



胡士军, 苏州大学心血管病研究所副所长、江苏特聘医学专家、放射医学与辐射防护国家重点实验室课题组长, 荣获国家人才计划青年项目、江苏省杰青、江苏省双创人才、双创团队领军人才。主要从事干细胞与心血管疾病的转化医学研究, 致力于利用人多能干细胞来源心脏类器官和动物模型, 解析遗传性心血管疾病的发病机制, 并开发心血管疾病治疗药物和细胞治疗手段。发表SCI论文70余篇; SCI文章被引用超过5 000次, 引用指数H-index为31; 获得发明专利3项, 主持制定细胞标准1项; 获得中华医学科技奖一等奖、中国干细胞青年研究员奖、江苏科学技术一等奖和江苏医学科技奖二等奖等奖励。

心脏类器官

赵丹丹¹ 雷伟¹ 胡士军^{1,2*}

(¹苏州大学医学部心血管病研究所, 苏州 215000; ²苏州大学放射医学与辐射防护国家重点实验室, 苏州 215000)

摘要 类器官是体外构建的一类由多种类型细胞组成的, 与体内器官或组织高度相似的三维培养物, 它能够模拟细胞所属器官的某些结构和生理功能。心血管疾病患病率及死亡率一直处于上升阶段, 相关基础研究主要基于细胞和动物模型。心脏类器官是对传统心血管疾病模型的有效补充, 在体外更真实和准确地反映人体心脏的生物学特性和功能, 使其在疾病机制研究、药物开发、精准医疗和再生医学等领域具有广泛应用前景和独特优势。该文主要介绍了心脏类器官作为新一代疾病模型在心肌梗死、心力衰竭、遗传性心脏病和心律失常等方面的应用, 并探讨了类器官技术未来的发展方向和面临的挑战。

关键词 心脏类器官; 多能干细胞; 心血管疾病

Cardiac Organoid

ZHAO Dandan¹, LEI Wei¹, HU Shijun^{1,2*}

(¹Institute for Cardiovascular Science, Medical College, Soochow University, Suzhou 215000, China;

²State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Medical College, Soochow University, Suzhou 215000, China)

Abstract Organoid is an *in vitro* formed three-dimensional structure, which contains different cell types and can simulate some of the structures and functions of its representative organ. The prevalence and mortality of cardiovascular disease have been on the rise, and the related research experiments are mainly based on cell and

收稿日期: 2021-03-23 接受日期: 2021-05-17

国家自然科学基金(批准号: 82000263、91949111、81770257)和中国博士后科学基金(批准号: 2018M642316)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0512-67781897, E-mail: shijunhu@suda.edu.cn

Received: March 23, 2021 Accepted: May 17, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82000263, 91949111, 81770257) and the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2018M642316)

*Corresponding author. Tel: +86-512-67781897, E-mail: shijunhu@suda.edu.cn

animal models. Cardiac organoid is an effective supplement to the traditional cardiovascular disease model. To a certain extent, cardiac organoid reflects the key biological characteristics of human heart more truly and accurately. Therefore, cardiac organoid has broad application prospects and unique advantages in the fields of disease mechanism research, drug evaluation, precision medicine and regenerative medicine. Here, the applications of cardiac organoid are mainly introduced as new generation of disease model in myocardial infarction, heart failure, genetic heart diseases and arrhythmia. In addition, the prospects and limitations of cardiac organoids are proposed.

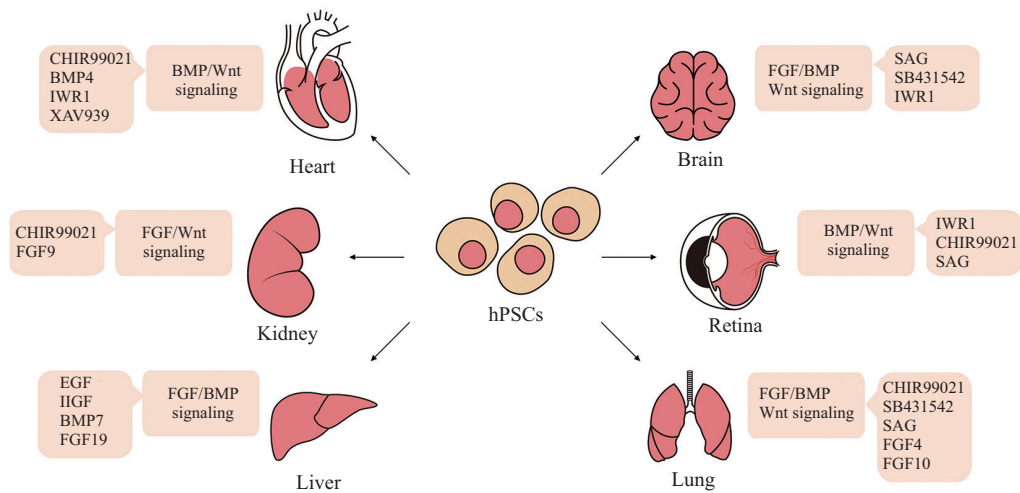
Keywords cardiac organoid; pluripotent stem cells; cardiovascular disease

