

文章编号: 1004-0374(2009)05-0729-05

诱导多能干细胞在心血管疾病研究和治疗中的应用

王弘恺^{1,2}, 康九红^{2*}

(1 复旦大学上海医学院, 上海 200032; 2 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)不仅具有与胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)相似的各项特性, 相对于ESC, iPS细胞, 尤其患者特异性iPS细胞还具有来源方便、不存在免疫排斥和伦理问题以及可以保留特定个体基因型等优点, 为再生医学提供了可能的细胞来源。该文主要从心血管药物的筛选、疾病模型的建立、iPS细胞应用于心脏移植研究等方面入手, 探讨了iPS细胞在心血管疾病研究和治疗中的现状和未来。

关键词: 干细胞; 诱导多能干细胞; 心血管疾病; 药物筛选; 疾病模型; 干细胞移植

中图分类号: Q813; R54 **文献标识码:** A

Application of induced pluripotent stem cells in cilinical cardiovascular diseases

WANG Hong-kai^{1,2}, KANG Jiu-hong^{2*}

(1 Shanghai Medicine School, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2 School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Besides the similar pluripotency and self-renewal with embryonic stem cells(ESCs), induced pluripotent stem cells(iPS), especially patient-specific iPS cells can also avoid the immunological rejection and the genome of the individual. Thus iPS cells are recognized as the potential and promising seed cells in regeneration medicine. Here we review the studies on the mechanisms and cilinical application of iPS cells in cardiovascular disease.

Key words: stem cell; induced pluripotent stem cells; cardiovascular disease; drug toxicity testing; disease model derivation; stem cell transplantation

心血管疾病(cardiovascular disease)包括心脏和血管疾病, 在我国的死因构成比中约占40%, 位居首位, 严重危害了人们的健康。由于心肌细胞是一种终末分化的细胞, 一旦心肌发生缺血梗死或者别的创伤导致心肌细胞死亡, 这种创伤就是不可逆的。因此, 尽管不断有新型药物的研发和新型治疗技术的推广以改善心血管疾病传统的治疗模式, 但现有的治疗心血管疾病的手段还不能降低已经发生器质性损伤的患者的病死率, 这也是为何晚期心衰患者或者冠心病患者的病情进行性恶化, 生活质量差, 最终导致死亡的一个主要原因^[1]。虽然近年来发展的移植技术可以有效地解决这一问题, 但由于活体心脏来源缺乏以及异体免疫排斥等, 移植术的应用

受到很大的限制。2002年, Strauer等^[2]通过经皮腔内冠状动脉成形术将骨髓干细胞移植入10名心肌梗死患者的梗死冠脉, 证实多能干细胞人体移植可以改善心肌梗死的梗死面积, 从而达到治疗效果^[2]。至此将干细胞技术引入临床, 展示出多能干细胞在心血管疾病治疗中广泛的应用前景。

目前应用于心血管疾病的多能干细胞(pluripotent stem cells)种类繁多, 例如骨骼肌成肌细胞、骨髓间充质干细胞、内皮祖细胞、肝脏干

收稿日期: 2009-08-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(30625014; 90919028)

*通讯作者 Tel:021-65988560; E-mail:jhkang@tongji.edu.cn

细胞、造血干细胞等。1996年,人类胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)被科研工作者成功分离并体外培养^[3],此后Amit等^[4]通过长期培养及诱导分化实验证实, hESC不仅具有分化为内、中、外三个胚层的多能性,而且具有持续分裂的自我复制能力,其分裂能力与全能性要远远高于已经部分分化的多能干细胞,这给移植医学带来极大的希望和曙光。可是如何克服人类胚胎干细胞面临的伦理和免疫排斥问题,从而应用于临床一直困扰着生命科学工作者。2006年, Takahashi和Yamanaka^[5]首次报道通过逆转录病毒将Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4等4个因子导入小鼠成纤维细胞,经培养得到一种具有类似ESC的具有分化为内、中、外三个胚层潜能的类干细胞,命名为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)。iPS细胞,尤其是患者特异性iPS细胞的出现,完全克服了伦理和免疫排斥两大难题,大大拓宽了多能干细胞种子的来源,将干细胞研究和再生医学推向了一个全新的境地。本文的目的在于探讨iPS细胞作为多能干细胞应用于心血管疾病治疗的现状与前景。

