS 克隆出现后,可将 iPS 克隆挑出,传代扩增。

1.3.3　诱导多潜能干细胞向心肌样细胞分化　　iPS 稳定传代至 10 代后,选择融合度为 80%~90%的无支原体污染的 iPS 细胞进行心肌细胞分化。首先去掉 PSC 培养基加入 4 mL 心肌细胞分化培养基 1 培养 48 h,然后去掉心肌细胞分化培养基 1 加入心肌细胞分化培养基 2 培养 48 h,最后去掉心肌细胞分化培养基 2 加入心肌细胞分化培养基 3 培养 48 h。此后每 2 天更换心肌细胞分化培养基 3。当出现大量跳动细胞后,用心肌细胞纯化培养基纯化 3 d,收集细胞进行下一步试验。

1.3.4　细胞免疫荧光及碱性磷酸酶染色　　用 4%多聚甲醛固定细胞爬片上的 iPS 细胞 15 min,PBS 清洗。0.05% TritonX-100 打孔 15 min,PBS 清洗。3% BSA 溶液封闭 30 min,加入用 3% BSA 稀释的一抗(iPS 一抗浓度 1∶100,iPS-CMs 一抗浓度 1∶50),4 ℃孵育过夜;PBS 清洗,再加入用 3%BSA 稀释的荧光二抗(1∶250),37 ℃避光孵育 1 h。吸弃二抗,PBS 清洗;加入 0.1 μg/mL DAPI 染核 15 min,PBS 清洗,用激光共聚焦显微镜采集图像。按照试剂说明书进行碱性磷酸酶染色。

1.3.5　拟胚体(EB)形成和体外分化　　EDTA 消化 iPS 细胞,300×*g* 离心 3 min。DMEM/F12(Gibco)+20%KSR+1xTZV(10 mmol/L)重悬细胞,1∶3转移至未铺板的 6 孔板中。2~3 d 后,将细胞和培养基置于离心管中静置一段时间,更换上清培养基。将细胞悬浮培养 7 d。悬浮培养 7 d 后,将细胞转移到预铺板的 6 孔板中并继续培养 7 d。观察到 3 个胚层细胞后,收集细胞用于 RNA 分离和反转录,然后用于琼脂糖凝胶电泳检测 3 个胚层的关键基因。

1.3.6　核型分析　　用标准试验方案对 10 代后的 iPS 细胞进行核型分析,检测细胞核型有无异常。

1.3.7　膜片钳试验　　按照标准试验方案[11-12],进行膜片钳试验,检测 iPS-CMs 的 Na^+电流和动作电位。

1.4　全外显子测序

用无菌抗凝采血管收集 NVM 患者及健康对照的 5 mL 血液。将 NVM 患者及健康对照的血液样品、iPS 细胞及 iPS-CMs 送至武汉康测生物科技有限公司进行测序,并对结果进行对比分析,功能预测。

2　结果

2.1　心肌致密化不全家系图与超声心动图

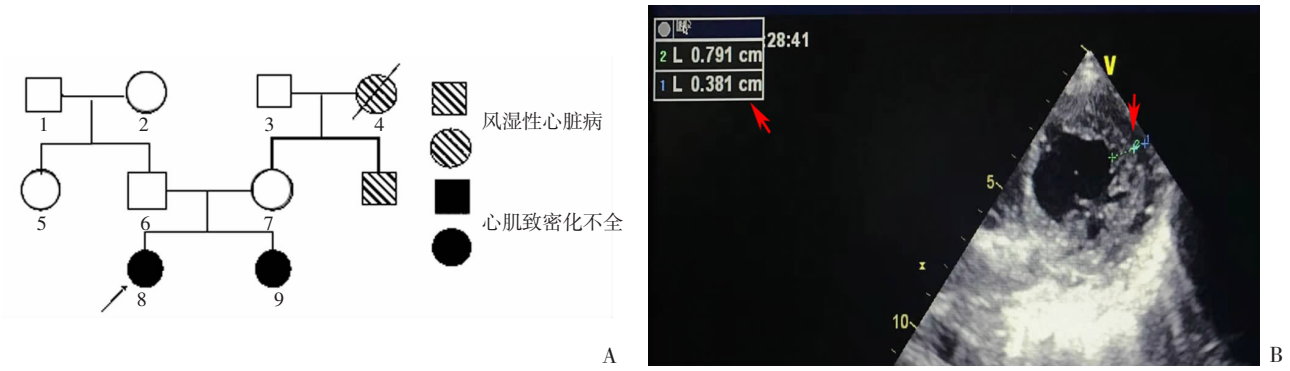
先证者及姐姐为 NVM 患者(图 1A)。先证者超声心动图可见:心腔扩大,心肌明显分为两层,箭头示非致密心肌及致密心肌厚度比>2.0(图 1B)。

