

文章编号 :1004-0374(2009)05-0663-06

胚胎干细胞及诱导多能干细胞向心肌细胞 分化和调控的研究进展

梁 贺, 王 嘉, 曹 楠, 黄吉均, 杨黄恬*

(中国科学院干细胞生物学重点实验室, 健康科学研究所, 中国科学院上海生命科学研究院 /
上海交通大学医学院, 上海 200025)

摘 要: 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有自我更新、无限增殖和多向分化的特性, 包括分化成心脏组织的多种类型细胞。经体细胞重编程产生的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)也被证明有类似胚胎干细胞的特性。但这些多能干细胞向心肌细胞自发分化的效率非常低, 因此, 如何有效地诱导这些多能干细胞向心肌细胞的定向分化对深入认识心肌发生发育的关键调控机制和实现其在药物发现和再生医学, 如心肌梗塞、心力衰竭的细胞治疗以及心肌组织工程中的应用均具有非常重要的意义。该文重点综述了近年来胚胎干细胞及诱导多能干细胞向心肌细胞分化和调控的研究进展, 并探讨了这一研究领域亟待解决的关键问题和这些多能干细胞的应用前景。

关键词: 干细胞; 胚胎干细胞; 诱导多能干细胞; 心肌细胞; 体外分化

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes: progresses and perspectives

LIANG He, WANG Jia, CAO Nan, HUANG Ji-jun, YANG Huang-tian*

(Key Laboratory of Stem Cell Biology, Institute of Health Science, Shanghai Institutes for Biological Sciences/Shanghai
Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: Pluripotent embryonic stem cells (ESCs) are capable of prolonged symmetrical self-renewal and possess the unique property to differentiate into derivatives of all three primary germ layers, including specialized cardiomyocytes with all cell types of the heart, such as atrial-like, ventricular-like, sinus nodal-like, and Purkinje-like cells. Recently generated ESC-like pluripotent cells by reprogramming somatic cells, named induced pluripotent stem cells (iPSCs), open a new gate for cell transplantation-based regenerative medicine. Spontaneous differentiation of ESCs and iPSCs into cardiomyocytes is however limited. To elucidate the regulatory mechanisms and effectively differentiate these pluripotent cells into specific cardiomyocytes are crucial to obtain fundamental knowledge in cardiogenesis, screen drugs and promote the usage of these cells in replacement therapy. This review summarizes the current state of differentiation of cardiomyocytes from mouse and human ESCs and their regulatory factors. The in vitro differentiation potential of iPSCs into cardiomyocytes is also described. Finally, the steps required to fully harness the potential of this in vitro differentiation system and the application potential are discussed.

Key words: stem cell; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells; cardiomyocytes; in vitro differentiation

收稿日期: 2009-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671045; 30518003); 科技部重大科学研究计划(2006CB0F0900); 上海市科委基础重大项目(06DJ14001)

* 通讯作者: Email: htyang@sibs.ac.cn

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有无限的自我更新能力和分化为三个胚层各种类型细胞的特性。研究表明 ESCs 可分化为包括心房肌、心室肌、房室结、蒲肯野氏细胞和窦房结样细胞等多种心肌组织细胞^[1]。这些特性不仅赋予了 ESCs 在研究心肌细胞发生发育分子机制中的重要价值,而且为药物发现和毒性的检测提供了独特的模型,并可能为治疗心肌梗塞的细胞替代疗法以及心肌组织工程提供无限的供源。同时,来自多种体细胞的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的建立,为再生医学带来了更为广阔的前景。然而,对 ESCs 和 iPSCs 向心肌细胞分化的调控机制的认识仍很有限,二类细胞的自发分化效率也非常低。因此,揭示这些多能干细胞向心肌细胞分化的调控机制并有效地诱导这些多能干细胞向心肌细胞的分化是这二类细胞走向应用的必经环节。本文重点总结了近年来诱导小鼠(mouse, m)和人(human, h) ESCs 向心肌细胞分化和调控的研究进展,简述了 iPSCs 在体外向心肌细胞分化的研究现状,并探讨了这些多能干细胞向心肌细胞定向分化亟待解决的关键科学问题和心肌细胞体外分化体系有待推进的用途。

