

## 基于心脏类器官场电位检测方法的建立以及美西律对场电位的作用研究

杨淑雯<sup>1,2</sup>, 曾芸茜<sup>1,2</sup>, 滕伊洋<sup>1,2</sup>, 赵琪<sup>1,2</sup>, 杨浩<sup>1,2</sup>, 侯敏博<sup>1,2</sup>, 汪溪洁<sup>1,2\*</sup>

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:** **目的** 建立一种基于心脏类器官模型的场电位测定方法, 用于临床前药源性心脏毒性评价。**方法** 自组织法体外构建人诱导多能干细胞 (hiPSC) 的心脏类器官模型, 显微镜下观察形态, 培养至第 18 天 (D18) 免疫荧光法检测成纤维细胞标志物波形蛋白 (VIM)、内皮细胞标志物 (CD31)、心肌细胞标志物肌钙蛋白 T (cTnT) 的表达; 选用钾通道阻滞剂 E-4031 作为阳性药评估方法的有效性, 待心脏类器官状态稳定 (D18 ≤ 培养时间 ≤ D30)、选取信号强度稳定且持续时间超过 3 d 的类器官分为对照组 (不加药)、E-4031 (0.5 μmol·L<sup>-1</sup>) 组, 加药前 1 h 进行培养基更换, 加药后使用微电极阵列技术对场电位进行检测, 记录波形和电生理参数; 应用建立的模型对美西律 (3、10、30 μmol·L<sup>-1</sup>) 潜在的心律失常风险进行评估。**结果** 自 D1 起, hiPSC 浓缩聚集呈球状, 形成拟胚体, 随着诱导分化时间延长, 细胞球直径逐渐增加, 球体边缘逐渐清晰; D8, 球体产生自发性跳动; D18, 心脏类器官状态稳定, 细胞球体直径大小趋于稳定, 直径为 (1 499.03 ± 101.60) μm, 形状规则, 边缘光滑清晰, 搏动频率规律, 可达 (33.39 ± 8.14) 次·min<sup>-1</sup>。VIM、CD31、cTnT 在心脏类器官内高度表达, 到达预期成熟特征。与对照组相比, 加入 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 的 E-4031 1 h 时, T 波明显延长; 1 h 起场电位持续时间 (FPD) 变化率显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), 校正场电位持续时间 (FPDc) 的变化率显著升高 ( $P < 0.05$ ); 搏动周期增加, 3 h 时达到较高幅度, 尖峰振幅的变化率呈现出下降趋势, 但差异均不显著。类器官暴露于 3、10 μmol·L<sup>-1</sup> 美西律后, 与对照组相比 T 波均无明显位移, 当美西律浓度达 30 μmol·L<sup>-1</sup> 时无场电位信号。与对照组相比, 3 h 时 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的美西律组 FPDc 变化率显著增加 ( $P < 0.05$ ); 搏动周期变化率在美西律浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup> 时存在明显变化, 3 h 时达到较高幅度, 存在显著性差异 ( $P < 0.001$ ); 3 μmol·L<sup>-1</sup> 的美西律组尖峰振幅的变化率表现出明显的下降趋势, 5 h 时存在显著性降低 ( $P < 0.05$ ), 当美西律浓度达到 10 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 尖峰振幅的变化率愈加明显, 1、3、5 h 时呈现显著性下降 ( $P < 0.05$ )。**结论** 建立的心脏类器官的场电位检测方法可以用于评估药物引起的心脏毒性, 可在药物研发早期提供较为准确的数据支持。

**关键词:** 心脏毒性; 心脏类器官; 场电位; 微电极阵列; 人诱导多能干细胞; 美西律

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)08-2099-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.08.004

## Establishment of detection method based on field potential of cardiac organoids and researching effects of mexiletine on field potentials

YANG Shuwen<sup>1,2</sup>, ZENG Yunqian<sup>1,2</sup>, TENG Yiyang<sup>1,2</sup>, ZHAO Qi<sup>1,2</sup>, YANG Hao<sup>1,2</sup>, HOU Minbo<sup>1,2</sup>, WANG Xijie<sup>1,2</sup>

1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China

2. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** A field potential measurement method based on a heart organoid model was established for preclinical drug-induced cardiotoxicity evaluation. **Methods** Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) were used to construct a heart organoid model in vitro by self-organization. The morphology was observed under a microscope. On day 18 (D18) of culture, the expression of fibroblast marker vimentin (VIM), endothelial cell marker CD31, and cardiomyocyte marker cardiac troponin T (cTnT) was detected by immunofluorescence. Potassium channel blocker E-4031 was used as a positive drug to evaluate the effectiveness of the method. When the heart organoids were in a stable state (D18 ≤ culture time ≤ D30), organoids with stable signal intensity and duration over three days were divided into a control group (without drug) and an E-4031 (0.5 μmol·L<sup>-1</sup>) group. The culture medium was changed

收稿日期: 2025-03-19

基金项目: 国家发改委支持先进制造业和现代服务业发展专项

作者简介: 杨淑雯 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物心脏毒性。E-mail: swyang@innostar.cn

\*通信作者: 汪溪洁 (1978—), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事药物心脏毒性和神经毒性研究。E-mail: xjwang@innostar.cn