2.2　尿液细胞,iPS 细胞和 iPS-CMs 的形态

尿液细胞呈梭形。iPS 克隆呈圆形或椭圆形,边界清晰,具有高核质比。iPS-CMs 细胞具有纤维形态(图 2)。

2.3　iPS 的鉴定

iPS 细胞具有高碱性磷酸酶活性,细胞克隆呈紫红色(图 3A)。患者 iPS 细胞具有正常女性核型,正常人 iPS 细胞具有正常男性核型(图 3A)。iPS 细胞表达干细胞标志 Sox2, Oct4, Ssea4 和 TRA-1-81(图 3B),Sox2, Oct4, Ssea4 和 TRA-1-81 均显示红色,细胞核显示蓝色。EBs 形成试验证实了 iPS 细胞具有分化为 3 个胚层细胞的潜力(图 4A),通过琼脂糖凝胶电泳显示代表不同胚层的关键基因(内胚层:SOX1;中胚层:GATA4;外胚层:MSX1,图 4B)。



A　　B

A:心肌致密化不全(NVM)家系图(↗:示 NVM 先证者;方形:男性;圆形:女性;空心:正常人;实心:NVM 患者;阴影:风湿性心脏病患者);B:先证者的超声心动图　↓:非致密心肌及致密心肌厚度比