1 ESCs 向心肌细胞自发分化的培养体系

ESCs 可在一定环境下自发分化为心肌细胞。最常用的方法是使 ESCs 自发或通过悬滴法聚集形成类胚体(embryoid bodies, EBs)。后者为诱导 mESCs 向心肌细胞分化的经典方法^[2],采用此方法来自 R1 mESCs 的 EBs 约 90% 以上出现跳动的心肌细胞^[2,3],但每个 EB 含有的心肌细胞数量有限。其向心肌细胞分化的效率受到悬滴中起始细胞数、培养液、血清、细胞系及贴壁时间等的影响。首次在体外诱导 hESCs 分化为跳动的心肌细胞是采用胶原酶消化的 hESCs 小团块自动聚集的 EBs 体系,约 8.1% EBs 含跳动的心肌细胞^[4]。类胚体的模型有较好的可比性和重复性,但效率较低,也较耗时耗力。除类胚体分化体系外,有采用单层贴壁诱导分化心肌细胞^[5],比较省时,也有利于在外加细胞因子或化合物时和细胞的充分接触,但各培养皿/孔间出现跳动的心肌细胞的差异较大。由于自发分化的效率低,近年来不少实验室致力优化培养条件和改进分化方案,以提高分化效率,并在认识影响和调控 ESCs 向心肌细胞分化的细胞内外因素的基础上改善自发分化过程。

2 ESCs 定向分化为心肌细胞的诱导因素

2.1 转录因子的调控 在 ESCs 向心肌细胞分化过程中,早期心肌转录因子,如 Nkx2.5、GATA-4、Tbx5/20、Mef2c、Myocardin 和 HAND 等相互协同,调控心肌特异性基因和蛋白的表达,启动 ESCs 的心肌分化^[6]。研究表明 Nkx2.5 和 GATA-4 受骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)调节,从而促进 mESCs 的心肌分化,同时高表达 Nkx2.5 和 GATA-4 也可提高心肌细胞分化率^[7]。

2.2 细胞因子及调控机制 目前认为心肌发生相关因子,如转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)^[8]、BMP^[9]、Wnt 家族蛋白(Wnt families)^[10]、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)^[8,11,12]等可以促进 ESCs 分化为心肌细胞,提高心肌细胞的分化效率。Cripto(TGF- β 信号通路的受体)的缺失导致 mESCs 向心肌细胞分化效率降低^[13]。类似的,去除 FGF 信号通路的受体 FGFR1,也会抑制 mESCs 向心肌细胞分化^[14]。Notch 信号通路在 mESC 分化为心肌细胞过程中的作用有不同的报道。有发现 Notch 受体的上调可抑制 mESCs 的心肌分化,而下调其受体则能提高心肌细胞分化效率^[15,16];但也有报道在 mESCs 由中胚层向心肌前体细胞分化过程中,上调 Notch 信号可以通过激活 BMP 信号和抑制 Wnt 信号促进中胚层细胞向心血管细胞分化,更有趣的是在 mESCs 分化为造血前体细胞时,加入 Notch 可以使细胞命运从造血系转向心血管系细胞,从而提高心肌细胞分化率^[17]。Wnt 的抑制剂 sFRP、Dkk 以及 Chibby 等可分别与 Wnt 配体、Wnt 受体及 Wnt 信号通路下游因子 β -catenin 结合,对 Wnt- β -Catenin 信号通路起负调节作用^[17,18]。更多研究表明 Wnt3 促进了 mESC 向中胚层的分化,但它抑制了中胚层向心肌细胞的分化^[10,19-21]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)通过 Fit-1 激酶和细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)介导了 FIK-1 激酶的激活,上调 Nkx2.5、 α -myosin heavy chain (α -MHC)和 cardiac troponin T (cTn-T)的表达,促进 mESC 向心肌细胞的分化^[22]。研究发现,生长因子家族成员神经调节蛋白 21 除了有促进神经系统发育的功能作用外,对于诱导心肌前体细胞向心肌细胞分化、促进肌小梁结构完善及心脏传导系统发育也起一定作用^[23]。