在过去的几十年里,细胞和动物模型一直是生物医学研究的主要工具,为我们深入了解人体生理和病理过程提供了重要支持。然而人类个体的多样性与近亲交配动物模型的遗传同质性具有很大差异,导致我们对人类特有的发育、细胞生物学、生理和疾病相关事件的解析仍存在空白^[1]。类器官(organoid)的出现使这种情况得到改变。类器官是体外构建的一类由多种类型细胞组成的,与体内器官或组织高度相似的三维(three-dimensional, 3D)培养物,可以模拟其代表器官的关键特征:(1)含有与原始器官相同的一种或多种细胞类型;(2)组成细胞具有组织特异性;(3)具有原始器官的某些特定功能^[2]。作为一种体外3D培养模型,类器官可以重现组织形态发生事件,用于分析人类个体之间的变异性,也可以用于研究导致疾病表型的人类特有的细胞机制^[1]。

类器官技术作为近年来生物和医学研究领域最受欢迎和最具影响力的培养技术之一,经过了近一个世纪的发展和完善^[3]。早在1906年,HARRISON^[4]开发了悬滴法以进行3D细胞培养。20世纪60年代到80年代,科学家们不断改进3D培养技术,从培养方式(包括悬滴法、试管培养、表面皿培养以及消化凝聚培养等)的多样性,到细胞外基质成分[胶原、纤连蛋白和基底膜基质(Matrigel)等]的优化,该发展阶段的核心是在体外模拟组织器官的生成过程。20世纪80年代以后,研究人员开始尝试精确调控类器官内组织形态,并建立特定器官功能^[5]。2009年,SATO等^[6]首次报道称,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)阳性的单个成人小肠干细胞可以在Matrigel中自组织并分化形成隐窝绒毛结构,即3D肠道类器官。这是一项里程碑式的研究,为其他类器官构建和应用奠定了基础。2013年和2017年,类器官技术分别被*Science*和*Nature*

*Methods*杂志评为年度十大进展和突破。近十年来,类器官的研究涉及大脑^[7]、视网膜^[8]、肺^[9]、心脏^[10]、肝脏^[11]、肾脏^[12]和血管^[13]等器官^[14],可应用于器官发育和病理机制研究、药物开发和再生治疗等多个领域^[15-16]。当前,面对全球疫情,类器官模型也为深入探究SARS-CoV-2的时空效应和新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)的致病机制提供了有价值的研究平台^[17-20]。

类器官培养方案的制定主要是基于目的器官发育过程中的生长信号和组织内环境稳态的需求。例如,利用成体干细胞构建类器官时,需要向培养基中添加维持相应器官组织稳态的信号调控因子和激素;多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)衍生的类器官多采取模拟体内发育过程(包括原肠形成和器官发生过程)的方案,需要向培养基中实时添加各种调控胚层发育过程的信号分子^[21]。尽管培养方案各不相同,但这些类器官的形成过程会受到一些共同核心因子的调控。例如,Wnt信号通路参与胚胎的早期发育、器官形成及组织再生等过程,能够调控发育中细胞的多能性和命运决定过程,并整合其他通路所传递的信号,如视黄酸、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等^[22]。BMP信号通路在动物胚胎发育、组织分化和细胞增殖更新中发挥关键作用,通过调节一系列下游基因的活性,控制着诸如中胚层形成、神经系统分化、牙齿和骨骼发育以及癌症发生等许多重要的生物学过程^[23]。因此,在多数类器官的培养过程中,向培养基中添加相应的Wnt激动剂和/或配体、FGF和BMP抑制剂,可以满足发育过程中生长信号的需求,并达到稳定组织内环境的目的^[24](图1)。本文将重点介绍心脏类器官的构建策略,以及其在多种心血管疾病模型中的应用。