1 iPS细胞的全能性和临床应用的安全性

1.1 全能性 Takahashi和Yamanaka等^[5]以Fbx15为筛选标记,向小鼠成纤维细胞中导入*Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4* 4个关键基因并获得最初的鼠源iPS细胞后,将其与ESC分别在形态学、基因标志物、表观遗传学以及诱导胚状体及畸胎瘤等方面进行了详细的对比,发现iPS细胞与ESC的各种生物学特性虽然不是完全一致,但非常相似。2007年, Takahashi等^[6]在前人的基础上使用相似的逆转录病毒介导的方法,向人成纤维细胞内导入上述4个因子,成功获得了人的iPS细胞并且在体外培养和畸胎瘤形成中观察到该iPS细胞可以分化为全部三个胚层。随后,诱导iPS细胞向各种方向分化的实验进一步证明了iPS细胞的分化潜力。对比了向心肌分化的iPS细胞与ESC,发现虽然iPS细胞形成胚状体的效率与速度比ESC慢,但是由iPS细胞分化而来的心肌细胞在组成、结构和功能上与来源于ESC的心肌细胞非常相似。Wernig等^[7]沿用Okabe等^[8]诱导分化ESC的方法,成功地由iPS细胞分化出具有典型神经祖细胞形态与蛋白表达的神经干细胞,之后通过培养分别得到神经元、星形胶质细胞和少突细胞,以及拥有多巴胺活性的神经细胞,并且这些细胞能够在帕金森小鼠的脑内表现出神经细胞的功能。随后的大量研究显示, iPS细胞还能分化为有

功能的肝细胞^[9]、胰腺细胞^[10]、视网膜细胞^[11]和骨细胞^[12]等。这些研究都证明iPS细胞具有与ESC相似的多向分化的潜能,并有可能取代干细胞进入临床治疗。

1.2 安全性 长期观察发现,借助反转录病毒向细胞导入Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc等因子诱导的iPS细胞导入小鼠体内后极易生长肿瘤^[10]。究其原因,可能是因为诱导因子中含有致癌基因*c-Myc*,反转录病毒附带的一些因子误激活了宿主的一些致癌基因,或者是反转录病毒本身诱导细胞产生了肿瘤等。这些都是iPS细胞走向临床的巨大障碍。为了解决这个问题,国际上很多实验室尝试在不带入反转录病毒的情况下诱导iPS细胞的产生,并取得了巨大的成功。Stadtfield等^[13]和Okita等^[9]先后利用不容易整合到宿主基因的腺病毒及质粒为载体向目的细胞导入上述4个因子诱导iPS细胞产生;Woltjen等^[14]利用piggyBac为中介向细胞内导入上述4个因子诱导iPS细胞;Gonzalez等^[15]则利用单个多顺反子的媒介同时导入上述4个因子的方法诱导iPS细胞;Zhou等^[16]将Yamanaka因子的蛋白质产物导入细胞诱导iPS细胞。结果,这些方式都在不带有反转录病毒的情况下成功产生了iPS细胞,而且这些iPS细胞同样能表达ESC的典型标志,如NANOG、SOX-2、SSEA-1等,并能分化出三胚层,表现出与由反转录病毒诱导的iPS细胞和ESC极为相似的特性。由此iPS细胞的安全性得到了可靠的提高。当然,癌症发生的危险性虽然能通过这些方式大大降低,但是在没有完全阐明iPS细胞产生机制之前,我们仍然不能说iPS细胞应用于临床就是安全的,iPS细胞的安全性和潜在危险性都需要通过长期的观察和实验加以证实。此外,与ESC相似,如果iPS细胞不经诱导定向分化就导入受体体内亦存在产生畸胎瘤的风险。

1.3 相对于ESC的优越性 研究证实相较于ESC, iPS细胞的来源很丰富。最初的iPS细胞是由鼠成纤维细胞诱导产生的,目前人们已经分别从人B淋巴细胞^[17]、胰腺细胞^[18]、肝细胞和胃细胞^[19]、神经细胞^[20]、睾丸细胞^[21]、骨髓细胞^[22]等诱导出了iPS细胞。可以肯定,体内的大部分细胞都有可能被转化为iPS细胞,相比之下ESC一般需要取自异体供者,来源受到了很大的限制并且成本也比较高。

