

# 基于先进生物材料的心肌细胞 力 – 电微环境体外构建

徐 峰<sup>1,2</sup>, 张晓慧<sup>1,2,†</sup>, 鲍雪娇<sup>1,2</sup>, 赵国旭<sup>1,2</sup>, 刘付生<sup>2,3</sup>,  
黄国友<sup>1,2</sup>, 李昱辉<sup>1,2</sup>, 卢天健<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物信息工程教育部重点实验室, 西安 710049

<sup>2</sup> 西安交通大学仿生工程与生物力学中心, 西安 710049

<sup>3</sup> 西安交通大学航空航天学院, 振动与强度国家重点实验室, 西安 710049

<sup>4</sup> 西安交通大学多功能材料与结构教育部重点实验室, 西安 710049

**摘 要** 心血管疾病是当前全球范围内导致人类死亡的首要原因, 心肌组织工程的发展为心血管疾病的治疗, 尤其是心肌组织再生修复提供了最有潜力的解决方案. 心血管疾病的发生发展与细胞力 – 电微环境的变化密切相关. 近十几年, 随着先进生物材料和微纳生物制造技术的发展, 越来越多的研究表明, 细胞力 – 电微环境的调控对工程化心肌组织的成熟和功能化以及心肌组织再生修复具有重要意义. 本文首先阐明了在体心肌细胞所处力学微环境的生物学基础以及电信号的传导过程, 包括正常和疾病状态下心肌细胞所处的力 – 电微环境. 其次调研了用于心肌组织工程的先进生物材料的研究现状. 最后总结用于基底硬度与应力应变细胞微环境以及细胞电学微环境的构建和调控, 以及细胞对力 – 电微环境的生物学响应.

**关键词** 细胞力学微环境, 细胞电学微环境, 心肌组织工程, 生物材料

中图分类号: Q27, R329, 2<sup>+</sup>7 文献标识码: A DOI: 10.6052/1000-0992-17-014

收稿日期: 2017-07-04; 录用日期: 2017-09-11; 在线出版日期: 2017-09-25

<sup>†</sup> E-mail: xiaohuizhang@mail.xjtu.edu.cn

引用方式: 徐峰, 张晓慧, 鲍雪娇, 赵国旭, 刘付生, 黄国友, 李昱辉, 卢天健. 基于先进生物材料的心肌细胞力 – 电微环境体外构建. 力学进展, 2018, 48: 201807

Xu F, Zhang X H, Bao X J, Zhao G X, Liu F S, Huang G Y, Li Y H, Lu T J. Engineering mechanical-electrical cell microenvironment in myocardium using advanced biomaterials. *Advances in Mechanics*, 2018, 48: 201807

© 2018《力学进展》版权所有

## 1 引言

心血管疾病已成为导致人类死亡的主要疾病之一, 其中因缺血而造成的心肌损伤以及恶化后引起的心脏衰竭是心血管疾病致死的首要原因 (Mozaffarian et al. 2015). 心脏缺血发生后, 如未得到及时有效治疗, 缺血部位将出现心肌组织坏死或凋亡, 并且逐渐被周围结缔组织代替而形成永久性瘢痕, 最终导致力学微环境的变化 (组织变硬), 失去正常搏动功能 (Sutton & Sharpe 2000). 此外, 心肌组织病变所引起的力学微环境异常也可通过力敏感离子通道诱使心肌细胞产生自发性兴奋和收缩, 最终导致心律失常 (陈新 2009). 因此, 对受损心肌组织进行及时有效的功能化修复和重建对于降低因缺血导致的致死率至关重要. 然而, 成熟心肌细胞作为高度分化的末端细胞, 受损后几乎无再生能力, 而常规的药物、介入以及手术等治疗方法无法从根本上实现对病变组织的修复和再生 (Laflamme & Murry 2011). 心脏移植虽是目前临床治疗的“金标准”, 但因供体缺乏以及移植后出现严重并发症的问题, 无法在临床上得到广泛应用 (薛梅等 2014). 因此, 目前亟须建立一种可用于修复或替代受损或坏死心肌组织的有效的治疗方法或手段.

组织工程和再生医学的出现与发展为体外构建具有生理功能的组织和器官带来了希望, 为受损心肌的修复提供了可能 (Hench & Polak 2002). 目前, 研究者已研发了多种方法用于工程化心肌组织的体外构建, 主要包括水凝胶法和多孔支架法. 水凝胶法是将细胞包裹于水凝胶内部, 而多孔支架法是将细胞接种于通过静电纺丝或微纳制造等技术制备的模拟细胞外基质 (ECM) 的材料表面. 例如, Tranquillo 等将心肌细胞包埋在纤维蛋白水凝胶中, 提高了心肌细胞间隙连接蛋白的表达并增强了收缩力, 实现了心肌组织功能的改善 (Black III et al. 2009). 与此同时, Akins 等将心肌细胞接种于有序的静电纺丝聚氨酯支架材料上, 实现心肌细胞的定向铺展, 更好地模拟了在体心肌细胞的形态 (Rockwood et al. 2008). 通过支架的设计和构建虽然可以在一定程度上模拟在体心肌的微环境, 改善体外构建心肌组织的表型和功能, 但由于细胞多数只接种于材料表面, 无法完全模拟在体心肌复杂的三维微环境 (Ghafar-Zadeh et al. 2011).

