

# 3D ECM凝胶支架对干细胞或祖细胞来源 心脏细胞行为的影响

王明玉 令文慧 熊春霞 谢登峰 陈麒宇 褚新月 李云鑫 邱小燕 李跃民 肖雄\*  
(西南大学动物科技学院, 重庆 400715)

**摘要** 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是一种高度动态的结构,参与细胞增殖、迁移和分化等的调节过程。利用ECM构建的三维(three dimension, 3D)培养体系能够模拟体内微环境,促进干细胞或祖细胞来源诱导性心肌细胞(induced cardiomyocytes, iCMs)的成熟和功能化;ECM与3D打印相结合能够促进心脏类器官的生成和应用;外科移植ECM补丁至受损心脏有利于改善其结构和功能。但体内、外研究表明,心脏修复的整体效率低下,ECM与细胞间的作用机制有待进一步探究。该文综述了ECM的组成、重构和功能,水凝胶的成分(ECM来源、组成比例)和弹性模量以及微脉管系统等对3D培养体系中心脏细胞行为的影响,阐述了ECM在3D打印技术和受损心脏体内修复中的应用,为心脏再生修复、疾病模型构建、药物筛选和发育机理探讨等研究奠定基础。

**关键词** ECM; 心脏细胞; 3D水凝胶; 3D打印; ECM补丁

## Effects of 3D ECM Hydrogel on Behaviors of Cardiac Cells Derived from Stem Cells or Progenitor Cells

WANG Mingyu, LING Wenhui, XIONG Chunxia, XIE Dengfeng, CHEN Qiyu, CHU Xinyue, LI Yunxin, QIU Xiaoyan, LI Yuemin, XIAO Xiong\*

(College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract** Extracellular matrix (ECM) is a highly dynamic structure, which regulates the cellular proliferation, migration and differentiation etc. 3D hydrogel culture system created with cardiac ECM simulates microenvironment of heart *in vivo*, which promotes the maturation and functionalization of induced cardiomyocytes (iCMs) derived from stem cells or progenitor cells. ECM combines with 3D printed technology to promote the construction and applications of cardiac organoid. ECM patch also can be transplanted into damaged heart to improve its structure and functions. However, the efficiencies in repair of damaged heart with those strategies *in vitro* and *in vivo* are low, furthermore, the underlying mechanisms are poorly understood. Therefore, the composition, remodeling and functions of ECM, effects of histologic origins, biochemical compositions, physical properties and micro-vascular systems of 3D ECM hydrogels on behaviors of cardiac cells generated from stem cells or progenitor cells, applications of ECM on 3D printed technology and transplant *in vivo* for repairing the damaged heart were reviewed in this paper in order to lay the foundation for cell therapy, disease modeling, drug

收稿日期: 2018-12-08 接受日期: 2019-04-04

国家自然科学基金项目(批准号: 31572488)和重庆市基础科学与前沿技术研究项目(批准号: cstc2017jcyjAX0477)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68251196, E-mail: y1982@swu.edu.cn

Received: December 8, 2018 Accepted: April 4, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31572488) and the Based and Advanced Research Projects of Chongqing (Grant No.cstc2017jcyjAX0477)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68251196, E-mail: y1982@swu.edu.cn

网络出版时间: 2019-11-12 12:36:20

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1204.030.html>

screening, exploration of development mechanism and so on.

**Keywords** ECM; cardiac cell; 3D hydrogel; 3D printed technology; ECM patch

心肌梗死(myocardial infarction, MI)会引起心肌细胞(cardiomyocytes, CMs)死亡、疤痕沉积和组织重构等,致使心脏收缩功能减弱甚至丧失。心脏器官移植有望完全恢复受损器官,但是,供体器官短缺、免疫抑制治疗容易出现并发症等问题仍未解决;药理学干预能够改善心衰患者的症状,却无法恢复受损CMs的功能,心脏修复效果有限;细胞治疗为修复心肌缺损、治疗心血管疾病提供了新策略。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)<sup>[1]</sup>和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)<sup>[2]</sup>可作为诱导性心肌细胞(induced cardiomyocytes, iCMs)的来源,移植至心脏受损区域并改善其功能。但是,由于ESCs和iPSCs体内移植后缺乏精准的定向分化调控措施,致使其存在致瘤性的安全隐患。只有心脏谱系细胞分化潜能的心脏祖细胞(cardiac progenitor cells, CPCs)有望成为更有发展前景的细胞资源。CPCs可以分化成为心脏中存在的所有细胞类型例如CMs、内皮细胞和平滑肌细胞<sup>[3]</sup>。小型和大型动物MI模型体内植入CPCs均表现出一定程度的心脏功能恢复<sup>[4]</sup>。自体CPCs的3个临床试验CADUCEUS、SCPIO和ALCADIA(NCT00981006),异体CPCs的一个临床试验ALLSTAR(NCT01458405)现已开展,以期能够治疗心脏疾病,但对其治疗机制仍知之甚少。除了多能干细胞或祖细胞分化可以形成iCMs外,还可以通过旁分泌效应和增强内源性修复机制等措施改善心脏功能,这在Akt-修饰的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的研究中已经得到证明<sup>[5]</sup>。因此,改变心脏病患者心肌的微环境信号有望驱动心脏修复。

心脏病发作期间不仅CMs受到影响,而且受损区域的空间结构和生物学微环境也发生了改变,致使外源性细胞移入后的存活率和功能下降,这已成为该策略有效临床转化所面临的突出问题<sup>[6]</sup>。目前,大多数心脏病治疗及其研究的焦点仍然集中在CMs的再生和功能改善,对细胞所处微环境的注意力有限。心脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是由细胞分泌的蛋白质和多糖所构成的各向异性的网状结构,指导细胞的分布和形态发生,促进CMs的收缩和松弛、介导细胞间机械力传导和电信号传递、调

节细胞与细胞或基质之间的交流和心肌微环境中的代谢变化等,影响周围细胞的存活、迁移、增殖和成熟等行为<sup>[7]</sup>。利用天然去细胞化的ECM能够操纵体内细胞的微环境,其通过贮存的生长因子、细胞基质蛋白和复杂的超微结构等发挥生物学功效。3D ECM培养体系可以模拟CMs的体内微环境,架起2D培养与动物实验之间的桥梁,生成功能性组织或微器官,获得在动物和人体研究中难以获取的高度实验控制的实时信息,并进行高通量的筛选,以探讨正常和疾病状态下的心脏生理和疾病发生机制,进行基础研究、药物筛选和开发新的再生治疗方法等<sup>[8]</sup>。因此,本文对ECM的组成和重构、ECM凝胶成分的来源和组成比例、微脉管系统对3D培养干细胞或祖细胞来源心脏细胞行为的影响,ECM在3D打印中的应用和ECM补丁体内修复受损心脏功能等内容进行了综述,以期对ECM在心脏组织工程化方面的应用提供参考。

