

心脏类器官的构建及应用

栾玉玲 张凌霄 邢丽娜 法菁菁 刘宗军

【摘要】 心脏类器官可在体外精确模拟机体的病理生理改变, 弥补细胞模型与动物实验无法准确模拟机体代谢的不足, 在疾病机制探索与药物开发方面有广泛的应用优势与前景。该文主要介绍心脏类器官的构建方法和应用及其优势和面临的挑战, 为心脏类器官在生物医学和疾病治疗领域的研究提供新的思路。

【关键词】 心脏类器官, 多能干细胞, 心血管疾病

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.06.004

类器官技术的发展与成熟为探讨心血管疾病的发病机制及相关新型药物的研发提供了新途径^[1]。类器官是在体外对祖细胞或干细胞重新诱导分化形成的, 是结构与功能都与目标器官或组织类似的三维细胞复合体, 具有稳定的表型和遗传学特征^[2-3]。

1 心脏类器官的构建

1.1 水凝胶技术

类器官与材料学的结合是当前的研究热点, 可用于类器官培养的生物材料有水凝胶、明胶、透明质酸钠、聚乳酸等, 其中以水凝胶为主^[4-5]。水凝胶为高分子网状结构, 组成较为明确, 有较好的生物相容性及理化性质, 可精准模拟细胞组织微环境^[5]。水凝胶可将细胞固定在 3D 空间中, 刺激细胞扩散及细胞间连接产生, 促进类器官的产生^[6-7]。采用动态共价键所交联的高分子水凝胶模拟在体血管组织基质, 建立体外血管内皮祖细胞 (EPC) 三维培养模型, 观测结果提示水凝胶动态特性可影响 EPC 从发泡到血管网络组织生成^[8]。调节细胞黏附水凝胶的硬度可促进血管化心肌样组织的形成, 进而形成具有收缩功能的心血管类器官^[9-10]。在药物检测方面, 类器官与细胞相比敏感性更高, 类器官在刺激下分泌的炎症因子及坏死因子明显增加, 而在 2D 培养中则无明显改变^[11]。水凝胶具有亲水性, 理化性质稳定, 可减少传统芯片

材料对药物或小分子的吸附性, 提高对药物预测的准确性^[5,12]。Wu 等^[13]研发了 1 种新型复合水凝胶, 该水凝胶由具有高电导率和高弹性模量的碳纤维与生物相容性良好的聚乙烯醇组成, 导电性与自然心脏组织相似, 收缩时的弹性模量接近自然心脏组织, 可通过激活 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素介导的力学信号转导通路和上调 RhoA、缺氧诱导因子-1 α 的表达, 显著增强大鼠心肌细胞的体外成熟度及电生理功能。此外, 形成的细胞/水凝胶复合体具有更为规律的自主搏动, 能够对心脏毒性药物阿霉素产生精准反应, 并可对异丙肾上腺素调节心率的作用产生快速反应, 为体外心脏药物的筛选及毒性评价提供了基础。

1.2 3D 打印技术

生物 3D 打印技术可将细胞和生物材料, 按照特定位置环境和生物结构形态, 制造出具有三维仿生和生物学功能的结构, 再现细胞微环境, 精细模拟大尺寸 (厘米级) 含细胞外基质的仿生组织结构。3D 打印技术可将诱导生成的心肌细胞与生物材料结合, 制成以心肌细胞为基础的环片和补片组织, 在一定程度上模拟心肌的结构与收缩特性。Noor 等^[14]报道了 1 种 3D 打印的血管化心脏补片, 该研究将患者大网膜组织细胞重编程为多能干细胞, 诱导其向心肌细胞及内皮细胞分化, 形成具有心脏实质组织和血管的生物墨水, 运用 3D 生物打印技术打印出带有血管的块状心脏组织。这种补片与患者心脏的组织结构及生理特征相匹配, 为药物筛选及器官工程研究提供了新工具。心脏结构及血管网络的完整对心脏功能的发挥至关重要, 3D 打印技

基金项目: 上海市“科技创新行动计划”医学创新研究专项 (21Y11909600); 上海市普陀区卫生健康系统临床医学学科项目 (2023ysxk01)
作者单位: 200062 上海中医药大学附属普陀医院心内科
通信作者: 刘宗军, E-mail: lzj72@126.com

术有望从血管到器官实现对心脏的形态和功能的精确模拟。以色列科学家利用 CT 扫描技术描绘出心脏的形状及主要血管的分布,同时运用数学模型计算不同区域的耗氧量,合理分配血管走向,再采用 3D 打印技术制作具有细胞、血管、心房及心室的“心脏”。由于所有材料均来自患者,可有效避免异体器官移植的排斥问题^[14]。3D 打印技术可完成对毛细血管至整个心脏类器官的精细调控,精准再现 CT 明确的患者特异性解剖结构,实现心室的同步收缩,在收缩峰值期,间壁增厚达 14%,这为实现仿生心脏收缩功能的研究提供了基础^[15]。

