

# 利用人诱导多能干细胞构建的心脏类器官在心脏疾病建模及药物评价中的应用价值

龚雪<sup>1</sup>, 樊雍扬<sup>2</sup>, 罗开元<sup>2</sup>, 燕翼<sup>2</sup>, 李忠豪<sup>2</sup>

<sup>1</sup>中国人民解放军南部战区总医院, 广东 广州 510010; <sup>2</sup>广州医科大学附属第三医院心血管内科//广东省产科重大疾病重点实验室//广东省妇产疾病临床医学研究中心, 广东 广州 510150

**摘要:**目的 探讨人诱导多能干细胞衍生的心脏类器官在心脏疾病模型和药物评价中的潜在应用。方法 通过调控 Wnt 信号通路构建由人诱导多能干细胞自组装衍生的心脏类器官, 采用流式细胞术检测心脏类器官中心肌细胞比例, RT-qPCR 检测干细胞标志基因 (*OCT4*, *Nanog*, *SOX2*) 和心肌细胞标志基因 (*TNNT2*, *NKX2.5*, *RYR2*, *KCNJ2*) 的表达, 免疫荧光染色检测 TNNT2、CD31、Vimentin 的蛋白表达, 钙瞬态检测心脏类器官跳动幅度; 建立体外心肌损伤模型和缺血再灌注模型, Masson 染色检测损伤水平, ELISA 检测心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 释放水平; 利用 TUNEL 染色和钙瞬态检测分别评价化疗药物多柔比星和曲妥珠单抗对心脏类器官的毒副作用。结果 心脏类器官在培养第 8 天开始跳动, 心肌细胞在心脏类器官中占比为 32.4%, 心脏类器官可见心肌标志物 TNNT2、NKX2.5、RYR2 和 KCNJ2 大量表达 ( $P < 0.001$ )。不同批次分化的心脏类器官在形态大小、跳动频率、心肌细胞比例、和心肌收缩力方面均无显著差异。心脏类器官可维持体外培养  $> 50$  d。液氮造成心脏类器官心肌损伤, TNNT2 和 MYH7 基因表达下降 ( $P < 0.05$ )、cTnT 分泌增加 ( $P < 0.01$ )、跳动幅度下降 ( $P < 0.01$ ) 和峰值时间增加 ( $P < 0.01$ ), 而卡托普利处理可减轻损伤发生。低氧/复氧诱导心脏类器官缺血再灌注损伤, 心肌纤维化和凋亡增多 ( $P < 0.001$ )。多柔比星处理心脏类器官 24 h 后, 细胞死亡明显增加 ( $P < 0.05$ )、心脏类器官的跳动频率和细胞活力下降 ( $P < 0.05$ ), 且具有剂量依赖性。曲妥珠单抗引起心脏类器官收缩力和钙处理能力下降 ( $P < 0.05$ )。结论 成功构建心脏类器官, 并可用于心脏疾病建模及药物评价。

**关键词:** 人诱导多能干细胞; 心脏类器官; 疾病建模; 药物评价

## Construction of cardiac organoids derived from human induced pluripotent stem cells for cardiac disease modeling and drug evaluation

GONG Xue<sup>1</sup>, FAN Yongyang<sup>2</sup>, LUO Kaiyuan<sup>2</sup>, YAN Yi<sup>2</sup>, LI Zhonghao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>General Hospital of Southern Theater Command of PLA, Guangzhou 510010, China; <sup>2</sup>Department of Cardiology, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University//Guangdong Provincial Key Laboratory of Major Obstetric Diseases//Guangdong Provincial Clinical Research Center for Obstetrics and Gynecology, Guangzhou 510150, China

**Abstract:** Objective To explore the potential applications of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac organoids in constructing cardiac injury models and drug evaluation. **Methods** Cardiac organoids derived from the self-assembled human induced pluripotent stem cells were constructed by regulating the Wnt signaling pathway. Flow cytometry was used to detect the proportion of cardiomyocytes in the cardiac organoids, and RT-qPCR was employed to detect the mRNA expressions. Immunofluorescence staining was used to detect the protein expressions of TNNT2, CD31, and vimentin. The beating amplitude of the cardiac organoids was determined with calcium transient. *In vitro* myocardial injury models and ischemia-reperfusion models were established, and the cell injuries were examined using Masson staining. TUNEL staining and calcium transient detection were used to evaluate the adverse effects of doxorubicin and trastuzumab in the cardiac organoids. **Results** The cardiac organoids began to beat on the 8th day of culture and consisted of 32.4% cardiomyocytes with high expressions of the myocardial markers TNNT2, NKX2.5, RYR2 and KCNJ2. No significant differences in morphological size, beating frequency, proportion of cardiomyocytes, or myocardial contractility were observed in the cardiac organoids differentiated from different batches. These cardiac organoids could be maintained in *in vitro* culture conditions for at least 50 days. Captopril treatment could obviously alleviate liquid nitrogen-induced myocardial injury in the cardiac organoids. Hypoxia/reoxygenation induced ischemia-reperfusion injury and promoted myocardial fibrosis and apoptosis in the cardiac organoids. Treatment with doxorubicin for 24 h resulted in significantly increased cell death and reduced beating frequency and cell viability in the cardiac organoids in a dose-dependent manner. Trastuzumab significantly impaired the contractile and calcium handling abilities of the cardiac organoids. **Conclusion** Cardiac organoids derived from human induced pluripotent stem cells have been successfully constructed and can be used for cardiac disease modeling and drug evaluation.

**Keywords:** human induced pluripotent stem cells; cardiac organoids; disease modeling; drug evaluation

收稿日期: 2025-04-03

基金项目: 国家自然科学基金 (82570445); 广东省科技厅国际合作专项 (2022A0505050079); 广东省基础与应用基础研究基金面上项目 (2024A1515012365); 广州市科技局临床研究专项 (202201020189)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82570445).

作者简介: 龚雪, 本科, 主管护师, E-mail: 503253172@qq.com; 樊雍扬,

在读硕士研究生, E-mail: 760445401@qq.com

通信作者: 李忠豪, 博士, E-mail: 525838244@qq.com

心血管疾病 (CVDs) 是全球首位疾病死亡因素, 其发病率和死亡率仍在持续升高, 目前仍缺乏有效的治疗手段和药物<sup>[1, 2]</sup>。动物模型和二维细胞是现阶段研究心脏发育和心血管疾病的主要模型<sup>[3]</sup>。然而, 二维细胞模型过于简单, 缺乏结构层次、细胞多样性、细胞和细胞间与细胞外基质相互作用, 导致许多生理学上的关键特征

不能通过二维细胞模型展现<sup>[4,5]</sup>。而小鼠、大鼠等动物模型因与人类间存在较大物种差异,并不能完全再现人类心脏的稳态和发病机制<sup>[6]</sup>。因此,迫切需要开发新的体外人源模型来模拟人类特有的心脏病理生理特征,提高心血管疾病研究和药物开发的临床转化效率。

人多能干细胞(hPSCs)包括人胚胎干细胞(hESCs)<sup>[7]</sup>和人诱导多能干细胞(hiPSCs)<sup>[8]</sup>的发现,已经成为研究人类心脏发育和各类心脏疾病基础的突破性工具<sup>[9,10]</sup>。利用hiPSC衍生的心脏类器官(COs)包含多种心脏谱系细胞和较高的细胞成熟度,能更真实模拟心脏组织的细胞互作、结构和功能<sup>[11]</sup>。Lee等<sup>[12]</sup>将基质胶包裹的hiPSCs通过摇床培养法形成拟胚体(EBs)后进行心脏类器官分化,观察到心脏类器官呈现出降解、大球体、大椭圆、大肿胀和多腔室5种形态。但是该分化方法操作复杂,而且得到的心脏类器官存在均一性差、批次间差异大的问题,不能进行大规模的批量培养。Madelyn等<sup>[13]</sup>利用hiPSCs分别衍生的心肌细胞、内皮细胞和心肌成纤维细胞,按照8:1:1比例经过1~2周培养组装成心脏类器官。这种方法构建的心脏类器官在结构上比较简单,大体上呈心肌团块或者贴片样,而且通常缺乏腔室结构,稳定性差,难以模拟心脏的复杂生理状态。因而,目前心脏类器官分化方法复杂,且均一性和稳定性差,亟需找到一种操作简单、稳定性高的心脏类器官分化方法。本研究拟通过优化心脏类器官的分化方法,建立一种更简便、稳定且可大规模培养的心脏类器官分化方案,并进一步利用构建的心脏类器官探索其在心脏疾病建模和药物评价中的应用前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