1 h before drug administration. Field potentials were detected using microelectrode array technology after drug administration, and waveforms and electrophysiological parameters were recorded. The potential arrhythmogenic risk of mexiletine (3, 10, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was evaluated using the established model. **Results** From D1, hiPSCs condensed and aggregated into spherical structures, forming embryoid bodies. As the induction differentiation time increased, the diameter of the cell spheres gradually increased, and the edges of the spheres became clearer. On D8, the spheres began to beat spontaneously. On D18, the heart organoids were in a stable state, the diameter of the cell spheres tended to be stable, with a diameter of  $(1\,499.03 \pm 101.60)\ \mu\text{m}$ , regular shape, smooth and clear edges, and regular beating frequency, reaching  $(33.39 \pm 8.14)\ \text{beats}\cdot\text{min}^{-1}$ . VIM, CD31, and cTnT were highly expressed in the heart organoids, reaching the expected mature characteristics. Compared with the control group, when  $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  E-4031 was added for 1 h, the T wave was significantly prolonged; the field potential duration (FPD) change rate significantly increased from 1 h ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the corrected field potential duration (FPDc) change rate significantly increased ( $P < 0.05$ ); the beating period increased, reaching a higher amplitude at three hours, and the peak amplitude change rate showed a downward trend, but the differences were not significant. After exposure to 3 and  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  mexiletine, there was no significant displacement of the T wave compared with the control group. When the mexiletine concentration reached  $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , there was no field potential signal. Compared with the control group, the FPDc change rate in the  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  mexiletine group significantly increased at 3 h ( $P < 0.05$ ); the beating period change rate showed a significant change at a mexiletine concentration of  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , reaching a higher amplitude at 3 h, with a significant difference ( $P < 0.001$ ); the peak amplitude change rate in the  $3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  mexiletine group showed a significant downward trend, with a significant decrease at five hours ( $P < 0.05$ ). When the mexiletine concentration reached  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the peak amplitude change rate became more obvious, showing significant decreases at 1, 3, and 5 h ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The field potential detection method of heart organoids can be used to evaluate drug-induced cardiotoxicity and provide relatively accurate data support in the early stage of drug development.

**Key words:** cardiotoxicity; cardiac organoid; field potential; multi electrode array; human induced pluripotent stem cells; mexiletine

药物在临床阶段引发心脏毒性是药物上市后被迫撤市的主要原因。1990—2006 年, 38 种获批药物由于存在潜在的心律失常风险而撤市<sup>[1]</sup>。药物诱导的长 QT 间期综合征是由心肌细胞动作电位改变引起的, 与抑制人类乙醚相关基因 (hERG) 编码的延迟整流钾通道 (IKr) 引起的复极化延长有关, 伴有致死性的心律失常, 例如尖端扭转型室性心动过速 (TdP), 临床表现为可观察到心电图 QRS 波振幅和极性呈现周期性扭转样改变<sup>[2]</sup>。2022 年, 国际人用药品注册协调会 (ICH) 发布的有关指导原则 S7B/E14 Q&A 中明确提出体外 IKr/hERG 试验结果受到多种因素的影响, 包括: 记录温度、电压协议、刺激率、试验过程汇总的药物损失和数据质量等, 存在假阴性/假阳性结果, 可使用人诱导多能干细胞 (hiPSC) 的复合制剂, 例如类器官等, 检测药物对体外场电位的影响, 评估药物对人体心脏离子电流的影响<sup>[3]</sup>, 给临床研发提供更多数据。

体外 IKr/hERG 试验常用于药物早期筛选和心脏毒性评估, 但该试验方法基于 HEK293 细胞的二维细胞模型, 仅能转染单一离子通道, 缺乏心脏生理的相关性, 无法模拟人体内的心脏微环境<sup>[4]</sup>。三维心脏类器官的形成和发展弥补了二维细胞模型的不足, 心脏类器官是一种通过体外培养拟胚体进

行分化得到的、可进行自主收缩的三维细胞结构, 能够最大程度地在体外重现人体内心脏结构组织, 包含主要心脏细胞类型, 例如: 成纤维细胞、内皮细胞、心肌细胞等, 存在可提供机械支持且对信号传导至关重要的细胞外基质 (ECM)<sup>[5]</sup>, 能够准确反映心脏的生理表型和药物反应, 更加真实地模拟人体内心脏电生理的复杂性<sup>[6]</sup>。

微电极阵列 (MEA) 技术是一种用于检测神经元培养物或心脏细胞、组织电生理活性的方法<sup>[7]</sup>, 可记录单层细胞或者小型心脏组织产生的电波形信号, 得到的细胞场电位 (FP) 与心脏动作电位相关, 并且在某种程度上与心电图 (ECG) 相关<sup>[8]</sup>。MEA 的主要优势是在高通量条件下, 以非侵入性的方法对细胞或组织进行电生理检测, 相比体外 hERG 实验, 提高了心脏毒性检测的准确性和灵敏性, 且由于可重复、长期、实时进行检测, 并通过数据分析用来检测心肌细胞的功能改变, 因此可用于研究药物的慢性心脏毒性, 可深入了解药物诱导心脏毒性的不同机制<sup>[9]</sup>, 在筛选药物心脏毒性阶段具有显著优势。

目前, 美西律在临床上常作为非营养不良性肌强直患者的一线治疗药物, 用于减轻患者的慢性神经性疼痛<sup>[10]</sup>。相关研究显示, 该药物在临床阶段的

心脏毒性主要表现为窦性心动过缓、心力衰竭和心源性胸痛<sup>[11]</sup>。临床数据显示,口服美西律后,人体内的血浆浓度在 2~4 h 内达到峰值,最大血浆浓度( $C_{\max}$ )为  $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[12]</sup>,但临床前体外 hERG 试验所得美西律对 hERG 钾通道的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为  $104.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[13]</sup>,  $\text{IC}_{50}/C_{\max}=41.88$ ,采用体外 hERG 数据无法准确预测心脏毒性,且灵敏度低。本研究拟选用美西律作为目标药物,通过 MEA 技术检测心脏类器官的场电位,记录电生理参数,分析数据结果,以期寻找一种在非临床阶段更为灵敏、准确的非临床心脏毒性检测方法,为后续体外心脏评估提供多种选择。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人诱导多能干细胞(hiPSC)购自北京赛贝生物技术有限公司。

### 1.2 药品及主要试剂

E-4031 (批号 14620, 每管  $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\times 1 \text{mL}$ ) 购自美国 MCE 公司;盐酸美西律(批号 BCCB6374, 规格 25 g) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