ESCs 向心肌细胞的分化是由干细胞分化为中胚层细胞,进而分化为心肌前体细胞,最终形成心肌

终末细胞的过程(图1, 图2)。随着分化时间的不同, 各不同分化阶段的细胞表达不同的表面因子, 因此通过分选出中胚层、心肌前体细胞类群并结合细胞因子的诱导, 可促进心肌细胞的分化。研究表明在 mESC 分化的 4.25 d, 通过 Flk-1 和 brachury 阳性细胞的分选, 可得到纯度较高的心肌细胞, 而在 3.25 d 所分选出的 Flk-1 和 brachury 阳性细胞大部分向造血系细胞分化, 这说明分化过程中细胞因子的时程表达对细胞命运决定起着重要作用^[24]。

同样, 单一的细胞因子也被证明可以促进 hESC 向心肌细胞的分化, 如 BMP2^[25]。采用不同细胞因子在不同时程的组合促进 hESC 的心肌分化被证明较单一因子更为有效。Murry 实验室^[26]用 Activin A 和 BMP4 处理 hESC, 促进其向心肌细胞分化, 并用 percoll 离心分离得到大量的心肌细胞移植大鼠受损的心脏, 使心脏功能得到了改善。Kellar 实验室^[27]用更加复杂的细胞因子组合(BMP4、bFGF、Activin A、VEGF, Wnt signaling inhibitor DKK1),

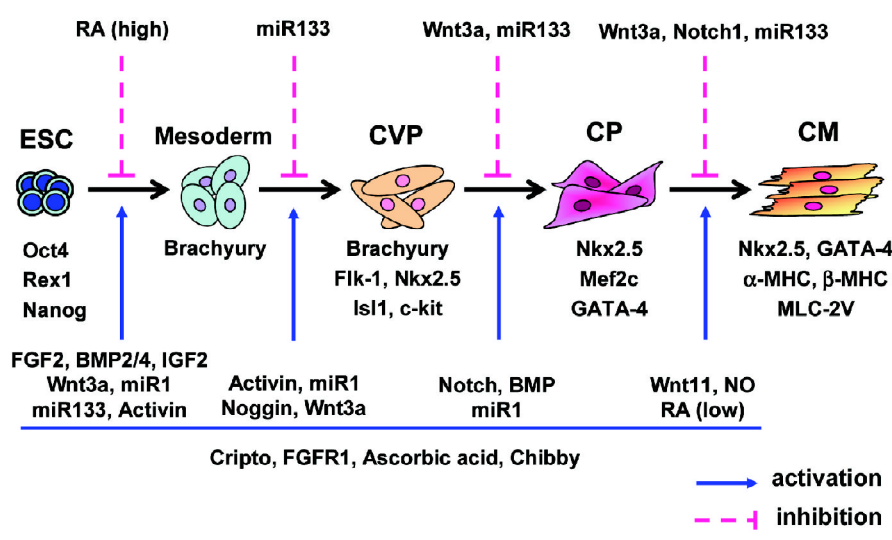


图1 小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化过程及其调控因子

ESC: 胚胎干细胞; CVP: cardiovascular progenitor; CP: cardiac progenitor; CM: 心肌细胞; RA: 视黄酸; NO: 一氧化氮; FGF2: 成纤维细胞生长因子 2; FGFR1: 成纤维细胞生长因子 1; BMP2: 骨形态发生蛋白 2; IGF2: 胰岛素样生长因子 2; miR1: microRNA 1; miR133: microRNA 133

