

## • 综述 •

## 心脏类器官的研究进展及在药物发现研究中的应用

吴迪<sup>1,2</sup>, 王守宝<sup>1\*</sup>, 杜冠华<sup>1\*</sup>

- (1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050;
2. 烟台大学, 分子药理和药物评价教育部重点实验室, 山东 烟台 264005)

**摘要:** 心血管疾病是人类卫生健康的重要威胁, 也是药物研发的重要研究领域。类器官是利用干细胞的自我更新和分化能力, 通过体外培养构建的一类与真实器官结构和功能类似的微器官。由于心脏类器官具备人源性、更贴近体内的结构和功能、可实现自组装及遗传稳定性好的特点, 其在心脏发生发育研究、心血管疾病模型构建药物研发领域中的应用受到广泛关注。因此, 本文将对近年来心脏类器官的发展与构建策略、心脏类器官在药物研发领域中的应用及该技术的前景进行讨论。

**关键词:** 心脏类器官; 诱导多能干细胞; 疾病模型; 类器官芯片; 药物筛选; 药物评价

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-0884-07

## Advances in research of heart organoid and its application in drug discovery

WU Di<sup>1,2</sup>, WANG Shou-bao<sup>1\*</sup>, DU Guan-hua<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of Drug Target Identification and Drug Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation (Yantai University), Ministry of Education, Yantai University, Yantai 264005, China)

**Abstract:** Cardiovascular diseases are fatal threats to human health and also important fields in drug discovery. Organoid is a miniature with the structure and function similar to the organ, which is formed by the self-updating and specific differentiation of stem cells during the *in vitro* culture. Considering its characteristics of human origin, physical features, self-assembling and genetic stability, heart organoid has attracted much attention in the study of cardiogenesis, cardiovascular diseases modeling and related drug research. Hence, this article will review the development of heart organoids and its construction strategies, highlighting its application and prospects in drug discovery.

**Key words:** heart organoid; induced-pluripotent stem cell; disease model; organoids on chip; drug screening; drug evaluation

类器官 (organoid) 是一种在体外环境培养的具有三维组织结构的微型器官, 拥有类似于真实器官的细

胞类型和复杂结构, 能够部分模拟真实器官的生理功能。类器官的研究可追溯到20世纪初, 有研究者尝试使用原代细胞培养在体外构建类器官甚至新生物体。随着干细胞的发现以及干细胞技术的不断发展, 对类器官研究产生了重要影响。2006年, 山中伸弥通过过表达 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 个转录因子首次将小鼠成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞 (induced-

收稿日期: 2022-11-03; 修回日期: 2022-12-20.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2022-I2M-2-002, 2022-I2M-1-015).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165313, E-mail: shoubaowang@imm.ac.cn;

Tel / Fax: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1175

pluripotent stem cells, iPSCs), 为类器官研究提供了新技术、新方案。这种基于多能干细胞或成体干细胞经体外培养构建的类器官, 能够自我更新和实现自组装, 具有可长期培养、遗传稳定等特点<sup>[1-3]</sup>。2009年, Clevers课题组<sup>[4]</sup>通过对富含亮氨酸重复序列G蛋白偶联受体5 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5, Lgr5) 阳性的成人小肠干细胞的培养, 成功构建出第一个类似小肠的隐窝绒毛结构, 成为类器官技术发展的里程碑式突破。此后, 类器官培养陆续应用于胃、肝脏、脑、肺、肾脏<sup>[5-9]</sup>等。与此同时, 基因编辑、3D打印、微流控技术及组织工程等技术的蓬勃发展也为类器官研究提供了进一步支持。

