基于人诱导多能干细胞的心脏类器官模型构建研究

张玉卿[1,2]，赵 琪[1,2]，杨 浩[1,2]，滕伊洋[1,2]，杨淑雯[1,2]，汪溪洁[1,2]*

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203）

摘要：采用人诱导多能干细胞（hiPSC）构建基于类器官的药物心脏毒性体外替代模型。首先筛选了 hiPSC 的优化分化代次，并使用免疫荧光染色法鉴定干细胞多能性。将 hiPSC 分别以不同的细胞密度接种到超低吸附 96 孔板，加入含有生长因子和信号通路抑制剂的培养基进行诱导分化，采用光学显微镜记录形态变化及搏动特征。收集分化过程中不同时间点的心脏类器官，采用实时逆转录定量聚合酶链反应（RT-qPCR）对心脏类器官组成细胞特异性基因的相对表达量进行检测。结果显示，复苏后的 hiPSC 生长状态良好，边缘清晰且细胞多能性优异。密度为每孔 5 000 个细胞分化形成的心脏类器官形态最优，培养 8 ～ 10 d 可趋于相对稳定，培养 18 d 内可维持相对稳定状态。RT-qPCR 结果显示，心肌细胞及其他心脏组成细胞，如内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等的特异性基因均有表达。该研究建立的心脏类器官模型，能更真实、更准确地模拟体内心脏的生物学特性和功能，为后续在研发早期采用心脏类器官模型对药物进行潜在心脏毒性研究奠定了基础。

关键词：心脏类器官；人诱导多能干细胞；体外模型；诱导分化

中图分类号：R965.1；Q813.1^{+}1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)10-1381-09

引用：张玉卿，赵 琪，杨 浩，等．基于人诱导多能干细胞的心脏类器官模型构建研究［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(10)：1381-1389．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.10.010

Study of Cardiac Organoids Model Construction Based on Human Induced Pluripotent Stem Cells

ZHANG Yuqing[1,2], ZHAO Qi[1,2], YANG Hao[1,2], TENG Yiyang[1,2], YANG Shuwen[1,2], WANG Xijie[1,2]*

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: In this study, human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) were used to construct an *in vitro* organoid-based substitution model for drug cardiotoxicity. The hiPSCs were cultured to determine the optimal differentiation generation, and pluripotency was identified using immunofluorescence staining. The hiPSCs were seeded into ultra-low adsorption 96-well plates at different cell densities, and the medium containing growth factors and signaling pathway inhibitors were added for inducing differentiation, and the morphological changes and pulsatile characteristics were recorded by light microscopy. Cardiac organoids at different time points in the differentiation process were collected, and real-time reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was adopted to detect the relative expression of cell-specific genes of cardiac organoids. The results showed that the resuscitated hiPSCs grew well with clear edges and excellent cell pluripotency. The morphology of the differentiated cardiac organoids at a density of 5 000 cells per well was the best, and trended to be a relatively stable state for 8 − 10 d culturing, and a relatively stable state could be maintained within 18 d. RT-qPCR results showed that specific genes of cardiomyocytes and other cardiac components, such as endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts, were expressed. The establishment of cardiac organoid models in this study can more realistically and accurately simulate the biological characteristics and functions of the heart *in vivo*, which lays a foundation for the subsequent use of cardiac organoid models for potential cardiotoxicity studies of drugs in the early stage of research and development.

Key Words: cardiac organoid; human induced pluripotent stem cell; *in vitro* model; inducing differentiation

药源性心脏毒性是导致药物撤市以及新药研发失败的重要原因，一直受到各国药品监管部门以及药企的广泛关注[1]。目前，药物非临床安全性评价研究机构（以下简称GLP机构）中临床前体外心脏毒性评价方法多常采用人胚肾细胞（HEK 293细胞）hERG（human ether-a-go-go related gene）钾通道进行全细胞膜片钳试验[2]。但研究证明，HEK 293细胞模型仅能转染单一离子通道，且属于非心肌细胞，无法准确概括人心肌细胞的电生理特性，试验结果可能出现假阳性或假阴性[3]。而临床前动物试验通量低、试验周期长、相对昂贵，且由于存在物种间差异，在预测药物疗效和心脏毒性方面存在先天缺陷，可预测性低[4]。2013年发布的综合性离体致心律失常风险评估（comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay，CiPA）策略中提到，应研究药物对人类心脏多个离子通道功能的影响而不仅仅局限于hERG钾通道检测，并推荐使用人诱导多能干细胞（human induced pluripotent stem cells，hiPSCs）分化来源的心肌细胞（hiPSCs-derived cardiomyocytes，hiPSC-CMs）验证已观察到具有心脏毒性的药物对动作电位的影响[5]。但hiPSC-CMs目前并无统一的质量标准，不同厂家、不同批次、不同干细胞来源的hiPSC-CMs表型不尽相同，不同实验室所得结果之间的准确性与可比性还有待商榷[6]。并且，2D单层培养分化的hiPSC-CMs表现出未成熟的心肌细胞表型，细胞类型单一，限制了应用性，亟需开发用于药物临床前心脏毒性评价的新模型、新方法。