Human iPSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Kit (货号 RIPO-HWM004) 购自 ACRO Biosystems 公司;基质胶(货号 354277)、超低吸附 U 型 96 孔板(货号 7007) 购自美国 Corning 公司; mTeSR™ Plus 培养基(货号 100-0276)、Y-27632 (二盐酸化物, 货号 72304)、温和细胞解离试剂(GCDR, 货号 100-0485) 均购自加拿大 STEMCELL Technologies 公司;杜氏磷酸盐缓冲液(D-PBS, 货号 14190136)、DMEM/F-12 培养基(货号 11330032) 购自美国 Gibco 公司;重组肌钙蛋白 T (cTnT) 抗体(EPR3695, 货号 ab91605) 购自英国 Abcam 公司;CD31 (货号 89C2) Mouse mAb (货号 3528S)、波形蛋白(VIM, 货号 D21H3) XP® Rabbit mAb (货号 5741T) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;抗荧光淬灭封片液(货号 G1401-25ML) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司, DAPI (货号 D1306) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;牛血清白蛋白(BSA, 货号 A1933)、Triton™ X-100 溶液(货号 93443) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;CytoView MEA 24 孔板(货号 M384-tMEA-24W) 购自美国 Axion Biosystems 公司。

### 1.3 主要仪器

IX71 倒置显微镜、CKX53 荧光显微镜均购自

日本 Olympus 公司;371 型二氧化碳培养箱、ST16R 式离心机均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;BSC-1600II A2 生物安全柜购自苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;EG-1150H 生物组织包埋机、RM2235 生物组织石蜡切片机均购自德国 Leica 公司;VIP6-E2 生物组织脱水机购自日本樱花检验仪器株式会社;Maestro Edge™ 多孔微电极阵列系统购自美国 Axion Biosystems 公司。

## 2 方法

### 2.1 心脏类器官模型的构建与鉴定

基质胶在  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下解冻,按 1:100 比例与 DMEM/F12 培养基进行稀释,6 孔板铺板包被,用于 hiPSC 细胞的复苏。细胞转移至 6 孔板后,加入 3 mL 的 mTeSR Plus 培养基(含  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Y-27632),培养条件为  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ,每天换液,直至融合度达到 80%~90%,进行传代。传代时,弃上清液,使用 D-PBS 溶液进行细胞清洗,弃上清后加入 1 mL GCDR,在  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 6 min,当显微镜下可观察到大部分细胞脱落,每孔加入 1 mL mTeSR Plus 培养基,移液枪轻轻吹打混匀细胞,以 1:20 的比例将细胞加入准备好的 6 孔板中,轻微晃动以保证细胞分布均匀。

当细胞融合度达到 80%~90%时,消化 hiPSC 细胞并分化为胚样体。从培养箱中取出待消化细胞,弃上清,加入 1 mL D-PBS 多次清洗细胞,每孔加入 1 mL GCDR,在  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 6 min,待显微镜下可观察到细胞团出现间隙时,加入 mTeSR Plus 培养基终止消化,重悬浑浊,形成单细胞悬液,按照每孔 7 500 个细胞数进行接种,接种当天记为 D0,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h。使用 Human iPSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Kit,加入含有生长因子和信号通路抑制剂的诱导分化液对拟胚体进行诱导分化,置于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h,形成拟胚体,记为 D1。自 D1 起,hiPSC 浓缩聚集形成细胞球,细胞球体积随诱导分化时间的延长而逐渐增大。

培养至第 18 天(D18),心脏类器官边缘平滑,搏动规律,进行免疫荧光染色。使用 PBS 清洗细胞后,加入 4% 的 PFA 进行固定,完成固定后的玻片置于  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  的烘箱 1.5 h,透化处理,加入封闭液,室温封闭 30~60 min,将玻片置于摇床进行抗体孵育( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、避光进行),使用 DAPI 染色液染色,待玻片干燥后滴加封片抗荧光淬灭剂,最后封片,在

荧光显微镜上观察拍照。

## 2.2 心脏类器官场电位检测方法的建立

使用 Human iPSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Kit 分化获得心脏类器官, 可观察心脏类器官产生自发性搏动时, 转移至 CytoView MEA 24 孔板。在 CytoView MEA 24 孔板的每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  DMEM/F12 培养基 (含 1% 基质胶), 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养至少 2 h, 吸弃多余培养基, 使用无菌巴氏吸管将心脏类器官转移至 CytoView MEA 24 孔板的中心检测区域, 在每个心脏类器官表面轻柔覆盖 15~20  $\mu\text{L}$  基质胶, 平稳转移 CytoView MEA 24 孔板至 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中 15~30 min, 缓缓加入 100  $\mu\text{L}$  DMEM/F12 培养基 (含 1% 基质胶), 过夜培养, 24 h 下在显微镜下观察类器官状态, 确认心脏类器官充分黏附后, 补加 100  $\mu\text{L}$  DMEM/F12 培养基 (含 1% 基质胶), 后续每 2 天进行换液, 且持续不断地通过 AxIS Navigator 软件进行场电位信号的检测和采集。提前进行 E-4031 储备液配制, 制备 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 E-4031 工作液。待心脏类器官状态稳定 ( $\text{D}18 \leq \text{培养时间} \leq \text{D}30$ ), 选取信号强度稳定且持续时间超过 3 d 的类器官进行给药,  $n \geq 3$ , 加药前 1 h 进行培养基更换, 分为对照组 (不加药)、E-4031 (0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组。完成加药后即刻将 CytoView MEA 24 孔板放入仪器, 开始进行检测, 分别在给药前及给药后 1、3、5 h 进行记录, 每次记录 2 min。

## 2.3 美西律对场电位的作用研究

美西律储备液配制: 将美西律溶解在相应培养基中, 配制储备液, 并加入适量 2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液调节 pH 值至 7.2~7.4, 进行分装, 保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱进行备用, 可复融 1 次, 通过逐级梯度稀释, 制备 3、10、30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的美西律工作液。

按照“2.2”项方法选取类器官并给药, 分为对照组 (培养基) 和美西律 (3、10、30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组, 完成加药后即刻将 CytoView MEA 24 孔板放入仪器, 开始进行检测, 分别在给药前及给药后 1、3、5 h 进行记录, 每次记录 2 min。

## 2.4 数据及统计分析

使用 Cardiac Analysis Tool、CardioExcyte 96 加载原始数据, 相应电生理参数的 csv 文件 (包含加药前和加药后不同时间点的数据), 计算加药后相对加药前的变化百分率, 然后使用 GraphPad Prism10.1.2 根据实际数据情况选择统计方法并作图。