人诱导多能干细胞(中国科学院广州生物医药与健康研究院馈赠); Essential 8培养基、DMEM/F-12、RPMI 1640培养基、DPBS、TrypLE、B27、B27 minus insulin (Gibco); Accutase (Merck); 基质胶 (Matrigel, Corning); Trizol (Invitrogen); CHIR99021、IWR-1、Y-27632 (Selleck); BMP-4、CD31/PECAM-1 Antibody (R&D Systems); Activin A、卡托普利、多柔比星、曲妥单抗 (MCE); 30%蔗糖溶液、4%多聚甲醛固定液、Triton X-100、DAPI染色液、TUNEL染色试剂盒、CCK-8试剂盒(碧云天); HisyGo RT Red SuperMix for qPCR (+gDNA Wiper)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme); Anti-Cardiac Troponin T抗体、Anti-Vimentin抗体、驴抗兔 IgG H&L、驴抗小鼠 IgG H&L、驴抗羊 IgG H&L (Abcam); FITC anti-human CD31 (BioLegend); PE Mouse Anti-Cardiac Troponin T (BD Pharmingen); 心肌钙蛋白T检测试剂盒 (Cloud-Clone Corp)。

### 1.2 方法

1.2.1 人诱导多能干细胞培养 人诱导多能干细胞在基质胶(1:250稀释于DMEM/F12培养基)包被的6孔细胞培养板中用Essential 8培养基维持和培养。当细胞密度达到85%, DPBS清洗1次,加入1 mL Accutase消化6~8 min,用4 mL培养基终止消化转入15 mL离心管,离心机中以200 g转速离心5 min。弃上清,加入含Rho相关蛋白激酶(ROCK)抑制剂Y-27632(10  $\mu\text{mol/L}$ )的新鲜培养基培养24 h,以减少细胞凋亡。所有细胞维持在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的细胞培养箱中。

1.2.2 心脏类器官分化 心脏类器官构建方法如下<sup>[14]</sup>:人诱导多能干细胞消化、计数,用含有Y-27632(10  $\mu\text{mol/L}$ )的Essential 8培养基接种 $1 \times 10^4$ /孔细胞到U形超低吸附96孔板,200 g转速离心5 min以形成细胞聚集体,记为day-2(D2)。24 h后更换新鲜Essential 8培养基维持培养。D0用含2% B27 minus insulin的RPMI 1640培养基,加入CHIR99021(6  $\mu\text{mol/L}$ )、BMP-4(1.25 ng/mL)和Activin A(1 ng/mL)诱导干细胞向中胚层分化。D1更换成含2% B27 minus insulin的RPMI 1640培养基维持培养。D2开始用含2% B27 minus insulin的RPMI 1640培养基,加入IWR-1(2  $\mu\text{mol/L}$ )培养2 d诱导向心肌前体分化。D4更换成含2% B27 minus insulin的RPMI 1640培养基维持培养。D6更换成含2% B27的RPMI 1640培养基维持培养。D7~10,心脏类器官开始跳动,2 d/次更换培养基维持生长。

1.2.3 冰冻切片免疫荧光染色 将心脏类器官用4%多聚甲醛固定1 h,置于30%蔗糖溶液脱水过夜,进行OCT包埋,切成5  $\mu\text{m}$ 厚的薄片。切片用0.5% Triton X-100破膜30 min, PBS洗3次,5% BSA封闭1 h。将切片放到湿盒里,加入一抗(1:200)置于在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS洗3次,加入二抗(1:1000)室温孵育1 h, PBS洗3次,添加DAPI室温孵育10 min, PBS清洗3次后,封片剂封片,置于共聚焦显微镜下拍照观察。

1.2.4 RT-qPCR检测基因表达 收集约20个心脏类器官置于1.5 mL离心管,加入Trizol进行超声破碎使心脏类器官充分裂解后提取总RNA,使用1  $\mu\text{g}$ 总RNA进行逆转录反应合成cDNA。将cDNA稀释5倍后配置RT-qPCR反应体系,根据ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix使用说明设定退火温度为60  $^{\circ}\text{C}$ 进行PCR扩增目的基因。以GAPDH为内参基因,记录目的基因Ct值,根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算目的基因的相对表达量,引物序列详见表1。

1.2.5 流式细胞术分析 收集约10个心脏类器官置于1.5 mL离心管,加入TrypLE( $\times 10$ )置于37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化30 min。细胞通过70  $\mu\text{m}$ 滤膜去除细胞团块,离心加入4%多聚甲醛固定30 min,接着加入0.5% Triton X-100破膜10 min。PBS清洗2次,5% BSA封闭1 h,将细胞

表1 RT-qPCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
OCT4	CTCTGAGGTGTGGGGGATTC	TCAGGCTGAGAGGTCCCAAG
Nanog	TTTGTGGGCCTGAAGAAAACCT	AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG
SOX2	GCCGAGTGGAACCTTTGTGCG	GGCAGCGTGTACTTATCCTTCT
TNNT2	GGAGGAGTCCAAACCAAGCC	TCAAAGTCCACTCTCTCTCCATC
NKX2.5	CCAAGTGTGCGTCTGCCTTT	CGCACAGCTCTTTCTTTTCGG
RYR2	GGCAGCCCAAGGGTATCTC	ACACAGCGCCACCTTCATAAT
KCNJ2	GTGCGAACCAACCGCTACA	CCAGCGAATGTCCACACAC
MYH7	GGCAAGACAGTGACCGTGAAG	CGTAGCGATCCTTGAGGTTGTA
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

平均分成2份,1份进行同型对照染色,另1份进行心肌细胞(PE Anti-Cardiac Troponin T, 1:100)和内皮细胞(FITC anti-human CD31, 1:100)染色30 min,置于流式细胞仪检测,数据用FlowJo软件进行分析。

1.2.6 心脏类器官低温损伤与卡托普利治疗 将心脏类器官(D25)从96孔板中转移至6孔培养板,DPBS冲洗3次以去除表面附着培养基,将5 mL无菌注射器针头用液氮预冷2 min,在显微镜下使针尖对准类器官外周区域精确接触5 s实施冷冻损伤,冷冻结束后迅速移走针尖并立即加入37 °C预热的培养基,轻轻晃动培养板促进解冻,随后将心脏类器官转移回96孔板,加入含与不含卡托普利(20 μmol/L)的培养基继续培养3 d直到后续分析。

1.2.7 缺血再灌注模型 将心脏类器官(D30)的培养基更换成不含葡萄糖和血清的DMEM/F12培养基,转移至含5% CO<sub>2</sub>和0.1% O<sub>2</sub>的细胞培养箱培养24 h,接着更换成含葡萄糖和10%血清的DMEM/F12培养基,转移至正常细胞培养箱继续培养24 h模拟缺血再灌注。

1.2.8 细胞毒性试验 将心脏类器官(D30)分别与不同剂量的多柔比星(1、5、10和25 μmol/L)孵育24 h,测定心脏类器官跳动频率和收缩力,使用CCK-8试剂盒和TUNEL染色试剂盒分别评估细胞活力和细胞凋亡情况。