目前国内外大力推进类器官的发展，心脏类器官的研究已成为心脏毒性体外评价模型的一个发展趋势。心脏类器官是自发形成的可呈现心脏组织形状或功能的三维结构，包含主要的心脏细胞类型，如心肌细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞等，能在一定程度上模拟心脏并应用到早期心脏发育、心血管疾病机制研究、药物测试以及心脏移植工作中[7—8]。心脏类器官由于结构及功能的复杂性，与其他类器官相比研发较为缓慢。HOFBAUER等[9]基于干细胞的自组装特性，在诱导分化过程中的不同时间节点，分别给予激活素（activin）、成纤维细胞生长因子2（fibroblast growth factor 2，FGF2）、骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMP）4、Wnt激动剂、Wnt抑制剂以及视黄酸，成功构建了首个具有单腔室结构的、能自主跳动的心脏类器官。DRAKHLIS等[10]采用$B27^+$、$B27^-$为添加因子，糖原合酶激酶3抑制剂（CHIR-99021），以及Wnt加工和分泌的抑制剂（IWP2）为诱导因子，将外层包裹基质胶的hiPSCs聚集体分化为心脏类器官，并用以模拟心血管和前肠组织的发育情况。目前国内关于心脏类器官的研究较少，还处于起步阶段。王海燕等[11]采用CHIR99021/IWR-1诱导系统，使人胚胎干细胞（H9细胞）向中胚层-心脏前体细胞分化，通过在诱导过程中向类胚体（又称拟胚体，embryoid bodies，EB）注射成人心脏成纤维细胞来促进心脏类器官成熟，与DRAKHLIS等[10]的诱导方法类似。本研究通过体外诱导hiPSCs分化为心脏类器官，采用实时逆转录定量聚合酶链反应（real-time reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）对心脏类器官各组成细胞特异性基因的表达情况进行分析，以确定该模型作为体外替代模型的可行性，为临床前药物心脏毒性评价提供新的思路和方法。

1　仪器与试剂

CKX53型荧光显微镜（日本Olympus公司）；QuantStudio™ 7 Flex型RT-qPCR仪、371型二氧化碳培养箱、ST16R型台式离心机（美国Thermo Fisher公司）；BSC-1600 Ⅱ A2型生物安全柜［苏洁医疗器械（苏州）有限公司］；超低吸附U型96孔板（美国Corning公司）。

多能干细胞分化诱导心脏类器官试剂盒（北京镁伽机器人科技有限公司）；基质胶（美国Corning公司，商品名为Matrigel）；mTeSR™ Plus型培养基、2,3,4,5-四氢-1*H*-苯

收稿日期：2024-01-20

基金项目：国家重点研发计划“干细胞及转化研究”专项项目（2020YFA0112600）

作者简介：张玉卿（1999—），女，硕士研究生，专业方向：药物心脏毒性研究。

通信作者：汪溪洁（1978—），女，研究员，博士生导师，从事药物心脏毒性和神经毒性研究。

E-mail：xjwang@innostar.cn

并[*e*][1,4]二氮杂萘双盐酸盐(Y-27632)、温和细胞解离试剂(gentle cell dissociation reagent，GCDR)和ReLeSR细胞消化液均购自加拿大STEMCELL Technologies公司；杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate-buffered saline，DPBS)和DMEM/F-12型培养基均购自美国Gibco公司；RNA快速提取试剂盒(EZ-press RNA Purification Kit PLUS，带DNA清除柱)、逆转录试剂盒(Color Reverse Transcription Kit，带gDNA Remover)和qPCR试剂盒[2×Color SYBR Green qPCR Master Mix(ROX2 plus)]均购自美国EZBioscience公司；重组Alexa Fluor® 488型荧光anti-NANOG抗体[EPR2027(2)]和重组Alexa Fluor® 555型荧光anti-SOX2抗体[EPR3131]均购自英国Abcam公司；Triton™ X-100溶液和牛血清白蛋白(bovine serum albumin，BSA)均购自美国Sigma-Aldich公司；DMSO和甘氨酸均购自国药集团化学试剂有限公司；4%多聚甲醛(上海碧云天生物技术股份有限公司)；Hoechst 33342蓝色荧光染料(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

DNA引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

hiPSCs由北京镁伽机器人科技有限公司赠予。

2 方法与结果

2.1 hiPSCs培养

细胞培养：hiPSCs以每孔1×10^5个细胞的密度接种于用Matrigel包被的6孔板中复苏培养，每孔加入含10 μmol/L Y-27632的mTeSR™ Plus型培养基3 mL，每天换液，至融合度达到80%～90%后传代。吸弃原培养液，每孔加入37 ℃的DPBS 1 mL清洗细胞，采用ReLeSR细胞消化液消化1 min，弃去细胞消化液，于37 ℃、5% CO_2的培养箱中孵育5～6 min，加入mTeSR™ Plus型培养基1 mL，振荡、拍打孔板，生成大小合适的细胞聚集体，照1∶20的比例传代，每天换液，培养4～5 d后融合度达到95%，用于后续心脏类器官分化。