从iPS细胞诱导方式的演化过程也可以清楚地看到,由于不再必须向细胞基因组内导入外源病毒和基因, iPS细胞的安全性得到了极大提高。其分

化方面的全能性也得到了不断的验证。同时, 合理运用 iPS 细胞可以避免免疫排斥。在移植治疗中, 不论是完整器官的移植还是多能干细胞移植, 目前面临的最大的障碍就是免疫排斥。虽然临床上有药物能降低患者对异体移植物的排斥反应或者通过对移植物的特殊处理去除其特异抗原, 但是往往远期效果不尽如人意。况且免疫抑制药物价格不菲, 其副作用也会导致患者免疫能力下降。iPS 细胞的最大特点就是能从患者自身获得, 从而表达与自身相同的抗原。因此在移植治疗中, 由 iPS 细胞分化而来的组织不会遭到自身免疫系统的攻击, 相对于异体来源的 ESC 能省去大笔用于免疫抑制的花费, 更重要的是, 应该也能够提高移植物的生存时间。由 iPS 细胞分化而来的心肌细胞不论在形态、基因表型、分子标志物、蛋白的表达还是功能上都和由 ESC 分化来的细胞极其相似, 更充分证明了 iPS 细胞具有取代 ESC 进而应用于临床治疗的巨大潜力和优势。

2 iPS细胞向心血管细胞的定向分化

iPS 细胞问世后, 科学家们立刻对 iPS 细胞的定向分化进行了广泛的探索。2008 年, Narazaki 等^[27]首先将原始 iPS 细胞置于涂有 DM(differentiation medium, 基本细胞培养液加上 10% 胎牛血清及 5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇)的 IV 号胶原蛋白培养基上诱导出中胚层细胞^[27], 并筛选出表达 Flk1(内皮细胞和血细胞最早的分化标志^[231])的干细胞。之后通过将 Flk1⁺ 细胞培养于含有 100 ng/mL 人类 VEGF₁₆₅ 及 0.5 mmol/L 的 8-bromo-cAMP 的 DM 培养基^[24]中培养出了血管内皮干细胞, 通过将 Flk1⁺ 与 OP9 基质细胞共同培养的方法^[25, 26]得到了淋巴管内皮细胞以及心肌细胞。Narazaki 等^[27]发现由此分化而来的血管内皮细胞能形成类血管, 可以正常表达 CD31 或 SMA, 而且 CD31⁺ 和 SMA⁺ 细胞还能相互连接, 同时证明这些细胞能进一步分化为微动脉与微静脉。这样分化来的淋巴管内皮细胞也能表现出和 ESC 分化而来的淋巴管内皮细胞相似的特性, 而靠这种方法得到的心肌细胞不仅能正常表达心肌钙蛋白 T, 而且其中一部分可以持续跳动 2 个月以上, 表达几乎所有心脏细胞标志物, 如 Nkx2.5、 α -MHC、HCN4, 还有传导系统及起搏系统标志物。Sawicke 和 Sturala^[28]使用类似的方法由 iPS 细胞获得了心肌细胞, 同样发现由 iPS 细胞分化而来的心肌细胞在组成、结构和功能上与源于 ESC 的心肌细胞非常相似。RT-PCR 显示源于 iPS 细胞的心肌能表达一些具

有代表意义的心肌基因, 例如 *Mesp1*、*FOG-2*、*GATA-4*、*Nkx2.5*、*ANF*、*ALPHA-MHC* 等。在他们的研究中, 由 iPS 细胞分化而来的心肌细胞中发现了钙离子的活动, 表现出搏动的自律性, 以及 β -肾上腺素和毒蕈碱能的信号传导系统。这些研究不仅证明了利用 iPS 细胞向心血管分化的可行性, 也进一步提示 iPS 细胞具有作为心血管移植治疗中种子细胞的潜力。