图 1　NVM 家族谱系图和先证者的超声心动图结果

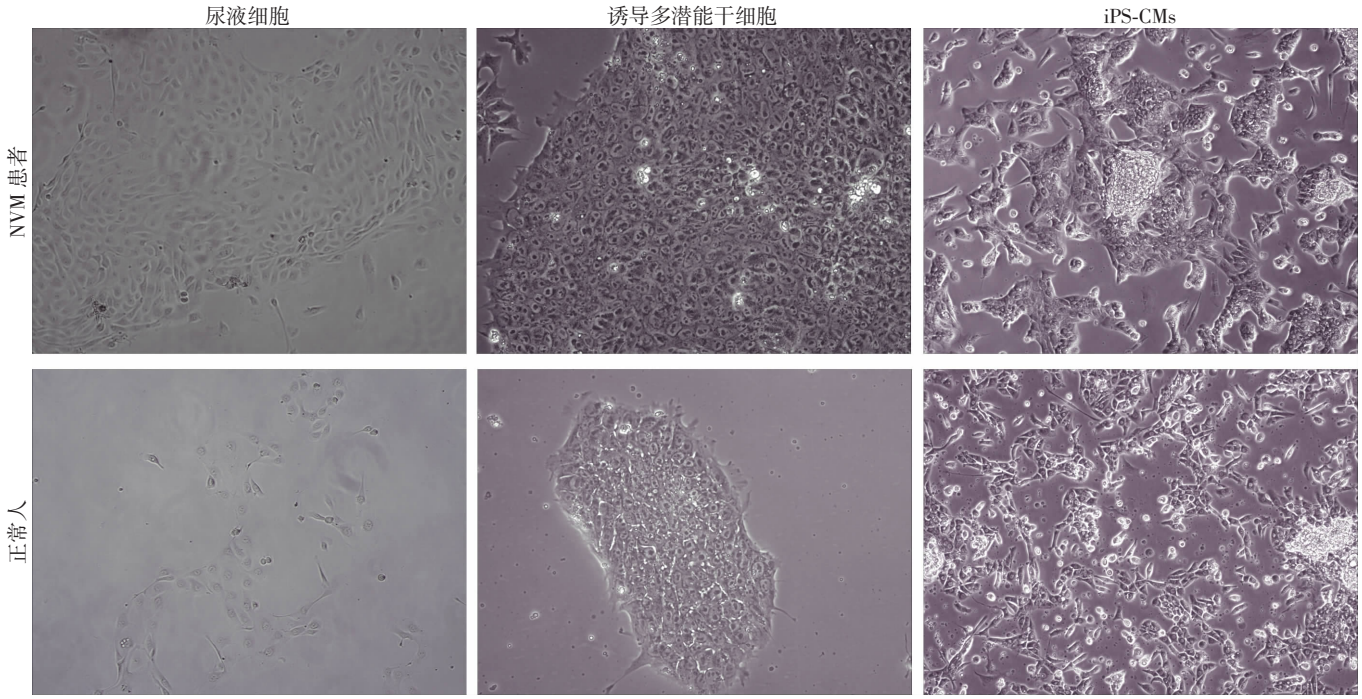