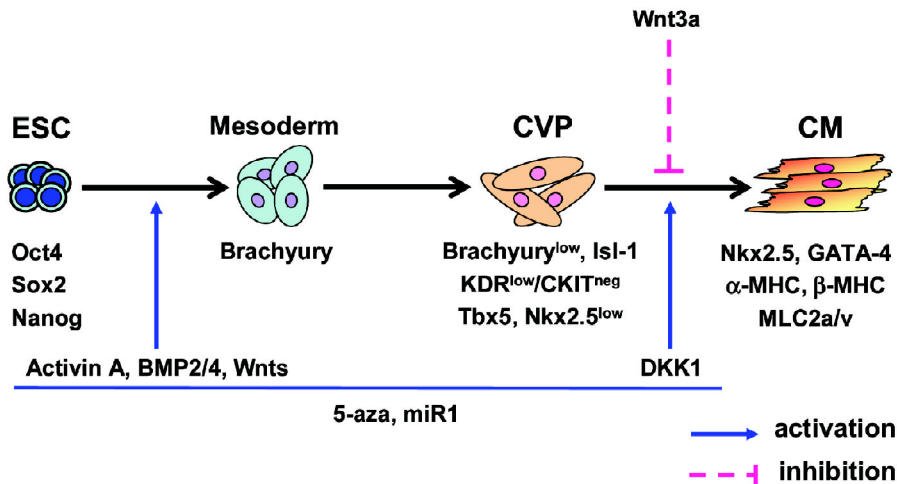


图2 人胚胎干细胞向心肌细胞分化过程及其调控因子

ESC: 胚胎干细胞; CVP: cardiovascular progenitor; CM: 心肌细胞; KDR: kinase insert domain protein receptor; CKIT: C-kit receptor; BMP2/4: 骨形态发生蛋白 -2/4; DKK1: dickkopf homolog 1; 5-aza: 5-Aza-2-deoxycytidine; miR1: microRNA 1

并经流式细胞仪分选出 $KDR^{low}/C-KIT^{neg}$ 的心肌前体细胞群, 在单层培养的体系中这些前体细胞的心肌细胞分化率大于 50%。但由于 $KDR^{low}/C-KIT^{neg}$ 细胞群只占分化细胞的极少部分, 心肌细胞的总体分化效率仍然较低。对细胞因子在 hESCs 心肌分化过程中的具体作用及调控机制的认识还很有限, 如何采用更为有效的细胞因子的组合并在适合的时程促进心肌细胞的分化仍然是该领域探索的热点。

2.3 化学诱导剂 研究证明化学诱导剂可诱导 ESCs 向心肌细胞定向分化。如维生素 C 可显著增加搏动的心肌细胞数, 同时促进心肌特异性基因表达。全反式维甲酸(retinoic acid, RA)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)和垂体后叶素等也可促进 ESCs 在体外分化为心肌细胞。在 EBs 形成的 5 - 7 d 加入低浓度的 RA 可促进 mESCs 向心室肌细胞的分化^[28]。维生素 C 则可促进小鼠心肌细胞特异性基因的表达^[5]。有报道一氧化氮(nitric oxide, NO)处理也可促进 mESCs 向心肌细胞的分化。诱导型 NO 合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和内皮型 NO 合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)上调心肌特异性基因的表达, 促进心肌细胞分化^[29]。此外, 中药淫羊藿苷和去甲淫羊藿素等均可诱导 mESCs 向心肌细胞分化^[30]。近年来, 通过高通量筛选技术发现有效的候选小分子化合物引起了人们越来越多的关注。hESCs 的心肌分化效率也可通过加入小分子化合物得到改善。如 Chien 实验室^[31]研究发现 GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β)的抑制剂 BIO 可以促进 $Isl1^{+}$ 心肌前体细胞的自我更新。