## 1 ECM的组成、重构和异常病理变化

### 1.1 ECM的组成及其功能

ECM是一种组成结构复杂又高度可变的3D非细胞结构,根据其组成和位置的不同,可分为间质结缔组织基质和基底膜。间质基质以多糖(如糖胺聚糖和蛋白聚糖)和纤连蛋白(fibronectin)为主,构成结构支架,具有缓冲压力、储存和释放生长因子、介导细胞间信息传递等功能<sup>[9]</sup>。Fibronectin基因的缺失会阻碍斑马鱼(Zebrafish)心脏前体细胞迁移至中线形成心脏管的过程<sup>[10]</sup>,也会导致小鼠早期胚胎死亡,部分CPCs的增殖能力和活性下降,而存活的CPCs趋向聚集于基因敲除前合成的纤连蛋白处<sup>[11]</sup>;基底膜的主要成分为胶原蛋白(collagen)、弹性蛋白(elastin)和层黏连蛋白(laminin)等,可为细胞黏附提供基本的骨架结构。I型胶原蛋白参与构建的原纤维赋予心血管组织强度和刚度,III型胶原蛋白可形成具有相容性的精细纤维网络,I型与III型胶原蛋白的比值常被用于检测心血管组织相对硬度的变化<sup>[12]</sup>;elastin的突变也会引起肺泡上主动脉瓣狭窄患者的动脉切面纤维化明显<sup>[13]</sup>;层黏连蛋白通过其 $\alpha$ 链G-结构域与整合素受体结合,形成黏着斑(focal

adhesion), 介导机械力和调节信号的传递<sup>[14]</sup>。过表达*ITGB1*(integrin B1)基因可以增强大鼠MSCs的黏附和存活率,有效减少其失巢凋亡(anoikis)<sup>[15]</sup>。因此,ECM在动物发育过程中的组成和结构变化可作为新的微环境触发器,在影响细胞的行为方面发挥着重要作用。

除上述主要蛋白外,ECM中还存在一些成分参与调节心脏细胞的黏附、存活、增殖和成熟等行为<sup>[16]</sup>。成年小鼠心脏ECM中,Agrin分子能够促进小鼠和人类iPSCs来源iCMs的体外增殖,在受损区域注射Agrin蛋白有助于修复受损心肌,恢复心脏的泵血功能和减少瘢痕面积<sup>[17]</sup>;骨膜蛋白(periostin)参与心脏ECM的有序组织和心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)的迁移<sup>[18]</sup>;腓骨蛋白(fibulin)是血管紧张肽II(angiotensin II)诱导心脏重构所必需的成分,能够显著提高MI后小鼠的存活率,可作为心脏再生治疗的潜在靶点<sup>[19]</sup>。大鼠胚胎、新生鼠、成年鼠的心脏ECM的质谱分析显示,纤连蛋白和骨膜蛋白的比例随年龄的增长而降低,表明ECM成分的变化具有动态持续性,影响心脏的形态和发育<sup>[20]</sup>。Gaetani等<sup>[21]</sup>将人源性胎儿CPCs和成年诱导性心脏祖细胞(induced cardiac progenitor cells, iCPCs)与猪心脏ECM共培养后,有利于增强小鼠CPCs的黏附、增殖和分化能力,增加CMs标志物Gata4、 $\alpha$ -MHC和troponins-T的表达率;小鼠CMs与人脂肪间质细胞(human adipose derived stromal cells, hADSCs)源性ECM成分共培养可以提升CMs的增殖、排列、细胞间连接和肌节成熟,降低心肌肥大<sup>[22]</sup>。天然ECM还能螯合和释放生长因子和信号分子,例如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )和双调蛋白(amphiregulin, AR)等,参与ECM构建和细胞行为的调节。

## 1.2 ECM的可控性重构

ECM除了提供物理支架以维持组织的完整性和弹性外,还呈现出高度的动力学变化,可以通过可控性重构以维持组织的动态平衡<sup>[16]</sup>。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)、去整合素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinases, ADAMs)、含血小板结合蛋白基序的ADAMs(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTs)和Meprins等特异性酶参与了ECM的降解,其中MMPs

能够降解几乎所有的ECM蛋白(图1),这在器官和分枝化形态发生中发挥关键作用<sup>[23]</sup>。例如,基因敲除*MMP9*会导致MI小鼠胶原沉积减少、赖氨酸氧化酶(lysyl oxidase, LOX)交联增加和心室扩张减少<sup>[24]</sup>。酶对ECM的水解作用也受到严格的调控,以避免过度的、有害的组织降解。金属蛋白酶的抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)家族的4个成员TIMP1、TIMP2、TIMP3和TIMP4能够可逆性地抑制MMPs、ADAMs和ADAMTs的活性<sup>[25]</sup>。基因敲除*TIMP2*和*TIMP3*导致MI小鼠胶原蛋白的累积减少和有序度降低,进而心脏功能恶化<sup>[26]</sup>。广谱MMPs抑制剂能够部分恢复*TIMP3*基因敲除小鼠的心脏功能<sup>[26]</sup>。因此,MMPs与TIMPs的比例在很大程度上决定了ECM的重构(图2)。

## 1.3 ECM的异常病理变化

ECM的成分、结构、硬度和丰度等的异常与一些病理变化密切相关(图2)。MI小鼠受损区域骨甘氨酸(osteoglycin)和黏结蛋白聚糖4(syndecan-4)的表达量降低,基质重塑和成熟度降低,心脏破裂死亡率增加<sup>[27]</sup>;大鼠骨髓基质细胞过表达弹性蛋白可有效防止MI后瘢痕面积的扩大<sup>[28]</sup>;小鼠过表达共结合蛋白聚糖1(syndecan-1)可减轻MI后心脏的炎症、扩张和功能障碍<sup>[29]</sup>;ECM的过度降解与骨关节炎相关<sup>[30]</sup>;心脏MMP1的过表达会导致胶原丢失,心脏收缩功能减弱,引发心肌病<sup>[31]</sup>;ADAMTs 4和ADAMTs 5的过表达将破坏软骨ECM引发骨关节炎<sup>[32]</sup>;慢性或严重的组织损伤会造成ECM的过度生成和沉积,如果缺乏平衡性降解,组织发生纤维化,甚至引起器官衰竭,例如肝硬化、骨髓纤维变性。TGF- $\beta$ 信号通路、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)信号通路、IL-33、肠道微生物组和miR-29等参与了ECM纤维化的过程<sup>[23]</sup>;ECM通过调节血管发生促进肿瘤生长,胶原的交联能够激活磷脂酰肌醇3-激酶phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号通路、miR-18a网络等促进肿瘤恶化,ECM还参与了免疫细胞和癌症细胞的转移<sup>[23]</sup>。因此,探究ECM与心脏疾病之间的关系将为其作为潜在靶点应用于心脏再生治疗奠定基础。

## 2 3D ECM凝胶支架对干细胞或祖细胞来源心脏细胞行为的影响

心脏组织经预处理/十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)/Triton X-100三步法去细胞化