1.2.9 曲妥珠单抗处理 将心脏类器官(D30)用含曲妥珠单抗(1 μmol/L)的培养基培养,3 d/次更换新鲜的含有曲妥珠单抗的培养基,培养7d后进行后续功能分析。

1.2.10 TUNEL染色 心脏类器官冰冻切片用0.5% Triton X-100室温破膜5 min, PBS清洗2次,加入50 μL TUNEL检测液在37 °C下避光孵育30 min, PBS清洗3次,滴加DAPI染色10 min,置于荧光显微镜下观察拍照。

1.2.11 钙瞬态测定 心脏类器官用Fluo-4(4 μmol/L)置于37 °C水浴锅中孵育40 min。PBS洗涤2次后,将心脏

类器官转移至玻璃底培养皿,加入Tyrode's溶液置于荧光显微镜下观察、分析绿色荧光信号,计算Ca<sup>2+</sup>瞬态的振幅(ΔF/F<sub>0</sub>),记录Ca<sup>2+</sup>达到峰值的时间。

1.2.12 统计学分析 所有数据均以均数±标准差表示,采用GraphPad Prism 10软件进行统计分析,两组间比较采用*t*检验。多组间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心脏类器官的构建与观察

心脏类器官的分化从EBs开始,通过调控Wnt通路的激活与关闭诱导EBs向中胚层和心肌中胚层分化(图1A)。随着分化的进行,EBs的形态和大小发生显著变化,体积逐渐增大,分化至第8天心脏类器官开始出现跳动,直径达到652.8 μm±38.5 μm(图1B、F)。冰冻切片成像显示分化至第6天心脏类器官出现明显的空腔样结构(图1E)。流式细胞术检测显示,心脏类器官中心肌细胞的占比为32.4%(图1C),内皮细胞的占比为7.03%(图1D)。另外,RT-qPCR结果也显示心肌细胞标记基因TNNT2、NKX2.5、RYR2、KCNJ2的表达升高(*P*<0.001),而干细胞的标记基因OCT4、Nanog、SOX2几乎检测不到(图1G)。

### 2.2 心脏类器官的基因表达及功能验证

将分化D15的心脏类器官进行冰冻切片免疫荧光染色,结果显示心脏类器官不仅富含TNNT2阳性的心肌细胞和Vimentin阳性的成纤维细胞,还有少量CD31阳性的内皮细胞(图2A)。进一步Whole-mount免疫荧光染色也显示D15的心脏类器官包含大量心肌细胞、成纤维细胞和少量内皮细胞(图2B)。钙瞬态检测显示D30的心脏类器官具有规律的收缩舒张能力(图2C、D)。

### 2.3 不同批次的心脏类器官一致性检测

3次重复实验结果显示不同批次的心脏类器官在形态结构大小方面较为一致(图3A),而且3个批次的心脏类器官的跳动频率无明显差异(图3B)。流式细胞术

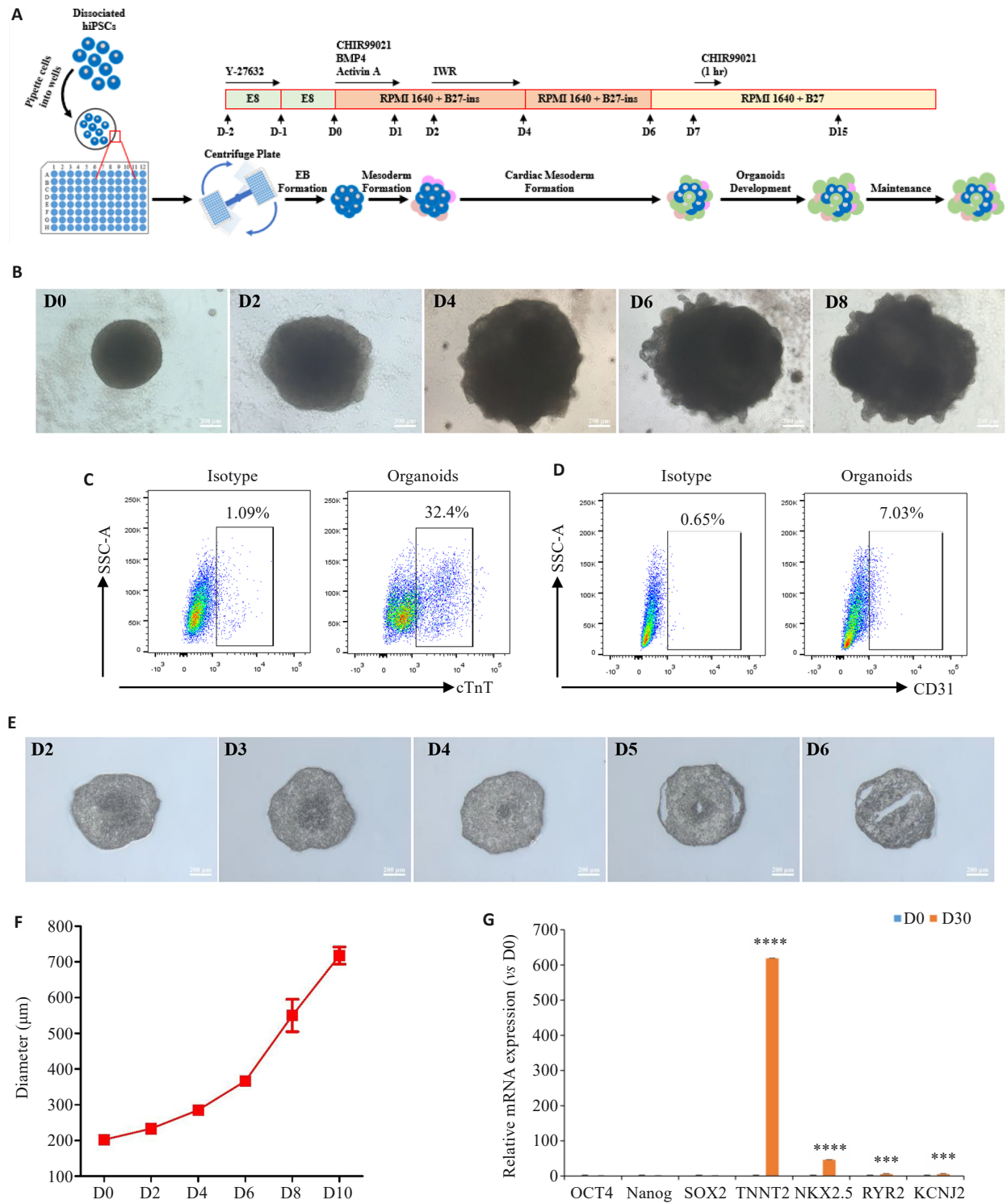


图1 心脏类器官的构建

Fig.1 Construction of the Cardiac Organoids derived from human induced pluripotent stem cells. **A**: Schematic diagram depicting the protocol for constructing cardiac organoids derived from human induced pluripotent stem cells. **B**: Brightfield images of the developing cardiac organoids. **C**, **D**: Proportion of cardiomyocytes and endothelial cells in cardiac organoids determined by flow cytometry. **E**: Frozen sections of the developing cardiac organoids. **F**: Diameter of the developing cardiac organoids ( $n=10$ ). **G**: The mRNA expressions in cardiac organoids determined by RT-qPCR. \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  vs D0.