FGF: 成纤维细胞生长因子; BMP: 骨形态发生蛋白; SAG: Hedgehog激动剂; SB431542: TGF- β 抑制剂; IWR1: Wnt抑制剂; CHIR99021: GSK3 β 抑制剂; XAV939: Wnt抑制剂; EGF: 表皮生长因子; HGF: 肝细胞生长因子; VEGF: 血管内皮生长因子。

FGF: fibroblast growth factor; BMP: bone morphogenetic protein; SAG: Hedgehog agonist; SB431542: a TGF- β inhibitor; IWR1: a Wnt inhibitor; CHIR99021: a GSK3 β inhibitor; XAV939: a Wnt inhibitor; EGF: epidermal growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor.

图1 利用多能干细胞构建各种类器官的必要信号通路和关键因子

Fig.1 Essential signaling pathways and key factors for the construction of various organoids with pluripotent stem cells

1 心脏类器官构建策略

心血管疾病是全球范围内致死率较高的疾病之一。心血管疾病研究通常以动物模型为基础。一般来说,动物模型经过基因改造或手术操作,可以产生与特定疾病相关的一系列症状^[25]。虽然动物模型在建立疾病表型方面非常成熟,但动物和人类在基因保守性、新陈代谢及寿命等方面存在巨大差异,导致动物实验成果在向临床转化过程中存在诸多瓶颈。人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)来源的心脏谱系细胞是构建人源疾病模型、进行药物研发和再生治疗研究的重要细胞来源^[26]。科学家们已经尝试使用多种策略,例如基因编辑或添加小分子,以提高hPSCs分化细胞的效率、纯度、成熟度和亚群特异性等。然而,二维(two-dimensional, 2D)培养的心脏谱系细胞在形态、活力、细胞功能和基因表达等方面与体内心肌细胞存在较大差别。此外,传统的细胞水平研究往往针对单一的细胞类型,难以反映不同细胞类型间的空间互作以及细胞与基质之间的交流情况^[27]。人心脏类器官(human cardiac organoids, hCOs)是传统2D培养和动物/人体模型之间的重要桥梁。hCOs具有与人类相同的基因背景、与人体一致的新陈代谢情况和细胞寿命;与单层细胞模型相比,能更真实、更准确地模拟体内心脏的生物学特性和功能;与动物模型相比,在

hCOs中更容易进行基因编辑、微环境操控和信号通路调控^[2]。因此,hCOs可以帮助我们更好地探索心脏的生理功能和病理机制^[28]。多年来,hCOs的定义在不同的生物医学领域仍未形成统一标准^[29]。在这里,我们认为心脏类器官是具有心脏样特性和功能的3D体外培养模型。

心脏发育大致分为心脏发生和成熟两个大的阶段。在早期心脏发生阶段,胚胎心源性中胚层细胞经历分型、分化,形成一个复杂的心脏结构^[30-31];而在后期成熟阶段,心脏会经历一个功能所需的适应性变化^[32]。人多能干细胞主要也是在体外模拟这两个过程。最初,科学家普遍采用拟胚体(embryoid bodies, EBs)分化的策略来构建心脏类器官。EBs是PSCs的3D集合体,通过体内原肠胚发育过程,可进一步分化形成各种组织和类器官结构^[33]。在早期发育阶段,胚胎心脏受到来自周围组织的Wnt、BMP和Notch等多种信号通路调节。因此,在体外构建心脏类器官时,需要通过额外添加外源性生心因子来模拟体内心脏发育环境^[34]。Wnt信号作为参与心脏中胚层发育的关键信号通路,也是PSCs衍生心脏谱系细胞和构建心脏类器官的重要调控通路^[35]。最近,来自德国汉诺威医学院的研究人员将hPSCs聚集细胞团嵌入基质胶中,先后使用Wnt信号通路激活剂CHIR和抑制剂IWP2进行处理,成功获得与早期心

脏结构非常相似的肝脏类器官,可用于前肠和心脏早期发育的研究^[36]。

除EB分化策略外,科学家们还建立了其他构建hCOs的方法,主要涉及到细胞重新凝集和组织的微图案化^[37]。凝集通常是利用PSCs衍生心脏谱系细胞在具有3D结构的生物材料中自组织形成。例如,将分化的心脏谱系细胞重悬接种在超低吸附的培养皿中,使它们自发聚合^[38];或者将细胞包裹到凝胶系统中,使其在可控的微环境中快速形成与体内生理活动相似的球体^[39]。微图案化法主要是依赖于光刻技术,使用聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)结合其他生物材料(如HA、PEG、聚苯乙烯等)制造可控的微结构模具^[20,40]。这种微型模具可以根据实验需求制备成不同的尺寸和形状,使分化的心脏谱系细胞接种后形成特定的组织形态。

