

· 综述 ·

心脏类器官研究进展

刘鹏 李凯园 王淑亚 赵明明 杜凤立 苏国海

【摘要】 类器官是体外构建的由多种类型细胞组成的三维组织培养物,可在培养皿中模拟人体器官发育和各种病理形态。结合基因编辑技术,构建出各种心脏疾病模型,有望以个体化方式预测患者对药物的反应,为基因治疗和再生医学提供新视角。该文介绍心脏类器官在构建心脏疾病模型和药物心脏毒性模型领域中的研究进展。

【关键词】 类器官;基因编辑技术;心脏毒性;疾病模型

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.04.001

自 2009 年成功构造出具有微绒毛结构的肠道类器官 (organoid) 后,类器官的研究一直在推进^[1]。类器官是具有类似人体生理组织功能的三维组织培养物 (3D organoid),可以在体外模拟人体的正常生理和病理变化,并在一定程度上模仿器官功能,因此,类器官成为从基础研究到个性化医疗的理想模型^[2]。

与传统的二维 (2D) 细胞模型相比,类器官能够形成复杂的组织和器官样结构^[3-4],且能模拟人体组织细胞-细胞和细胞-基质间的相互作用。

与动物模型相比,类器官克服了人类与动物在种源上的差异,突破了动物实验成果向临床转化过程中的诸多瓶颈^[5]。

全世界每年死于心血管疾病的人数高达 1 500 万,居各种死因的首位^[6-7]。近年来,各种心脏类器官模型研发迅速^[8],最常见的是人类胚胎干细胞 (HESC) 和人类诱导多潜能干细胞 (HiPSC) 构造的心脏类器官模型^[9-11]。心脏类器官作为新一代药物心脏毒性评估模型和心脏疾病诊疗模型,有利于深入探索心脏的生理功能和心血管疾病的病理机制,也有利于探索肿瘤等相关药物的心脏毒性。

1 心脏类器官培养过程

心脏类器官培养主要需要人多功能干细胞、基质胶以及维持和诱导分化的相关因子。例如,通过各种生长因子诱导 HiPSC 转录分化,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路及其他参与心脏发育的信号通

路,可产生不同的心肌细胞群,如窦房结细胞、房室细胞和浦肯野细胞,在此基础上,利用成纤维细胞合成细胞外间质,可实现心室和心房特有的心肌电生理特性^[12]。在已证实的转录因子中,矮小同源盒基因亚型 2 (SHOX2) 编码蛋白、胰岛因子 1 (ISL1)、T-框蛋白 3 (TBX3) 等可诱导窦房结分化,鸡卵白蛋白上游启动子转录因子 I、II (COUP-TF I、COUP-TF II) 可诱导心房分化。在基质胶中对细胞进行选择诱导分化,可得到不同类型模型,用于疾病模型研究、药物评估模型研究^[13-14]。

结构柱、水凝胶模具、重力悬垂法以及多材料 3D 打印等新技术的兴起,使生理性心脏类器官模型的构建成为可能。Kupfer 等^[15]用 3D 生物打印制造出可灌注的心腔仿真体,该仿真体具有较大的血管管道和间隔通道,可以实现连续、单向流动。Zou 等^[16]研究发现,“valentine heart”型构造可以通过使用水凝胶材料和 3D 生物打印技术来实现。使用定制的基于细胞外基质的生物墨水,可以构造出同步收缩的人体心室式肌泵,肌泵的细胞密度与天然心脏组织的细胞密度具有相同的数量级。

目前,心脏类器官培养最常用的方法是获取患者血液样本、皮肤活组织甚至尿液样本,利用规律间隔成簇短回文重复序列及其相关核酸酶 9 (CRISPR/Cas9) 等技术,经修复基因突变、重建细胞功能及重编程,获得新型人工多能干细胞,进而构造出特定的心脏类器官模型。

2 心脏类器官模型的应用

心脏类器官模型的研究相对其他疾病类器官模型较为滞后,原发性结肠癌、肝癌和胃癌等类器官模型已能进行功能测试 (如药物敏感性研究等),

基金项目:国家科技重大专项课题 (2020ZX09201025)