2.4 共培养诱导分化 共培养方法模拟了胚胎发育的调控机制, 采用 ESCs 和内脏内胚层细胞共培养的方式, 利用后者分泌的多种细胞因子可以促进 ESCs 向中胚层心肌细胞分化的机制, 提高心肌细胞的分化效率^[32]。如采用禽类的肝细胞等内脏类细胞和中胚层细胞与 mESCs 共培养可以诱导 mESCs 向心肌细胞分化^[32,33]。Mummery 等^[34]将 hESCs 与内脏内胚层细胞(visceral-endoderm-like cell lines, END-2)共培养可以有效地促进 hESCs 的心肌细胞分化。进一步的研究发现加入 p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinase)信号通路抑制剂的 END-2 条件培养基同样可以促进 hESCs 的心肌分化^[35]。但对于 END-2 细胞分泌的哪些细胞因子在此过程中起到了关键作用尚在研究中。

2.5 表观遗传修饰(epigenetic modification)的调控

ESCs 向心肌细胞分化除了受细胞因子、转录因子和信号通路的调控外, 越来越多的实验证据表明表观遗传修饰在此过程中发挥着重要作用。表观遗传修饰是指非基因序列改变所致基因表达水平的变化, 这种变化可通过减数分裂或(和)有丝分裂遗传, 表观遗传修饰可通过特定酶调节干细胞分化过程中特定基因的沉默或激活, 影响分化的进程, DNA 的去甲基化和组蛋白的乙酰化修饰调节着 ESCs 向心肌细胞的分化进程^[36]。如去甲基化制剂 5-氮杂胞苷促进 hESCs 的心肌细胞分化^[37]。下调组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)的表达可上调 Wnt 信号和 Nkx2.5 的表达, 进而促进心肌分化^[38]。同样, 抑制组蛋白去乙酰化酶可促进中胚层细胞向心肌细胞的分化, 上调心肌细胞 Nkx2.5、GATA-4、MEF 的表达^[39]。对 GATA-4 的乙酰化修饰, 也可上调心肌细胞特异性基因的表达^[40]。近年来, microRNA 在发育和定向分化中的调控作用引起了研究者的关注。Srivastava 实验室^[41]的工作表明, mir-1 和 mir-133 可以促进 mESCs 中胚层的分化, mir-1 可通过转录抑制 Notch 配体 delta-like 1 促进心肌细胞的分化, 但 mir-133 抑制了 Nkx2.5 的表达。同样在 hESCs, 高表达 mir-1 可以提高 Nkx2.5 的表达量和心肌细胞分化效率, 但高表达 mir-133 没有促进心肌细胞分化的作用。小鼠和人胚胎干细胞向心肌细胞分化过程调控因子见图 1 和图 2。

3 iPSCs 向心肌细胞的分化

2006 年 Yamanaka 研究组^[42]通过巧妙的实验设计, 从 24 个候选基因中筛选出 4 个与 ESCs 多能性密切相关的基因 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4, 并将它们导入到小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)和鼠尾成纤维细胞(tail tip fibroblast, TTF), 成功地将其重编程为具有类似 mESCs 的多能性细胞——iPSCs。2007 年底, 人类皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblast, HDF)重编程成功^[43,44]。2008 年, Martin 研究组^[45]和 Yamanaka 研究组^[46]相继在 Circulation 杂志发表论文证明 miPSCs 可以在体外分化成为心肌细胞, 但其分化效率低于 mESCs。这些工作对于 iPSCs 作为新的心肌细胞移植来源给予了肯定与支持, 同时也进一步证明了 iPSCs 的分化多能性。