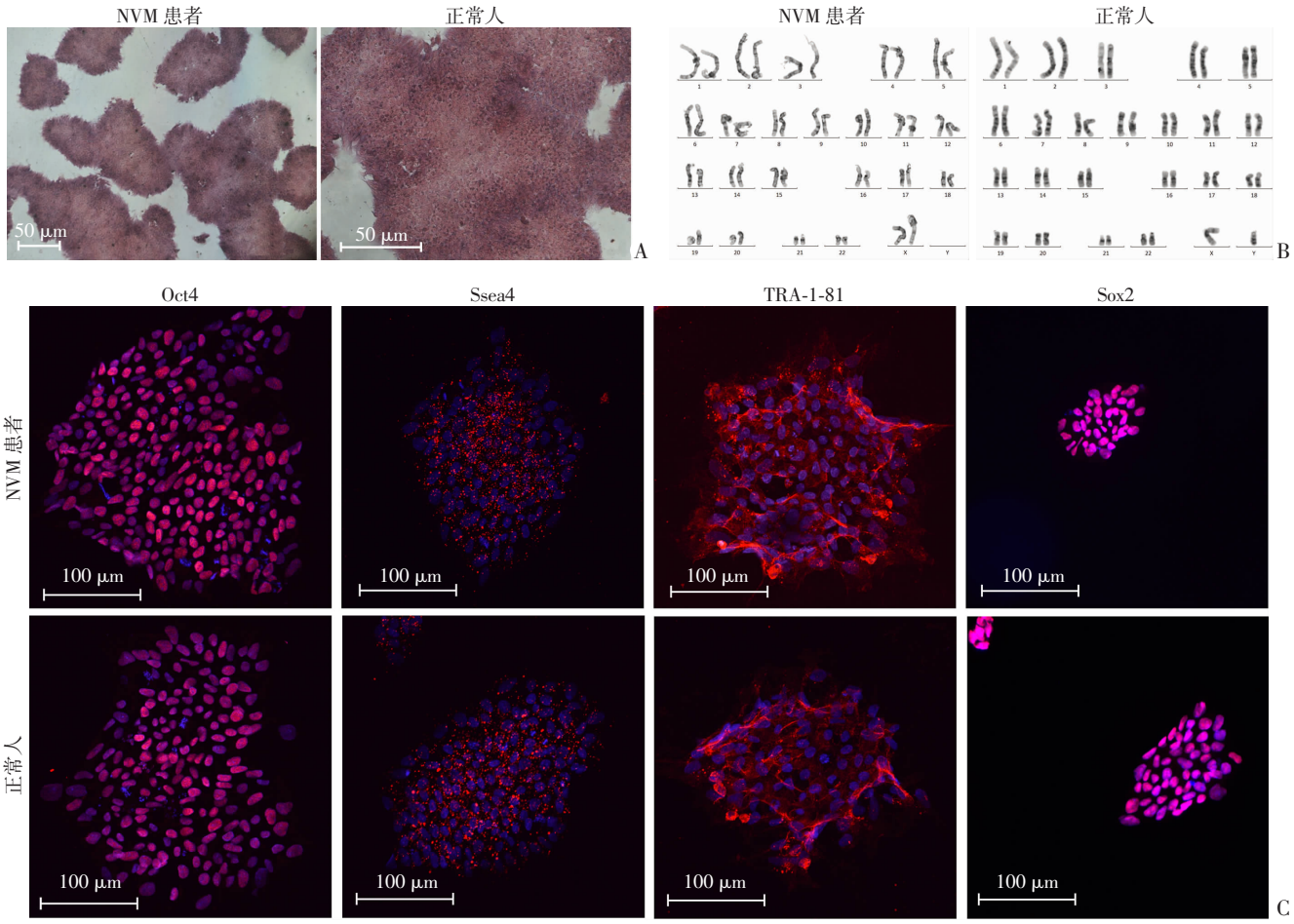
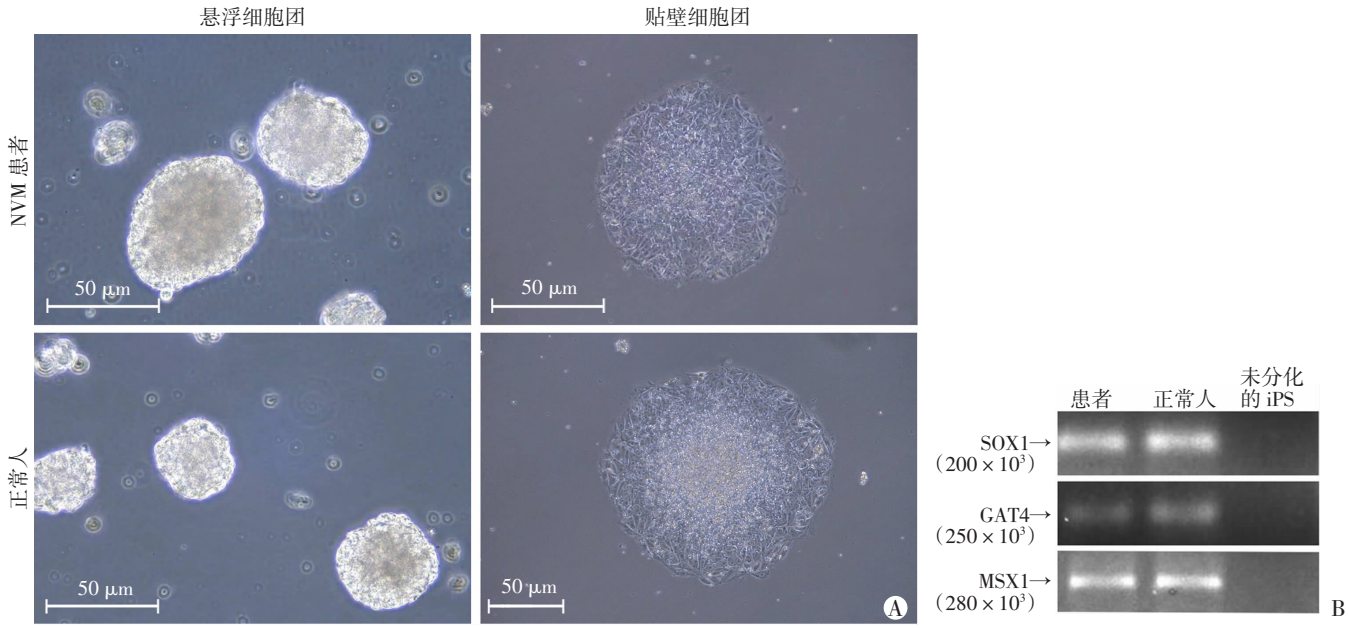