检测结果显示3个批次心脏类器官中心肌细胞的比例分别为33.3%、34.0%、36.5%，变化幅度在 $34.6\% \pm 1.37\%$ ，表明心肌细胞在不同批次分化的心脏类器官中的占比较为接近(图3C)。进一步对3个批次的心脏类器官进

行收缩力测定,结果显示不同批次的心脏类器官收缩力差异无统计学意义(图3D)。

#### 2.4 心脏类器官长期培养的稳定性检测

心脏类器官持续培养至D50,发现类器官仍正常跳

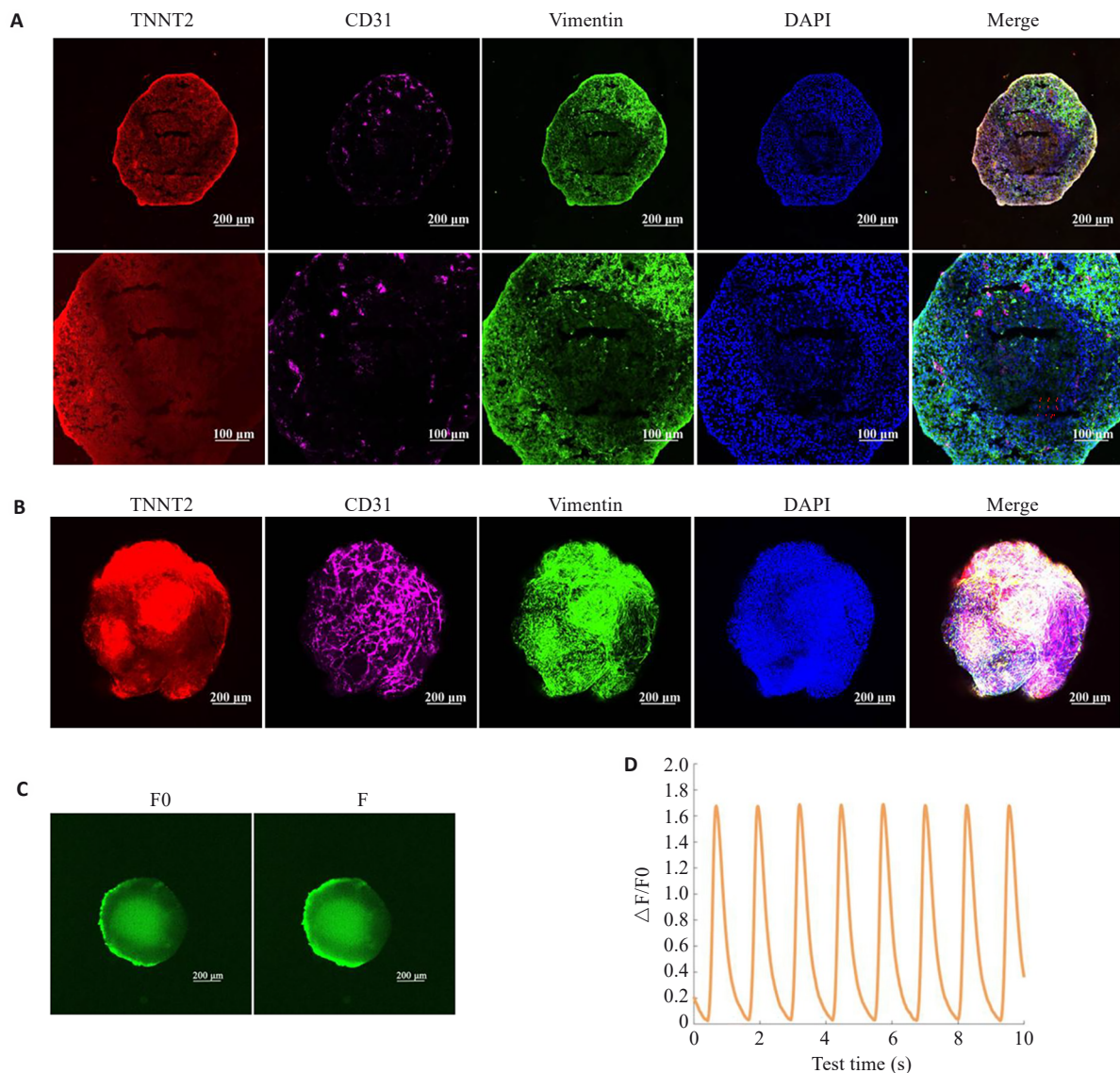


图2 心脏类器官的鉴定

Fig. 2 Characterization of the constructed cardiac organoids. A: Immunofluorescent staining of frozen sections of the cardiac organoids. B: Whole-mount staining of the cardiac organoids. C, D: Calcium transient assay of the cardiac organoids ( $n=3$ ).

动且未见类器官的形态结构出现明显异常(图4A),而且心脏类器官的收缩能力未见明显下降(图4B)。进一步免疫荧光鉴定证实培养至50 d的心脏类器官仍富含TNNT2阳性的心肌细胞(图4C)。

### 2.5 心脏类器官建模

光学显微镜拍照显示各处理组心脏类器官的形态大小没有明显差别(图5A)。Masson's三色染色显示液氮低温处理导致心脏类器官出现明显的纤维化,而给予卡托普利处理可以减轻液氮低温诱导的损伤(图5B)。钙瞬态分析表明,冷冻损伤的心脏类器官钙处理能力显著降低,表现为峰值幅度下降( $P<0.01$ )和峰值时间增加( $P<0.01$ ),而卡托普利处理可以改善低温引起的损伤(图5C、D)。RT-qPCR分析显示低温导致心肌细胞标记基因TNNT2、MYH7表达下降( $P<0.05$ ,图5E)。进一步发现低温导致cTnT水平释放增加( $P<0.01$ ),卡托普

利处理可以减少心脏类器官释放cTnT( $P<0.05$ ,图5F)。24 h缺氧后紧接着24 h复氧明显增加心脏类器官的纤维化水平(图5G)。TUNEL染色进一步显示模型组中细胞凋亡比例高达60%(图5H、I)。

### 2.6 利用心脏类器官进行药物评价

多柔比星处理心脏类器官24 h降低了心脏类器官的跳动频率,并呈剂量依赖性( $P<0.05$ ,图6A、B)。CCK-8检测结果显示多柔比星以剂量依赖性抑制心脏类器官的细胞活力(图6C)。同时,TUNEL染色结果也表明多柔比星增加心脏类器官细胞凋亡,而且具有剂量依赖性( $P<0.05$ ,图6D、E)。此外,多柔比星处理24 h抑制心脏类器官的收缩能力(图6F)。

曲妥珠单抗降低了钙振幅( $P<0.05$ )并延长了钙清除时间( $P<0.01$ ,图7A、B)。此外,给予心脏类器官曲妥珠单抗处理后,心脏类器官的收缩能力受到削弱(图7C)。