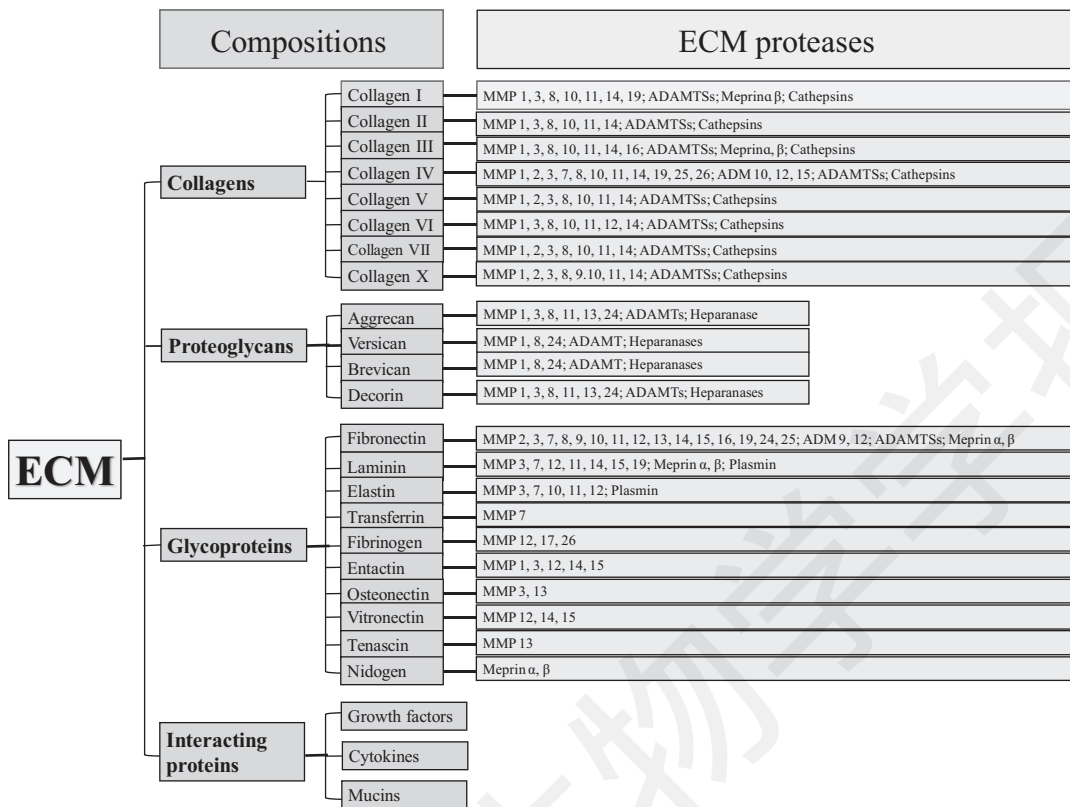


图1 ECM的主要成分和对应的蛋白酶

Fig.1 Main compositions of ECM and respective proteases

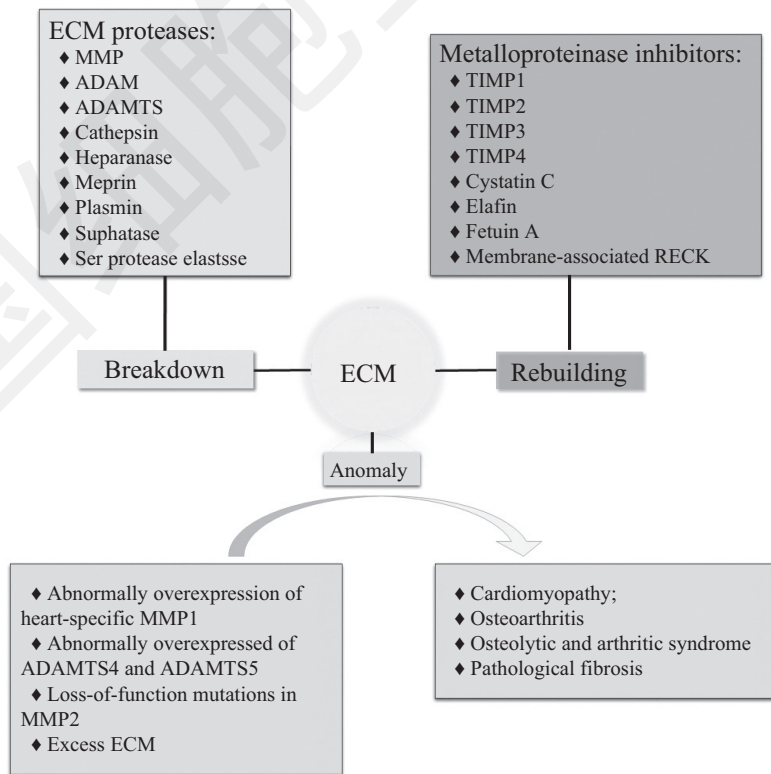


图2 ECM的降解、重塑和异常引发的疾病

Fig.2 Degradation, remodeling of ECM and diseases resulted from anomaly of ECM

处理后所得ECM仍保留有主要蛋白成分、完整空间结构和天然生物活性成分,例如FGF-2和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),其微环境有利于促进细胞的增殖,支持CMs肌小节的形成<sup>[33]</sup>。采用天然ECM参与构建的3D支架因具备生物相容性、生物降解性、适宜的纤维直径和取向、高度多孔且相互关联的空隙网状结构,有利于养分和代谢产物的交换,形成适宜的力学强度、表面性状和化学特性,释放或限制生长因子、细胞因子、趋化因子和多肽等,增强细胞间的相互作用,暴露具有生物活性的序列以提供组织特异性诱导方向等优势而具有广阔的应用前景<sup>[34]</sup>。3D ECM凝胶是由原纤维(包括胶原蛋白、纤连蛋白等)、交联元件、与细胞受体相互作用的特异性配体等多种分子组成的复杂结构,其物质特性、空间排列和生化特征将影响细胞的应力反应、协同作用和亲和作用等(图3)。因此,探究ECM凝胶的成分和物理特性、微脉管系

统对3D培养细胞的影响和作用机制至关重要。

## 2.1 ECM凝胶成分对干细胞或祖细胞来源心脏细胞行为的影响

### 2.1.1 胎儿和成年心脏来源ECM

哺乳动物(包括猪、牛、羊等)的胎儿ECM具有致密的空间结构,弹性纤维分布均匀,有利于细胞的极性迁移以及细胞间促生长因子信号的快速传递。胎儿心脏组织中存在的两种特殊蛋白即骨甘氨酸(与TGF结合,与左心室的肥大增长有关)和多功能蛋白聚糖(一种抗黏附分子,可调节整合素与细胞表面受体的相互作用)参与了心脏发育过程中干细胞的黏附和迁移。因此,胎儿心脏ECM的蛋白组成、空间结构及贮存因子更有利于细胞的增殖和成熟。成年心脏ECM具有更多的弹性纤维束,纤维直径更大,胶原蛋白数量更多,其弹性模量约为胎儿ECM的10倍,且成年心脏功能更加成熟,具有更强的收缩力和机械力耐受性。因此,成年心脏ECM的结构和生化组成可能更有利于