图 2　光学显微镜观察 NVM 患者和健康对照的第 1 代尿液细胞(×100)、iPS 细胞(×200)和 iPS-CMs(×100)的形态



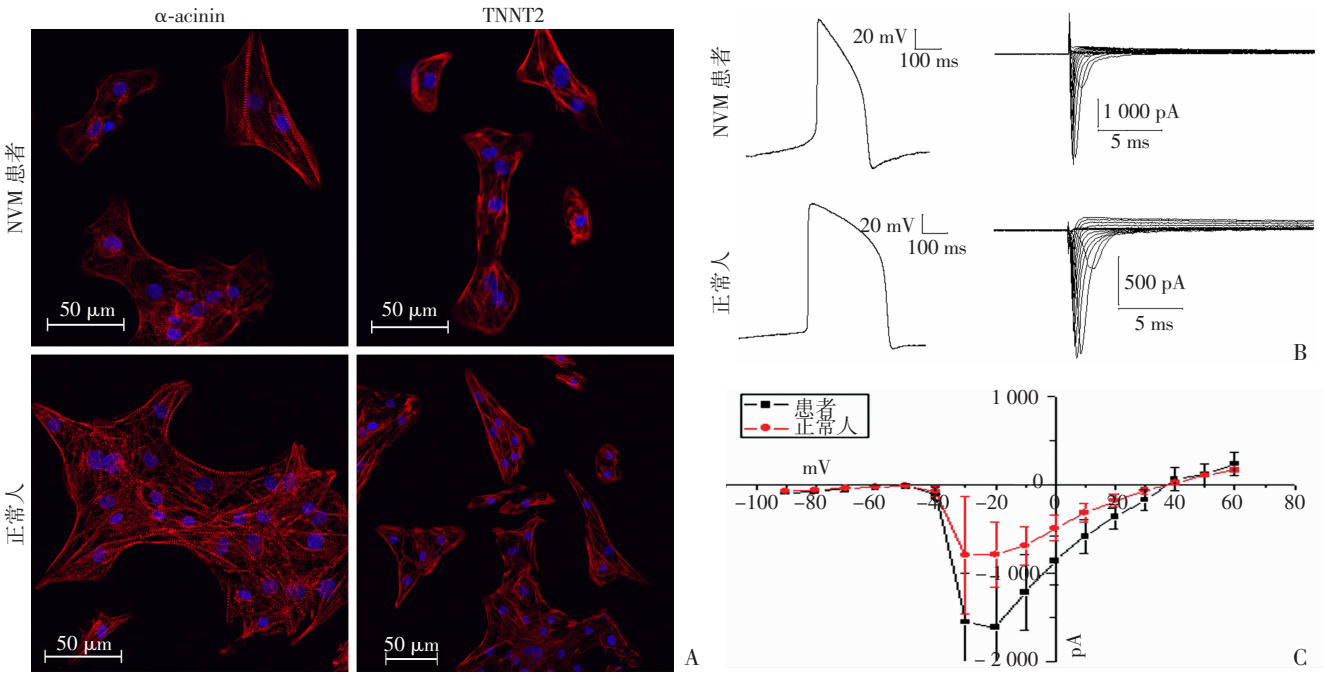
A:碱性磷酸酶染色;B:核型分析结果;C:免疫荧光染色检测干细胞标志

图 3　NVM 患者和正常人衍生的 iPS 细胞的碱性磷酸酶活性、核型分析和 iPS 细胞的特异性标记物结果



A:iPS 的拟胚体分化图;B:琼脂糖凝胶电泳显示代表不同胚层的关键基因

图 4 拟胚体形成试验验证 iPS 的三胚层分化能力的结果



A:免疫荧光检测心肌细胞特异性标志物(红色示 α-actinin 和 TNNT2,蓝色示细胞核);B:膜片钳结果;C:平均电压-电流关系

图 5 iPS-CMs 的心肌细胞特异性标志物和膜片钳结果

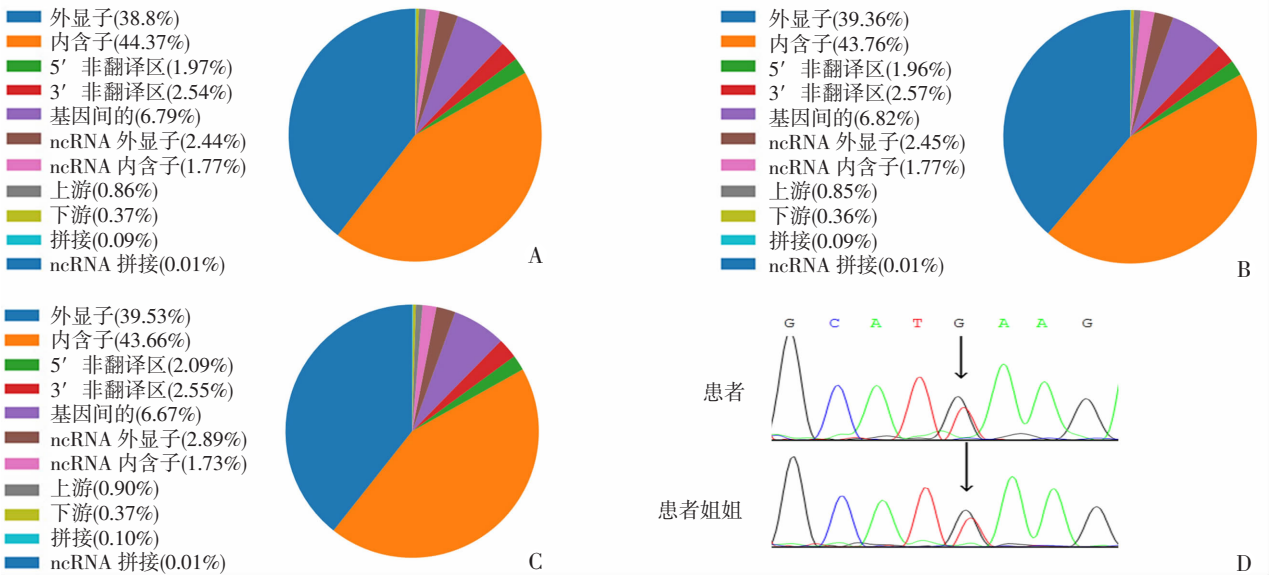
2.4 iPS-CMs 的鉴定

在分化的第 8 天,iPS-CMs 细胞出现了明显的自主搏动,呈同步性,搏动的频率约为 70/min,iPS-CMs 表达心肌细胞特异性表面标志 α-actinin 和 TNNT2(图 5A),iPS-CMs 具有心肌细胞特异性的钠电流及动作电位形成(图 5B)。分别检测患者和正常对照的 6 个 iPS-CMs 的 Na^+ 电流,通过 OriginPro 8 和 Clampfit 10.3 软件绘制平均电压-电流关系,结果显示患者组和正常组的电压-电流关系,钠电流的起始激发电压为-50 mV 左右,最大激发电压为-30 mV 左右(图 5C)。

2.5 全外显子测序结果

在患者的血液样品,iPS 细胞和 iPS-CMs 中发现了相同的 13 587 个单核苷酸多态性 SNP 和 1 004 个

插入缺失突变 InDel,该结果证明我们得到的 iPS-CMs 具有与患者非常相似的突变谱(图 6A~C)。采用生物信息学软件对这些突变进行分析、然后在数据库中 SIFT(http://sift.jcvi.org),Polyphen2_HDIV(http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2)和 MutationTaster(http://www.mutationtaster.org/)进行功能预测。最后,筛选出位于重要功能结构域中的、导致氨基酸极性变化的、在不同物种间保守性好的突变,初步认为它们可能和 NVM 发生相关。本研究共筛选出了 23 个突变位点(表 1、2),其中有 15 个突变(表 2)未被报道与 NVM 相关,另外 7 个突变位点在 MYH7,MYBPC3,TNNT2 中。