截至2018年, 我国心血管病死亡率仍居首位, 患病率仍持续攀升, 推算目前心血管病患者人数达3.30亿<sup>[10]</sup>。而在心血管疾病药物研究方面, 从传统模型到人类受试者之间的转换是有限的。啮齿动物模型是研究心脏疾病常见的模型, 它们的基因可操作性和活体建模优势的确为疾病研究提供了系统的模型, 但显然它们在心脏搏动频率、动作电位持续时间、收缩功能调节等方面与人类存在明显差异, 使得在人类疾病中观察到的遗传变异性很难在啮齿动物上复制, 而且动物实验耗费巨大。原代心血管细胞和永生细胞在心脏模型中的应用也存在不同的局限性。前者在培养过程中难以维持, 体外寿命有限; 后者经修饰后细胞周期改变, 增殖异常活跃, 表现出与体内细胞不同的表型<sup>[3,11,12]</sup>。因此, 亟待突破传统研究思维及技术局限, 构建仿生程度更高的研究模型。心脏类器官是一类具有心脏样结构和功能特性的微型三维体外培养模型, 在一定程度上模拟了心脏的结构和功能, 是心脏发育与再生研究、精准医学研究的重要技术手段, 也受到药物研究领域的广泛关注。基于干细胞技术所产生的人类心脏类器官 (human cardiac organoids, hCOs) 及有关疾病模型成为人体和动物模型/细胞间重要的桥梁。

本文描述了心脏类器官及有关疾病模型的构建方法和应用, 并对其在药物研究中的作用及发展潜力进

行介绍。

## 1 心脏类器官的构建

鉴于传统二维细胞培养模式下, 细胞成熟度较低, 缺乏体内的复杂结构和多细胞组织, 异质性较高, 导致结果不可预测性强<sup>[13]</sup>, 为三维细胞培养的产生和发展提供了需求。早期心肌细胞三维培养的细胞来源以小鼠原代心肌细胞或干细胞分化的心肌细胞为主, 还可结合组织工程技术来模拟心肌组织的多层各向异性结构和细胞生长环境。Fan等<sup>[14]</sup>用新生大鼠原代心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs)、心肌细胞 (cardiomyocytes, CMs) 和内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 悬滴法3D培养构建了具有自发性搏动的心脏微球模型。也有研究将人源化诱导多能干细胞 (human induced-pluripotent stem cells, hiPSCs) 衍生的CMs、CFs等细胞按照类似于人体心脏的比例在悬滴培养模型中共培养得到血管化心脏球体<sup>[11]</sup>。但这些心脏细胞模型的局限性也十分明显, 即心肌细胞不够成熟, 不能再现心脏特定的自组装特性, 不会形成体内心脏独特的复杂组织结构。而心脏类器官是hiPSCs经过向特定谱系细胞的分化和自我更新, 并能自组装形成更成熟的三维组织结构, 与体内心脏的生理结构与功能更相近 (表1)。

心脏的发育可简单分为两个阶段: 早期发生阶段心脏细胞特异化、分化并组装成复杂的结构, 然后在胚胎成熟阶段产生功能适应性变化<sup>[15]</sup>。大部分心脏类器官的研究也是旨在体外实现这两个阶段的心脏变化。由于心脏发育的形态发生过程受到多种类型的心脏祖细胞及分泌介质的时空调控, 心脏类器官早期研究侧重于通过对心肌细胞分化的分子机制研究以实现体外胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESCs) 或多能干细胞 (pluripotent stem cells, PSCs) 向心脏细胞的高效分化, 具体方式包括类胚体 (embryoid bodies, EBs) 诱导分化、单层贴壁培养和共培养诱导分化, 以及体外转录因子、细胞因子调控及化学诱导剂的使用等<sup>[16,17]</sup>。Drakhlis等<sup>[18]</sup>将hiPSCs聚集细胞团嵌入基质胶, 利用Wnt通路激活剂CHIR99021和Wnt通路抑制剂IWP2

**Table 1** Comparison between heart organoids and two-dimensional cell culture

Item	Two-dimensional cell culture	Heart organoid
Physiologic enactment	Limited	Semi physiologic
Organogenesis modeling	Poor	Suitable
Human development and diseases modeling	Poor	Yes
Gene and protein expression	Often differs from expression <i>in vivo</i>	More closely mimic expression <i>in vivo</i>
Genome stability	Instable	Stable
Genome editing	Yes	Yes
Manageability	Excellent	Good
High-throughput screening	Suitable	Suitable
Vascularization and immune system	Lack	Lack
Cost	Low	Relatively high