对不同分组、不同时间点的参数进行比较时: 若不同分组样本数不一致或存在缺失值, 使用混合效应模型分析, 并使用 Sidak 方法进行多重比较校正; 若不同分组样本数一致且不存在缺失值, 使用重复测量方差分析 (repeated measures ANOVA), 并使用 Sidak 方法进行多重比较校正。如样本参数存在某些时间点的缺失值的, 当同一参数只有一个缺失值时, 该参数数据仍纳入统计分析; 当同一参数有多个缺失值时, 该参数数据不再纳入统计分析。

对不同分组、同一时间点的参数进行比较时: 若分组数大于 2, 使用单因素方差分析, 并使用 Dunnett 方法进行多重比较校正; 若分组数等于 2, 使用  $t$  检验分析。

## 3 结果

### 3.1 心脏类器官模型的构建与鉴定

自 D1 起, hiPSC 浓缩聚集呈球状, 形成拟胚体, 随着诱导分化时间增加, 细胞球直径逐渐增加, 球体边缘逐渐清晰。D8, 球体产生自发性跳动。D18, 心脏类器官状态稳定, 细胞球体直径大小趋于稳定, 直径为 ( $1\,499.03 \pm 101.60$ )  $\mu\text{m}$ , 形状规则, 边缘光滑清晰, 见图 1, 搏动频率规律, 可达 ( $33.39 \pm 8.14$ ) 次 $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

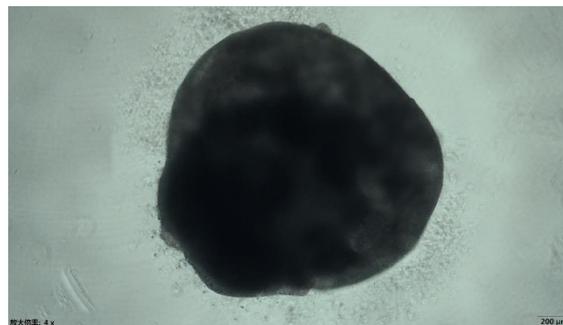
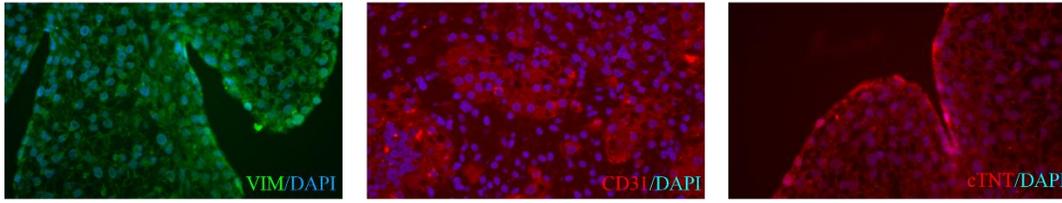


图 1 心脏类器官在培养第 18 天的形态 ( $\times 4$ )

Fig. 1 Morphology of cardiac organoids on day 18th of culture ( $\times 4$ )

通过免疫荧光成像技术, 可视化类器官心脏谱系细胞的分布, 评估 D18 的心脏类器官是否能够模仿人类心脏多种细胞的组成。免疫荧光染色结果如图 2 所示, 细胞核均用 DAPI 复染为蓝色, 成纤维细胞标志物 (VIM)、内皮细胞标志物 (CD31) 染色分别呈现绿色、红色, 成纤维细胞和内皮细胞在心脏类器官内分布均匀广泛, 心肌细胞标志物 (cTnT) 染色为红色, 呈阳性, 外侧细胞排列较为紧密。VIM、CD31、cTnT 在心脏类器官内高度表达, 到达预期成熟特征, 能够一定程度上对心脏的血管

图 2 培养第 18 天心脏类器官的免疫荧光 ( $\times 10$ )Fig. 2 Immunofluorescence in cardiac organoids at D18 ( $\times 10$ )

细胞进行模拟<sup>[14]</sup>。

### 3.2 心脏类器官场电位检测方法的建立

选择 E-4031 作为阳性药,能够高选择性地抑制心肌细胞中的快速  $IK_r$  电流,即具有 hERG 通道的阻断特性,这种阻断特性会延缓动作电位复极化的过程,导致 QT 间期延长,且 E-4031 对其他离子通道的亲和力较低。在暴露于浓度为  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 E-4031 后,对心脏类器官的场电位进行持续检测,选择给药前和给药后 1、3、5 h 共计 4 个时间点进行数据统计。E-4031 对场电位波形的影响结果

如图 3 所示,与对照组相比,加入  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 E-4031 的 1 h 时, T 波明显延长。E-4031 对心脏类器官电生理参数的影响结果如图 4 所示,1 h 起,场电位持续时间 (FPD) 明显增加, FPD 变化率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),校正场电位持续时间 (FPDc) 明显增加,在 1、3、5 h 时 FPDc 的变化率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 搏动周期存在明显增加,3 h 时达到较高幅度,但与对照组比较并无显著性差异; 尖峰振幅的变化率呈现出下降趋势,但与对照组比较并无显著性差异。