3 iPS细胞在心血管疾病研究和治疗中的应用

3.1 药物筛选

心血管疾病的临床及科研工作者通过长期临床治疗与观察发现, 一些心血管药物或者非心血管药物(精神病药物、镇静药、止咳药等)都有可能是致死性心律失常, 特别是尖端扭转型室性心动过速的诱因^[29, 30]。由于缺少心肌的体外模型, 许多新药的心脏毒性往往要等到其进入临床试验阶段才会显现, 这给患者带来很大的生命危险。同时, 由于患者体质及病情各异, 不同的药物在同一个患者身上会有不同的作用效果, 如何选择对特定患者最有效的药物也是临床医生常常思考的问题。iPS 细胞的出现首先极大地增加了体外心肌细胞的来源, 还使获得并研究患者的心肌细胞对特定药物的反应成为了可能。不少研究者已经就 iPS 细胞用于临床药物筛选的可能性进行了有益的尝试。Tanaka 等^[31]在 2007 年使用 iPS 细胞 201B7 细胞株进行了这方面研究。他们首先利用 RT-PCR 发现由 iPS 细胞分化而来的心肌细胞中表达了钠离子通道基因 *SCN5A*、钙离子通道基因 *Cav1.2* 和钾离子通道基因 *KCNH2*。随后利用 MEA(multi electrode arrays)系统^[32]分别记录了在奎尼丁(作用于钠通道)、维拉帕米(作用于钙通道)、E-4031(作用于钾通道)作用下心肌细胞的电生理活动, 发现该心肌细胞对这些药物都有类似正常细胞的反应, 进一步证明了各离子通道的存在和该心肌细胞能够对特定药物发生正常反应。最后他们加入去甲肾上腺素并记录到了心肌收缩频率的提升。Yokoo 等^[33]也使用 iPS 细胞 201B7 细胞株从心肌搏动频率和收缩能力做了相似的研究。他们发现 β 受体激动剂、肾上腺素和异丙肾上腺素能随剂量升高而增加心肌细胞搏动频率, 相反 β 受体阻断剂、钠通道阻断剂、普鲁卡因、美西律和氟卡律对心率没有影响。同时, 维拉帕米能降低心肌搏动频率, 而且到一定浓度的时候能导致心肌停搏。在测定心肌细胞收缩力的变化时发现, 肾上腺素和异丙肾上腺素能提高心肌细胞收缩能力, 相反胺碘酮、心得安、美西律对心肌细胞收缩力没

有影响。维拉帕米、普鲁卡因和氟卡律能降低心肌细胞收缩能力。

这些研究说明由iPS细胞201B7分化而来的心肌细胞具有与正常心肌细胞相似的离子通道、信号传导系统，并且能对相应药物作出相应反应。同时，这些研究也提示，将iPS细胞来源的血管细胞用于新药筛选以及毒性测试是完全可行的。而且，利用iPS细胞可以分化为不同种类的细胞，诸如血管细胞、起搏细胞、传导细胞的特性，还可以研究这些不同种类的细胞对同一药物的反应性。当然，由于现在有关iPS细胞的药物研究还局限于体外，在体内特定环境下iPS细胞来源的细胞对药物的反应是否会和正常来源的体细胞相同，人们还不得而知。

3.2 制造遗传性心血管疾病模型 随着基因技术的完善，研究人员可以通过各种生物工程手段获得拥有特定基因型的模型小鼠用于疾病的研究。但是这种方法是在已经明确该基因作用的基础上实现的，对于大部分遗传性疾病，人们并不知道是哪些基因在起主要作用，这大大限制了遗传性疾病模型的建立。从患者身上获得的iPS细胞因为能保留患者的特殊基因型，为研究遗传性疾病发病机制、治疗方法提供了前所未有的机遇。Park等^[34]已经由iPS细胞建立了半腺苷脱氨酶缺乏的重症联合免疫缺陷、戈谢病、帕金森病、亨廷顿病、1型糖尿病、唐氏综合征等遗传性疾病模型。Ebert等^[35]建立了脊髓性肌萎缩(SMA)模型并发现了SMA的一些疾病机制。心血管疾病中已发现诸多遗传性疾病，包括高血压、冠心病、肥厚性心肌病、长QT综合征等，但目前还没有iPS细胞用于建造心血管疾病模型报道。可以预见，iPS细胞技术应用于建造心血管疾病模型指日可待，并将成为未来研究与治疗该类疾病的宝贵财富。

3.3 细胞移植 ESC分化而来的心肌细胞移植实验很早就开始在小鼠身上进行。研究发现，直接向心肌梗死区域注射ESC源的心肌细胞或者通过冠状动脉向梗死区域注射ESC源的心肌细胞能获得良好的再生效果，然而通过支架植入心肌细胞却不能和小鼠心脏结合^[36]。就生存时间来说，ESC细胞分化而来的心肌细胞的功能期最长是6个月^[37]，而且时间与移植组织体积大小成反比。移植后的心肌细胞致瘤的报道比较少见，但是在其他移植领域却发现由ESC分化来的移植细胞有致瘤的现象^[38]。可见，即使在ESC领域，干细胞移植仍然存在不少问题有待