进行双相调控,通过改变特定的信号如聚集体的大小、培养基处理时间、CHIR浓度等,诱导hiPSCs向多种谱系定向分化,14天后获得了直径2 mm的三维心脏形成类器官,表现出早期胚胎发育结构,但与原生心脏和前肠发育仍有差异。还有一些利用微图案化技术或支架、模具等组织工程材料对体外心肌组织模型开展研究<sup>[19]</sup>,Shkumatov等<sup>[20]</sup>通过调节水凝胶的硬度来促进类胚体中血管化心肌样组织和可收缩心血管类器官的形成。然而这些心脏类器官也不能完整实现心脏发育的特定组装过程与相应结构,缺乏具有不同层次的心室腔和房室结构及自组装过程等。因此,需要进一步解析心脏形态发生过程中的发育机制。近年来,细胞谱系示踪、单细胞RNA和DNA测序等技术的发展为深入了解人类心脏发生发育的分子机制以及量化心脏类器官的异质性等提供了新的工具<sup>[21]</sup>。如王永煜课题组<sup>[22]</sup>构建了通过调节多条信号通路参与人胚胎干细胞向中胚层分化的潜在miRNA-mRNA网络,并利用RNAseq和基因芯片技术等分析手段,筛选出关键基因并检测相关表达,发现参与中胚层分化的Wnt/ $\beta$ -catenin通路,TGF- $\beta$ 和Hippo通路涉及多个miRNA,靶向多个基因。其中,关键基因的表达验证结果证明Wnt3A是Wnt/ $\beta$ -catenin通路的激活因子,可增强ESCs向中胚层分化和心肌细胞形成。

心室腔的形成是心脏发育中的关键步骤。Hofbauer等<sup>[23]</sup>率先揭示了心脏发育过程中的自组装原理并构建了首个人类自组织心脏类器官。他们在时间和空间上控制心脏发生的6种关键通路(ACTIVIN、BMP、FGF、VEGF、RA和Wnt)的激活来诱导hiPSCs分化并形成含完整封闭心腔结构且能节律性收缩的心脏类器官,此类器官还具有自组装的主要特征——持续进行的特化过程、中胚层中内在自组装模式以及腔室的自我形态发生。该研究表明,类器官空腔形成过程始于表达HAND1(heart and neural crest derivatives-expressed protein 1)蛋白的心脏中胚层时期,而Wnt、BMP联合下游的HAND1组成Wnt-BMP-HAND1轴控制心脏类器官空腔结构的自组装。高浓度的Wnt在心肌细胞没有发生特异化的情况下可促使空腔形成;而抑制BMP使空腔形态受损,为解析先天性心脏缺陷发生有关的分子机制提供了思路。Lee等<sup>[24]</sup>报道在LN/ET复合物、FGF4和BMP4等因子作用下,小鼠ESCs可自组装产生具有心房和心室样结构的心脏类器官,这种类器官包含CMs、VSMCs、ECs及潜在的心脏自主神经元等,与心脏胚胎组织具有相似的化学和基因表达谱。同时,还能在小鼠心脏类器官产生过程中观察到心管形成、心管环化和心室形成等连续的形态变

化。Ergir等<sup>[25]</sup>则开发了一种无支架、基于iPSCs的人心脏类器官,这种类器官不仅可自发完成自组装并形成分离的房室结构,还可进行长期培养,在无外界因素刺激下保持数月协调的收缩活动。此外,微流控技术、器官芯片和3D生物打印等新兴技术的出现,有助于进一步提高心脏类器官的仿生程度并促进心脏类器官规模化生产的实现<sup>[26-28]</sup>。Zhang等<sup>[29]</sup>提出了一种基于3D生物打印的混合策略构建内皮化心肌,他们利用复合生物墨水,直接在微纤维水凝胶支架内生物打印内皮细胞,后者逐渐向外迁移并形成一层融合的内皮细胞,随后在此3D内皮细胞床内种植心肌细胞产生能够自发和同步收缩的排列好的心肌。而Noor等<sup>[30]</sup>则利用患者来源的网膜组织中分离的体细胞,经重编程成为多能干细胞,经诱导重新分化为心肌细胞和内皮细胞,将分离出来的基质加工成水凝胶,利用3D打印技术构建出首颗微型心脏。还有报道<sup>[31]</sup>将微流控技术、器官芯片与3D打印结合,制备出微型精密单向微流控泵。他们通过3D打印构建微型心脏组织框架,用来自人类干细胞的心肌细胞构成心脏组织,这种微流控泵能复制心脏收缩然后回弹的腔室,以及调节血液流动的瓣膜等,因此能够模拟心脏的压力和泵送液体的体积等,以此获得更多的心脏性能指标(图1)。但和大部分类器官一样,目前心脏类器官还未实现真正意义上的血管化,无法完成自主工作。