1.3 器官芯片技术

器官芯片技术以微流控芯片技术为核心,可识别不同细胞和组织,通过软刻蚀等微细加工技术,将细胞与生理微环境精准结合,在体外最大限度模拟器官特异性生长发育的微环境^[16-17]。传统研究方法无法在体外精确模拟心脏组织的收缩性与电生理反应,而微流控技术则可在体外通过电脉冲信号控制心率,将微流体网络与平面微电极结合,对心肌细胞的电位进行测量^[18]。心脏芯片可确定具有收缩功能的心肌细胞的排列,有助于分析心肌收缩力产生的分子学机制,为精准治疗提供基础^[19]。波士顿大学的研究通过一个 3 cm² 的心脏微型化精密单向微流控泵 (miniPUMP),使心脏组织在 3D 环境中生长,并通过晶片垂直壁上的细胞附着点,观察心肌细胞自体组装并测量心脏细胞的收缩力,进行心脏组织机械应变分析^[20]。miniPUMP 采用患者的细胞制成,可精准了解不同药物对其心脏的影响^[21]。受变色龙变色机制启发,东南大学赵远锦教授课题组,构建具有结构色传感功能的心脏芯片,通过观察颜色变化监测心脏搏动^[22]。将大鼠心肌细胞培养在对光有反射作用且能产生颜色变化的反蛋白石结构水凝胶弹性薄膜中,形成活体结构色水凝胶材料。该材料并与微流控芯片结合,可构建出具有可视化功能的心脏芯片^[22]。薄膜随着心肌细胞发生相应改变,产生光学信号,发生颜色改变,通过芯片颜色可检测心脏搏动情况^[23-24]。

2 临床应用

2.1 疾病模型的构建

心脏类器官可用于研究组织器官的结构与功能,还可模拟早期心脏发育模式及基因突变导致的病理改变,对疾病的发生机制进行研究。心脏类器官可产生自发电位与诱发电位,信号传导速度比二

维培养的细胞更快。虽然用于类器官整体的电生理技术尚未成熟,但类器官为心律失常研究提供了可视化手段。Shinnawi 等^[25]从携带 *KCNH2* 基因 N588K 突变的短 QT 综合征 (SQTS) 患者中培育出特异性多能干细胞,诱导分化 SQTS 心脏类器官疾病模型,利用光学绘图在组织水平上研究电信号传导和心律失常。研究发现,该心脏类器官的动作电位持续时间明显短于正常多能干细胞诱导分化的心脏类器官,表明类器官可在体外模拟 SQTS,这为 SQTS 的心律失常机制研究与治疗提供了新方法。

心脏类器官可用于解析人类心脏生理特点,也可模拟在发生损伤时的病理改变。Hofbauer 等^[26]构建了可用于解析人类心脏发生自组织原理的心脏类器官平台,采用转录组测序在不同时间段进行测序,发现利用心脏类器官可精确分析心脏发育过程中的基因表达谱。该研究构建敲除 *NKX2-5* 及 *HAND1* 的心脏类器官,证实 *HAND1* 与 *NKX2-5* 具有上下游关系,在冷冻损伤后,心脏类器官可在体外有效模拟心脏再生以及纤维化反应。

2.2 药物试验

药物的不良反应,尤其是器官毒性是药物研发失败和上市后撤回的主要原因,其中十分重要的原因是使用的细胞及动物模型不能准确模拟人体微环境及药物反应^[27]。Mills 等^[28]开发了人类高通量生物工程心脏类器官平台,对 105 个具有促再生潜能的小分子进行了功能筛选,发现类器官与传统 2D 培养结果具有显著差异,可揭示化合物的有害影响,筛选出对心脏功能无明显毒性、促增殖的小分子物质。心脏类器官可最大程度上模拟体内生理状态,同时在空间结构上更真实地模拟心肌,用于临床前药物筛选工作。Lemme 等^[29]采用多能干细胞诱导分化心肌细胞,建立右心房工程化心脏组织 (RA-EHT) 作为人类心房的 3D 模型,与肌肉相比,RA-EHT 心房选择性标志物的表达水平更高,具有更快的收缩性能、更短的动作电位持续时间和更高的复极分数,能对心房选择性钾电流的药理学操作产生反应,准确反映心房心室肌差异。该研究表明,RA-EHT 可作为临床前药物筛选与实验中的人类心房模型。体外药物诱导心脏毒性试验是临床药物开发的关键,单一诱导的多能干细胞分化的心肌细胞 (hiPSC-CM) 在结构和功能上模拟原生心脏组织的能力有限。利用纤维黏连蛋白、明