解决。

Nelson等^[39]在2009年7月份报道，将由iPS细胞分化而来的心肌细胞移植入具有完整免疫系统的成年小鼠梗死心脏内，能够观察到功能性的新生心肌。鉴于iPS细胞和ESC的相似性，出现在由ESC分化而来的心肌细胞上的问题很可能也是iPS细胞移植应用上不得不面对的障碍。虽然需要进一步证实，没有免疫排斥现象也许能延长iPS细胞分化而来的心肌细胞在宿主内的存活时间。iPS细胞的另一特性是获得渠道广泛，这给人们更多的iPS细胞株的选择空间，也许由别的细胞而不是成纤维细胞获得的iPS细胞分化而来的心肌细胞能表现出更好的功能和寿命，等等。所有这些都证明，与ESC比较，iPS细胞移植治疗具有更大的潜力和优越性。

4 总结与展望

综上所述，iPS细胞的出现对心血管疾病的研究乃至整个再生医学领域都是个有力的强心剂，特别是在移植治疗、药物筛查和疾病模型建造方面有其独到的优势，但结合近来的发展，iPS细胞在如下领域将有更加诱人的前景。

近期有学者报道了p53的缺失能使iPS细胞的生成效率提高到10%^[40]，类似的越来越多的研究将极大地促进iPS细胞重编程机制研究，为揭开细胞编程和重编程的面纱做出巨大贡献。随着研究的进展，如果能利用细胞重编程机制使终末分化细胞(如心肌细胞)跳过iPS细胞阶段直接获得分裂活性或直接转化为其他细胞，使这些细胞具有一定的自我生长和相互代偿能力，或许能取代细胞移植在临床领域的应用，同时也将省去定向分化诱导的过程。心脏或血管组织工程学的研究一直是再生医学的重要课题，如今还没有iPS细胞用于组织工程学的相关报道，但iPS细胞肯定也能在这个领域发挥重要作用。同时干细胞安全性的评估(包括致癌性)仍然是至关重要的，详尽的机制研究，权威的安全范围标准，必将推动规范iPS细胞以及其他多能干细胞在临床上的应用。

[参 考 文 献]

- [1] Helito RA, Branco JN, D'Innocenzo M, et al. Quality of life in heart transplant candidates. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2009, 24(1):50-7
- [2] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, 106(15):1913-8

- [3] Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 1996, 55: 254-9
- [4] Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *developmental biology*, 2000, 227: 271-8
- [5] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-6
- [6] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-2
- [7] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5856-61
- [8] Okabe S, F-Nilsson K, Spiro A. C, et al. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. *Mechan Devel*, 1996, 59: 89-102
- [9] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, 322: 949
- [10] Zhang D, Jiang W, Liu M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*, 2009, 19: 429-38
- [11] Hiramia Y, Osakada F, Takahashi K, et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett*, 2009, 458: 126-31
- [12] Tashiro K, Inamura M, Kawabata K, et al. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*, 2009, 27(8): 1802-11
- [13] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322(5903): 945-9
- [14] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-70
- [15] Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(22): 8918-22
- [16] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(5): 381-4
- [17] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133(2): 250-64
- [18] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 890-4
- [19] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 2008, 321(5889): 699-702
- [20] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, 136(3): 411-9
- [21] Golestaneh N, Kokkinaki M, Pant D, et al. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev*, 2009, doi:10.1089/scd.2008.0347
- [22] Kunisato A, Wakatsuki M, Kodama Y, et al. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells Dev*, 2009, doi:10.1089/scd.2009.0149
- [23] Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000, 408: 92-6
- [24] Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 1977-84
- [25] Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 2070-6
- [26] 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: 1534-6
- [27] Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2008, 118: 498-506
- [28] Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2008, 118: 507-17
- [29] Sawicki L, Sturla S. Potentially lethal cardiac side effects caused by psychiatric drugs. *Vertex*, 2008, 19(82): 387-93
- [30] Raschi E, Ceccarini L, De Ponti F, Recanatini M. hERG-related drug toxicity and models for predicting hERG liability and QT prolongation. *Exp Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5(9): 1005-21
- [31] Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al. *In vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385: 497-502
- [32] Suzuki, K, Yasuda, Detection of tetanus-induced effects in linearly lined-up micropatterned neuronal networks: application of a multi-electrode array chip combined with agarose microstructures. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356: 470-5
- [33] Yokoo N, Baba S, Kaichi S, et al. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387: 482-8
- [34] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 07: 041
- [35] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(24): 9826-30
- [36] Siepea M, Heilmanna C, von Samsona P, et al. Stem cell research and cell transplantation for myocardial regeneration. *Eur Cardio thoracic Surg*, 2005, 28: 318-24
- [37] van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res*, 2007, 1: 9-24
- [38] Erdo F, Buhrle C, Blunk J, et al. Host dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23: 780-5
- [39] Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2009, 120(5): 408-16
- [40] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 2009, doi:10.1038/nature08235