心脏再生曾是生物医学领域的研究热点,而事实证明,c-kit心脏干细胞无论是在生理还是病理状态下都很难向成熟心肌细胞分化,心肌原位干细胞分化再生心肌的理论也被否定。近来研究证明,血管壁和脂肪组织存在着丰富的祖/干细胞<sup>[32]</sup>,这些细胞具有增殖和分化为特定终末细胞的能力。Flk1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>主动脉外膜细胞在未进行任何遗传操作的情况下,可作为自发搏动心肌细胞的细胞来源<sup>[33]</sup>,表明利用成体血管干细胞构建心脏类器官存在可能性。

## 2 心脏类器官用于复制疾病模型的研究进展

心血管疾病严重影响着人类的健康和生活方式,随着年龄增长和机体衰老,心肌梗死、心力衰竭等心血管疾病是老年患者的头号杀手;在不同病因中,心肌病成为年轻人心衰的主要原因;而先天性心脏病则是我国5岁以下患儿的主要死因。而针对心脏疾病的研究从动物实验到人类受试者的转化是有限的,人诱导多能干细胞来源的心脏类器官模型使心脏病的疾病建模有了新的方向。

**2.1 心肌梗死模型** Richards等<sup>[34]</sup>将通过hiPSCs分裂分化为成熟的心脏细胞,将hiPSC-CMs与非心肌细胞(人心脏成纤维细胞、人脐静脉内皮细胞和人脂肪

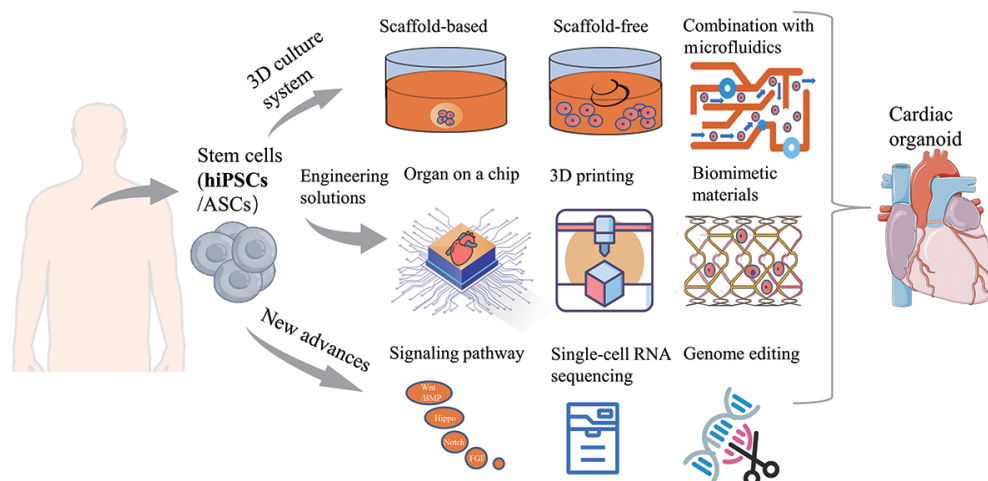


Figure 1 The strategies to construct human cardiac organoids

来源的间充质干细胞比例为4:2:1)等比例混合形成悬液,用非黏附性琼脂糖凝胶包裹培养,然后通过模拟心梗过程中的低氧环境和细胞凋亡构建心脏类器官,成功在转录水平、结构和功能方面重现了心肌梗死的病理代谢变化、纤维化和细胞内钙失衡等。