胶纳米膜和 3D 培养的人诱导多能干细胞衍生的心肌细胞构造的心脏类器官,其心肌细胞表现出肌节结构,破解了人类 *Herg* 基因编码通道研究中对非心肌细胞的使用限制,在体外表现出阿霉素的心脏毒性和对 hERG 通道阻滞剂/异丙肾上腺素的电活性,表明其在药物诱导的心脏毒性测定和药物筛选中的有效性^[30]。

2.3 中医药领域的探索

中药具有多组分、多靶标的特点,如何对其进行检测和有效筛选是中药学研究中的关键问题。类器官为中医药相关药物筛选及安全性评价提供了新思路,为中药的药效评估及作用机制研究提供了可视化模型。采用新生大鼠心肌细胞、内皮细胞及心脏成纤维细胞构建的 3D 心脏类器官对冠心宁注射液进行研究,发现其能显著逆转苯肾上腺素导致的心脏微球面积和直径增大,以及细胞内钙离子水平、线粒体质量和膜电位的改变,降低 β 心肌肌球蛋白重链、心钠肽及脑钠肽的表达,较为全面系统地描述相应的病生理改变,与中医学整体观念相契合,同时为中医药的系统科学评价提供了可能^[31]。Wang 等^[32]建立了 1 个固定在自动膜片钳系统上的集成平台用于筛选和评估中药提取物、组成物和单体化合物的体外心脏毒性。在筛选出的 1 036 个中草药样品中,2.79% 显著抑制 hERG 通道活性,这种高通量 hERG 膜片钳和多参数心脏毒性筛查方法可用于复杂中草药的大规模临床前评价。Becker 等^[33]进一步优化人诱导多能干细胞来源的心肌细胞电流的实验方法,验证了膜片钳技术应用于人诱导多能干细胞来源的心肌细胞检测的有效性,证实全自动膜片钳通过检测离子电流,进行心脏毒性评价的实用性。

3 小结

心脏类器官是具有研究前景的体外模型,填补了传统二维细胞培养和动物实验的不足,相关研究提供了更为精准的模型,但依然存在一些问题。大部分心脏类器官只含有单一细胞,未涉及神经、免疫系统组织微环境,无法全面模拟体内状态。心脏类器官对于干细胞增殖能力及遗传修饰具有较高的依赖性,较长的建模时间及类器官培养过程中添加的分子抑制剂及生长因子可能会对药物试验结果产生干扰。心脏类器官的构建方式较多,目前尚无统一标准进行评价及量化。尽管心脏类器官技术存在一些缺陷,但是对于疾病模型的构建及药

物试验的探索仍然具有巨大的潜力。将心脏类器官技术与生物材料科学技术结合,为心脏类器官的生长提供空间功能支持,实现组织血管化和神经化,可构建出更符合人体生理状态的心脏类器官模型,加快心脏药物的研发,实现心脏疾病的个性化治疗,为器官移植提供了新的发展方向。

参 考 文 献

- [1] Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research[J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(11):671-687.
- [2] Corrò C, Novellasdémunt L, Li VSW. A brief history of organoids[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 319(1):C151-C165.
- [3] Lehmann R, Lee CM, Shugart EC, et al. Human organoids: a new dimension in cell biology[J]. Mol Biol Cell, 2019, 30(10):1129-1137.
- [4] Mollica PA, Booth-Creech EN, Reid JA, et al. 3D bioprinted mammary organoids and tumoroids in human mammary derived ECM hydrogels[J]. Acta Biomater, 2019, 95:201-213.
- [5] Liu HT, Wang YQ, Cui KL, et al. Advances in hydrogels in organoids and organs-on-a-chip[J]. Advanced Materials, 2019, 31(50):e1902042.
- [6] Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering: state of the art[J]. Circ Res, 2014, 114(2):354-367.
- [7] Weinberger F, Mannhardt I, Eschenhagen T. Engineering cardiac muscle tissue: a maturing field of research[J]. Circ Res, 2017, 120(9):1487-1500.
- [8] Wei Z, Schnellmann R, Pruitt HC, et al. Hydrogel network dynamics regulate vascular morphogenesis[J]. Cell Stem Cell, 2020, 27(5):798-812.
- [9] Shkumatov A, Baek K, Kong H. Matrix rigidity-modulated cardiovascular organoid formation from embryoid bodies[J]. PLoS One, 2014, 9(4):e94764.
- [10] Ahadian S, Yamada S, Ramón-Azcón J, et al. Hybrid hydrogel-aligned carbon nanotube scaffolds to enhance cardiac differentiation of embryoid bodies[J]. Acta Biomater, 2016, 31:134-143.
- [11] Astashkina AI, Mann BK, Prestwich GD, et al. A 3-D organoid kidney culture model engineered for high-throughput nephrotoxicity assays[J]. Biomaterials, 2012, 33(18):4700-4711.
- [12] Yi SA, Zhang YX, Rathnam C, et al. Bioengineering approaches for the advanced organoid research[J]. Adv Mater, 2021, 33(45):e2007949.
- [13] Wu FX, Gao AJ, Liu J, et al. High modulus conductive hydrogels enhance in vitro maturation and contractile function of primary cardiomyocytes for uses in drug screening[J]. Adv Healthc Mater, 2018, 7(24):e1800990.
- [14] Noor N, Shapira A, Edri R, et al. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts[J]. Adv Sci