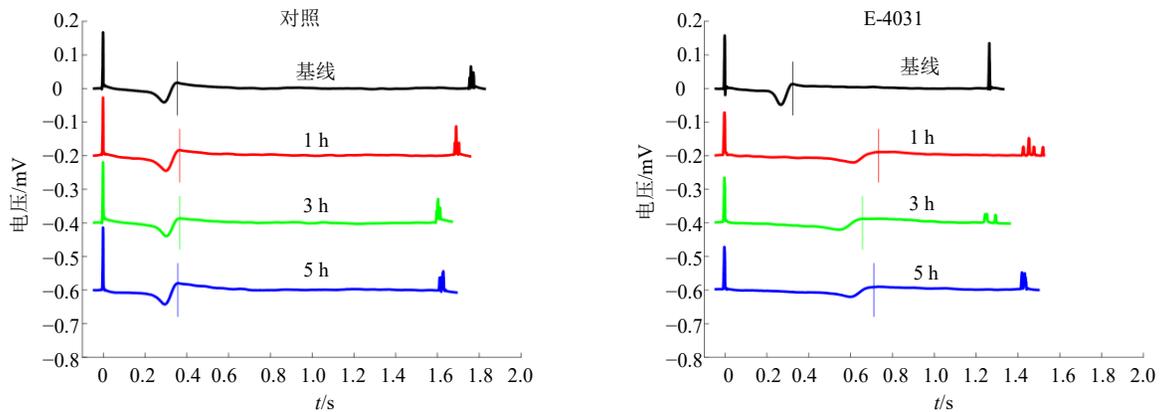
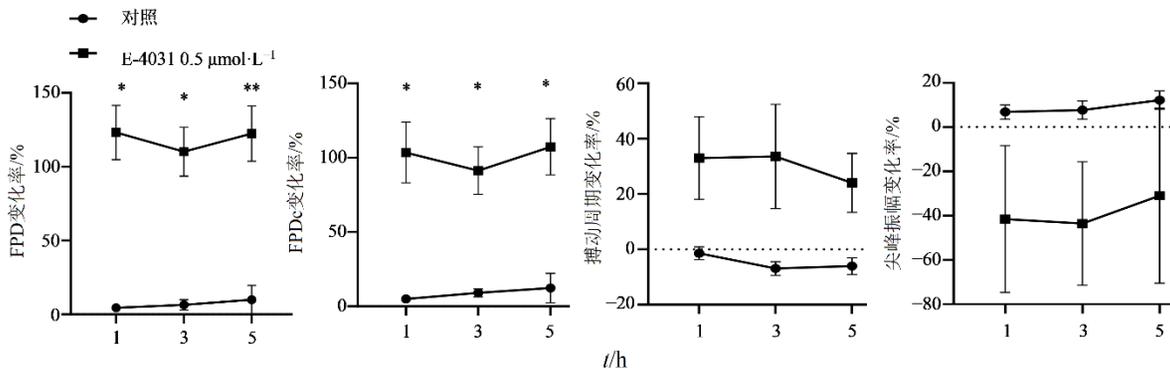


图 3 MEA 记录的心脏类器官的场电位波形图

Fig. 3 Field potential waveform of cardiac organoids recorded by MEA



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图 4 E-4031 对心脏类器官场电位电生理参数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )Fig. 4 Effects of E-4031 on electrophysiological parameters of cardiac organoid field potentials ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

### 3.3 美西律对场电位的作用研究

美西律是非营养不良性肌强直患者的一线治疗药物，具有潜在的心律失常风险。美西律对心脏类器官场电位波形的影响结果如图 5 所示，暴露于 3、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  美西律后，在 5 h 的记录期间内，与对照组相比，T 波均无明显位移，当美西律浓度到达 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，药物处理类器官后，该组类器官均无场电位信号。美西律对心脏类器官电生理参数的影响结果如图 6 所示，加入 3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的美西律后，与对照组相比，FPD、FPDc 的变化率在 5 h 的记录期间虽有波动，但并未观察到明显差异；加入 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的美西律后，FPD 的变化率在 5 h 的记

录期间虽增加，但无显著差异，FPDc 的变化率在 1、3、5 h 内有差异，3 h 时 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的美西律对 FPDc 变化率作用显著 ( $P < 0.05$ )；搏动周期变化率在美西律浓度为 3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时无明显差异，在美西律浓度为 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时存在明显变化，3 h 时达到较高幅度，存在显著性差异 ( $P < 0.001$ )；3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的美西律组与对照组相比，尖峰振幅的变化率表现出明显的下降趋势，5 h 时存在显著性降低 ( $P < 0.05$ )，当美西律浓度达到 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时，尖峰振幅的变化率愈加明显，1、3、5 h 时，呈现显著性下降 ( $P < 0.05$ )，提示美西律对心脏类器官场电位的尖峰振幅变化率影响存在剂量相关性。