**2.2 心肌病模型** Yang等<sup>[35]</sup>用基因编辑技术敲除编码肌球蛋白重链 $\beta$ 亚单位的MYH7(myosin heavy chain 7)基因建立等基因iPSC系,对家族性心肌病患者特异性hiPSC-CMs和骨髓基质细胞进行3D培养构建工程化心脏组织,与2D培养的心肌细胞相比,在3D培养的基因突变型hCOs更容易检测到收缩功能差异。Duchenne型肌营养不良症(DMD)是一种X连锁隐性遗传病,其病理特征是由炎症反应引发心肌细胞变性,导致心肌被脂肪和结缔组织取代(即左心室心肌壁的纤维化),心壁变薄,最终导致充血性心力衰竭,患者通常死于心肺功能下降导致的扩张型心肌病。Marini等<sup>[36]</sup>分别构建了从患者来源的多能干细胞和等基因校正多能干细胞中产生相应心脏类器官(DMD-CO和DMD-Iso-CO),经长期培养后这些类器官发生DMD相关的心肌病和疾病进展。由于DMD-CO缺乏初始增殖能力,表现为 $\alpha$ -肌聚糖进行性丢失、内质网高度应激等,随后心肌细胞状态进一步恶化,可观察到纤维化和脂肪生成,而在DMD-Iso-CO对照组中未观察到这些病理进程的发生。这些研究有助于科研者深入了解心肌病发病的分子机制和治疗方法的探索。

**2.3 先天性心脏病模型** 先天性心脏缺陷是心脏发育过程中出现的严重的结构和功能缺陷,在新生儿中发病率很高,而母体妊娠早期糖尿病状态是引发胎儿先心病的主要原因,已有先关报道可通过类器官再现与先天性心脏缺陷相关的复杂代谢性障碍。Lewis-Israeli等<sup>[37-39]</sup>首先在96孔板中生成hiPSCs衍生

的类胚体,基于小分子三步Wnt激活-抑制-激活策略,连续暴露于CHIR99021和Wnt-C59实现中胚层和源性中胚层的诱导,所构建的心脏类器官在转录、结构和细胞水平上与年龄匹配的人类胎儿心脏组织相似。在此基础上,研究人员通过改变hCOs的培养条件,分别在正常母体和1、2型糖尿病母体的葡萄糖和胰岛素水平下培养得到正常心脏类器官(NCO)和孕前糖尿病心脏类器官(PGDGO),二者在分化的第4天就表现出明显的形态学差异。NCO生长较缓慢,而PDGGO明显增大,提示糖尿病状态下巨大儿的发育结局,电生理分析、代谢分析、透射电镜结果进一步佐证了糖尿病状态下引起的PGDGO缺陷。

**2.4 心律失常模型** 心脏类器官也可用来模拟非器质性心脏病引起的心律失常,Hulot等<sup>[40,41]</sup>将短QT间期综合征(short QT interval syndrome, SQTs)患者特定iPSC-CMs与CRISPR/Cas9基因编辑和组织工程技术相结合产生了一个直径5 mm的心肌组织片,这样的类器官结构表现出SQTs-iPSC-CMs在细胞水平未表现出的持续性折返性心律失常螺旋波,具有更复杂的生物物理性质。

### 3 心脏类器官在药物发现研究中的应用

**3.1 药物筛选** 类器官技术在高通量药物筛选及个体化治疗方面展示出其独特优势,如利用肠道类器官进行高通量药物筛选并对肠道类器官表型图谱鉴定<sup>[42]</sup>,还有通过结直肠癌患者来源的肿瘤类器官开展抗肿瘤药物高通量筛选工作<sup>[43]</sup>等。至于利用心脏类器官模型进行药物筛选,Mills等<sup>[44]</sup>开发了一种基于96孔板的高通量生物工程化人心脏类器官筛选平台,该模型同时包含成熟期与周期停滞期的心肌细胞,具有与天然心脏组织相似的生物学特性的功能性收缩组织。研究者用此类器官筛选模型对105个小分子化合物进

行筛选, 获得了通过甲羟戊酸途径发挥促增殖作用的化合物, 同时提示了类器官筛选结果与传统2D分析结果间的不一致性。他们在另一项研究中, 将磷酸化蛋白质组学技术、单核RNA测序技术与心脏类器官结合, 对SARS-CoV-2感染引起的心脏损伤和功能障碍的病理机制进行研究, 最终确定了诱导心脏舒张功能障碍的炎性“细胞因子风暴”即干扰素、白介素1 $\beta$ 和poly(I:C)的联合诱导, 并获得相关靶标信息, 以此筛选了能预防和治疗心脏功能障碍的药物, 为理解新冠肺炎病毒感染机制和治疗策略提供新见<sup>[45]</sup>。