2 心脏类器官疾病模型

科学家利用多能干细胞固有的自组织能力,结合生物相容性材料支架,成功构建了不同的hCOs疾病模型,对心血管疾病(包括心肌细胞损伤、心脏收缩功能障碍和电生理活动异常等)的研究颇有获益^[41-43]。

2.1 心肌梗死

最近,VOGES团队研究人员^[44]尝试利用图案化微型模具来构建几何空间,以约束hPSCs分化过程中的组织结构,使其形成一个跳动的心脏样微腔室。这种设计规范了细胞的空间命运,可模拟早期人类心脏器官形态发育特征,为研究心脏功能和心肌损伤修复机制提供了灵活的平台。他们将胶原凝胶包裹hPSCs衍生的心肌细胞(hPSC-derived cardiomyocytes, hPSC-CMs)注入环形模具中形成hCOs,随后对hCOs进行局部冷冻来模拟体内急性心肌损伤。研究发现,hCOs的功能在急性损伤2周后便得到恢复。这项研究首次报道了hCOs具有胎儿的心脏组织特征和内源性再生反应,为研究心脏再生及其分子机制提供了良好的视角。

RICHARDS团队^[45]利用非黏附性琼脂糖凝胶模型构建了hPSC-CMs与非心肌细胞混合形成的hCOs,并通过模拟心梗过程中的低氧环境和细胞凋亡梯度,在转录水平、结构和功能方面成功重现了心肌梗死的各种特性(包括病理性代谢变化、纤维化和细胞内钙失衡等)。研究人员进一步利用hCOs评估了

抗纤维化药物JQ-1对心肌梗死的治疗效果,发现JQ-1可改善心梗hCOs的纤维化和搏动不同步性。同时,该团队发现抗肿瘤药物多柔比星(doxorubicin, DOX)可加剧hCOs中的细胞凋亡程度,减弱hCOs的收缩力。综上所述,hCOs能够再现心肌纤维化和药物毒性反应,在探究心血管疾病病理进程、优化药物设计、评价药物毒性等方面具有广阔的应用前景。

值得注意的是,免疫/炎症细胞在心肌梗死的早期反应中起重要作用,且有助于激活随后的纤维化反应^[46]。由于缺乏炎性细胞,hCOs不能呈现免疫系统在心肌梗死中的作用,因此不能完全概括体内心脏应激反应的各个方面。

2.2 心力衰竭

TIBURCY团队^[47]基于工程化心肌组织组装和机械牵拉策略,优化了利用hPSC-CMs和成纤维细胞构建hCOs过程中的细胞比例、细胞基质和培养条件,在无血清条件下成功构建了心肌细胞结构和功能更成熟的hCOs。研究人员利用该模型研究发现,神经体液(如儿茶酚胺)过度刺激会引发hCOs的收缩功能障碍、心肌肥大、心肌细胞死亡、肾上腺素能信号脱敏以及心力衰竭生物标志物释放等,上述特征正是心力衰竭的典型表现。而 β -肾上腺素受体拮抗剂美托洛尔和 α -肾上腺素受体拮抗剂苯氧苄胺可部分抑制儿茶酚胺引发的hCOs病理表型。这项研究为将hCOs应用于心力衰竭疾病模型研究和抗心衰药物的评估奠定了理论基础,有助于开发新的心衰治疗策略。

然而,这种hCOs在结构和功能上与新生儿心脏相仿,在转录组水平的成熟度类似于妊娠13周胎儿心脏。如何获得完全成熟的心肌细胞表型仍然是hCOs面临的主要挑战。

2.3 遗传性心肌病

几十年来,人们一直致力于探究家族性心肌病(如肥厚型心肌病或扩张型心肌病)的遗传病因和发病机制。人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)因具有与患者一致的基因背景,其衍生心肌细胞能更好地反映疾病特征,在遗传性疾病研究中具有广泛应用前景。最近,YANG团队^[48]利用患者特异hiPSC-CMs和人骨髓基质细胞组合构建了hCOs,以探究肌球蛋白重链7突变(E848G)在家族性心肌病中的作用。结果显示,E848G突变可导致hCOs的结构排列整齐性和收缩功能显著降