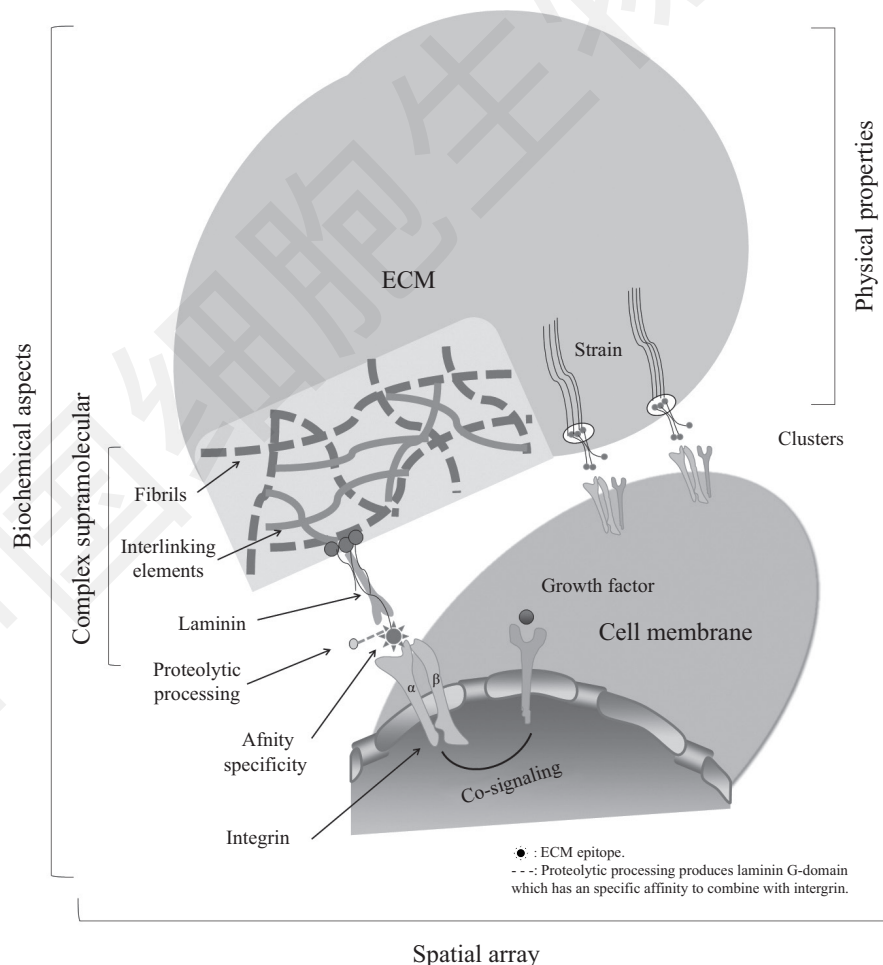


图3 ECM凝胶的物理特性、空间排列和生化特征对细胞行为的影响

Fig.3 Effects of physical properties, spatial array and biochemical aspects of ECM gel on behavior patterns and selection of cells

CMs功能的完善。Fong等<sup>[35]</sup>研究表明,牛胎儿和成年心脏组织经去细胞化处理所得ECM具有相似的聚合特征和基因表达图谱。胎儿和成年ECM水凝胶均能促进iCMs成熟基因的表达,增加细胞间联合调控钙通道的动力学,增强钙离子信号,提高心肌收缩能力。但是,成熟心脏ECM水凝胶中CMs的钙离子信号和调控相关基因如*CASQ2*、*CX43*、*Junctin*的表达量均高于胎儿心脏ECM处理组,而胎儿ECM水凝胶中培养的CMs表达更高水平的钙离子调控基因——钠钙交换体1(sodium-calcium exchanger 1, *NCX1*),细胞外刺激例如激素、机械拉伸、非CMs支持等因素均会影响*NCX1*的表达,调节CMs间钙离子信号传递,影响CMs的成熟。Silva等<sup>[36]</sup>研究表明,小鼠胎儿和成年ECM处理组的细胞存活率相似,胎儿ECM凝胶支架有利于提高细胞的黏附率和增殖率。虽然健康和疾病生物基质均能阻止细胞凋亡,但是仅有健康的ECM才能刺激细胞的增殖和迁移。Sullivan等<sup>[37]</sup>研究表明,与梗死组织来源ECM相比,采用健康心脏来源ECM包被平皿进行MSCs的2D培养更有利于促进其向早期心脏分化。

**2.1.2 其他组织来源ECM** 心脏ECM由于自源性心脏组织缺乏,异源性心脏ECM易引发免疫反应等原因,其临床应用有限。支架的良好生物相容性是其用于建立仿生工程组织的关键因素。骨骼肌因具有与心肌相似的横纹肌结构和组成,其ECM在细胞迁移、稳定细胞与周围结缔组织之间的联系、肌源性祖细胞增殖和分化形成肌纤维等方面发挥重要作用<sup>[38]</sup>,且具有容易从患者自身获得、减轻免疫排斥问题等优势而受到人们的关注。Hong等<sup>[39]</sup>研究发现,去细胞化的骨骼肌ECM和心脏ECM具有类似的遗传物质残留、蛋白质组成成分和微观结构,支持小鼠ESCs的黏附、存活、增殖和分化成为具有自发、同步、节律性心跳和正常肾上腺素刺激反应的心脏微组织;与心脏ECM相比,骨骼肌ECM更能刺激小鼠ESCs分泌更高水平的一氧化氮(nitrogen monoxide, NO),有望通过阻止caspase-3活性、激活P38丝裂原活化蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinases, P38MAPK)信号通路和PI3K/v-akt鼠科胸腺瘤病毒癌基因同源物(PI3K/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, PI3K/Akt)信号通路、降低线粒体Ca<sup>2+</sup>吸收等机制抑制CMs凋亡,增加植入细胞的存活。因此,骨骼肌ECM也适用于工程化心脏组织补

丁的制备。此外,小肠黏膜下层ECM和膀胱ECM也能促进MI动物模型中MSCs向iCMs的分化和改善心脏的功能<sup>[40]</sup>。而且,具有高度再生能力的器官例如肠胃系统的去细胞化ECM支架可用于改善心脏的有限再生能力。

**2.1.3 体外培养多层细胞来源ECM** Przybyt等<sup>[22]</sup>利用体外培养的人源性hADSC去细胞化获得ECM(hADSC-ECM),该基质能够提高体外CMs的增殖率,促进肌小节的成熟、排列和细胞间的联系。ADSC能够分泌可溶性因子(如生长因子、激素),抑制炎症反应和细胞凋亡,促进MI中血管再生和CMs扩散,一些功能性因子能够贮藏在ECM中,且不受去细胞化过程的影响。ADSC-ECM填充在细胞间隙,可通过旁分泌和近分泌的信号结合,直接调节MI的微环境,改善细胞治疗效果,有利于体外心肌组织工程结构的构建,促进MI受损区心肌的重塑;Schmuck等<sup>[41]</sup>将体外培养的高密度CFs去细胞后,获得CFs-ECM支架(直径为15~20 mm,厚度为50~150 μm)。将接种有外胚间充质干细胞(ectomesenchymal stem cells, EMSCs)的CFs-ECM支架转移至心脏受损区域,无需缝合或胶黏能够保持48 h以上。EMSCs可从心外膜转移至心内膜,有效修复心脏损伤,这为转移干细胞至缺血性心肌提供了新策略。

**2.1.4 ECM凝胶的组成比例** 水凝胶中ECM和蛋白成分及其比例影响细胞的增殖、存活、分化和成熟等行为。Duan等<sup>[42]</sup>研究表明,在不添加生长因子的情况下,心脏ECM含量高的凝胶(75% ECM+25%胶原蛋白)比ECM含量低的凝胶(25% ECM+75%胶原蛋白;100%胶原蛋白)更能增强人ESCs来源的iCMs的收缩能力(收缩细胞的数量和收缩振幅增加)和成熟(*CX43*和*cTnI*的表达量增加)。采用100%的ECM制备的水凝胶的凝结时间长且较难成型,随着ECM所占比例的减小,其凝结时间递减,弹性模量和损耗模量呈线性增加。材料的损耗模量愈小则其阻尼损耗因子(damping loss factor, DLF)越小,更接近于理想的弹性材料。较高ECM含量的凝胶质地较为柔和,其基质反应与类胚体的收缩和舒张同步,能够促进ECM凝胶中力学和生化刺激的有效传递,从而有利于早期ESCs向CMs方向的分化,是诱导心脏中胚层特异性分化较为理想的材料。

**2.2 ECM凝胶的弹性模量对干细胞或祖细胞来源心脏细胞行为的影响**

正常心脏细胞的行为受到血流动力学压力、CMs收缩的拉伸力以及ECM的弹力等机械力的影响。心脏ECM的组成和交联呈动态变化,导致发育期间细胞微环境的硬度发生改变,心脏硬度从胚胎期的低于1 kPa增加到成年心脏舒张期的大约10 kPa<sup>[43]</sup>。MI和其它心脏病导致的纤维化可使ECM微环境的硬度达约100 kPa,从而影响固有CMs或干细胞来源iCMs的行为。ECM凝胶的机械性能包括刚度(或弹性)、黏弹性、孔隙大小和孔隙率等。弹性模量是衡量基质抵抗弹性变形能力大小的尺度,弹性模量越大则基质的刚性越大。MSCs对基质的弹性模量具有高度敏感性,在模拟大脑软基质、肌肉较硬基质、胶原骨硬基质中分别表现出促神经性<sup>[44]</sup>、促肌源性<sup>[45]</sup>和促成骨性方向分化<sup>[46]</sup>。MSC形态的变化决定了其分化的命运<sup>[47]</sup>。