**3.2 药物安全性评价** 器官毒性是药物开发失败和撤市的主要原因, 特别是药物潜在的心脏毒性。目前, 使用的细胞系和动物模型的毒理学评价往往不能预测对人类心脏的不良影响。美国FDA早已将hiPSCs诱导的心肌细胞建议为心脏毒性的研究工具, 而心脏类器官由于本身的人源性和生理结构特点, 可能提供更准确的心脏毒性评价结果。Sallam等<sup>[46]</sup>利用人诱导多能干细胞衍生的心脏类器官研究了免疫抑制剂他克莫司和西罗莫司在心脏移植术后的不良重塑影响, 结果提示他克莫司相较西罗莫司可能导致更加不利的心脏重塑结局。而Hoang等<sup>[47,48]</sup>利用基因工程化的GCaMP6f-hPSCs产生心脏类器官, 基于心脏分化、收缩行为和3D组织形态来评估9种致畸风险等级从A到X的药物的心脏发育毒性, 并与药物对斑马鱼全胚胎培养的体内心脏发育毒性进行比较。随着药物在妊娠风险分类等级的增加, 对心脏类器官的发育毒性增加。A类代表药琥珀酸多羟胺对心脏分化及各项评价指标没有毒性影响, D类药物苯妥英、锂、多西环素和维甲酸等药物对心脏类器官发育影响的各异, 而经典X类药物沙利度胺则导致心脏类器官出现明显形态异常, 说明该模型对药物暴露所致的形态缺陷敏感。但该类模型仅关注药物的心脏发育毒性, 而不能提供对广泛器官的作用信息。Yin等<sup>[49]</sup>利用器官芯片将肝脏和心脏类器官共培养, 用以评估抗抑郁药物肝脏代谢后的心脏毒性, 发现氯丙咪嗪经CYP450酶代谢后的产物去甲基氯丙咪嗪可引起心脏类器官细胞活力、搏动功能和钙通量的显著受损, 表明其具有肝代谢依赖性心脏毒性。Skardal等<sup>[50]</sup>搭建了肝脏、心脏、肺、内皮、睾丸和脑类器官联合的微流控多类器官平台, 并基于此对上市后召回的药物经过肝脏类器官代谢激活后对心脏和肺等产生的毒性作用进行检测。

**3.3 药效评价** 随着类器官疾病模型的日益成熟和标准化, 利用类器官模型进行药物疗效评价也在积极开展中, 如用氧糖剥夺再灌注损伤诱导血脑屏障类器官功能障碍, 并以此对中药冠心宁注射液的保护作用

进行探究<sup>[51]</sup>。利用心脏类器官进行药物疗效评价也是可实现的。Fan等<sup>[14]</sup>用苯肾上腺素诱导产生新生大鼠原代细胞衍生的心脏肥大类球体模型并对冠心宁注射液的作用进行解析。Richards等<sup>[34]</sup>则利用心肌梗死类器官模型评估了一种抗纤维化药物JQ-1对梗死的治疗效果, 多柔比星处理后的心肌梗死类器官模型比正常对照组出现明显的纤维化进程, 而JQ-1可抑制成纤维细胞增殖并减轻梗死器官的不同步收缩。但其所构建的类器官模型缺乏免疫细胞, 而免疫系统是心肌梗死病理进程的主要参与因素, 若能进一步模拟再灌注损伤如活性氧自由基的产生和细胞凋亡等, 该模型预测药物疗效的能力将提高。

## 4 总结

iPSC技术的进步极大地促进了类器官领域的快速发展, 它们已被证明在再生医学、器官移植、疾病建模、发育机制、药物发现/疗效评估及毒理学研究中具有重要作用。和其他类器官一样, 心脏类器官也面临着相似的技术困难亟待解决, 如何实现心脏类器官大规模、标准化、高质量生产仍是关键。首先, 目前成功制作的类器官受限于血管化程度低、缺乏组织微环境如免疫系统和神经系统, 以及心肌细胞成熟度低而导致体积微小, 所以仍需要构建结构更复杂、仿生程度更高的心脏类器官模型, 这有赖于对心脏有关的生理病理机制进行更深入的解析, 加深理论认识。其次, 需要对器官发育过程中不同时期不同细胞的协同作用进行深入研究, 从而对不同细胞间信号的精准时空调控以促进其自组装, 才能进一步提高类器官结构和功能的成熟度。另外, 心脏类器官的结构和功能评价指标及相应标准也是缺乏的。但可以明确的是, 在全球积极寻求动物实验替代方法的背景下, 类器官显然获得了广泛的关注, 研究者们也正在寻求生物工程学、遗传学、干细胞生物学等方法进一步完善心脏类器官, 这些技术的飞速发展和光明前景是令人期待的。