传代后细胞培养至D3的形态如图1所示，可见hiPSCs呈克隆团状，生长良好，细胞团边缘清晰且光滑，细胞排列紧密，呈圆形或卵圆形，核仁较大。

2.2 hiPSCs的多能性鉴定

细胞种板：于6孔板中培养hiPSCs，当融合度达到80%～90%时，每孔加入GCDR 1 mL消化

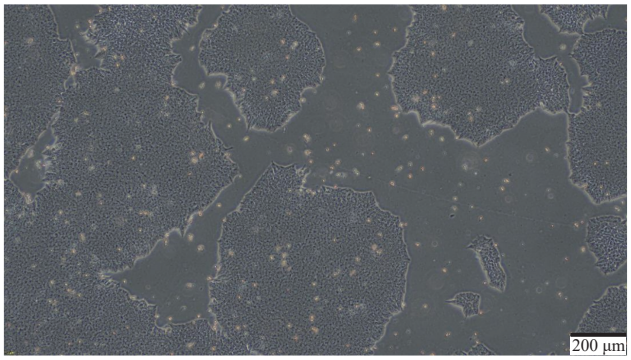


图1 生长在Matrigel上的hiPSCs

Fig.1 hiPSCs Grown on Matrigel

8 min；镜下观察到hiPSCs克隆团出现间隙时，每孔加入mTeSR™ Plus型培养基1 mL终止消化并使细胞悬浊，制成hiPSCs的单细胞悬液，离心(300×*g*)5 min；沉淀中加入含10 μmol/L Y-27632的mTeSR™ Plus型培养基1 mL重悬，计数，照每孔3 000个细胞接种于经Matrigel包被的96孔板中，培养2～3 d，待细胞生长至对数期进行染色操作。

细胞免疫荧光染色鉴定转录因子SOX-2、NANOG：吸弃培养基，剩余物用PBS洗涤1 min，共3次；于室温下用4%多聚甲醛固定10 min；吸弃固定液，剩余物用冰PBS(4 ℃)洗涤5 min，共3次；每孔加入通透液(0.2% Triton™ X-100)50 μL透膜10 min；吸弃通透液，剩余物用PBS洗涤10 min，共3次；每孔加入封闭液(含1% BSA和22.52 mg/mL甘氨酸)50 μL封闭30 min；吸弃封闭液，剩余物用PBS洗涤5 min，共3次；每孔加入重组Alexa Fluor® 555型荧光anti-SOX2抗体(1∶100稀释)50 μL或重组Alexa Fluor® 488型荧光anti-NANOG抗体(1∶100稀释)，置摇床中80 r/min、4 ℃、避光过夜孵育；吸弃抗体工作液，剩余物用PBS充分洗涤5 min，共3次；每孔加入Hoechst 33342染料工作液50 μL，于室温、避光放置20 min后，吸弃染料工作液，剩余物用PBS洗涤5 min，共3次；每孔加入PBS 100 μL，置荧光显微镜下观察并拍照。

多能性蛋白的免疫荧光染色结果如图2所示，多能性标志物SOX-2蛋白(红色)和NANOG蛋白(绿色)在细胞核内高表达，阳性率极高，符合干

细胞特性。

2.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8、IBM SPSS Statistics 21、Adobe Illustrator 2020 和 Microsoft Excel 2019 软件对数据进行统计分析及作图。试验结果由 3 次独立重复试验获得，试验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析和 t 检验进行数据统计，$P \leqslant 0.05$ 表示差异具有显著性，$P \leqslant 0.01$ 表示差异非常显著。

2.4 hiPSCs 诱导分化为心脏类器官

单细胞悬液的制备及 EB 的形成：取“**2.1**”项下用于心脏类器官分化的 hiPSCs，消化并分化 EB。用 37 ℃的 DPBS 清洗细胞，6 孔板每孔中加入 GCDR 1 mL 消化为单细胞，添加 mTeSR™ Plus 型培养基 1 mL，离心（300×*g*）5 min，弃去上清，剩余物中添加含 10 μmol/L Y-27632 的 mTeSR™ Plus 型培养基 1 mL，混匀后取细胞悬液计数，剩余细胞悬液稀释为每 100 μL 含 3 000、5 000、7 500、10 000 个细胞，向 U 底 96 孔低吸附培养板中依次加入不同细胞数的细胞悬液 100 μL，每种细胞数悬液各 8 孔；然后于 4 ℃离心（300×*g*）5 min，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，形成 EB。

心脏类器官分化：取 EB 培养孔板，小心吸弃培养基，每孔剩余物中加入心脏类器官分化试剂盒培养基 A 200 μL，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h；吸弃全部培养基 A，剩余物中加入培养基 B 200 μL，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 h；再将培养基更换为培养基 C 200 μL，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h；重复该操作，共更换培养基 C 4 次，培养基 D 5 次，培养基 E 5 次；第 5 次更换培养基 E 培养 24 h 后，更换为维持培养基 M-M，每天半换液。

以不同细胞密度分化培养的心脏类器官形态如图 3 所示。当接种的细胞密度为每孔 3 000 个时，分化的心脏类器官球体大小适当、搏动规律，但心脏类器官边缘不够光滑、形态不规则；接种密度为每孔 5 000 个细胞时，分化的心脏类器官球体大小适当、搏动规律、边缘光滑、形态规则；接种密度为每孔 7 500 个细胞时，分化的心脏类器官在培养的 D10 即发生崩解情况；接种密度为每孔 10 000 个细胞时，分化的心脏类器官在培养的 d8 出现无规律搏动，培养的 D10 停止搏动。