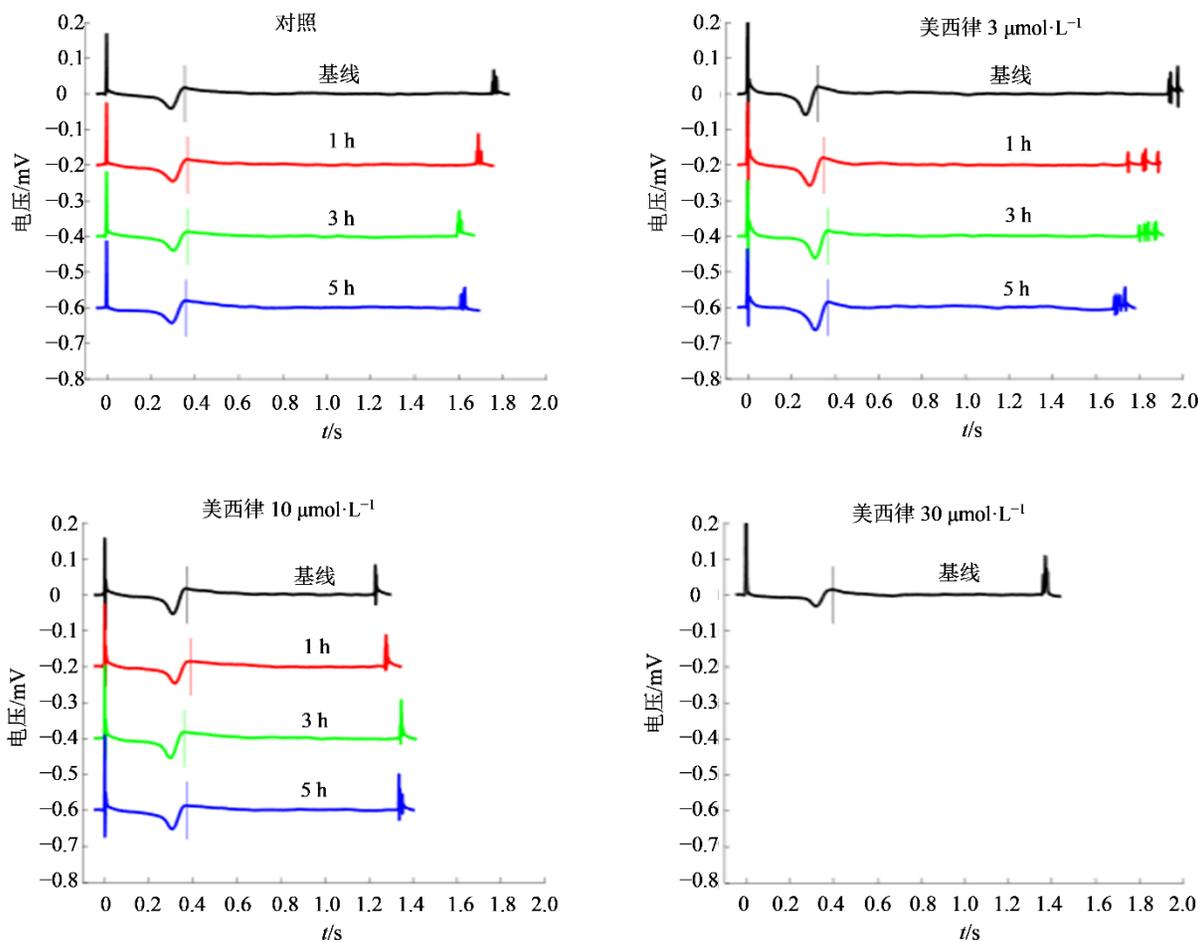


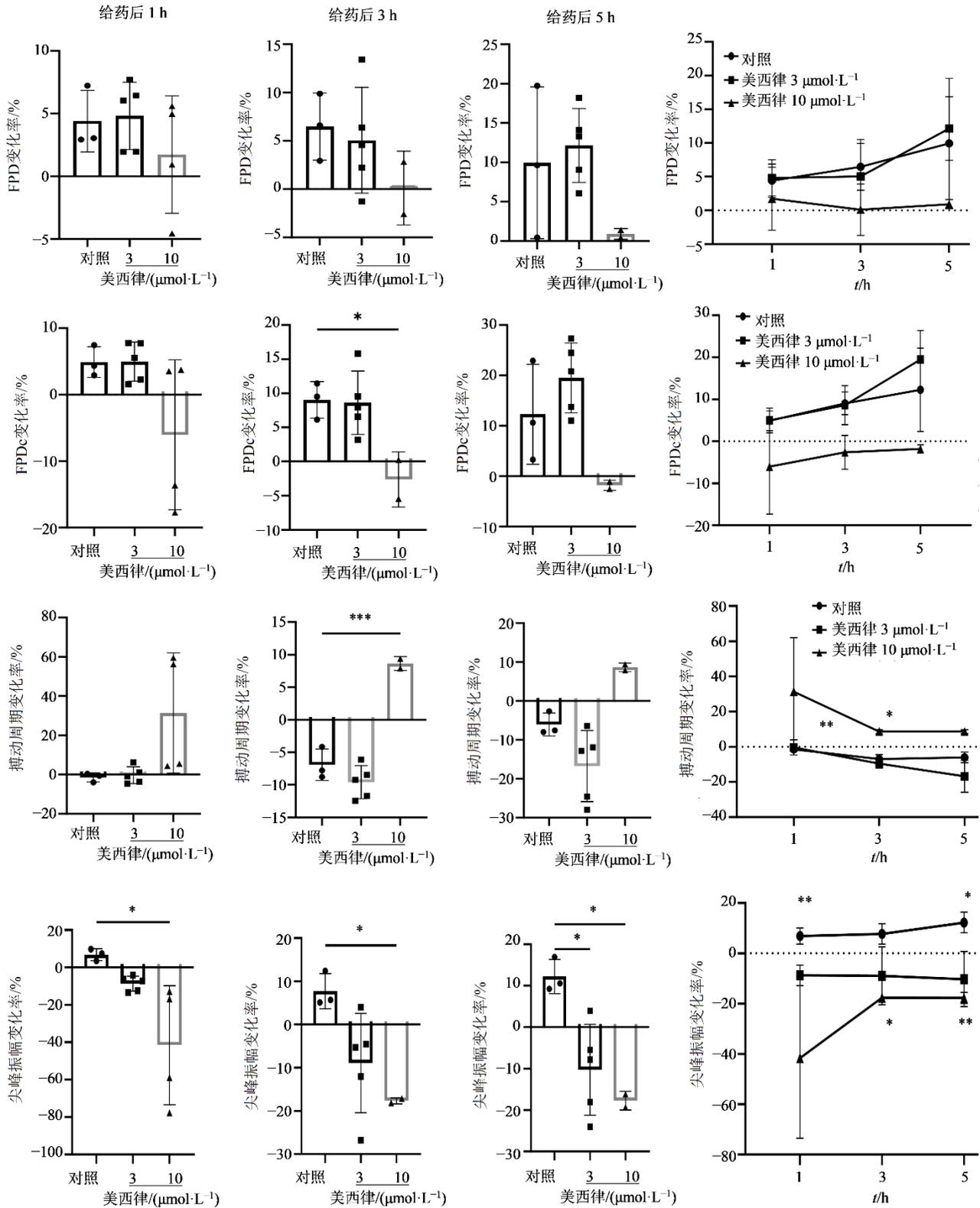
图 5 MEA 记录的心脏类器官的场电位波形图

Fig. 5 Field potential waveforms of cardiac organoids recorded by MEA

### 4 讨论

人类心脏是一个复杂的器官，在进行体外模拟时极具挑战性。心脏类器官是通过诱导 hiPSC 在体外自组织形成的三维细胞结构，是可应用于心脏发育生物学、心脏疾病模型建立、心脏药物筛选的有效工具<sup>[14]</sup>。心脏内部环境复杂，相应细胞会受到多

种信号因子相互作用的影响，用以维持和调节细胞表型和特定功能。诱导 hiPSC 衍生的心肌细胞由于缺乏内源性细胞外基质 (ECM) 和非心肌细胞的心脏细胞类型、生理形态和细胞组织，无法概括体内正常的细胞原始形态和层级结构，影响细胞间和细胞外的信号转导和相互作用<sup>[15]</sup>，且基于二维培养环



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 6 美西律对心脏类器官场电位 FPD、FPDc、搏动周期、尖峰振幅的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 6 Effects of mexiletine on FPD, FPDc, beat period, and spike amplitude of cardiac organoids ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