低。同时,与2D培养的心肌细胞相比,在基因突变型hCOs中更容易检测到收缩功能差异。上述研究表明,患者特异hCOs对于基因遗传病研究不仅具有遗传学意义,也具有生理学意义。

近年来,基因组编辑技术的引入极大地促进了同源hPSCs谱系的发展,并已广泛应用于细胞模型^[49]。规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)基因编辑技术的巨大突破,对纠正基因突变和减轻疾病程度具有良好的推动作用^[50],也可为个性化治疗平台的建立提供基础。LONG等^[51]研究发现,利用肌营养不良蛋白(dystrophin)突变hiPSC-CMs构建的hCOs具有明显的收缩功能障碍,而CRISPR/Cas9介导的突变校正可以改善hCOs的收缩功能,达到特定组织治疗效果。该研究突显了hCOs作为基因治疗临床前研究工具的实用性。

但是目前hCOs与CRISPR的联合应用仍存在一定限制。首要问题是难以获得较高的转染效率,也无法保证所转染的细胞都能实现正确的基因编辑。因此也导致利用基因组突变建立类器官系统所需的细胞数量相对较大^[50]。

2.4 心律失常

过往研究证实,hCOs能够产生自发和诱发动作电位,并且其传导速度高于2D细胞模型,提示hCOs更适用于心律失常的研究。此前针对遗传性心律失常的研究主要集中于hiPSC-CMs的细胞特性,即动作电位特性和离子电流分布。最近SHINNAWI团队^[52]研究发现,hCOs可用于观察短QT综合征(short QT interval syndrome, SQTS)等心律失常综合征中更为复杂的电生理现象,如传导和折返等;而利用患者来源的hiPSC-CMs构建的hCOs对折返性心律失常更加敏感。同时,该团队研究人员利用hCOs评估了抗心律失常药物的疗效,结果显示奎尼丁和异丙吡胺可延长动作电位时程,抑制心律失常的发生,而索他洛尔未显示出抑制心律失常的作用。这项研究证明,hCOs具有模拟SQTS疾病表型的能力,并为心律失常潜在机制研究和药物评估提供了新的思路。

为了进一步探究心室和心房的生物学特性,GOLDFRHT团队^[53]将hPSCs分化为心房和心室细胞,分别转移到具有硅胶支架的圆形铸造模具中,形成腔室特异性的环形hCOs。这种房室特异的hCOs

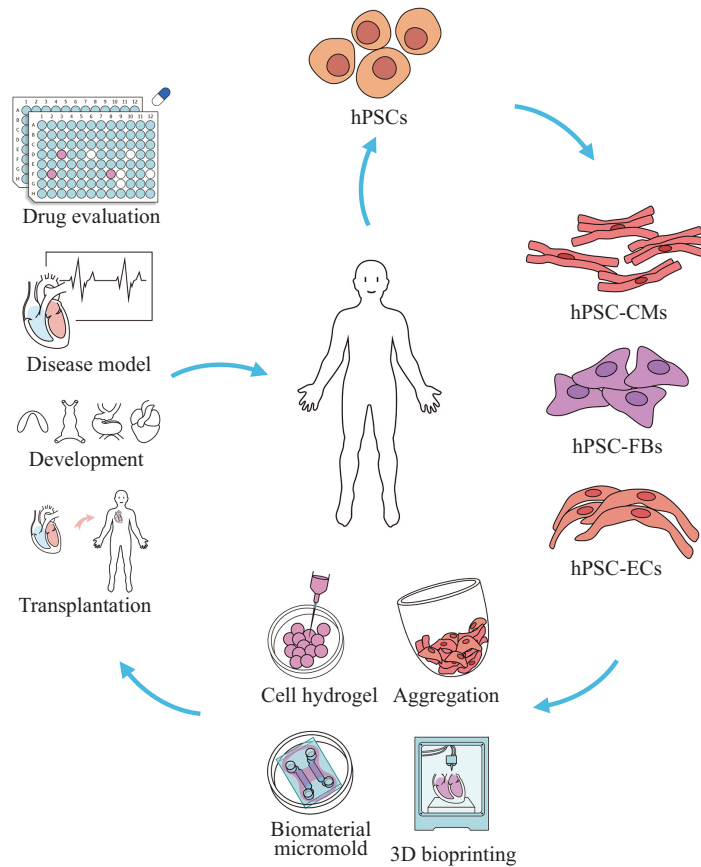
在形态、基因表达、电生理和收缩方面分别表现出心房和心室的特性。研究发现,大多数心房特异的hCOs在基础水平就显现出不同类型的心律失常,通过施加电击可以终止这些心律失常的发生。研究人员以此为基础进一步验证了抗心律失常药氟卡尼和维纳卡兰终止心房特异的hCOs折返性活动的的能力,更有力地证实了hCOs有可能成为研究复发性心律失常(如房颤等)的模型,可用来评估相关药物的干预效果。不过目前所用的hCOs缺乏腔室特异性构造,其离子通道相关基因的表达和静息膜电位也无法达到成人心脏的水平。