综上所述，后续试验将以每孔 5 000 个细胞的密度，接种 hiPSCs 到超低吸附 96 孔板中，加入含有生长因子和信号通路抑制剂的诱导分化液进行诱导分化，结果如图 4 所示。

自 D1 开始，hiPSCs 浓缩聚合为细胞球，形成 EB，直径约为 330 μm，球体中心颜色较深，细胞

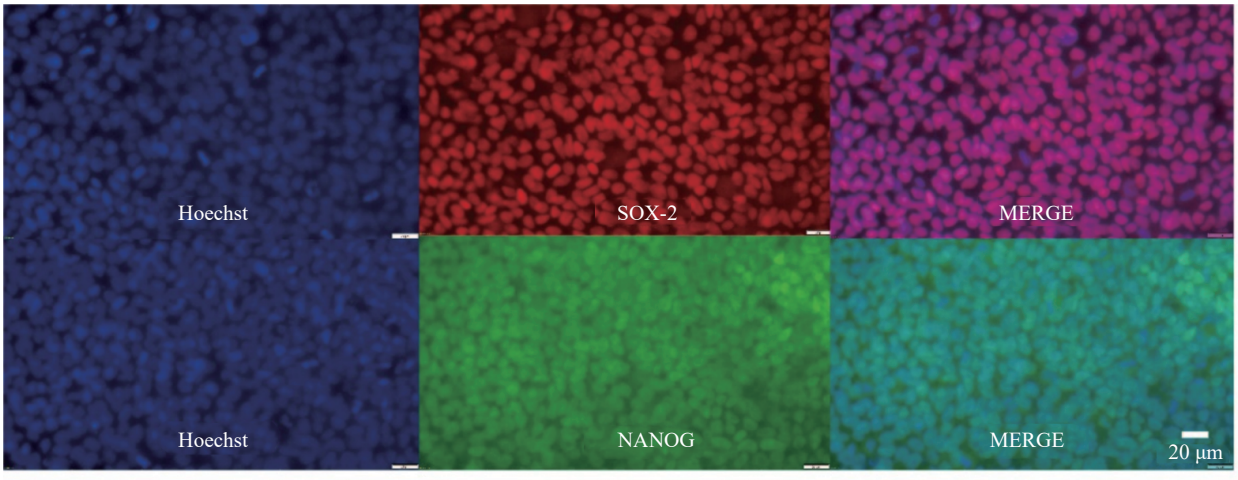


图 2　免疫荧光染色鉴定 hiPSCs 的多能蛋白

Fig.2　Immunofluorescence Staining Identification of Pluripotent Proteins in hiPSCs