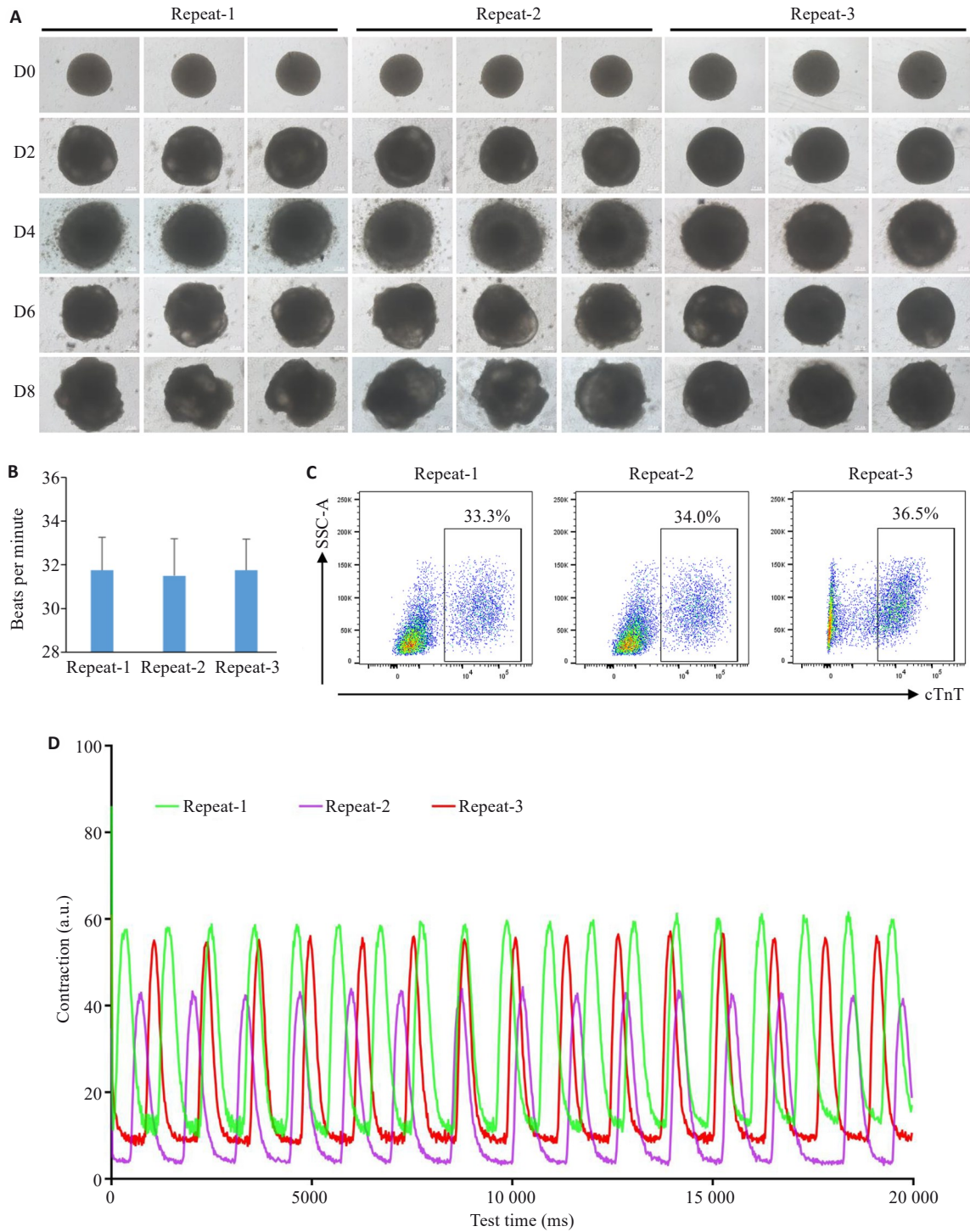


图3 不同批次的心脏类器官一致性检测

Fig.3 Consistency tests of the cardiac organoids from different batches. **A**: Brightfield images of the developing cardiac organoids from different batches. **B**: Beating frequency of the cardiac organoids from different batches ( $n=8$ ). **C**: Proportion of cardiomyocytes in the cardiac organoids from different batches determined by flow cytometry. **D**: Measurement of the contractile ability of cardiac organoids using ImageJ.

### 3 讨论

本研究利用诱导多能干细胞通过96孔板强制离心形成拟胚体,进而通过控制Wnt信号通路的激活与关闭诱导拟胚体向中胚层和心肌中胚层分化形成心脏类器官。本研究发现心脏类器官最早在分化的第七天出现有规律的跳动,这与Yonatan等<sup>[14]</sup>最早在第6天观察到

心脏类器官跳动的结果基本符合。而且本研究构建的心脏类器官包含心肌细胞、心肌成纤维细胞和内皮细胞,与目前心脏类器官单细胞测序结果一致<sup>[15-17]</sup>。本研究通过控制Wnt信号通路实现了直接由诱导多能干细胞向心脏类器官的转变,而Madelyn等<sup>[13]</sup>通过多能干细胞分别分化成心肌细胞、内皮细胞和心肌成纤维细胞后

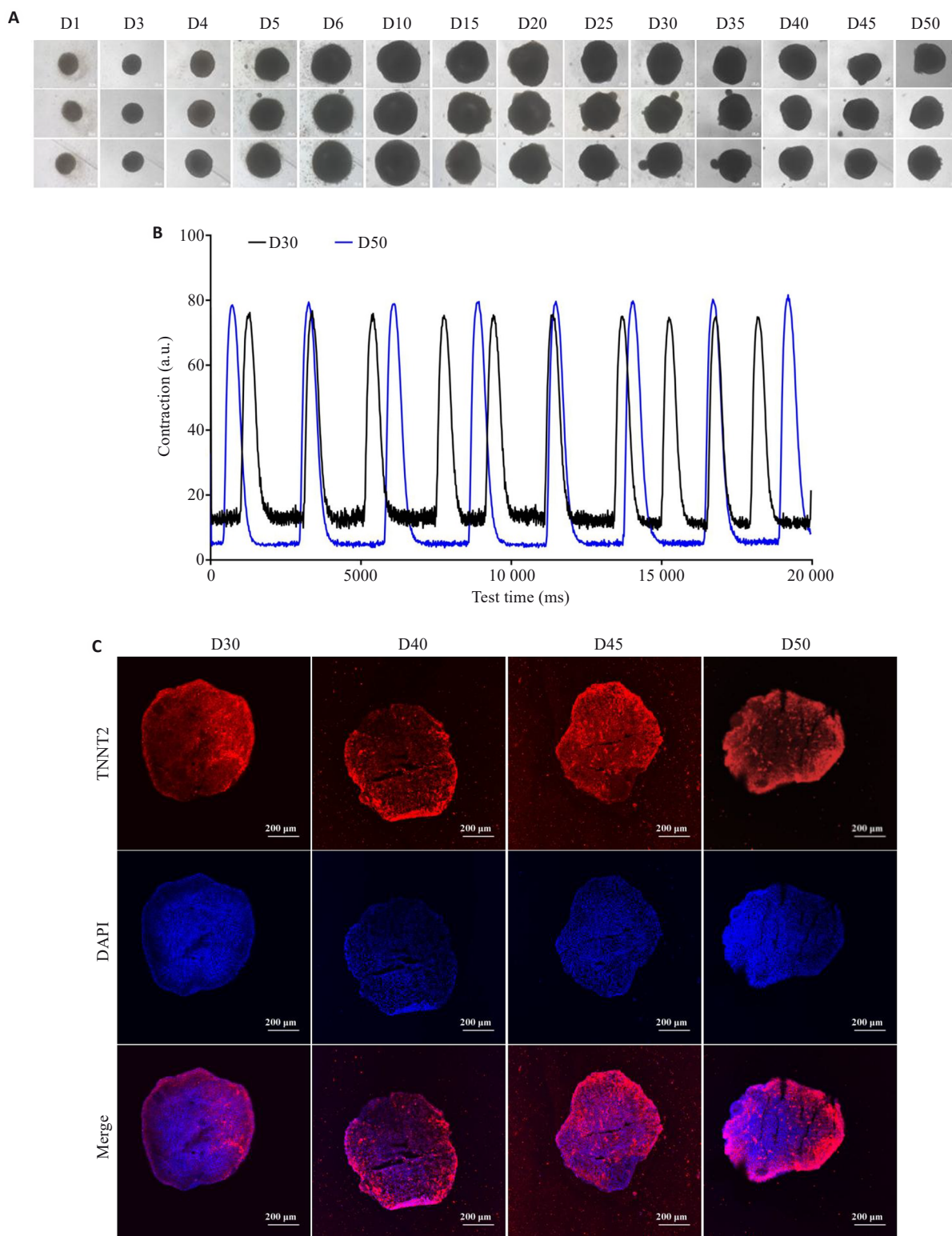


图4 心脏类器官长期培养

Fig. 4 Long-term culture of the cardiac organoids. **A**: Brightfield images of the developing cardiac organoids. **B**: Measurement of contractile ability of the cardiac organoids using Image J. **C**: Immunofluorescent staining of frozen sections of the cardiac organoids.