作者单位:250013 济南,山东第一医科大学附属中心医院心血管内科 (刘鹏,李凯园,王淑亚,赵明明,苏国海);250000 济南,山东省公共卫生临床中心 (杜凤立)

通信作者:苏国海, E-mail: suguohai65@163.com

并能将所得数据与个体基因相关联,这证明类器官有助于研究基因靶向精准治疗。心脏是不可再生器官,细胞内基因表达相对保守,利用基因编辑技术,在人类心脏类器官干细胞中引入不同的序列突变,模拟各种心肌突变序列,可以有效从分子水平研究各种心脏疾病的发病机制。

2.1 遗传性心脏病模型

遗传性心脏病是由携带基因突变的心肌细胞引起的,随着时间的推移,这些突变引发心脏功能异常和慢性疾病进展,较常见的即 1 个基因的突变导致大范围遗传性和/或获得性心肌病变。将 CRISPR/Cas9 突变基因组编辑技术应用到心脏类器官中,根据已知特定基因,纠正突变基因或删除异常基因,可修复细胞的生理功能^[17]。编码心脏钠离子通道 α 亚基 (SCN5A)、环化核苷酸调控阳离子通道蛋白亚型 4 (HCN4) 等离子通道的基因若发生突变,可引起先天性窦房结功能障碍。使用基因突变技术改变特异性窦房结样细胞的基因,可构造疾病模型。此外,已有学者利用 HiPSC 构造出心肌病相关性 Duchenne 肌营养不良症、肌联蛋白基因截短突变相关扩张型心肌病、*BRAF* 基因突变相关肥厚型心肌病以及 Barth 综合征等心脏遗传性疾病模型;在离子通道突变导致的各种心律失常中,家族性长 QT 间期综合征、QT 间期延长等疾病模型也已成功构建^[18]。

2.2 非遗传性心脏病模型

急性心肌梗死、心力衰竭、心房颤动、心室颤动(室颤)等非遗传性心脏病模型的构建,不管是动物模型还是细胞模型,一直都是高成本、低效率。

2.2.1 急性心肌梗死模型 在急性心肌梗死模型的研究中, Voges 等^[19] 利用 HiPSC 建立心脏类器官,通过低温损伤造成类器官局部创伤,模拟局部血管收缩导致的区域内心肌细胞缺血和死亡,观察心肌细胞梗死 2 周以上的病理变化。此外,利用 3D 微组织固有的氧扩散梯度和肾上腺素慢性刺激,心脏类器官可以模拟梗死后心脏的器官反应,如心肌酶指标(如肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I 等)变化,细胞-基质的病理变化,在心肌梗死后心脏功能及后期病理性纤维化研究中具有优势^[20]。

2.2.2 心力衰竭模型 Tiburcy 等^[21] 在无血清条件下诱导胚胎中的多能干细胞,使之衍生出大批量的

人类心肌细胞,成功构建细胞结构和功能更成熟的类器官,并探索儿茶酚胺慢性刺激对心肌细胞的作用。心力衰竭模型的构建有利于深入研究心力衰竭的病理机制。

2.2.3 心律失常模型 心律失常可单独发病,亦可与其他心血管疾病伴发。利用人类多能干细胞(hPSC)衍生的心房样心肌细胞,在外界快速起搏的诱导下,可以成功构建室性心动过速(室速)、室颤等心律失常模型,用于离子通道突变的研究。Libring 等^[22] 利用 3D 生物打印胶原的方法和悬浮水凝胶可逆嵌入的特性,设计人体心脏组件,在心肌收缩高峰时,心脏类器官模型的心室可成功实现同步收缩,并可定向传导动作电位。Lee 等^[23] 利用层粘连蛋白/内皮抑素(LN/ET)复合物和成纤维细胞生长因子 4 (FGF4) 等构建体外心脏器官样组织,其中包含心肌细胞、传导组织、平滑肌细胞和内皮细胞,心肌细胞具有收缩功能并可产生动作电位,借助电生理设备可评估心脏疾病对心室功能的影响。心脏类器官在长 QT 综合征、房性心动过速、室速、致心律失常性右心室心肌病等心律失常疾病的研究中显示出巨大的潜力。