本研究还发现了 MTUS1 上 2617A > C 的突变位点,本研究前期在患者姐姐全血样本外显子测序中也发现该突变位点(图 6D),并且该突变位点我们已在 HEK293 细胞上进行了功能验证(数据已发表在 Fronrier in pediatrics)[13],结果显示该突变位点与 NVM 的发生相关。



A~C: 先证者血液样本中 iPS、iPS-CMs 基因突变图谱;D: 在两个姐妹中均鉴定出 MTUS1 基因中的 2617A>C. 突变位点

图 6 NVM 患者血液样本,iPS 和 iPS-CMs 的突变分布结果及 MTUS1 的 Sanger 测序结果

表 1 位于 MYBP3, TNNT2, MYH7 和 MTUS1 基因上的突变

染色体位置	参照序列	样本序列	基因名	外显子区域的变异类型	FATHMM	MutationTaster
chr11:47371485	G	A	MYBP3	未知	未知	未知
chr14:23889445	T	G	MYH7	未知	未知	未知
chr:1201334382	G	A	TNNT2	未知	未知	未知
chr14:23892888	A	G	MYH7	未知	未知	未知
chr14:23900794	G	A	MYH7	未知	未知	未知
chr14:23902753	G	A	MYH7	非同义 SNV	未知	未知
chr14:23902865	G	A	MYH7	非同义 SNV	有害	有害
chr8:17570729	A	C	MTUS1	非同义 SNV	有害	中性

表 2 未报道的可能和心肌致密化不全相关的突变

染色体位置	参照序列	样本序列	基因名	氨基酸变化	SIFT	LRT	Polyphen2	MutationTaster
chr1:35227362	C	G	GJB4	p. C169W	有害	有害	有害	有害
chr1:169437392	A	G	SLC19A2	p. I441T	有害	有害	有害	有害
chr2:74166105	C	T	DGUOK	p. P71S	有害	有害	有害	有害
chr3:16344963	C	A	OXNAD1	p. T278N	有害	有害	有害	有害
chr3:139097997	C	T	COPB2	p. V83M	有害	有害	有害	有害
chr3:161214909	G	T	OTOL1	p. C105F	有害	有害	有害	有害
chr7:74193642	G	A	NCF1	p. R90H	有害	有害	有害	有害
chr8:2017449	G	A	MYOM2	p. G236R	有害	有害	有害	有害