按照一定比例组装成心脏类器官,该方法虽然操作简单但耗时更长,而且组装成的心脏类器官结构也较为简单,需要精确计划心肌细胞、内皮细胞和心肌成纤维细胞的分化以满足组装要求。此外,本研究利用96孔板悬浮培养法分化的心脏类器官在形态上以圆形或椭圆

形为主,不同批次的心脏类器官在形态大小、跳动频率、心肌细胞比例、和心肌收缩力方面均无显著差异,具有明显的稳定性和均一性,而Lee等<sup>[12]</sup>利用摇床法分化心脏类器官不仅操作上较为复杂,而且分化得到的心脏类器官呈现出大球体、大椭圆、大肿胀等多种形态,批次间

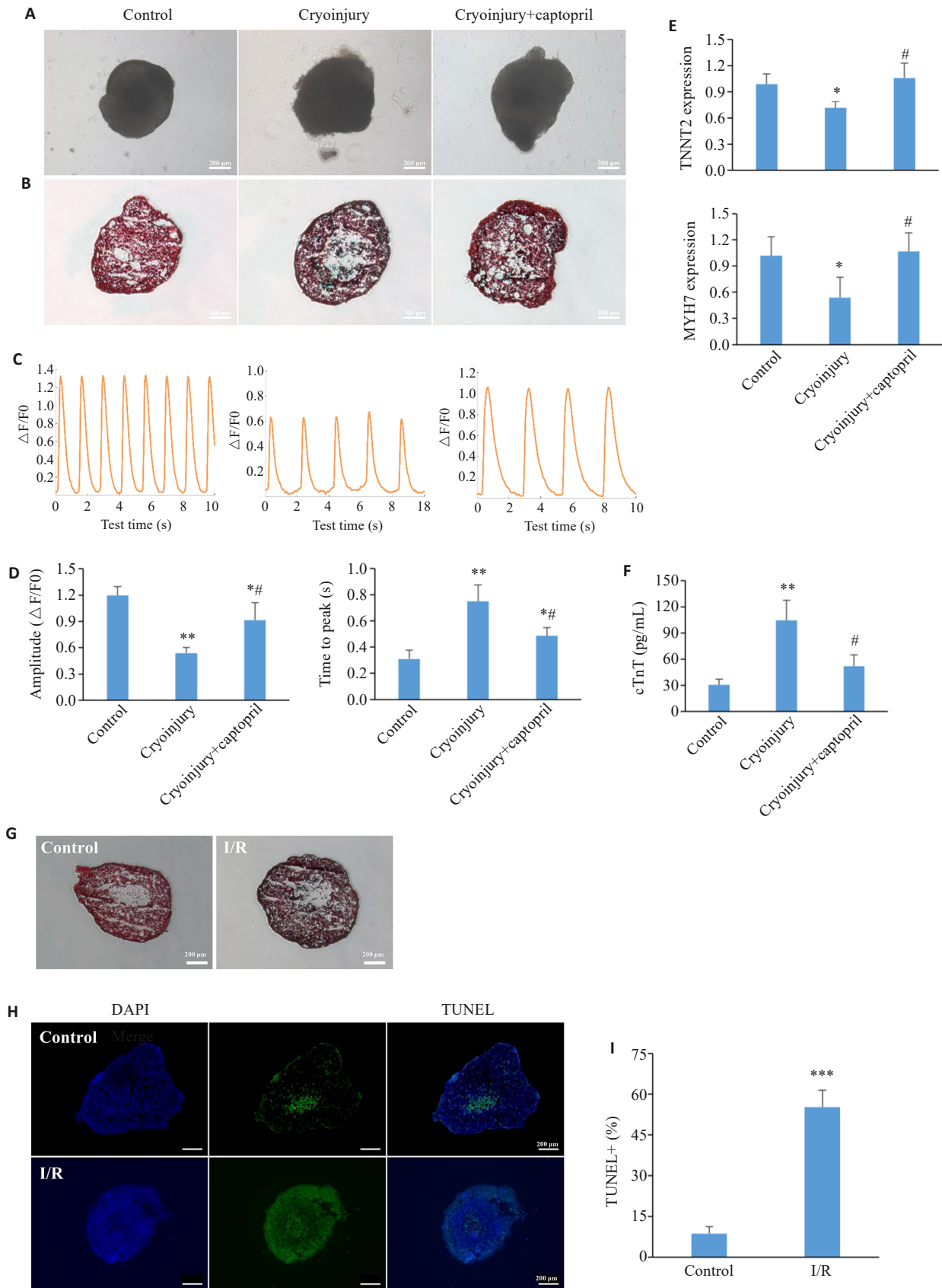


图5 心脏类器官建模

Fig.5 Disease modeling of cardiac organoids. **A**: Brightfield images of the cardiac organoids with different treatments. **B**: Masson's staining of the cardiac organoids. **C**: Calcium transient assay of the cardiac organoids. **D**: Amplitude of  $Ca^{2+}$  transient and the time to peak of  $Ca^{2+}$  transient ( $n=5$ ). **E**: mRNA expressions of MYH7 and TNNT2 with or without cryoinjury and captopril treatment. **F**: Evaluation of cTnT levels in the culture medium by ELISA ( $n=6$ ). **G**: Masson's staining of the cardiac organoids. **H**: TUNEL staining of the organoid sections after H/R treatment. **I**: Statistical analysis of apoptosis. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs control group;  $^{\#}P<0.05$  vs cryoinjury group.