**作者贡献:** 吴迪负责文献检索和文章撰写; 王守宝和杜冠华指导论文写作与修改, 对整体结构和质量进行把控。

**利益冲突:** 无任何经济利益或版权冲突。

## References

- [1] Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 246-254.
- [2] Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 671-687.
- [3] Tang XY, Wu S, Wang D, et al. Human organoids in basic research and clinical applications [J]. *Signal Transduct Target*

- Ther, 2022, 7: 168.
- [4] Sato T, Robert GV, Hugo J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. Nature, 2009, 459: 262-265.
- [5] McCracken KW, Cata EM, Crawford CM, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids [J]. Nature, 2014, 516: 400-404.
- [6] Wang S, Wang X, Tan Z, et al. Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury [J]. Cell Res, 2019, 29: 1009-1026.
- [7] Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system [J]. Nat Methods, 2019, 16: 1169-1175.
- [8] Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells *in vitro* [J]. Nat Protoc, 2019, 14: 518-540.
- [9] Zeng Z, Huang B, Parvez RK, et al. Generation of patterned kidney organoids that recapitulate the adult kidney collecting duct system from expandable ureteric bud progenitors [J]. Nat Commun, 2021, 12: 3641.
- [10] National Center for Cardiovascular Diseases. Annual report on cardiovascular health and diseases in China 2020 [J]. J Cardiovasc Pulm Dis (心肺血管病杂志), 2021, 40: 885-889.
- [11] Liu XY, Shao R, He S, et al. Application prospect of organoids and 3D-cell models in evaluation of cardiotoxicity of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1888-1894.
- [12] Li M, Izpisua Belmonte JC. Organoids-preclinical models of human disease [J]. N Engl J Med, 2019, 380: 569-579.
- [13] Arai K, Kitsuka T, Nakayama K. Scaffold-based and scaffold-free cardiac constructs for drug testing [J]. Biofabrication, 2021. DOI: 10.1088/1758-5090/ac1257.
- [14] Fan SW, Zhao YH, Xiao GX, et al. Establishment of 3D organoids model of cardiac hypertrophy and its application in the mechanistic analysis of cardiovascular traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 3067-3076.
- [15] Miyamoto M, Nam L, Kannan S, et al. Heart organoids and tissue models for modeling development and disease [J]. Semin Cell Dev Biol, 2021, 118: 119-128.
- [16] Moon SH, Bae D, Jung TH, et al. From bench to market: preparing human pluripotent stem cells derived cardiomyocytes for various applications [J]. Int J Stem Cells, 2017, 10: 1-11.
- [17] Liang H, Wang J, Cao N, et al. Differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes: progresses and perspectives [J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2009, 21: 663-668.
- [18] Drakhlis L, Devadas SB, Zweigerdt R. Generation of heart-forming organoids from human pluripotent stem cells [J]. Nat Protoc, 2021, 16: 5652-5672.
- [19] Zhao L, Qiu XN, Li XF. Research progress of myocardial scaffolds in the treatment of myocardial infarction [J]. Chin J Tissue Eng Res (中国组织工程研究), 2019, 23: 2279-2284.
- [20] Shkumatov A, Baek K, Kong H. Matrix rigidity-modulated cardiovascular organoid formation from embryoid bodies [J]. PLoS One, 2014, 9: e94764.
- [21] Witman N, Zhou C, Grote Beverborg N, et al. Cardiac progenitors and paracrine mediators in cardiogenesis and heart regeneration [J]. Semin Cell Dev Biol, 2020, 100: 29-51.
- [22] Yang JW, Quan YY, Zhang H, et al. miRNA-mRNA network regulation of mesodermal differentiation from human embryonic stem cells [J]. Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报), 2021, 43: 1380-1390.
- [23] Hofbauer P, Jahnel SM, Papai N, et al. Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis [J]. Cell, 2021, 184: 3299-3317.e22.
- [24] 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: 4283.
- [25] Ergir E, Olive-De La Cruz J, Fernandes S, et al. Generation and maturation of human iPSC-derived 3D organotypic cardiac microtissues in long-term culture [J]. Sci Rep, 2022, 12: 17409.
- [26] Garreta E, Kamm RD, Chua de Sousa Lopes SM, et al. Rethinking organoid technology through bioengineering [J]. Nat Mater, 2021, 20: 145-155.
- [27] Khademhosseini A, Eng G, Yeh J, et al. Microfluidic patterning for fabrication of contractile cardiac organoids [J]. Biomed Microdevices, 2007, 9: 149-157.
- [28] 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: 8352-8380.
- [29] Zhang YS, Arneri A, Bersini S, et al. Bioprinting 3D microfibrous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip [J]. Biomaterials, 2016, 110: 45-59.
- [30] Noor N, Shapira A, Edri R, et al. 3D Printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts [J]. Adv Sci, 2019, 6: 1900344.
- [31] Michas C, Karakan MC, Nautiyal P, et al. Engineering a living cardiac pump on a chip using high-precision fabrication [J]. Sci Adv, 2022, 8: eabm3791.
- [32] Chen K, Xu QB. Roles of stem cells in vascular remodeling [J]. Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报), 2021, 43: 1352-1361.
- [33] Liu C, Niu K, Xiao Q. Updated perspectives on vascular cell specification and pluripotent stem cell-derived vascular organoids for studying vasculopathies [J]. Cardiovasc Res, 2022, 118: 97-114.
- [34] 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: 446-462.
- [35] Yang KC, Breitbart A, De Lange WJ, et al. Novel adult-onset systolic cardiomyopathy due to MYH7 E848G mutation in