ECM凝胶的组成和硬度可通过半桥粒来调控ECM受体和生长因子受体的协同作用,调节细胞运动和信号分子转换。天然ECM中 $\alpha\beta$ 4整合素连接层黏连蛋白,其联合单位较大,易波动和易发生重叠、聚集,并与骨架蛋白(如角蛋白和网蛋白等)形成半桥粒,介导信号传递;如果ECM凝胶的弹性模量过度增加, $\alpha\beta$ 4整合素的运动性受到束缚,而层黏连蛋白的密度相对恒定,则 $\alpha\beta$ 4整合素与层黏连蛋白的聚集减少, $\alpha\beta$ 4整合素无法与网蛋白结合形成半桥粒,因而整合素上有多个位点被受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs)磷酸化,磷酸化的 $\beta$ 4整合素可导致PI3K信号通路和Rac1信号通路的激活,可能引发细胞出现恶性表型;而ECM含量增加即层黏连蛋

白的密度增加,将减少 $\alpha\beta$ 4整合素-层黏连蛋白聚集的障碍,有效避免细胞的恶性表型<sup>[48]</sup>(图4)。此外,弹性模量的变化调节Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase, ROCK)的活性<sup>[49]</sup>,ROCK的活化促使肌球蛋白轻链磷酸化,增加肌球蛋白II ATP酶活性,诱导肌动蛋白应力纤维、极性相反的肌动蛋白纤维束的形成,包括肌球蛋白II、原肌球蛋白、钙结合蛋白和肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK),从而调控肌动蛋白应力纤维的收缩,影响干细胞的运动性、收缩性和局灶性黏附等<sup>[50]</sup>。因此,通过调节ECM水凝胶的组成和弹性模量,可以构建复杂的微环境,从而影响细胞的行为。

Williams等<sup>[51]</sup>研究表明,在弹性模量较高(14 kPa、32 kPa)的胎儿ECM水凝胶中,CPCs的存活率和细胞密度明显低于低弹性模量(2 kPa)凝胶处理组;不同弹性模量的成年ECM水凝胶对细胞的存活率无明显影响,这可能与成年ECM更加稳定,能够有效抵抗一定程度的机械力变化有关。随着弹性模量的增加,细胞与ECM间通过谷氨酰胺转移酶(transglutaminase, TG)连接成网状结构的程度呈缓慢递减趋势。弹性模量较高(32 kPa)的胎儿和成年ECM凝胶中,CMs标志物肌联蛋白(titin, TTN)、内皮细胞标志物血管假性血友病因子(von Willebrand factor, VWF)和平滑肌细胞标志物钙调节蛋白1(calponin 1, CNN1)的表达量增加<sup>[51]</sup>。Hirata和Yamaoka<sup>[52]</sup>研究表明,在弹性模量较低的ECM基质(9 kPa)中,干细胞维持未分化标志基因*Nanog*的表达,而在弹性模量较高(20 kPa、180 kPa)

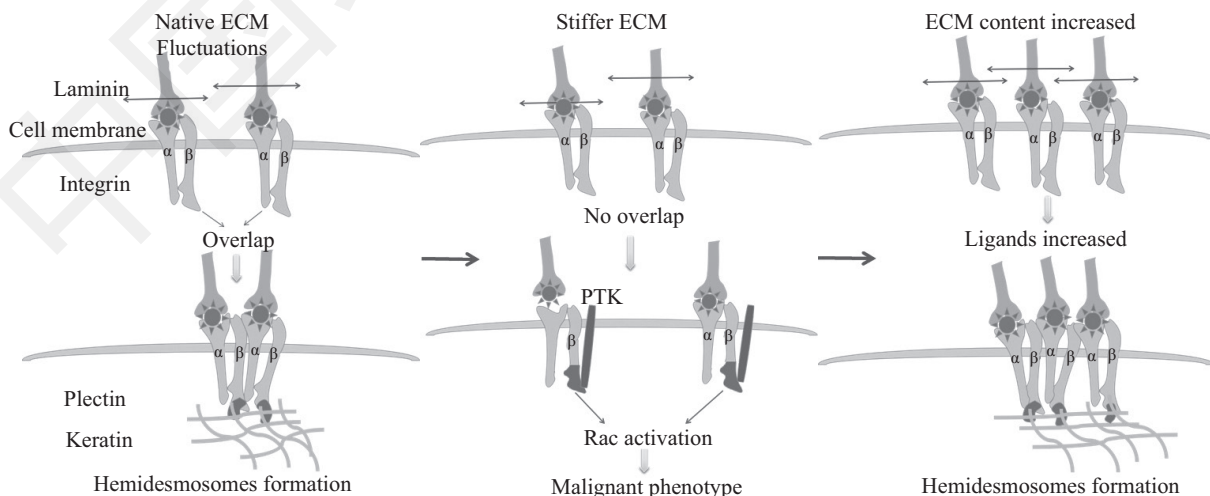


图4 ECM凝胶的组成和硬度影响细胞表型的机理

Fig.4 Mechanism on effects of composition stiffness of ECM gel on cellular phenotype

的ECM基底膜中,心脏分化基因(例如 *Gata4*、*Tbx5*)的表达量显著提升; CMs收缩基因(例如:  $\alpha$ -MHC、*TnCl*和*TnT2*)在弹性模量较低的ECM基质(20 kPa)中表达明显增加。因此,刚性较大的ECM基质有利于干细胞向心脏细胞的分化,较柔软的ECM基质更有利于心脏的搏动。

细胞对周围ECM的机械敏感性影响细胞铺展、细胞迁移和干细胞分化等行为。通过感知方向和复杂信息的大小幅度,3D培养细胞呈现出趋化性、趋触性和趋硬性。细胞的趋硬性受到ECM硬度梯度的调节<sup>[53]</sup>,被认为是上皮细胞向间充质细胞转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)、肿瘤生长、癌症侵袭和癌症转移的关键<sup>[54]</sup>。现已构建出许多模型用于研究细胞迁移趋硬性的机制,包括黏连运动介导肌球蛋白马达和F-肌动蛋白束收缩的单细胞模型<sup>[55]</sup>、药物诱导细胞和ECM纤维变形模型<sup>[56]</sup>、集成细胞机械感应过程和单细胞迁移的3D数字模型<sup>[57]</sup>、在2D底物上通过延伸伪足作为传感器的细胞迁移3D有限元模型<sup>[58]</sup>、通过细胞-底物机械性偶联促使整体细胞迁移的Potts和有限元计算机模型<sup>[59]</sup>。但是,这些模型只研究在2D底物或3D材料中的细胞迁移,较少考虑ECM纤维的散在分布性并探讨细胞和基质之间的相互作用,因此,有必要研究细胞如何能够感应硬度和确定迁移的方向。丝状伪足(filopodia)是富含肌动蛋白的质膜突出体,可作为感受器探查周围环境和检测趋化性、趋硬性和趋触性信号;作为致动器,与ECM纤维结合,形成肌动蛋白-肌球蛋白相互作用的牵引力<sup>[60]</sup>,其机械感应主要发生在肌球蛋白II收缩运动驱动F-肌动蛋白逆行流动的收缩阶段<sup>[61]</sup>。Kim等<sup>[61]</sup>基于弹性理论和ECM纤维的分散性及弹性能量,利用丝状伪足机械敏感性计算机模型,结合荧光微球观察3D ECM纤维变形试验,建立了一个公式用于估计每个丝状伪足顶端的有效合力和周围ECM纤维的位移,从而计算出局部感应的硬度,解释了细胞向更硬的ECM方向迁移的极性机制。