4 本领域亟待解决的问题与展望

毫无疑问, ESCs 的研究在最近十几年已经取得了丰硕的成果, 不仅在建系和培养技术上, 而且在对其自我更新和定向分化的调控机制方面有了更

深的认识。iPSCs的问世还不到三年,但研究进展迅猛。新近我国科学家证明了iPSCs可以培育出活体小鼠^[47,48],表明iPSCs拥有和ESC相似的全能性。但人们对二类细胞的认识仍有限。如何充分利用ESC和iPSCs向心肌细胞分化的体系,更清楚地了解心肌分化的机制,并揭示二类细胞在分化过程中的异同,为这些多能干细胞的临床应用做好铺垫是我们面临的挑战。为有效地实现ESC和iPSCs向心肌细胞的定向分化,以下几方面的研究有待加强:(1)进一步揭示ESC向心肌细胞定向分化的分子调控机制和表观遗传修饰机理;(2)筛选和确定ESC向心肌细胞分化各阶段的表面标志物;(3)优化ESC向心肌细胞分化的培养方案,有效地提高ESC向心肌细胞的分化效率及建立诱导向特定类型心肌细胞定向分化的方案并探讨其调控机制。在iPSCs研究方面,Lowry研究组^[49]新近利用比较表达组学手段发现miPSCs与mESC基因表达谱上存在明显差别。因此,有必要加强iPSCs向心肌细胞分化过程中和ESC分化特性的比较研究,如iPSCs是否具有和ESC一样的体外分化为心肌细胞潜能和调控机制;不同来源、不同方法和不同因子组合产生的iPSCs其心肌分化潜能以及成瘤性是否有差别;现阶段已知的一些促进ESC向心肌分化的因子和化合物是否同样能促进iPSCs的心肌分化;iPSCs分化得到的心肌细胞是否有正常的生理功能和电生理特性,并能改善心梗模型动物的心功能;iPSCs的应用有待于建立起有效的向心肌细胞诱导分化的方案,在ESC建立的诱导分化方案是否同样适用于iPSCs。由于ESC分化的心肌细胞具有类似成熟心肌细胞的功能和调控机制^[50-52],随着研究的深入,iPSCs和iPSCs的体外分化模型作为进一步了解心脏发育的过程,进而研究遗传性心脏疾病的发生机制的用途将会受到更多的重视;同时,利用ESC向心肌细胞分化的体外模型检测药物的心肌细胞毒性及筛选促进心肌分化、改善心肌细胞收缩和心电功能化合物的价值将会得到体现;并且,这二类多能干细胞作为细胞替代疗法供源的临床前研究将会加强。总之,随着我们对心血管发育生物学和干细胞生物学的深入了解,再生医学将会迎来一个新的纪元。

[参 考 文 献]

- [1] Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*, 2002, 91(3): 189-201
- [2] Wobus AM, Guan K, Yang HT, et al. Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol*, 2002, 185: 127-56
- [3] Yang HT, Tweedie D, Wang S, et al. The ryanodine receptor modulates the spontaneous beating rate of cardiomyocytes during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9225-30
- [4] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 2001, 108(3): 407-14
- [5] Takahashi T, Lord B, Schulze PC, et al. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation*, 2003, 107(14): 1912-6
- [6] Chen K, Wu L, Wang ZZ. Extrinsic regulation of cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *J Cell Biochem*, 2008, 104(1): 119-28
- [7] Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, et al. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(10): 7096-105
- [8] Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res*, 2009, 19(1): 103-15
- [9] Hosseinkhani M, Hosseinkhani H, Khademhosseini A, et al. Bone morphogenetic protein-4 enhances cardiomyocyte differentiation of cynomolgus monkey ESCs in knockout serum replacement medium. *Stem Cells*, 2007, 25(3): 571-80
- [10] Nakamura T, Sano M, Songyang Z, et al. A Wnt- and β -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 5834-9
- [11] Rosenblatt-Velin N, Lepore MG, Cartoni C, et al. FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 2005, 115(7): 1724-33
- [12] Kruthof BP, van WB, Somi S, et al. BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol*, 2006, 295(2): 507-22
- [13] Xu C, Liguori G, Adamson ED, et al. Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1. *Dev Biol*, 1998, 196(2): 237-47
- [14] Dell'Era P, Ronca R, Coco L, et al. Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circ Res*, 2003, 93(5): 414-20
- [15] Nemir M, Croquelois A, Pedrazzini T, et al. Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling. *Circ Res*, 2006, 98(12): 1471-8
- [16] Schroeder T, Meier-Stiegen F, Schwanbeck R, et al. Activated Notch1 alters differentiation of embryonic stem cells into mesodermal cell lineages at multiple stages of development. *Mech Dev*, 2006, 123(7): 570-9
- [17] Chen VC, Stull R, Joo D, et al. Notch signaling respecifies the hemangioblast to a cardiac fate. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10): 1169-78
- [18] Singh AM, Li FQ, Hamazaki T, et al. Chibby, an antagonist of the Wnt/ β -catenin pathway, facilitates cardiomyocyte