3 讨论

NVM 是一种遗传性心肌病,该病的年发病率约为 0.5‰~2.4‰,12%~50%的心肌致密化不全患者有家族史。NVM 常与单基因疾病相关,尤其与神经肌肉疾病或染色体缺失有关[14-16]。难以获取 NVM 病变组织标本,限制了 NVM 发病机制的研究,因此该病的发病机制尚不清楚。

iPS 具有胚胎干细胞相似的增殖和分化潜能,并且避免了有创操作和伦理问题。心肌细胞是一种终末分化细胞,这使得心脏疾病的治疗成为全球面临的热点和难点;另一方面,目前心脏疾病相关的研究大多在动物模型和工具细胞模型上进行,这些模型不能准确地反映疾病的发生机制而限制了研究的进展。iPS 技术的发展为解决这些困惑提供了可能性。研究人员重编程出 1 型长 QT 综合征的 iPS-CMs 模型,该模型对儿茶酚胺诱导出的快速心律失常有显著易感性,并且可以被 β 受体阻滞剂减弱,证明了患者来源的 iPS-CMs 具有患者本身的基因及电生理特性[17]。因此通过 iPS 技术所获得的 iPS-CMs,可以作为心肌细胞的种子细胞,为 NVM 构建疾病模型,为疾病的遗传学研究开辟新的思路。

本研究结果将 NVM 患者及正常人尿液细胞重编程为 iPS,并且证实其具有干细胞的特性和功能,更重要的是进一步成功分化出 iPS-CMs,其细胞形态、细胞自主搏动能力、心肌细胞特异性表面标志表达和离子电流和人心肌细胞相似。本研究采用仙台病毒进行重编程试验[18]。重编程过程中使用了两个小分子:Rho 相关蛋白激酶(ROCK)抑制剂和丁酸钠。Y-27632 是 ROCK 抑制剂已知成员[17],它能使解离的人胚胎干细胞生长、帮助 iPS 细胞的产生[19-20]。据报道,丁酸钠能支持相对低浓度的人和小鼠胚胎干细胞的自我更新,此外,它的使用增加了 iPS 集落与总集落的比例[21-23]。

理论上,iPS-CMs 应与患者具有相同的遗传背景。事实上,iPS 与患者的遗传背景存在一些差异,例如,研究表明,在供体及其 iPS 中发现了 922 种不同的 SNP 和 77 种不同的 InDel[24],iPS 传代越多,iPS 发生突变的可能性就越大,但 YOUNG[25] 已证明 iPS 中的大多数突变是随机和良性的。因此,验证 iPS-CMs 的遗传背景是否发生变化显得格外重要。我们在患者的血液样品,iPS 和 iPS-CMs 中发现了相同的 13 587 个 SNP 和 1 004 个 InDel 突变,该结果表明患者的 iPS-CMs 具有与患者本身非常相似的突变谱。为了确保 iPS-CMs 检测到的突变存在于患者的遗传背景中,必须排除在细胞诱导、分化和传代过程中发生突变的干扰,因此需要选择同时存在于患者血液样品,iPS 和 iPS-CMs 中的突变来进行生物信息学分析和功能预测。这是第一份对 iPS 分化的细胞进行外显子测序的报告。这项研究筛选出了 23 个突变位点,其中有 15 个突变位点未被报道与 NVM 相关,另外 7 个突变位点在 MYH7, MYBPC3 和 TNNT2 中。本研究还发现了一个位于 MTUS1 基因上的突变位点,并且已在 HEK293 细胞上对该位点进行了功能验证,结果显示该突变位点与 NVM 的发生相关(数据已发表在 Fronrier in pediatrics)。作为疾病模型,iPS-CMs 具有不可比拟的优势,因此在患者 iPS-CMs 上进一步验证前期筛选到的突变是下一步研究的重点,以此寻找到和 NVM 发生相关的新突变及其机制。

NVM 患者特异性 iPS-CMs 的构建,不仅为 NVM 研究提供了更优异的“种子”细胞,还能模拟个体的病理状态。在分子、细胞、组织水平上为探索疾病的发生和干预措施提供良好的研究工具,在遗传和表观遗传两方面促进 NVM 的纵深研究,从而推动 NVM 从基础机制研究到临床诊治方案制定及精准干预措施实施的一体化发展。

参考文献:

[1] FINSTERER J, STÖLLBERGER C, TOWBIN J A. Left ventricular noncompaction cardiomyopathy: cardiac, neuromuscular, and genetic factors[J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(4): 224-237. DOI: 10.1038/nrcardio.2016.207.

[2] LUXÁN G, CASANOVA J C, MARTÍNEZ-POVEDA B, *et al*. Mutations in the NOTCH pathway regulator MIB1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy[J]. Nat Med, 2016, 19(2): 193-201. DOI: 10.1007/978-4-431-54628-3_12.