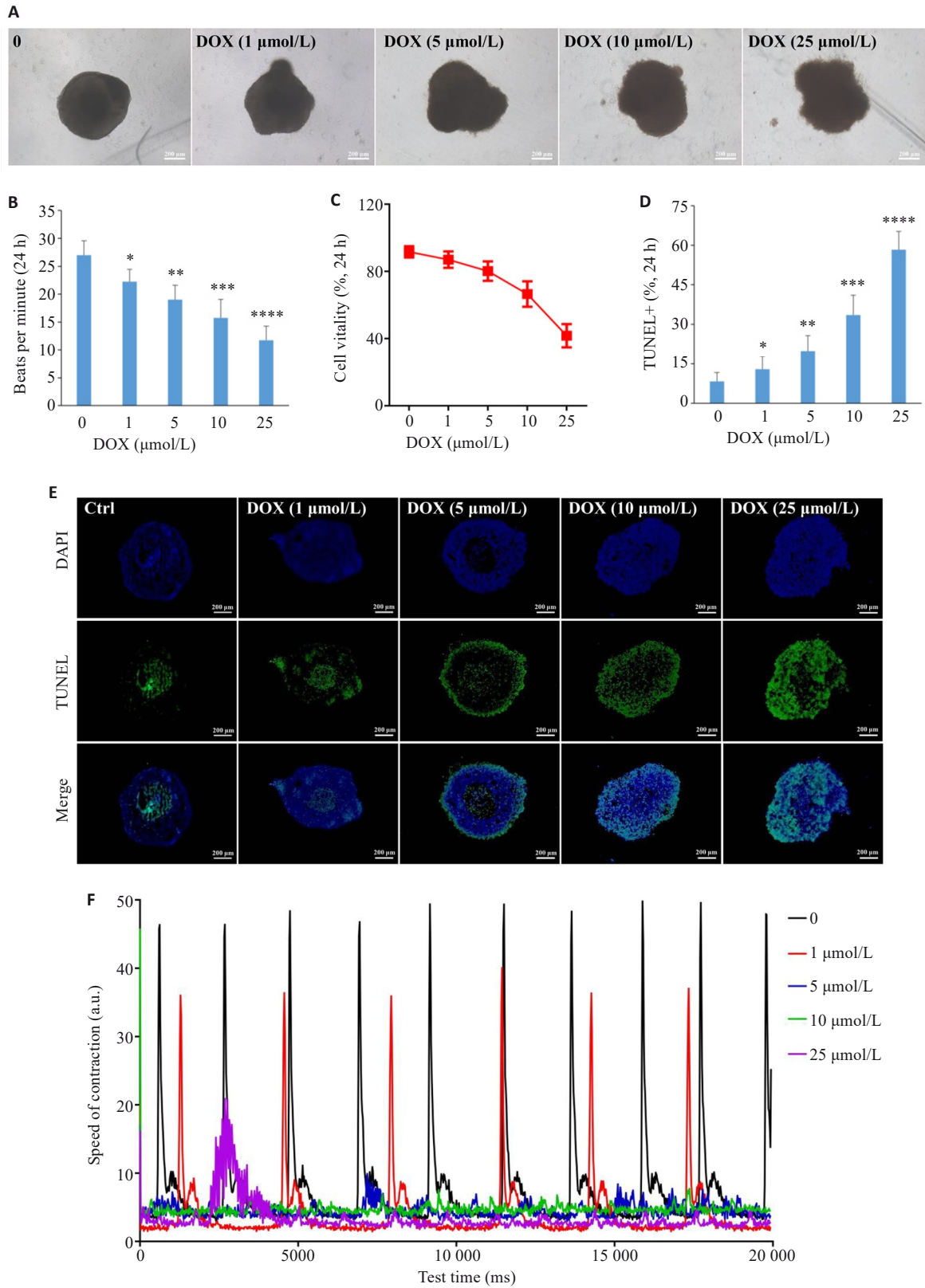


图6 多柔比星对心脏类器官的影响

Fig.6 Effect of doxorubicin on the cardiac organoids. A: Brightfield images of the cardiac organoids treated with doxorubicin (scale bar=200  $\mu\text{m}$ ). B: Dose-dependent effects of doxorubicin on beating frequency of the cardiac organoids ( $n=8$ ). C: Dose-dependent effects of doxorubicin on cell vitality in the cardiac organoids by CCK8 assay. D: Statistical analysis of cell apoptosis. E: TUNEL staining of the organoid sections after exposure to doxorubicin for 24 h at the indicated concentrations. F: Measurement of contractile ability of the cardiac organoids using Image J. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  vs control group (0).

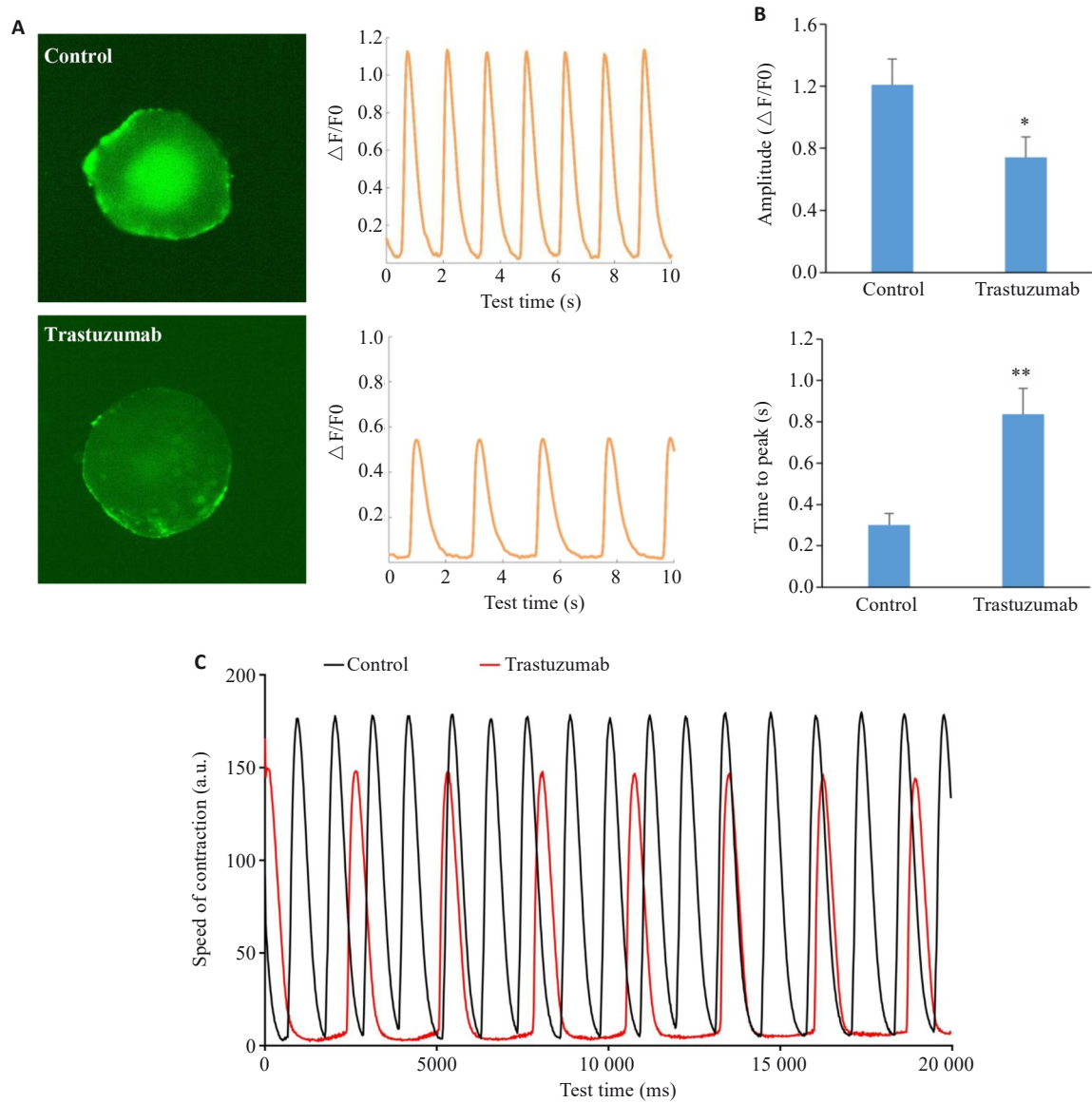


图7 曲妥珠单抗引起心脏类器官功能异常

Fig.7 Trastuzumab causes dysfunction of the cardiac organoids. **A:** Calcium transient assay of the cardiac organoids with Trastuzumab treatment. **B:** Amplitude of  $Ca^{2+}$  transient and the time to peak of  $Ca^{2+}$  transient (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group,  $n=5$ ). **C:** Measurement of contractile ability of the cardiac organoids with Trastuzumab treatment using Image J.

的差异问题异常突出。以上均表明本研究构建心脏类器官的分化方案切实可行。

类器官可以展现原代组织细胞的异质性、结构、功能和遗传特征,目前广泛应用于疾病模型研究、药物发现、精准医疗和再生医学领域<sup>[18-23]</sup>。本研究利用液氮低温损伤心脏类器官模拟心肌梗死过程,发现液氮低温损伤导致心脏类器官出现明显的纤维化和cTnT释放增加,给予卡托普利处理可以减轻液氮低温引起的损伤。而Richards等<sup>[24]</sup>利用心脏类器官结合去甲肾上腺素处理构建了人类心肌梗死疾病模型,不仅在结构上与心肌梗死后的人类心脏相似,而且在转录组学、结构和功能水平上也能复刻心肌梗死的特征。此外,本研究利用低氧/复氧处理心脏类器官出现明显纤维化和细胞凋亡,

模拟了心脏缺血再灌注损伤过程。这些研究表明心脏类器官在模拟人类心脏疾病方面展现出极大的应用前景。而且,本研究分化的心脏类器官在培养至D50未见形态结构出现明显异常,心脏类器官的收缩能力也未发生显著的改变,表明心脏类器官作为长期疾病模型的可靠性。另外,将CRISPR/Cas9基因编辑技术与类器官技术相结合,构建携带致病突变的心脏类器官模拟疾病发生发展过程为阐明发病机制提供新思路<sup>[25,26]</sup>。

与传统模型相比,心脏类器官具有独特的优势,使其更适合作为药物测试平台<sup>[11,27,28]</sup>。本研究利用心脏类器官测试化疗药物多柔比星对心脏的毒副作用,发现多柔比星显著抑制了心脏类器官的跳动和收缩能力,并增加心脏类器官的细胞凋亡。这与Yang等<sup>[29]</sup>观察到血管