2.2.4 糖尿病引起的血管性疾病模型 糖尿病可引起血管病变,如基底膜扩张、血管细胞丢失以及内皮细胞损伤等,导致失明、肾功能衰竭、心血管疾病、卒中等。Wimmer 等^[24] 将人类胚胎干细胞系 H9 和另外 2 个诱导多能干细胞系相结合,生成血管网络并成功构造出功能性血管,并模拟糖尿病引起的基底膜增厚,其中 IV 型胶原显著增加、各种炎性细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)和白细胞介素(IL)-6 的异常表达,这为深入探索糖尿病引起的各种血管病变提供了理想模型。

2.3 药物评估

动物模型虽然在一定程度上可以满足药物安全性研究的要求,但种族差异、高额实验成本、周期长等缺点阻碍了药物的研发进程。类器官可以保持与来源组织高度相似的分子结构和细胞构成,满足临床前药物开发和个体化治疗选择的迫切需要^[25-26]。

通过诱导 HPSC 分化,可以提供大批量、可替代、可再生的体外人类心肌细胞来源的心脏类器官。利用 3D 打印技术,将 PDMS 模具与康宁 Sylgard 184 硅橡胶组织支架相结合,制造出硅胶模具,可以批量获得心脏类器官模型。该模型在组

织水平上与人体心肌细胞具有相似的同步收缩功能,利用非侵入性荧光标记技术、实时视频记录和离线自动量化心肌组织收缩特性,基本可以满足药物筛选要求。利用纤维黏连蛋白、明胶纳米膜和 3D-HiPSC-CT 同样可以构造心脏类器官,其心肌细胞和细胞外基质蛋白(如纤维连接蛋白、I / III 型胶原和层粘连蛋白)呈肌节结构,打破了人类 *Herg* 基因编码通道研究中对非心肌细胞的使用限制^[27]。

3 展望

目前,心脏类器官研究相比其他组织类器官尚处于起步阶段,但在转化研究中表现出巨大的潜力。然而,心脏类器官所构建的疾病模型仍存在较为明显的限制因素。一方面,类器官培养体系与活体相比,缺少与微环境成分(如免疫细胞、肾上腺激素、甲状腺激素等)的相互作用,不能完全模拟细胞在体内所处的状态。心脏类器官模型后期培养过程较为复杂,手动处理微组织和培养基相当困难。另一方面,心脏类器官模型高度依赖干细胞的增殖能力和基因的修饰表达,建模耗时长等因素可能会影响细胞功能,且各个模型的功能认证标准、心脏毒性筛选标准尚未统一。

未来的研究方向是将诱导的心肌干细胞与微环境成分共培养,构建出更符合人体生理状态的心脏类器官模型。心脏类器官是基础研究和转化医学研究的重要工具,通过多学科联合研究,在培养皿中构建出“个性化”心脏类器官疾病模型,有助于推动各种心脏疾病个体化、精准治疗。