境, 导致细胞逐渐失去细胞形态、异常分裂导致影响细胞分化表型, 无法模拟心脏组织中存在的细胞功能和行为<sup>[5]</sup>。Volmert 等<sup>[16]</sup>通过 Wnt 途径调节, 将 hiPSC 胚状体进行分化, 得到心脏类器官, 通过电子纤维图像技术可观察到发育良好的肌原纤维和肌节结构, 通过 qRT-PCR 技术揭示了心肌细胞的标志性标记基因的表达, 通过 scRNA-scq 技术确定了心脏类器官中存在心室和心房心肌细胞 (分别为 VCMs 和 ACMs)、瓣膜细胞 (VCs)、心外膜衍生细胞 (PEDCs)、心外膜细胞 (ECs)、基质细胞 (SCs)、心脏祖细胞 (CPCs)、电导细胞 (CCs) 和内皮细胞 (EC), 通过对类器官中发现的关键基因进行细胞间通讯网络的计算分析, 证实了心脏类器官内存在的受体-配体通讯途径, 且通过免疫荧光技术可观察到心脏类器官的电生理成熟。心脏类器官具有人类心脏类器官相似的细胞类型, 且具有的高度细胞复杂性驱动了心脏内自组织和细胞间通讯, 为研究心脏毒性、药物筛选、心脏疾病提供了一种可能的体外模型。

本研究基于课题组的前期探索研究, 选用自组织法, 不断优化试验方法, 构建可用于后续心脏毒性检测的心脏类器官。为确定心脏类器官的成熟, 培养至第 18 天时采集心脏类器官进行免疫荧光染色, 结果显示成纤维细胞标志物 VIM、内皮细胞标志物 CD31、心肌细胞标志物 cTnT 高度表达, 与文献报道基本相同, 表明本研究已成功建立心脏类器官模型, 可用于进一步研究。心脏类器官模型被用于基于 MEA 技术的功能性电生理检测, 选取 E-4031 作为阳性药, 通过持续检测其场电位变化, 得到 FPD、FPDc、搏动周期、尖峰振幅 4 个电生理参数, 在浓度  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  观察到明显的电生理毒性, T 波明显延长, FPD/FPDc 变化率显著, 搏动周期变化明显, 在 3 h 时幅度较大, 尖峰振幅呈现轻微下降趋势。E-4031 是一种 hERG 通道阻断剂, 通过与开放状态的 hERG 通道进行结合, 抑制 hERG 通道, 导致  $\text{K}^+$  外流受阻, 导致心肌细胞的动作电位时程延长, 引发心脏毒性, 根据文献报道<sup>[17-19]</sup>, E-4031 作用于心肌细胞后进行场电位的记录并数据分析, 延长 FPD 和搏动周期, 抑制尖峰振幅, 变化趋势与本研究结果基本一致, 达到预期 E-4031 的药物效果, 表示本研究建立的基于心脏类器官的场电位检测方法可用于潜在心脏毒性药物的场电位研究。实验过程中需注意: ①心脏类器官转移过程中, 需保证

CytoView MEA 24 孔板处于微微湿润的状态; ②心脏类器官需确保轻柔转移至 CytoView MEA 24 孔板的中心检测区域; ③药物处理前 1 h 进行换液, 换液完成后密切关注类器官信号状态, 确保信号强度稳定。

美西律在临床上被用于治疗先天性肌强直病和强直性肌营养不良, 可减少肌强直现象, 也可用作慢性疼痛缓解药物<sup>[10]</sup>, 常见的不良反应表现为窦性心动过缓、心力衰竭和心源性胸痛<sup>[11]</sup>。临床前传统的体外 hERG 实验数据显示: 美西律抑制 hERG 钾离子通道, 并呈现浓度相关性, 半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $104.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[13]</sup>, 但临床数据显示, 口服美西律后, 人体内的血浆浓度在 2~4 h 内达到峰值,  $C_{\text{max}}$  为  $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[12]</sup>, 两者相差 40 倍, 体外 hERG 数据已无法满足临床前的心脏毒性评估需求。本研究基于心脏类器官的场电位检测方法, 检测美西律对场电位的影响作用, 记录电生理参数, 分析数据结果, 对美西律的心脏毒性进行评估。当暴露浓度达到  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 药物对心脏类器官电生理参数的影响较小, 在较高浓度下 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对心脏类器官电生理特性存在一定的影响, 表现出一定的剂量反应关系。在高浓度条件下 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 3 h 的观测窗口内, 可以观察到 FPDc 的降低、搏动周期的延长以及尖峰振幅的显著降低 ( $P < 0.05$ )。证明在高浓度的条件下随着孵育时长的增加, 美西律具有引起心脏类器官毒性的潜力提升, 场电位尖峰振幅降低, 表示心肌细胞的收缩能力受到损伤。美西律通过与钠通道的失活状态进行结合, 导致  $\text{Na}^+$  快速内流, 心肌细胞动作电位振幅降低, 复极化时间延长, 引发心脏毒性, 根据文献数据, 美西律作用于心肌细胞后对其场电位进行记录 and 数据分析, 搏动周期和尖峰振幅显著抑制, 与本研究结果趋势基本一致<sup>[19-21]</sup>。相关临床报告中, 美西律心脏毒性的具体表现为抑制心肌细胞兴奋, 降低兴奋传导, 减少动作电位的持续时间<sup>[22]</sup>, 与研究结果基本一致。当暴露时间为 5 h、暴露浓度为  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 对比对照组, 美西律对心脏类器官场电位的尖峰振幅表现出显著性抑制, 与临床  $C_{\text{max}}$  ( $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[12]</sup> 接近, 提示该模型可在临床  $C_{\text{max}}$  浓度区间范围预测到药物的心脏毒性。本研究以心脏类器官为模型, 对其场电位进行记录并数据分析, 对 E-4031 和美西律的心脏毒性进行较为准确的评估, 2 种药物基于不同的药理作用机制引发心脏毒性, 一定程度上说明了本