最近,科研人员利用hiPSCs成功地制造出了世界上第一个包含细胞、血管和心室腔的3D生物打印心脏^[54]。然而,由于缺乏窦房结等心脏传导系统,这种通过3D生物打印的hCOs不具有收缩和舒张功能。之后,FEINBERG团队^[55]发表在*Science*杂志上的一项研究表明,他们利用一种生物3D悬浮水凝胶自由可逆嵌入技术(freeform reversible embedding of suspended hydrogels, FRESH),成功构建出了包含整个心脏器官组件的hCOs,不仅可以重现天然心脏组织的关键结构、机械和生物学特性,而且还能够用来分析心律失常的电生理活动和心室收缩能力,是未来具有发展潜力的hCOs之一。但目前通过这种模型实现人工心脏的生理功能仍然存在许多挑战,例如细胞消耗量巨大、生物材料昂贵等。

虽然到目前为止重建一个功能齐全的器官还没有完全实现,但我们已经有能力通过现有的技术生产具有部分心脏生物学功能的类器官模型。以上研究很好地例证了hCOs具备与心脏相似的生物学特性,可以作为临床前模型的补充,有效地模拟病理过程,并促使我们进一步联合多领域先进的技术,深入研发构建hCOs的新方法,生产更完善的hCOs,以促进其在转化医学领域的应用(图2)。

3 展望与挑战

iPSC技术的进步极大地推动了个性化医疗的快速发展。个性化医疗针对患者的自身特点进行个性化用药,其巨大潜力在于从一种适用于所有人的方法转向最有可能使每个人受益的治疗策略^[56]。使用患者特异性iPSCs构建的hCOs具有与患者完全匹配的遗传背景,可以提供整合所有参与药物反应的基因组位点的模型系统,便于对患者的药物反



人心脏类器官由人多能干细胞衍生的心脏谱系细胞组成。利用多种生物材料和技术,形成的心脏类器官能够模拟心脏的部分关键特征和功能。心脏类器官在药物评估、疾病模型、心脏发育过程和器官移植研究等方面具有广阔的应用前景。

Human cardiac organoids are composed of cardiac lineage cells derived from human pluripotent stem cells. Using a variety of biomaterials and technologies, the formation of cardiac organoids can simulate some of the key features and functions of the heart. Cardiac organoids have broad application prospects in drug evaluation, disease models, heart development and transplantation.

图2 心脏类器官的构建及应用

Fig.2 Construction and application of cardiac organoids

应进行比较,因此可以在体外更好地评估药物有效性和安全性,从而改善临床结果,实现最佳预期^[57]。

多类器官芯片(multi-organoids-on-chip)是在同一平台集成多种类器官,从而实现体外模拟多器官组织之间的相互作用,可用于系统地评价药物^[58]。YIN团队^[59]通过共培养装置(包括由多孔膜隔开的分隔室)实现肝脏类器官和hCOs的共培养,以评估抗抑郁药物肝脏代谢后的心脏毒性。SKARDAL等^[60]通过开发6种类器官(肝脏、心脏、肺、内皮、睾丸和脑)联合的微流控平台,检测抗肿瘤药物经过肝脏类器官代谢激活后对心脏和肺产生毒性作用。以上研究说明,多器官芯片系统能够在器官水平上反映器官特定功能,重现药物代谢的复杂过程,更真实地呈现了体内多器官的联合作用,是良好的具有生理相关性的药物筛选模型。因此,类器官可以有效降低