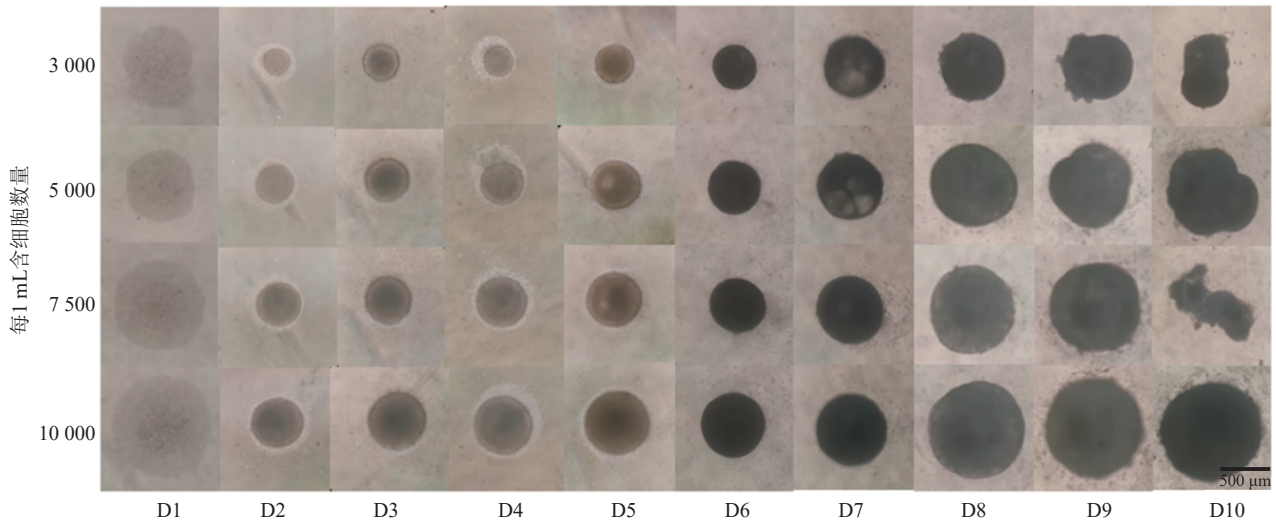


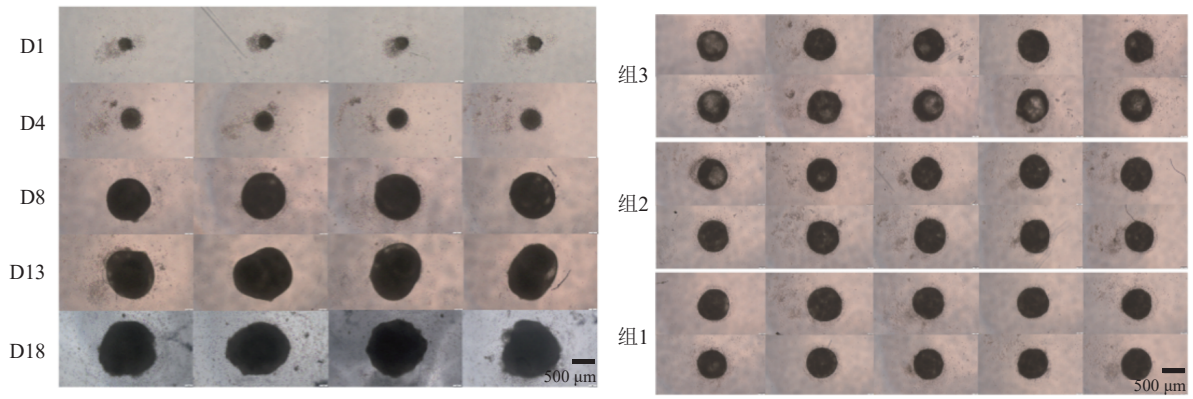
图 3 不同细胞接种密度的心脏类器官形态特征

Fig.3 Morphological Characteristics of Cardiac Organoids with Different Inoculum Density

密度高于球体外侧区域。随着诱导时间的增加，球体体积逐渐增大，如图 4B 所示，培养至 D5 的心脏类器官大小均一，球体体积明显膨大，在倒置显微镜下观察到空腔形成，球体外侧区域细胞密度高于球体中心，边缘规则整齐，逐渐形成膜状样结构，直径约为 800 μm。如图 5 所示，D8 开始球体可自发性产生相对稳定的二波段跳动，波动频率为 (36±9) bpm，外周可见明显的层状结构形成，直径为 (1 580±98) μm，达到培养最大值；分化至 D10，部分心脏类器官的搏动频率可达 66 bpm；D13 ～ D18 的球体直径大小趋于稳定，为 1 467 ～ 1 477 μm，且可维持相对稳定的搏动 (37 ～ 40 bpm)。根据以上结果，推荐选用培养至 D13 ～ D18 的心脏类器官进行后续药物心脏毒性的检测试验。

2.5 RT-qPCR 检测心脏类器官特异性基因的相对表达

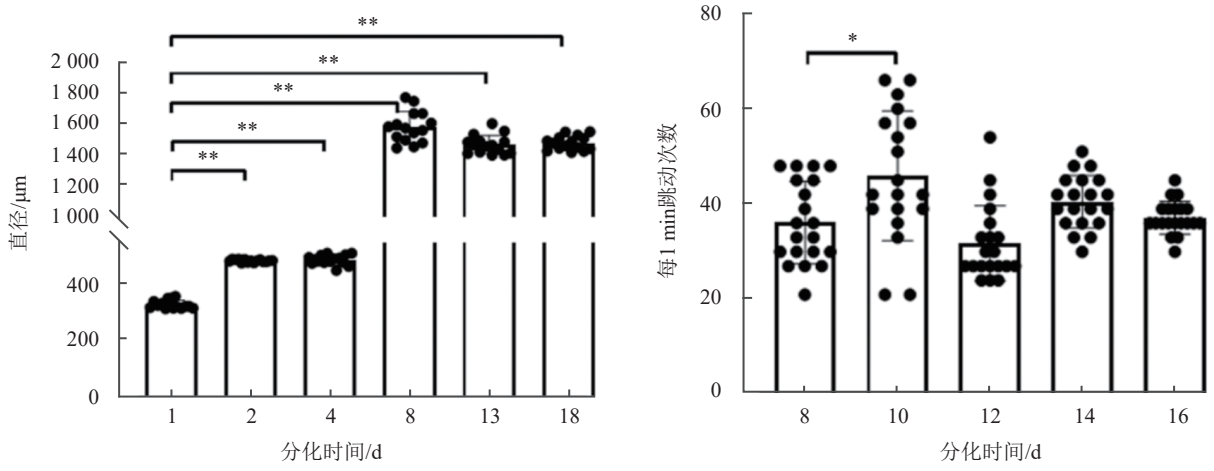
按“**2.4**”项下方法诱导分化心脏类器官。在诱导分化过程中，分别收集 D0、D4、D8、D13 和 D18 的心脏类器官样品，以人 β- 肌动蛋白 (human β-actin，β-ACT) 为内参，采用 RT-qPCR 方法检测心脏类器官组成细胞中多能性标志物 *SOX*-2、



A—培养不同天数的心脏类器官形态；B—3 组独立重复试验中培养至 D5 的心脏类器官形态。

图 4 心脏类器官分化过程中的形态照片

Fig.4 Morphological Images during Cardiac Organoid Differentiation



A　　B

图 5　心脏类器官分化过程中的直径变化（A；** 代表 *P*<0.01；*n*=15）**和搏动变化**（B；* 代表 *P*<0.05；*n*=20）

Fig.5　Diameter Changes (A; **Represents *P*<0.01; *n*=15) and Beating Changes (B; *Represents *P*<0.05; *n*=20) during Cardiac Organoid Differentiation