### 2.3 微脉管系统对干细胞或祖细胞来源心脏细胞行为的影响

利用ESCs制备的类胚体往往因缺乏功能性血管网,无法满足内部细胞的氧气和营养物质的供给而造成其死亡。体外3D培养细胞也存在类似的情况,从而限制了体外培养类器官的大小和存活时

间,当前的生物技术包括3D打印均还无法制造出微脉管系统(直径 $<10\ \mu\text{m}$ )以满足3D培养功能化血管网的需求,从而限制了工程化组织器官的应用进程。Gershlak等<sup>[62]</sup>采用植物例如菠菜叶片的去细胞化ECM作为体外3D培养干细胞的微脉管系统,构建生物相容性的组织工程支架,结果表明,去细胞化的植物脉管系统具有运输微粒物质的功能,人类EMSCs和iPSCs来源的iCMs可黏附和生长于支架外表面,表现出收缩能力和钙处理能力,为大量血管化组织再生提供了一种“绿色”技术。Nilghaz等<sup>[63]</sup>以多线程的棉线(thread)作为天然亲水通道支持多层细胞的体外培养。在无需泵或外部压力的作用下,依靠棉线的毛细作用可持续(时间至少250 s)向系统提供培养液,并能输出细胞的代谢产物。培养的多层细胞具有良好的生存能力和形态,能够促进细胞的增殖。棉线作为一种容易获得且经久耐用的生物相容性材料,其多孔结构具有类似毛细血管的作用,将串联的棉线穿过经纤维蛋白包被的二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)多层细胞培养体系,提供有效的运输渠道,为体外3D培养构建微脉管系统提供了新思路。

## 3 ECM在心脏修复中的应用

### 3.1 ECM凝胶在3D打印技术中的应用

3D打印可以对多种生物相容性材料进行高分辨率的精确沉积,有效模拟天然心脏组织的原生细胞因子和空间结构,构建心脏3D类器官。利用含有细胞的海藻酸-明胶生物材料为“墨水”,通过3D打印技术现已制造出了半心脏几何构型(half-heart geometries),该构型具有两个相连的心室结构,CMs具有搏动功能<sup>[64]</sup>;以3D打印的透明质酸-明胶贴片为载体介导CPCs的移植,可以明显减少大鼠MI后的梗塞面积<sup>[65]</sup>;ECM也可作为“墨水”用于3D细胞打印技术,构建细胞外微环境。Jang等<sup>[66]</sup>利用多层交替叠加3D打印技术获得了由EMSCs/iCPCs和ECM凝胶构成的干细胞补丁,可以减少受损区域心肌肥大和纤维化,促进肌肉层和毛细血管的新生,加快心脏功能恢复。而且,植入补丁在大约3个月后完全消失,具有生物可代谢性。因此,ECM凝胶“墨水”有利于增强3D打印结构中细胞的活性和功能。但是,其在室温条件下质地较为柔软,难以多层叠加,致使3D结构的维持面临挑战。深入探讨ECM凝胶的结构参



数、增加蛋白交联程度和弹性模量、科学设计营养物质灌注的微通道等措施有利于实现体外心脏类器官的构建。

### 3.2 ECM补丁在受损心脏修复中的应用

利用ECM构建的补丁,能够有效黏附、滞留和保护外源性细胞,经体内移植后参与损伤组织的修复。D'Amore等<sup>[67]</sup>将双层聚氨酯-ECM补丁植入到心外膜8周后,改善了慢性MI模型大鼠心脏的不良重构,减轻瘢痕形成和左心室壁的变薄程度,促进血管新生,提升了心脏的收缩力;Becker等<sup>[68]</sup>发现,无细胞羊膜上的人心脏ECM水凝胶涂层不会改变其力学特性,反而明显提高了羊膜的黏附能力,促进了培养细胞的存活率和增殖能力。因此,心脏ECM补丁具有良好的生物相容性和功能促进性。ECM补丁承载的大量外源性生长因子能够改善植入干细胞的存活率,增强其对MI后不利微环境的耐受力<sup>[69]</sup>;肠道ECM能够活化猪缺血再灌注损伤组织的心外膜,增强梗死区域 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)的细胞核定位,动员心外膜中的祖细胞,激活内源性修复机制<sup>[70]</sup>;心外膜作为血管平滑肌细胞和血管旁分泌因子的重要来源,其活化能够增加梗死区域新血管的生成和分布;在清除坏死CMs的缺血区域,由CFs分化而成的肌成纤维细胞的持续活化将导致梗死区域疤痕扩张、边缘心肌变薄变硬<sup>[71]</sup>;然而,将源自人心房的心

脏肌成纤维细胞植入ECM支架后,能够增加关键血管源性蛋白的表达,促进新血管的形成,减轻过度的疤痕沉积<sup>[72]</sup>。因此,外科移植ECM补丁改善心脏功能的机制可能与其贮存的外源性生物活性成分、巨噬细胞从促炎性M1表型向促修复性M2表型转变、血管形成、心外膜活化、基质调节CFs的功能改变等因素有关<sup>[73]</sup>。

### 4 展望

去细胞化ECM保留有天然基质的生化复合物、纳米结构和生物诱导特性等,其构建的生物支架代表了一种可调平台,能够进一步工程化以实现心脏疾病的个性化和精准化治疗,已广泛应用于心脏损伤的修复(图5)。利用ECM构建3D支架模拟体内细胞微环境,探究其分子特性(包括结构复杂性、黏附表位和相应受体的类型、生长因子依赖受体和基质依赖受体的协同作用和亲和作用等)、机械性能(包括弹性模量、黏弹性、孔隙大小和孔隙度、静态和动态变形幅度、循环变形的频率等)和空间排列(包括基质维数、细胞极性、附着力表面的表面积和几何形状、表面微观形态、抗原决定基浓度、表位聚类特征、纳米结构特征等等),能够进一步优化体外ECM支架的构建,以满足细胞生长所需的复杂、动态微环境。然而,目前构建高效、可调的ECM 3D