新药研发的成本,极大地推进药物疗效和安全测试的开展,在药物开发和安全性评估的监管领域具有广阔的发展前景。

目前,类器官要实现真实地模拟活体组织的结构和功能仍面临许多挑战。首先,如何整合生物材料和生物工程的前沿优势,构建结构更复杂、功能更精确的类器官是亟待解决的问题。其次,类器官自组织依赖于内源性机制,经历与体内器官相似的发育轨迹,合理利用小分子精准协调各信号通路在整个过程中的作用是十分必要的^[2-3]。最后,营养物质通过扩散在类器官中分布不均匀,经常导致核心坏死,并限制类器官的尺寸。构建血管化的类器官促进其自身发育和成熟是类器官技术研究的重点之一。目前国内外已基于细胞生物学、遗传学和生物工程引入内皮细胞或在类器官内打印血管结构试图

解决这个至关重要的问题^[61]。

类器官作为最有发展前景的新生代体外模型, 填补了2D细胞实验和活体动物实验之间的空白。以上这些关键限制因素的突破将进一步优化类器官的结构和功能, 不仅可以为疾病和药物研究提供更精准的模型, 而且可能为临床组织/器官修复提供原始移植供体。

参考文献 (References)

- [1] LEHMANN R, LEE C M, SHUGART E C, et al. Human organoids: a new dimension in cell biology [J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(10): 1129-37.
- [2] FATEHULLAH A, TAN S H, BARKER N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(3): 246-54.
- [3] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-97.
- [4] HARRISON R G. Observations on the living developing nerve fiber [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1906, 4(1): 140-3.
- [5] SIMIAN M, BISSELL M J. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(1): 31-40.
- [6] SATO T, VRIES R G, SNIPPET H J, et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-5.
- [7] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-9.
- [8] NAKANO T, ANDO S, TAKATA N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 771-85.
- [9] MILLER A J, DYE B R, FERRER-TORRES D, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells *in vitro* [J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(2): 518-40.
- [10] HOANG P, WANG J, CONKLIN B R, et al. Generation of spatial-patterned early-developing cardiac organoids using human pluripotent stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(4): 723-37.
- [11] HUCH M, DORRELL C, BOJ S F, et al. *In vitro* expansion of single *Lgr5*⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration [J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 247-50.
- [12] TAKASATO M, ER P X, CHIU H S, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis [J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 564-8.
- [13] WIMMER R A, LEOPOLDI A, AICHINGER M, et al. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy [J]. *Nature*, 2019, 565(7740): 505-10.
- [14] ROSSI G, BROGUIERE N, MIYAMOTO M, et al. Capturing cardiogenesis in gastruloids [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(2): 230-40, e6.
- [15] WANG X. Stem cells in tissues, organoids, and cancers [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(20): 4043-70.
- [16] DEMIRCI S, HARO-MORA J J, LEONARD A, et al. Definitive hematopoietic stem/progenitor cells from human embryonic stem cells through serum/feeder-free organoid-induced differentiation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 493.
- [17] YANG L, HAN Y, NILSSON-PAYANT B E, et al. A human pluripotent stem cell-based platform to study SARS-CoV-2 tropism and model virus infection in human cells and organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(1): 125-36, e7.
- [18] SAMUEL R M, MAJD H, RICHTER M N, et al. Androgen signaling regulates SARS-CoV-2 receptor levels and is associated with severe COVID-19 symptoms in men [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(6): 876-89, e12.
- [19] MAHALINGAM R, DHARMALINGAM P, SANTHANAM A, et al. Single-cell RNA sequencing analysis of SARS-CoV-2 entry receptors in human organoids [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(4): 2950-8.
- [20] MILLS R J, HUMPHREY S J, FORTUNA P R J, et al. BET inhibition blocks inflammation-induced cardiac dysfunction and SARS-CoV-2 infection [J]. *Cell*, 2021, 184(8): 2167-82, e22.
- [21] CORRO C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1): C151-65.
- [22] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-99.
- [23] ZHANG Y, QUE J. BMP signaling in development, stem cells, and diseases of the gastrointestinal tract [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82: 251-73.
- [24] HUCH M, KOO B K. Modeling mouse and human development using organoid cultures [J]. *Development*, 2015, 142(18): 3113-25.
- [25] FRANCO R, CEDAZO-MINGUEZ A. Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans [J]? *Front Pharmacol*, 2014, 5: 146.
- [26] ZWI-DANTSIS L, GEPSTEIN L. Induced pluripotent stem cells for cardiac repair [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(19): 3285-99.
- [27] WANG Z, WANG S N, XU T Y, et al. Organoid technology for brain and therapeutics research [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2017, 23(10): 771-8.
- [28] BREDENOORD A L, CLEVERS H, KNOBLICH J A. Human tissues in a dish: the research and ethical implications of organoid technology [J]. *Science*, 2017, 355(6322): eaaf9414.
- [29] ROSSI G, MANFRIN A, LUTOLF M P. Progress and potential in organoid research [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(11): 671-87.
- [30] KLAUS A, SAGA Y, TAKETO M M, et al. Distinct roles of Wnt/ β -catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(47): 18531-6.
- [31] WANG W, NIU X, STUART T. A single-cell transcriptional roadmap for cardiopharyngeal fate diversification [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(6): 674-86.
- [32] GUO Y, PU W T. Cardiomyocyte maturation [J]. *Circ Res*, 2020, 126(8): 1086-106.
- [33] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [34] ANDERSEN P, TAMPKAKAKIS E, JIMENEZ D V, et al. Precardiac organoids form two heart fields via Bmp/Wnt signaling [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3140.
- [35] TRILLHAASE A, MAERTENS M, AHERRAHROU Z, et al. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) in vascular research: from two- to three-dimensional organoids [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 18: 1-13.