NANOG，中胚层标志物 *BRY*，心肌细胞转录因子 *NKX*2.5，心肌细胞标志物 *TNNT*2，血管内皮生长因子 *CD*31，平滑肌细胞标志物 *SMC*，以及成纤维细胞标志物 *VIM* 等相关基因的相对表达情况。

采用 RNA 快速提取试剂盒提取总 RNA，采用超微量分光光度计检测所提取 RNA 的浓度及纯度，采用逆转录试剂盒将所提取的 RNA 逆转录为 cDNA 模板，采用 2×Color SYBR Green qPCR Master Mix-（ROX2 plus）试剂盒进行荧光定量分析。试验中采用的引物如表 3 所示。

RT-qPCR 结果如图 6 所示。多能性基因 *SOX*-2 和 *NANOG* 在 D0 表达量最高，加入分化培养基后多能性基因表达量显著性下降，标志着心脏类器官相关组成细胞分化开始；中胚层标志物 *BRY* 在 D4 时表达量最高，D5 后表达量显著性降低，说明存在中胚层发育阶段；心脏前体细胞标志物 *NKX*2.5 在 D8 后表达量有显著性升高，且 D8 ～ D18 一直呈上升趋势；平滑肌细胞标志物 *SMC* 和成纤维细胞标志物 *VIM* 在心脏类器官发育过程中均有表达；*SMC* 在心脏类器官培养至 D8 时表达量存在显著性升高，D18 达最大表达量；*VIM* 在培养至 D13 时表达量存在显著性升高，D18 达最大表达量；心肌细胞标志物 *TNNT*2 在 D8 后表达量逐渐增高，D13 达最大表达量，D18 表达量有所降低；内皮细胞标志物 *CD*31 在培养至 D8 开始表达，D13 后表达量趋于稳定。