- (Weinh), 2019, 6(11):1900344.
- [15] Lee A, Hudson AR, Shiowski DJ, et al. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart[J]. Science, 2019, 365(6452):482-487.
- [16] Zhang F, Qu KY, Zhou B, et al. Design and fabrication of an integrated heart-on-a-chip platform for construction of cardiac tissue from human iPSC-derived cardiomyocytes and in situ evaluation of physiological function[J]. Biosens Bioelectron, 2021, 179:113080.
- [17] Ugolini GS, Visone R, Cruz-Moreira D, et al. Generation of functional cardiac microtissues in a beating heart-on-a-chip[J]. Methods Cell Biol, 2018, 146:69-84.
- [18] Cho KW, Lee WH, Kim BS, et al. Sensors in heart-on-a-chip: a review on recent progress[J]. Talanta, 2020, 219:121269.
- [19] Grosberg A, Alford PW, McCain ML, et al. Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: heart on a chip[J]. Lab Chip, 2011, 11(24):4165-4173.
- [20] Jayne RK, Karakan MÇ, Zhang KH, et al. Direct laser writing for cardiac tissue engineering: a microfluidic heart on a chip with integrated transducers[J]. Lab Chip, 2021, 21(9):1724-1737.
- [21] Luni C, Gagliano O, Elvassore N. Derivation and differentiation of human pluripotent stem cells in microfluidic devices[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2022, 24:231-248.
- [22] Fu F, Chen Z, Zhao Z, et al. Bio-inspired self-healing structural color hydrogel[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(23):5900-5905.
- [23] Sun L, Chen Z, Xu D, et al. Electroconductive and anisotropic structural color hydrogels for visual heart-on-a-chip construction[J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(16):e2105777.
- [24] Shang YX, Chen ZY, Fu FF, et al. Cardiomyocyte-Driven structural color actuation in anisotropic inverse opals[J]. ACS Nano, 2019, 13(1):796-802.
- [25] Shinnawi R, Shaheen N, Huber I, et al. Modeling reentry in the short QT syndrome with human-induced pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(18):2310-2324.
- [26] Hofbauer P, Jahnel SM, Papai N, et al. Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis[J]. Cell, 2021, 184(12):3299-3317.e22.
- [27] Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, et al. Xenograft and organoid model systems in cancer research[J]. EMBO J, 2019, 38(15):e101654.
- [28] Mills RJ, Parker BL, Quaife-Ryan GA, et al. Drug screening in human PSC-Cardiac organoids identifies pro-proliferative compounds acting via the mevalonate pathway[J]. Cell Stem Cell, 2019, 24(6):895-907.
- [29] Lemme M, Ulmer BM, Lemoine MD, et al. Atrial-like engineered heart tissue: an in vitro model of the human atrium[J]. Stem Cell Reports, 2018, 11(6):1378-1390.
- [30] Takeda M, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Development of in vitro drug-induced cardiotoxicity assay by using three-dimensional cardiac tissues derived from human induced pluripotent stem cells[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2018, 24(1):56-67.
- [31] 范斯文, 赵玉涵, 肖光旭, 等. 3D类器官心脏肥大模型的建立及在心血管病治疗中药作用机制解析中的应用[J]. 药学报, 2022, 57(10):3067-3076.
- [32] Wang TY, Chen XN, Yu JH, et al. High-throughput electrophysiology screen revealed cardiotoxicity of strychnine by selectively targeting hERG Channel[J]. Am J Chin Med, 2018, 46(8):1825-1840.
- [33] Becker N, Stoelzle S, Göpel S, et al. Minimized cell usage for stem cell-derived and primary cells on an automated patch clamp system[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2013, 68(1):82-87.

(收稿:2022-12-26 修回:2023-09-25)

(本文编辑:王雨婷)