- [36] 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): 737-46.
- [37] HOFER M, LUTOLF M P. Engineering organoids [J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 19: 1-19.
- [38] GIACOMELLI E, MERAVIGLIA V, CAMPOSTRINI G, et al. Human-iPSC-derived cardiac stromal cells enhance maturation in 3D cardiac microtissues and reveal non-cardiomyocyte contributions to heart disease [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(6): 862-79.e11.
- [39] RICHARDS D J, LI Y, KERR C M, et al. Human cardiac organoids for the modelling of myocardial infarction and drug cardiotoxicity [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(4): 446-62.
- [40] ZHAO Y, RAFATIAN N, FERIC N T, et al. A platform for generation of chamber-specific cardiac tissues and disease modeling [J]. *Cell*, 2019, 176(4): 913-27.e18.
- [41] NUGRAHA B, BUONO M F, EMMERT M Y. Modelling human cardiac diseases with 3D organoid [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(48): 4234-7.
- [42] HULOT J S. Modeling cardiac arrhythmias with organoids [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(18): 2325-7.
- [43] LIU C, OIKONOMOPOULOS A, SAYED N, et al. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond [J]. *Development*, 2018, 145(5): dev156166.
- [44] VOGES H K, MILLS R J, ELLIOTT D A, et al. Development of a human cardiac organoid injury model reveals innate regenerative potential [J]. *Development*, 2017, 144(6): 1118-27.
- [45] RICHARDS D J, LI Y. Human cardiac organoids for the modeling of myocardial infarction and drug cardiotoxicity [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(4): 446-62.
- [46] FORTE E, FURTADO M B, ROSENTHAL N. The interstitium in cardiac repair: role of the immune-stromal cell interplay [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(10): 601-16.
- [47] TIBURCY M, HUDSON J E, BALFANZ P, et al. Defined engineered human myocardium with advanced maturation for applications in heart failure modeling and repair [J]. *Circulation*, 2017, 135(19): 1832-47.
- [48] YANG K C, BREITBART A, DE LANGE W J, 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(6): 728-40.
- [49] ZHANG Y, SASTRE D, WANG F. CRISPR/Cas9 genome editing: a promising tool for therapeutic applications of induced pluripotent stem cells [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(4): 243-51.
- [50] DRIEHUIS E, CLEVERS H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(3): G257-65.
- [51] LONG C, LI H. Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(1): eaap9004.
- [52] 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(18): 2310-24.
- [53] 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.
- [54] NOOR N, SHAPIRA A, EDRI R, et al. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(11): 1900344.
- [55] LEE A, HUDSON A R. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart [J]. *Science*, 2019, 365(6452): 482-7.
- [56] FATKIN D, HUTTNER I G, KOVACIC J C, et al. Precision medicine in the management of dilated cardiomyopathy: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(23): 2921-38.
- [57] JODAT Y A, KANG M G, KIAEE K, et al. Human-derived organ-on-a-chip for personalized drug development [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(45): 5471-86.
- [58] MIRANDA C C, FERNANDES T G, DIOGO M M, et al. Towards multi-organoid systems for drug screening applications [J]. *Bioengineering*, 2018, 5(3): 49.
- [59] 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(3): 571-81.
- [60] 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(2): 025017.
- [61] CAKIR B, XIANG Y, TANAKA Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(11): 1169-75.