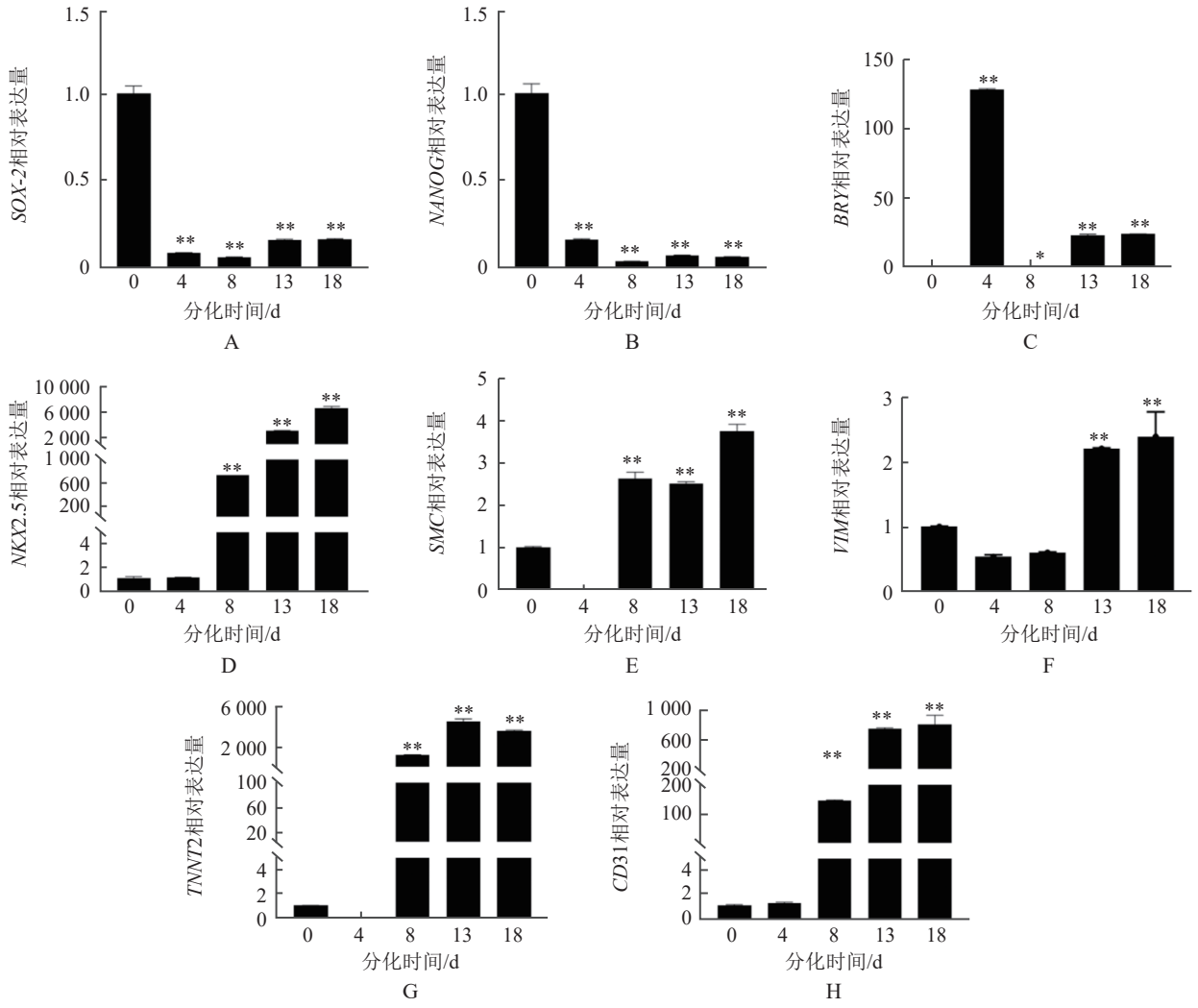
表 3　RT-qPCR 引物序列

Tab.3　The Primer Sequences for RT-qPCR

名称	序列（5'→3'）
SOX-2-F	ATGGCGAGCGGGGTTGG
SOX-2-R	TCTGCGAGCTGGTCATGGAGTT
NANOG-F	TGAACCTCAGCTACAAACAG
NANOG-R	TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG
BRY-F	TATGAGCCTCGAATCCACATAGT
BRY-R	CCTCGTTCTGATAAGCAGTCAC
*NKX*2.5-F	AAGTGTGCGTCTGCCTTTCCCG
*NKX*2.5-R	TTGTCCGCCTCTGTCTTCTCCA
*TNNT*2-F	AAGAGGCAGACTGAGCGGGAAA
*TNNT*2-R	AGATGCTCTGCCACAGCTCCTT
*CD*31-F	AAGTGGAGTCCAGCCGCATATC
*CD*31-R	ATGGAGCAGGACAGGTTCAGTC
SMC-F	TGTAGTCGCCAACCGAGCTA
SMC-R	GCCTCCCATCAGCATAATGGA
VIM-F	GACGCCATCAACACCGAGTT
VIM-R	CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT
β-*ACT*-F	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
β-*ACT*-R	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

3　讨论

心脏是首个在发育过程中形成的功能器官，也是最难在体外建立模型的器官[12]。因具有独特的腔室结构、收缩泵血功能以及电生理特性，心脏类器官与肠、肾、皮肤等类器官相比，发展



A—*SOX*-2；B—*NANOG*；C—*BRY*；D—*NKX*2.5；E—*SMC*；F—*VIM*；G—*TNNT*2；H—*CD*31。

图 6 心脏类器官分化过程中特异性基因的相对表达量（与 D0 相比，* 代表 $P<0.05$，** 代表 $P<0.01$；$n=3$）

Fig.6 The Relative Expressions of Specific Genes during Cardiac Organoid Differentiation (Compared with D0, *Represents $P<0.05$, **Represents $P<0.01$; $n=3$)

较为缓慢。目前主流机构及实验室中心脏类器官的构建方法主要有 4 种，体外微组织法、自组织法、组织工程法以及借助 3D 打印技术构建心脏类器官的方法。GOLDFRACHT 等[13]通过在不同时间点给予不同小分子依次激活 BMP、激活素、Wnt 以及视黄酸信号通路，将人胚胎干细胞（human embryonic stem cell，hESC）分化为心房肌和心室肌细胞，分别与胶原蛋白结合后，形成水凝胶结构，在铸造模具内冷凝成环并转移到硅拉伸器上，用于心律失常疾病建模以及药物测试。工程化的心脏类器官可以重现心脏的收缩功能并应用于疾病建模、药物筛选及器官修复，但仅包含心肌细胞，组成较为单一，结构并不完整。ARCHER 等[14]通过微组织法在体外将 hiPSC-CMs、原代人血管内皮细胞及原代人心脏成纤维细胞按 4 ∶ 2 ∶ 1 的比例混合，并于 384 孔低附着培养皿中共培养至少 14 d 获得 3D 微组织，用于探究心肌梗死模型中细胞间的相互作用。与传统 2D 共培养技术相比，该法能更好地还原 3D 状态下细胞间的相互作用，可重复性高，但只是机械性的组装工作，不能模拟早期心脏发育过程。KUPFER 等[15]在人类心脏磁共振扫描结果基础上构建心

脏打印模板，以纤连蛋白、层黏连蛋白、胶原蛋白甲基丙烯酸甲酯组成的水凝胶为骨架，加入hiPSCs，通过3D打印技术获得小鼠心脏大小的人类心脏类器官（长轴约1.3 cm）。该模型在获得心脏特定腔室结构的同时，保证了大血管的打印结果，使得血管化成为可能。3D打印技术获得的心脏能够模拟其机械特性及泵功能，但因需要特定材料及仪器、技术要求较高，推广难度较大。