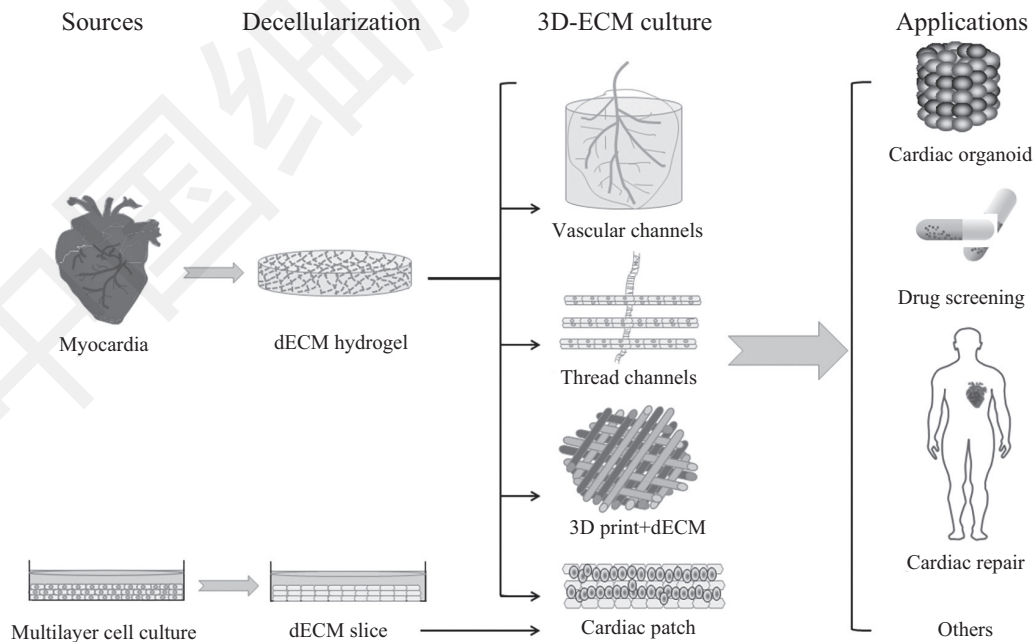


图5 ECM在心脏损伤修复中的应用

Fig.5 Applications of ECM on repair for cardiac injury

支架用于心血管组织工程仍面临极大的挑战, 需要进一步筛选、确定影响心脏细胞分化、增殖和成熟等重要行为的关键参数值, 探究ECM与细胞之间的相互作用机制。通过微脉管系统、3D打印等技术的发展应用, 为3D培养体系提供物质运输的微通道, 可以构建出更为复杂的3D类器官。ECM补丁移植也为体内修复心脏功能提供了新途径。因此, 通过体外模型和体内移植研究, 探讨ECM对于干细胞或祖细胞来源心脏细胞的影响, 有望开发出具有组织特异性的生物活性材料, 应用于临床心脏组织的修复、疾病模型构建和药物筛选等。

### 参考文献 (References)

- 1 Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, *et al.* Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014; 510(7504): 273-7.
- 2 Ong SG, Huber BC, Lee W, Kodo K, Ebert AD, Ma Y, *et al.* Microfluidic single-cell analysis of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *Circulation* 2015; 132(8): 762-71.
- 3 Smits AM, van Vliet P, Metz CH, Korfage T, Sluijter JP, Doevendans PA, *et al.* Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: An *in vitro* model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nat Protoc* 2009; 4(2): 232-43.
- 4 Lee ST, White AJ, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, *et al.* Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(4): 455-65.
- 5 Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, *et al.* Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006; 20(6): 661-9.
- 6 Nguyen PK, Neofytou E, Rhee JW, Wu JC. Potential strategies to address the major clinical barriers facing stem cell regenerative therapy for cardiovascular disease: a review. *JAMA Cardiol* 2016; 1(8): 953-62.
- 7 Li AH, Liu PP, Villarreal FJ, Garcia RA. Dynamic changes in myocardial matrix and relevance to disease: translational perspectives. *Circ Res* 2014; 114(5): 916-27.
- 8 Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater* 2009; 5(1): 1-13.
- 9 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. *Molecular biology of the cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002, 189.
- 10 Matsui T, Raya A, Callol-Massot C, Kawakami Y, Oishi I, Rodriguez-Esteban C, *et al.* Miles-apart-mediated regulation of cell-fibronectin interaction and myocardial migration in zebrafish. *Nat Rev Cardiol* 2007; 4(S1): S77.
- 11 Konstandin MH, Toko H, Gastelum GM, Quijada P, De La Torre A, Quintana M, *et al.* Fibronectin is essential for reparative cardiac progenitor cell response after myocardial infarction. *Circ Res* 2013; 113(2): 115-25.
- 12 Limon-Miranda S, Salazar-Enriquez DG, Muñiz J, Ramirez-Archila MV, Sanchez-Pastor EA, Andrade F, *et al.* Pregnancy differentially regulates the collagen types I and III in left ventricle from rat heart. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 984785.
- 13 Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, *et al.* Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 1998; 393(6682): 276-80.
- 14 Ichikawa-Tomikawa N, Ogawa J, Douet V, Xu Z, Kamikubo Y, Sakurai T, *et al.* Laminin  $\alpha_1$  is essential for mouse cerebellar development. *Matrix Biol* 2012; 31(1): 17-28.
- 15 Chen HY, Pan L, Yang HL, Xia P, Yu WC, Tang WQ, *et al.* Integrin  $\alpha_5\beta_1$  suppresses rBMSCs anoikis and promotes nitric oxide production. *Biomed Pharma* 2018; 99: 1-8.
- 16 Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome: an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(1): a004903.
- 17 Bassat E, Mutlak YE, Genzelinakh A, Shadrin IY, Baruch UK, Yifa O, *et al.* The extracellular matrix protein Agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature* 2017; 547(7662): 179-84.
- 18 Snider P, Standley KN, Wang J, Azhar M, Doetschman T, Conway SJ. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res* 2009; 105(10): 934-47.
- 19 Zhang H, Wu J, Dong H, Khan SA, Chu M-L, Tsuda T. Fibulin-2 deficiency attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by reducing transforming growth factor- $\beta$  signalling. *Clin Sci* 2014; 126(4): 275-88.
- 20 Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, *et al.* Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest* 2014; 124(3): 1382-92.
- 21 Gaetani R, Yin C, Srikumar N, Braden R, Doevendans PA, Sluijter JP, *et al.* Cardiac-derived extracellular matrix enhances cardiogenic properties of human cardiac progenitor cells. *Cell Transplant* 2016; 25(9): 1653-63.
- 22 Przybyt E, Luyn MJ, Harmsen MC. Extracellular matrix components of adipose derived stromal cells promote alignment, organization, and maturation of cardiomyocytes *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103(5): 1840-8.
- 23 Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(12): 786-801.
- 24 Voorhees AP, DeLeon-Pennell KY, Ma Y, Halade GV, Yabluchanskiy A, Iyer RP, *et al.* Building a better infarct: Modulation of collagen cross-linking to increase infarct stiffness and reduce left ventricular dilation post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 85: 229-39.
- 25 Kandalam V, Basu R, Abraham T, Wang X, Awad A, Wang W, *et al.* Early activation of matrix metalloproteinases underlies the exacerbated systolic and diastolic dysfunction in mice lacking TIMP3 following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(4): H1012-23.
- 26 Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(9): 649-65.
- 27 Daley MC, Fenn SL, Black LD. Applications of cardiac extracellular