- patient-derived induced pluripotent stem cells [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3: 728-740.
- [36] 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.
- [37] Lewis-Israeli YR, Abdelhamid M, Olomu I, et al. Modeling the effects of maternal diabetes on the developing human heart using pluripotent stem cell-derived heart organoids [J]. *Curr Protoc*, 2022, 2: e461.
- [38] 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: 5142.
- [39] 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: 1277.
- [40] Hulot JS. Modeling cardiac arrhythmias with organoids [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73: 2325-2327.
- [41] 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: 2310-2324.
- [42] van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients [J]. *Cell*, 2015, 161: 933-945.
- [43] Lukonin I, Serra D, Challet Meylan L, et al. Phenotypic landscape of intestinal organoid regeneration [J]. *Nature*, 2020, 586: 275-280.
- [44] 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: 895-907.e6.
- [45] Mills RJ, Humphrey SJ, Fortuna PRJ, et al. BET inhibition blocks inflammation-induced cardiac dysfunction and SARS-CoV-2 infection [J]. *Cell*, 2021, 184: 2167-2182.e22.
- [46] Sallam K, Thomas D, Gaddam S, et al. Modeling effects of immunosuppressive drugs on human hearts using induced pluripotent stem cell-derived cardiac organoids and single-cell RNA sequencing [J]. *Circulation*, 2022, 145: 1367-1369.
- [47] Hoang P, Kowalczewski A, Sun S, et al. Engineering spatial-organized cardiac organoids for developmental toxicity testing [J]. *Stem Cell Rep*, 2021, 16: 1228-1244.
- [48] Hoang P, Wang J, Conklin BR, et al. Generation of spatial-patterned early-developing cardiac organoids using human pluripotent stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13: 723-737.
- [49] Yin F, Zhang X, Wang L, et al. hiPSC-derived multi-organoids-on-chip system for safety assessment of antidepressant drugs [J]. *Lab Chip*, 2021, 21: 571-581.
- [50] Skardal A, Aleman J, Forsythe S, et al. Drug compound screening in single and integrated multi-organoid body-on-a-chip systems [J]. *Biofabrication*, 2020, 12: 025017.
- [51] Du HY, Xue ZF, Xia ZT, et al. Construction of 3D blood-brain barrier organoid oxygen-glucose deprivation model and exploration of the protective effect of Guanxinning injection [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3086-3094.