本研究在比较各构建方法的优缺点后，采用自组织法，在HOFBAUER等[9]研究的基础上，通过优化试验方法、改进诱导体系、调整Wnt-BMP信号通路的激活以及抑制时间，建立了一种基于hiPSCs的心脏类器官培养方法。本研究所用的hiPSCs复苏培养一代后形态良好。采用细胞免疫荧光染色技术鉴定全能性，结果显示其SOX-2和NANOG染色均呈强阳性，表示hiPSCs全能性标志蛋白高表达，符合文献[16]要求。以优化的接种密度（每孔5 000个细胞）培养hiPSCs并诱导其分化为心脏类器官，可见分化至D5时出现明显腔室结构，且所得心脏类器官大小均一，可观察到边缘膜状结构。该结果提示D5可作为判断心脏类器官是否分化成功的重要时间节点。培养至D8时，心脏类器官出现二波段的自主搏动，与文献[10]中采用CHIR99021/IWR-1诱导系统的分化结果一致，且本研究中二波段跳动表示心肌细胞的种类不止1种，即除第一生心区（first heart field，FHF）外，中胚层还有向第二生心区（second heart field，SHF）方向分化的趋势[17]。D13后，心脏类器官体积趋于稳定且搏动维持在一定频率，到D18未发生坍缩及周围细胞凋亡坏死等情况，提示心脏类器官分化至D13～D18，可进行后续的药物心脏毒性试验。

为进一步确定本诱导方案的可行性，收集不同时间点的心脏类器官进行RT-qPCR检测。结果表明，中胚层标志物*BRY*在D4高表达，D5后表达量降低，标志着中胚层阶段发育完全；心脏前体细胞标志物*NKX*2.5在D8后表达量显著升高，标志着早期心脏类器官往心脏中胚层方向开始分化；分化到D8时，心肌细胞标志物*TNNT*2、平滑肌细胞标志物*SMC*和内皮细胞标志物*CD*31的表达量均存在显著性升高，成纤维细胞标志物*VIM*在分化的D13表达量显著性升高，心脏各组成细胞均有表达，与已发表文献中心脏类器官的生长模式基本相同，心脏各组成细胞均有表达，标志着心脏类器官模型分化成功。

综上所述，本研究成功构建了能自主搏动的心脏类器官，具有接近人类心脏组织的基因表达谱且形成了内层封闭的腔室，在结构和功能上反映了心脏的特征。并且，该心脏类器官能稳定培养，无需支架或其他特殊生物材料，仅需使用小分子诱导，操作方便、易复现。后续工作将采用已知心脏毒性药物验证所构建心脏类器官作为体外心脏毒性检测模型的可行性，从而建立一种基于心脏类器官模型的体外心脏毒性评价新方法。

参考文献：

[1] SIRAMSHETTY V B, NICKEL J, OMIECZYNSKI C, *et al*. WITHDRAWN—a resource for withdrawn and discontinued drugs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(D1): D1080-D1086.

[2] BRINKWIRTH N, TAKASUNA K, DOI M, *et al*. Reliable identification of cardiac liability in drug discovery using automated patch clamp: benchmarking best practices and calibration standards for improved proarrhythmic assessment [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2020, **105**: 106884.

[3] RIDDER B J, LEISHMAN D J, BRIDGLAND-TAYLOR M, *et al*. A systematic strategy for estimating hERG block potency and its implications in a new cardiac safety paradigm [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, **394**: 114961.

[4] KRAMER J, OBEJERO-PAZ C A, MYATT G, *et al*. MICE models: superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes [J]. *Sci Rep*, 2013, **3**: 2100.

[5] 胡晓敏, 张子腾, 宗　英, 等. 心脏安全药理学评价新策略——CiPA [J]. 中国新药杂志, 2016, **25**(17): 1939-1945.

[6] STRAUSS D G, GINTANT G, LI Z H, *et al*. Comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay (CiPA) update from a cardiac safety research consortium/health and environmental sciences institute/FDA meeting [J]. *Ther Innov Regul Sci*, 2019, **53**(4): 519-525.

[7] LEE S G, KIM Y J, SON M Y, *et al*. Generation of human iPSCs derived heart organoids structurally and functionally

similar to heart [J]. *Biomaterials*, 2022, **290**: 121860.

[8] SAHARA M. Recent advances in generation of *in vitro* cardiac organoids [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(7): 6244.

[9] HOFBAUER P, JAHNEL S M, PAPAI N, *et al*. Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis [J]. *Cell*, 2021, **184**(12): 3299-3317.

[10] DRAKHLIS L, BISWANATH S, FARR C M, *et al*. Human heart-forming organoids recapitulate early heart and foregut development [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, **39**(6): 737-746.

[11] 王海燕, 吴 波, 任燕妮, 等. 人胚胎干细胞 H9 诱导心脏类器官的方法研究 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2021, **21**(3): 4017-4021.

[12] LANCASTER M A, HUCH M. Disease modelling in human organoids [J]. *Dis Model Mech*, 2019, **12**(7): dmm039347.

[13] GOLDFRACHT I, PROTZE S, SHITI A, *et al*. Generating ring-shaped engineered heart tissues from ventricular and atrial human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 75.

[14] ARCHER C R, SARGEANT R, BASAK J, *et al*. Characterization and validation of a human 3D cardiac microtissue for the assessment of changes in cardiac pathology [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 10160.

[15] KUPFER M E, LIN W H, 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] 孔瑞泽. 利用多能干细胞构建人心脏类器官的研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学博士学位论文, 2021.

[17] SCHMIDT C, DEYETT A, ILMER T, *et al*. Multi-chamber cardioids unravel human heart development and cardiac defects [J]. *Cell*, 2023, **186**(25): 5587-5605.