化心脏类器官对多柔比星表现出明显毒性反应一致。此外,本研究发现曲妥珠单抗处理心脏类器官可引起心脏类器官收缩力和钙处理能力下降。利用来源于患者的诱导多能干细胞构建心脏类器官评估药物对人类心脏发育和基因表达模式的影响,这为开展个性化医疗提供新方法<sup>[30-32]</sup>。

虽然心脏类器官在基础研究、药物测试和疾病建模等方面发挥了关键作用,但是要将心脏类器官运用到临床前研究中仍存在不少挑战。首先,目前还没有标准化的类器官分化方案,导致不同分化方案分化得到心脏类器官在细胞比例、形态结构方面差异大<sup>[33]</sup>。本研究分化的心脏类器官虽然具有明显的空腔样结构,但主要是单个腔室结构,与传统心脏复杂的“四腔室”结构相差甚远,导致结构模拟不充分、无法重现电传导等关键生理过程,如何优化心脏发育中关键的信号通路诱导干细胞自发形成多腔室结构,将推动心脏类器官向更贴近体内生理状态的方向发展。其次,血管化程度低限制了心脏类器官的生长<sup>[34]</sup>。本研究分化的心脏类器官中内皮细胞占比只有7.03%,远低于正常心脏组织中的内皮细胞占比,限制了心脏类器官的生长尺寸。通过在心脏类器官分化过程中激活调控内皮细胞命运转录因子,或采用多胚层协同分化的血管化策略,以此提高心脏类器官的血管化程度将极具研究前景。最后,心脏类器官无法复制和正常心脏所包含的全部细胞类型,导致心脏类器官更多表现出与胎儿而非成人心脏相似的特征<sup>[35]</sup>。心脏类器官虽然包含心肌细胞、成纤维细胞和内皮细胞,仍缺少心外膜细胞等支持细胞,且心肌细胞大多处于未成熟状态,电生理特性与成年心脏差异大。通过优化分化方法,诱导干细胞分化为多种心脏细胞类型并通过自组织过程实现细胞间的正确空间排列,将能突破细胞组成与成熟度不足的局限性。

综上所述,本研究通过接种限定数量的hiPSCs到96孔超低粘附U型培养板,分化得到心脏类器官在细胞组成、形态结构大小方面一致程度高,重复性好,不同批次间的差异小,并通过液氮低温损伤心脏类器官建立了体外心肌梗死模型和低氧/复氧建立心脏类器官缺血再灌注损伤模型,进一步探索了心脏类器官在药物测试中的应用,为心血管疾病研究提供了一种可靠的体外模型。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

[1] Yusuf S, Joseph P, Rangarajan S, et al. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study[J]. *Lancet*, 2020, 395(10226): 795-808.

[2] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart disease and stroke

statistics-2017 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2017, 135(10): e146-603.

- [3] Tang XY, Wu SS, Wang D, et al. Human organoids in basic research and clinical applications[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 168.
- [4] Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures[J]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(4): 910-9.
- [5] Wnorowski A, Yang HX, Wu JC. Progress, obstacles, and limitations in the use of stem cells in organ-on-a-chip models[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 140: 3-11.
- [6] Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, et al. *In vitro* models for liver toxicity testing[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2013, 2(1): 23-39.
- [7] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7.
- [8] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [9] Thomas D, Cunningham NJ, Shenoy S, et al. Human-induced pluripotent stem cells in cardiovascular research: current approaches in cardiac differentiation, maturation strategies, and scalable production[J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(1): 20-36.
- [10] Yang DH, Gomez-Garcia J, Funakoshi S, et al. Modeling human multi-lineage heart field development with pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(9): 1382-401. e8.
- [11] Kim H, Kamm RD, Vunjak-Novakovic G, et al. Progress in multicellular human cardiac organoids for clinical applications[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(4): 503-14.
- [12] Lee SG, Kim YJ, Son MY, et al. Generation of human iPSCs derived heart organoids structurally and functionally similar to heart[J]. *Biomaterials*, 2022, 290: 121860.
- [13] Arzt M, Pohlman S, Mozneb M, et al. Chemically defined production of tri-lineage human iPSC-derived cardiac spheroids[J]. *Curr Protoc*, 2023, 3(5): e767.
- [14] 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.
- [15] Zhang FZ, Qiu H, Dong XH, et al. Single-cell atlas of multilineage cardiac organoids derived from human induced pluripotent stem cells[J]. *Life Med*, 2022, 1(2): 179-95.
- [16] Ho BX, Pang JKS, Chen Y, et al. Robust generation of human-chambered cardiac organoids from pluripotent stem cells for improved modelling of cardiovascular diseases[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 529.
- [17] Santoro R, Piacentini L, Vavassori C, et al. An *in vitro* model for cardiac organoid production: The combined role of geometrical confinement and substrate stiffness[J]. *Mater Today Bio*, 2025, 31: 101566.
- [18] Song HB, Weinstein HNW, Allegakoen P, et al. Single-cell analysis of human primary prostate cancer reveals the heterogeneity of tumor-associated epithelial cell states[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 141.
- [19] Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(11): 671-87.

- [20] Rossi G, Broguiere N, Miyamoto M, et al. Capturing cardiogenesis in gastruloids [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(2): 230-40. e6.
- [21] Drakhlis L, Biswanath S, Farr CM, et al. Human heart-forming organoids recapitulate early heart and foregut development [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(6): 737-46.
- [22] Song M, Choi DB, Im JS, et al. Modeling acute myocardial infarction and cardiac fibrosis using human induced pluripotent stem cell-derived multi-cellular heart organoids [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(5): 308.
- [23] Arhontoulis DC, Kerr CM, Richards D, et al. Human cardiac organoids to model COVID-19 cytokine storm induced cardiac injuries [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2022, 16(9): 799-811.
- [24] 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): 446-62.
- [25] Gopal S, Rodrigues AL, Dordick JS. Exploiting CRISPR Cas9 in three-dimensional stem cell cultures to model disease [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 692.
- [26] Hofbauer P, Jahnel SM, Papai N, et al. Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis [J]. *Cell*, 2021, 184(12): 3299-317.e22.
- [27] Schmidt C, Deyett A, Ilmer T, et al. Multi-chamber cardioids unravel human heart development and cardiac defects [J]. *Cell*, 2023, 186(25): 5587-605.e27.
- [28] Hoang P, Kowalczewski A, Sun SY, et al. Engineering spatial-organized cardiac organoids for developmental toxicity testing [J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(5): 1228-44.
- [29] Yang JS, Lei W, Xiao Y, et al. Generation of human vascularized and chambered cardiac organoids for cardiac disease modelling and drug evaluation [J]. *Cell Prolif*, 2024, 57(8): e13631.
- [30] Paik DT, Chandy M, Wu JC. Patient and disease-specific induced pluripotent stem cells for discovery of personalized cardiovascular drugs and therapeutics [J]. *Pharmacol Rev*, 2020, 72(1): 320-42.
- [31] Marini V, Marino F, Aliberti F, et al. Long-term culture of patient-derived cardiac organoids recapitulated Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy and disease progression [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 878311.
- [32] Filippo Buono M, von Boehmer L, Strang J, et al. Human cardiac organoids for modeling genetic cardiomyopathy [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1733.
- [33] Garreta E, Kamm RD, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. Rethinking organoid technology through bioengineering [J]. *Nat Mater*, 2021, 20(2): 145-55.
- [34] Zhang S, Wan ZP, Kamm RD. Vascularized organoids on a chip: strategies for engineering organoids with functional vasculature [J]. *Lab Chip*, 2021, 21(3): 473-88.
- [35] Kim H, Wang MQ, Paik DT. Endothelial-myocardial angiocrine signaling in heart development [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 697130.

(编辑:经 媛)