- differentiation of murine embryonic stem cells. *Circulation*, 2007, 115(5): 617-26
- [19] Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al. Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J*, 2005, 19(11): 1534-6
- [20] Koyanagi M, Haendeler J, Badorff C, et al. Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of human circulating progenitor cells to cardiomyogenic cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 16838-42
- [21] Singh AM, Terada N. Bypassing heterogeneity: the road to embryonic stem cell-derived cardiomyocyte specification. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(3): 96-101
- [22] Song YH, Gehmert S, Sadat S, et al. VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(4): 999-1003
- [23] Wang Z, Xu G, Wu Y, et al. Neuregulin-1 promotes cardiomyocyte differentiation of genetically engineered embryonic stem cell clones. *BMB Rep*, 2008, 41(10): 699-704
- [24] Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1⁺ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell*, 2006, 11(5): 723-32
- [25] Tomescot A, Leschik J, Bellamy V, et al. Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. *Stem Cells*, 2007, 25(9): 2200-5
- [26] 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. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(9): 1015-24
- [27] Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, 2008, 453(7194): 524-8
- [28] Wobus AM, Kaomei G, Shan J, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(6): 1525-39
- [29] Kanno S, Kim PK, Sallam K, et al. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(33): 12277-81
- [30] Zhu DY, Lou YJ. Inducible effects of icariin, icaritin, and desmethylcaritin on directional differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(4): 477-85
- [31] Qyang Y, Martin-Puig S, Chiravuri M, et al. The renewal and differentiation of Isl1⁺ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(2): 165-79
- [32] Rudy-Reil D, Lough J. Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells. *Circ Res*, 2004, 94(12): e107-16
- [33] Bin Z, Sheng LG, Gang ZC, et al. Efficient cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2 combined with visceral endoderm-like cells. *Cell Biol Int*, 2006, 30(10): 769-76
- [34] Mummery C, Ward-van OD, Doevendans P, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*, 2003, 107(21): 2733-40
- [35] Graichen R, Xu X, Braam SR, et al. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation*, 2008, 76(4): 357-70
- [36] Tada T. Toti-/pluripotential stem cells and epigenetic modifications. *Neurodegener Dis*, 2006, 3(1-2): 32-7
- [37] Xu C, Police S, Rao N, et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res*, 2002, 91(6): 501-8
- [38] Liu Z, Li T, Liu Y, et al. WNT signaling promotes Nkx2.5 expression and early cardiomyogenesis via downregulation of Hdac1. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(2): 300-11
- [39] Karamboulas C, Swedani A, Ward C, et al. HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 20): 4305-14
- [40] Kawamura T, Ono K, Morimoto T, et al. Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 19682-8
- [41] Ivey KN, Muth A, Arnold J, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 219-29
- [42] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76
- [43] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20
- [44] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [45] Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2008, 118(5): 507-17
- [46] Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2008, 118(5): 498-506
- [47] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 135-8
- [48] Zhao XY, Li W, Lü Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461: 86-90
- [49] Chin MH, Mason MJ, Xie W, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 111-23
- [50] Guo A, Yang HT. Ca²⁺ removal mechanisms in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297: C732-41
- [51] Fu JD, Li J, Tweedie D, et al. Crucial role of the sarcoplasmic reticulum in the developmental regulation of Ca²⁺ transients and contraction in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *FASEB J*, 2006, 20(1): 181-3
- [52] Liu J, Fu JD, Siu CW, et al. Functional sarcoplasmic reticulum for calcium handling of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: insights for driven maturation. *Stem Cells*, 2007, 25(12): 3038-44