参考文献

- [1] Hofbauer P, Jahnel SM, Papai N, et al. Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis[J]. *Cell*, 2021, 184(12):3299-3317.
- [2] Nugraha B, Buono MF, von Boehmer L, et al. Human cardiac organoids for disease modeling[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2019, 105(1):79-85.
- [3] Yang L, Han Y, Nilsson-Payant BE, et al. A human pluripotent stem cell-based platform to study SARS-CoV-2 tropism and model virus infection in human cells and organoids[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(1):125-136.
- [4] Mittal R, Woo FW, Castro CS, et al. Organ-on-chip models: implications in drug discovery and clinical applications[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6):8352-8380.
- [5] Richards DJ, Li Y, Kerr CM, et al. Human cardiac organoids for the modelling of myocardial infarction and drug cardiotoxicity[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(4):446-462.
- [6] Fuster V, Kelly BB, Vedanthan R. Global cardiovascular health: urgent need for an intersectoral approach[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(12):1208-1210.
- [7] Tzoulaki I, Elliott P, Kontis V, et al. Worldwide exposures to cardiovascular risk factors and associated health effects: current knowledge and data Gaps[J]. *Circulation*, 2016, 133(23):2314-2333.
- [8] Jahnel SM, Mendjan S. Taking heart development to the next level[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(2): 180-181.
- [9] Richards DJ, Coyle RC, Tan Y, et al. Inspiration from heart development: biomimetic development of functional human cardiac organoids[J]. *Biomaterials*, 2017, 142(2017):112-123.
- [10] Mithal A, Capilla A, Heinze D, et al. Generation of mesenchyme free intestinal organoids from human induced pluripotent stem cells[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):215.
- [11] Mills RJ, Titmarsh DM, Koenig X, et al. Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(40):E8372-E8381.
- [12] Lewis-Israeli YR, Volmert BD, Gabalski MA, et al. Generating self-assembling human heart organoids derived from pluripotent stem cells[J]. *J Vis Exp*, 2021(175):10.3791/63097.
- [13] Nugraha B, Buono MF, Emmert MY. Modelling human cardiac diseases with 3D organoid[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(48):4234-4237.
- [14] Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct[J]. *Circ Res*, 2002, 90(2):223-230.
- [15] Kupfer ME, Lin WH, Ravikumar V, et al. In situ expansion, differentiation, and electromechanical coupling of human cardiac muscle in a 3D bioprinted, chambered organoid[J]. *Circ Res*, 2020, 127(2):207-224.
- [16] Zou Q, Grottkau BE, He Z, et al. Biofabrication of valentine-shaped heart with a composite hydrogel and sacrificial material[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 108:110205.
- [17] Seguret M, Vermersch E, Jouve C, et al. Cardiac organoids to model and heal heart failure and cardiomyopathies [J]. *Biomedicine*, 2021, 9(5):563.
- [18] Lewis-Israeli YR, Wasserman AH, Gabalski MA, et al. Self-assembling human heart organoids for the modeling of cardiac development and congenital heart disease[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):5142.
- [19] Voges HK, Mills RJ, Elliott DA, et al. Development of a human cardiac organoid injury model reveals innate regenerative potential[J]. *Development*, 2017, 144(6):1118-1127.
- [20] Sharma A, Sances S, Workman MJ, et al. Multi-lineage human iPSC-derived platforms for disease modeling and drug discovery[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(3):309-329.
- [21] Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P, et al. Defined engineered human myocardium with advanced maturation for applications in heart failure modeling and repair[J]. *Circulation*, 2017, 135(19):1832-1847.
- [22] Libring S, Enríquez Á, Lee H, et al. In vitro magnetic

- techniques for investigating cancer progression[J]. Cancers, 2021, 13(17):4440.
- [23] Lee J, Sutani A, Kaneko R, et al. In vitro generation of functional murine heart organoids via FGF4 and extracellular matrix[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):4283.
- [24] Wimmer RA, Leopoldi A, Aichinger M, et al. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy[J]. Nature, 2019, 565(7740):505-510.
- [25] Lewis-Israeli YR, Wasserman AH, Aguirre A. Heart organoids and engineered heart tissues: novel tools for modeling human cardiac biology and disease[J]. Biomolecules, 2021, 11(9):1277.
- [26] Lu HF, Leong MF, Lim TC, et al. Engineering a functional three-dimensional human cardiac tissue model for drug toxicity screening[J]. Biofabrication, 2017, 9(2):025011.
- [27] 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.
- (收稿:2021-11-29 修回:2022-04-20)
(本文编辑:胡晓静)

声 明

尊敬的作者及读者:

近期本刊收到作者举报,有人借《国际心血管病杂志》编辑部的名义与作者进行联系,以国家科研监管抽查往期稿件数据为由,索取费用。

《国际心血管病杂志》编辑部在此郑重声明:

(1)《国际心血管病杂志》唯一的投稿途径为本刊的官方网站 <http://gjxxgzz.paperopen.com/>, 不接受微信、邮箱、纸质稿件邮寄等形式的投稿。

(2)《国际心血管病杂志》编辑部与作者沟通稿件相关事宜均通过官方邮箱 xin_xg@aliyun.com 或办公电话 021-33262055,不会以个人名义主动添加作者、读者微信。

(3)《国际心血管病杂志》官方汇款单位名称为“上海市卫生和健康发展研究中心(上海市医学科学技术情报研究所)”,任何要求作者将费用汇入指定的个人账户或微信、支付宝账号的行为均为欺诈行为。

请各位作者、读者提高警惕,谨防上当受骗!

《国际心血管病杂志》编辑部