研究所构建的基于心脏类器官场电位检测方法的普适性。尽管当前心脏类器官的研究取得阶段性进展,但仍有待进一步完善。心脏类器官基于三维培养,一定程度上提升了心肌细胞的成熟度,但与人体内成熟的心肌细胞相比,仍表现出胎儿样特征,且由于缺乏巨噬细胞、T 细胞等免疫细胞以及血管平滑肌细胞,因此无法反应心脏疾病中的炎症反映和血管重塑,无法对成人心脏中血液流动或循环以及心肌纤维的精密排列进行重现,使得其功能和结构与成人心脏存在差异,无法完全模拟心脏疾病中的神经内分泌调节、全身炎症反应以及与其他器官的相互作用<sup>[23-27]</sup>。

本研究成功构建了基于心脏类器官的场电位检测方法,通过场电位的波形图和电生理参数,捕获不同浓度以及不同时间点下,药物对心脏类器官的毒性表现形式,解决二维细胞模型的离子通道单一性问题,充分考虑到 ECM 在心脏内信号传导的重要作用,探索研究药物的迟发性心脏毒性,提高早期药物筛选的准确性和灵敏度,为后续建立基于心脏类器官模型的体外心脏毒性评价方法提供了一种可能。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Stockbridge N, Morganroth J, Shah R R, et al. Dealing with global safety issues: Was the response to QT-liability of non-cardiac drugs well coordinated? [J]. *Drug Saf*, 2013, 36(3): 167-182.
- [2] Tisdale J E, Chung M K, Campbell K B, et al. Drug-induced arrhythmias: A scientific statement from the American heart association [J]. *Circulation*, 2020, 142(15): e214-e233.
- [3] ICH. S7B-E14 [S]. 2022.
- [4] Gibson J K, Yue Y M, Bronson J, et al. Human stem cell-derived cardiomyocytes detect drug-mediated changes in action potentials and ion currents [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2014, 70(3): 255-267.
- [5] Saraswathibhatla A, Indana D, Chaudhuri O. Cell-extracellular matrix mechanotransduction in 3D [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(7): 495-516.
- [6] Andrysiak K, Stepniewski J, Dulak J. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, 3D cardiac structures, and heart-on-a-chip as tools for drug research [J]. *Pflugers Arch*, 2021, 473(7): 1061-1085.
- [7] Stoppini L, Heuschkel M O, Loussert-Fonta C, et al. Versatile micro-electrode array to monitor human iPSC derived 3D neural tissues at air-liquid interface [J]. *Front Cell Neurosci*, 2024, 18: 1389580.
- [8] Sala L C, Ward-van Oostwaard D, Tertoolen L G J, et al. Electrophysiological analysis of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hPSC-CMs) using multi-electrode arrays (MEAs) [J]. *J Vis Exp*, 2017(123): 55587.
- [9] Altrocchi C, Van Ammel K, Steemans M, et al. Evaluation of chronic drug-induced electrophysiological and cytotoxic effects using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1229960.
- [10] Alhourani N, Wolfes J, Könemann H, et al. Relevance of mexiletine in the era of evolving antiarrhythmic therapy of ventricular arrhythmias [J]. *Clin Res Cardiol*, 2024, 113(6): 791-800.
- [11] van der Ree M H, van Dussen L, Rosenberg N, et al. Effectiveness and safety of mexiletine in patients at risk for (recurrent) ventricular arrhythmias: A systematic review [J]. *Europace*, 2022, 24(11): 1809-1823.
- [12] Crumb W J, Vicente J, Johannesen L, et al. An evaluation of 30 clinical drugs against the comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay (CiPA) proposed ion channel panel [J]. *J Pharmacol Toxicol Meth*, 2016, 81: 251-262.
- [13] Windley M J, Abi-Gerges N, Fermi B, et al. Measuring kinetics and potency of hERG block for CiPA [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2017, 87: 99-107.
- [14] Sahara M. Recent advances in generation of *in vitro* cardiac organoids [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6244.
- [15] Ingber D E. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine [J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(8): 467-491.
- [16] Volmert B, Kiselev A, Juhong A, et al. A patterned human primitive heart organoid model generated by pluripotent stem cell self-organization [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8245.
- [17] Guerrelli D, Pressman J, Salameh S, et al. hiPSC-CM electrophysiology: Impact of temporal changes and study parameters on experimental reproducibility [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2024, 327(1): H12-H27.
- [18] Yamamoto W, Asakura K, Ando H, et al. Electrophysiological characteristics of human iPSC-derived cardiomyocytes for the assessment of drug-induced proarrhythmic potential [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167348.
- [19] Park N K, Park Y G, Choi J H, et al. Human induced pluripotent stem cell-cardiomyocytes for cardiotoxicity assessment: A comparative study of arrhythmia-inducing

- drugs with multi-electrode array analysis [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2025, 29(2): 257-269.
- [20] Nozaki Y, Honda Y, Watanabe H, et al. CSAHi study-2: Validation of multi-electrode array systems (MEA60/2100) for prediction of drug-induced proarrhythmia using human iPS cell-derived cardiomyocytes: Assessment of reference compounds and comparison with non-clinical studies and clinical information [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2017, 88: 238-251.
- [21] Bai S Y, Pei J J, Chen K, et al. Assessment of drug proarrhythmic potential in electrically paced human induced pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes using multielectrode array [J]. SLAS Discov, 2021, 26(3): 364-372.
- [22] Akhtar M. Practical considerations in the treatment of ventricular arrhythmias with mexiletine [J]. Am Heart J, 1984, 107(5): 1086-1090.
- [23] Augustyniak J, Bertero A, Coccini T, et al. Organoids are promising tools for species-specific *in vitro* toxicological studies [J]. J Appl Toxicol, 2019, 39(12): 1610-1622.
- [24] Song M, Choi D B, Im J S, 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.
- [25] Suryawanshi H, Clancy R, Morozov P, et al. Cell atlas of the foetal human heart and implications for autoimmune-mediated congenital heart block [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(8): 1446-1457.
- [26] Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, et al. Cardiomyocyte maturation: Advances in knowledge and implications for regenerative medicine [J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(6): 341-359.
- [27] Zhao X L, Xu Z L, Xiao L, et al. Review on the vascularization of organoids and organoids-on-a-Chip [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 637048.

[责任编辑 兰新新]