- matrix in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1098: 59-83.
- 28 Li SH, Sun Z, Guo L, Han M, Wood MF, Ghosh N, *et al.* Elastin overexpression by cell-based gene therapy preserves matrix and prevents cardiac dilation. *J Cell Mol Med* 2012; 16(10): 2429-39.
- 29 Vanhoutte D, Schellings MW, Götte M, Swinnen M, Herias V, Wild MK, *et al.* Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation* 2007; 115(4): 475-82.
- 30 Zhen G, Cao X. Targeting TGF- $\beta$  signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35(5): 227-36.
- 31 Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest* 2000; 106(7): 857-66.
- 32 Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, Caterson B. The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: A review. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(1): 139-45.
- 33 Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, *et al.* Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C* 2010; 16(3): 525-32.
- 34 Agrawal V, Tottey S, Johnson SA, Freund JM, Siu BF, Badyalak SF. Recruitment of progenitor cells by an extracellular matrix cryptic peptide in a mouse model of digit amputation. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(19/20): 2435-43.
- 35 Fong AH, Romero-López M, Heylman CM, Keating M, Tran D, Sobrino A, *et al.* Three-dimensional adult cardiac extracellular matrix promotes maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng Part A* 2016; 22(15/16): 1016-25.
- 36 Silva AC, Rodrigues SC, Caldeira J, Nunes AM, Sampaio-Pinto V, Resende TP, *et al.* Three-dimensional scaffolds of fetal decellularized hearts exhibit enhanced potential to support cardiac cells in comparison to the adult. *Biomaterials* 2016; 104: 52-64.
- 37 Sullivan KE, Quinn KP, Tang KM, Georgakoudi I, Black LD. Extracellular matrix remodeling following myocardial infarction influences the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(1): 14.
- 38 L. Eklund J, Piuholta J, Komulainen R, Sormunen C, Ongvarrasopone R, Fassler A, *et al.* Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(3): 1194-9.
- 39 Hong X, Yuan Y, Sun X, Zhou M, Guo G, Zhang Q, *et al.* Skeletal extracellular matrix supports cardiac differentiation of embryonic stem cells: A potential scaffold for engineered cardiac tissue. *Cell Physiol and Biochem* 2018; 45(1): 319-31.
- 40 Tan MY, Zhi W, Wei RQ, Huang YC, Zhou KP, Tan B, *et al.* Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits. *Biomaterials* 2009; 30(19): 3234-40.
- 41 Schmuck EG, Mulligan JD, Ertel RL, Kouris NA, Ogle BM, Raval AN, *et al.* Cardiac fibroblast-derived 3D extracellular matrix seeded with mesenchymal stem cells as a novel device to transfer cells to the ischemic myocardium. *Cardiovasc Eng Technol* 2014; 5(1): 119-31.
- 42 Duan Y, Liu Z, John O'N, Wan LQ, Freytes DO, Gordana VN. Hybrid gel composed of native heart matrix and collagen induces cardiac differentiation of human embryonic stem cells without supplemental growth factors. *J Cardiovasc Transl Res* 2011; 4(5): 605-15.
- 43 Huyer LD, Montgomery M, Zhao Y, Xiao Y, Conant A, Korolj M, *et al.* Biomaterial based cardiac tissue engineering and its applications. *Biomed Mater* 2015; 10(3): 034004.
- 44 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126(4): 677-89.
- 45 Wang LS, Boulaire J, Chan PP, Chung JE, Kurisawa M. The role of stiffness of gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogels formed by enzyme-mediated crosslinking on the differentiation of human mesenchymal stem cell. *Biomaterials* 2010; 31(33): 8608-16.
- 46 Wen JH, Vincent LG, Fuhrmann A, Choi YS, Hribar KC, Taylor-Weiner H, *et al.* Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nat Mater* 2014; 13: 979.
- 47 Cameron AR, Frith JE, Cooper-White JJ. The influence of substrate creep on mesenchymal stem cell behaviour and phenotype. *Biomaterials* 2011; 32(26): 5979-93.
- 48 Chaudhuri O, Koshy ST, Cunha C, Shin JW, Verbeke CS, Allison KH, *et al.* Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat Mater* 2014; 13(10): 970-8.
- 49 Akhmanova M, Osidak E, Domogatsky S, Rodin S, Domogatskaya A. Physical, spatial, and molecular aspects of extracellular matrix of *in vivo* niches and artificial scaffolds relevant to stem cells research. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 167025.
- 50 Anjum I. Calcium sensitization mechanisms in detrusor smooth muscles. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2018; 29(3): 227-35.
- 51 Williams C, Budina E, Stoppel WL, Sullivan KE, Emani S, Emani SM, *et al.* Cardiac extracellular matrix-fibrin hybrid scaffolds with tunable properties for cardiovascular tissue engineering. *Acta Biomater* 2015; 14: 84-95.
- 52 Hirata M, Yamaoka T. Effect of stem cell niche elasticity/ECM protein on the self-beating cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem (iPS) cells at different stages. *Acta Biomater* 2018; 65: 44-52.
- 53 Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang Y. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 2000; 79(1): 144-52.
- 54 Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell* 2005; 8(3): 241-54.
- 55 Harland B, Walcott S, Sun SX. Adhesion dynamics and durotaxis in migrating cells. *Phys Biol* 2011; 8(1): 015011.
- 56 Reinhardt JW, Krakauer DA, Gooch KJ. Complex matrix remodeling and durotaxis can emerge from simple rules for cell-matrix interaction in agent-based models. *J Biomech Eng* 2013; 135(7): 71003.
- 57 Borau C, Kamm RD, Garcia-Aznar JM. Mechano-sensing and cell migration: A 3D model approach. *Phys Biol* 2011; 8(6): 066008.
- 58 Allena R. Cell migration with multiple pseudopodia: Temporal and spatial sensing models. *Bull Math Biol* 2013; 75(2): 288-316.
- 59 Oers RF, Rens EG, LaValley DJ, Reinhart-King CA, Merks RM. Mechanical cell-matrix feedback explains pairwise and collective

- endothelial cell behavior *in vitro*. PLoS Comput Biol 2014; 10(8): e1003774.
- 60 Jacquemet G, Hamidi H, Ivaska J. Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 36: 3-31.
- 61 Kim MC, Silberberg YR, Abeyaratne R, Kamm RD, Asada HH. Computational modeling of three-dimensional ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(3): e390-9.
- 62 Gershlak JR, Hernandez S, Fontana G, Perreault LR, Hansen KJ, Larson SA, *et al*. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2017; 125:13-22.
- 63 Nilghaz A, Hoo S, Shen W, Lu X, Chan PY. Multilayer cell culture system supported by thread. *Sensor Actuat B: Chem* 2018; 257: 650-7.
- 64 Xu T, Baicu C, Aho M, Zile M, Boland T. Fabrication and characterization of bioengineered cardiac pseudo tissues. *Biofabrication* 2009; 1(3): 035001.
- 65 Pati F, Jang J, Ha DH, Won KS, Rhie JW, Shim JH, *et al*. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun* 2014; 5: 3935.
- 66 Jang J, Park HJ, Kim SW, Kim H, Park JY, Na SJ, *et al*. 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials* 2017; 112: 264-74.
- 67 D'Amore A, Yoshizumi T, Luketich SK, Wolf MT, Gu X, Cammarata M, *et al*. Bi-layered polyurethane-extracellular matrix cardiac patch improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model. *Biomaterials* 2016; 107: 1-14.
- 68 Becker M, Maring JA, Schneider M, Martin AX, Seifert M, Klein O, *et al*. Towards a novel patch material for cardiac applications: Tissue-specific extracellular matrix introduces essential key features to decellularized amniotic membrane. *Int J Mol Sci* 2018; 19(4): 1032.
- 69 Wang L, Meier EM, Tian S, Lei I, Liu L, Xian S, *et al*. Transplantation of Is11<sup>+</sup> cardiac progenitor cells in small intestinal submucosa improves infarcted heart function. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 230.
- 70 Mewhort H, Svystonyuk D, Turnbull JD, Teng G, Belke DD, Guzzardi D, *et al*. Bioactive extracellular matrix scaffold promotes adaptive cardiac remodeling and repair. *JACC Basic Transl Sci* 2017; 2(4): 450-64.
- 71 Czubryt MP. Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012; 5(1): 19.
- 72 Svystonyuk DA, Mewhort HEM, Fedak PWM. Using acellular bioactive extracellular matrix scaffolds to enhance endogenous cardiac repair. *Front Cardiovasc Med* 2018; 5: 35.
- 73 Mewhort HE, Turnbull JD, Satriano A, Chow K, Flewitt JA, Andrei AC, *et al*. Epicardial infarct repair with bioinductive extracellular matrix promotes vasculogenesis and myocardial recovery. *J Heart Lung Transplant* 2016; 35(5): 661-70.