[3] TOWBIN J A. Inherited cardiomyopathies[J]. Circ J, 2014, 78(10): 2347-2356. DOI: 10.1253/circj.cj-14-0893.

[4] 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. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

[6] HUANGFU D W, OSAFUNE K, MAEHR R, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(11): 1269-1275. DOI: 10.1038/nbt.1502.

[7] KIM J B, SEBASTIANO V, WU G M, *et al*. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. Cell, 2009, 136

(3): 411-419. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.023.

[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. DOI: 10.1038/nature07863.

[9] CSÖBÖNYEIOVÁ M, POLÁK Š, DANIŠOVIČ L. Toxicity testing and drug screening using iPSC-derived hepatocytes, cardiomyocytes, and neural cells[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(7): 687-694. DOI: 10.1139/cjpp-2015-0459.

[10] ZHOU T, BENDA C, DUNZINGER S, *et al*. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples [J]. Nat Protoc, 2012, 7(12): 2080-2089. DOI: 10.1038/nprot.2012.115.

[11] HEUBACH J F, GRAF E M, LEUTHEUSER J, *et al*. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells [J]. J Physiol (Lond), 2004, 554(Pt 3): 659-672. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.055806.

[12] GLENN E K, CARLOS A. OBEJERO P. Functional characterization of human stem cell-derived cardiomyocytes[J]. Curr Protoc Pharmacol, 2004, 64(11): 12.1-26. DOI: 10.1002/0471141755.ph1112s64.

[13] BAI X H, ZHOU Y L, OUYANG N, *et al*. A de novo mutation in the MTUS1 gene decreases the risk of non-compaction of ventricular myocardium via the Rac1/Cdc42 pathway [J]. Front Pediatr, 2019, 7: 247. DOI: 10.3389/fped.2019.00247.

[14] ARBUSTINI E, WEIDEMANN F, HALL J L. Left ventricular noncompaction: a distinct cardiomyopathy or a trait shared by different cardiac diseases? [J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 64(17): 1840-1850. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.08.030.

[15] ALTENBERGER H, STÖLLBERGER C, FINSTERER J. Isolated left ventricular hypertrabeculation/noncompaction in a Turner mosaic with male phenotype[J]. Acta Cardiol, 2009, 64(1): 99-103. DOI: 10.2143/AC.64.1.2034370.

[16] OECHSLIN E, JENNI R. Left ventricular non-compaction revisited: a distinct phenotype with genetic heterogeneity? [J]. Eur Heart J, 2011, 32(12): 1446-1456. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq508.

[17] MORETTI A, BELLIN M, WELLING A, *et al*. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome[J]. N Engl J Med, 2010, 363(15): 1397-1409. DOI: 10.1056/NEJMoa0908679.

[18] STADTFELD M, NAGAYA M, UTIKAL J, *et al*. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration[J]. Science, 2008, 322(5903): 945-949. DOI: 10.1126/science.1162494.

[19] KUROSAWA H. Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells [J]. J Biosci Bioeng, 2012, 114(6): 577-581. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.07.013.

[20] PARK I H, ZHAO R, WEST J A, *et al*. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. Nature, 2008, 451(7175): 141-146. DOI: 10.1038/nature06534.

[21] WARREN L, MANOS P D, AHFELDT T, *et al*. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(5): 618-630. DOI: 10.1016/j.stem.2010.08.012.

[22] WARE C B, WANG L L, MECHAM B H, *et al*. Histone deacetylase inhibition elicits an evolutionarily conserved self-renewal program in embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(4): 359-369. DOI: 10.1016/j.stem.2009.03.001.

[23] LIANG G Y, TARANOVA O, XIA K, *et al*. Butyrate promotes induced pluripotent stem cell generation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(33): 25516-25521. DOI: 10.1074/jbc.M110.142059.

[24] OKAMURA K, TOYODA M, HATA K, *et al*. Whole-exome sequencing of fibroblast and its Ips cell lines derived from a patient diagnosed with xeroderma pigmentosum[J]. Genom Data, 2015, 6: 4-6. DOI: 10.1016/j.gdata.2015.07.008.

[25] YOUNG M A, LARSON D E, SUN C W, *et al*. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(5): 570-582. DOI: 10.1016/j.stem.2012.03.002.

(**收稿**:2019-07-10;**修回**:2019-09-24)

(编辑 栾 嘉)