在体心肌组织处于电信号和力学收缩等因素构成的复杂微环境中. 正常生理条件下, 心肌细胞处于硬度正常的三维力学环境中, 且受到节律性力学形变的刺激. 节律性电信号从窦房结发出通过细胞间隙连接传播至心肌层细胞, 再通过高导电性的浦肯野纤维传导到心脏其他区域, 最终实现整个心脏的节律性收缩. 在此过程中, 节律性电信号和导电性的浦肯野纤维和间隙连接对心脏的同步搏动至关重要. 因此, 要全面模拟在体心肌细胞微环境, 就需要考虑到细胞力-电微环境的重建 (如 **图 1**). 随着先进生物材料 (尤其是水凝胶材料) 和微纳制造方法的发展, 目前研究者在体外构建细胞力-电微环境及其在功能性心肌组织再生应用方面开展了一系列地研究 (Simmons

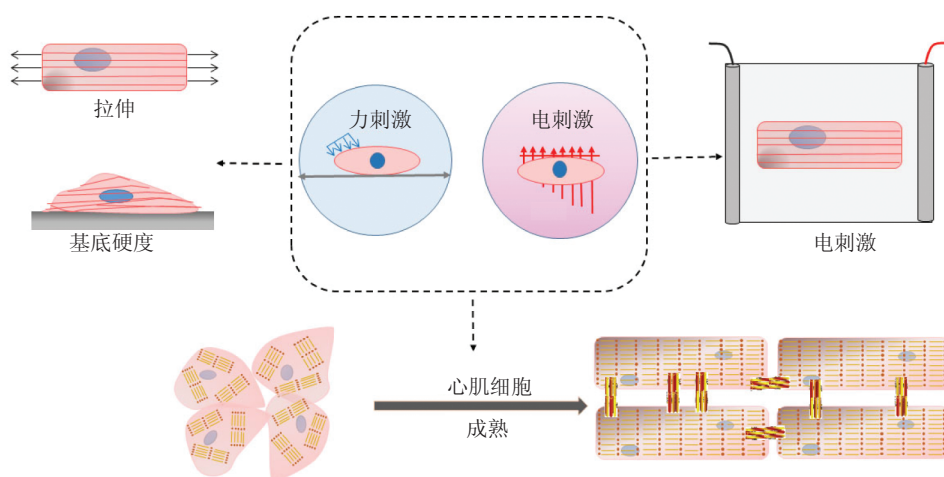


图 1

基于先进生物材料的心肌细胞力-电微环境体外构建, 体外细胞力-电微环境的重建促进心肌细胞的成熟

et al. 2012). 在细胞力学微环境调控方面, 主要是通过控制基底材料的硬度来模拟生理或病理状态下心肌细胞所处力学微环境 (Tallawi et al. 2015); 或对接种细胞的支架材料进行仿生力学拉伸刺激来调控动态力学微环境进而促进心肌细胞的功能 (Mihic et al. 2014). 大多数电刺激加载主要通过电极对细胞进行脉冲式的刺激实现的. 相比于传统的非导电性支架材料, 接种于导电的微纳复合材料支架上的心肌细胞对电刺激的响应大大提高, 能够更好地传导施加的电信号, 以促进心肌细胞的同步搏动功能 (Hsiao et al. 2013). 因此, 体外培养的过程中通过加载仿生力-电刺激重构细胞力-电微环境改善工程化心肌组织的搏动功能, 对力-电信号刺激装置的设计和方法优化是实现成熟的工程化心肌组织的核心.

目前已发表的有关心肌组织工程的综述文章多着眼于支架材料和种子细胞的选择和优化 (张惊和王永武 2007), 而对通过细胞力-电微环境的调控来促进工程化心肌组织功能方面的综述未见报道. 在本文中, 我们主要总结了体外借助力学和电学刺激改善心肌细胞功能的相关研究, 主要关注心肌细胞形态、功能性蛋白和基因的表达以及同步收缩频率和强度等. 首先, 概述了在体心肌组织在正常生理和病理状态下的力-电微环境; 然后介绍用于构建心肌组织工程的先进生物材料及其力学和电学性能; 其次, 介绍了基于先进生物材料的心肌力学微环境和电学微环境的体外构建及其在生物医学中的应用.

## 2 在体心肌细胞力-电微环境

### 2.1 在体心肌细胞力学微环境

#### 2.1.1 正常生理状态下的心肌细胞力学微环境

心脏是由 30%~40% 的心肌细胞和 60%~70% 非心肌细胞组成 (Banerjee et al. 2007). 心肌细胞 (CMs) 主要分为工作细胞和自律细胞两种类型, 其中工作细胞是心脏收缩力的动力来源, 而自律细胞是特殊分化了的心肌细胞, 组成了心脏的特殊传导系统, 具有自动产生节律性兴奋的能力. 心肌成纤维细胞 (CFs) 是非心肌细胞的主要类型, 围绕着心肌细胞并连接心肌细胞间质, 并通过合成和分泌生物因子调控心肌细胞的生理功能 (郝嘉等 2011). 在心血管疾病发展过程中, 心肌成纤维细胞对心肌组织的重构起着至关重要的作用. 心肌成纤维细胞是细胞外基质合成的主要参与者, 对心脏的结构和发育、信号系统和物质代谢等功能至关重要; 心肌成纤维细胞还通过与其他心肌成纤维细胞或内皮细胞相互作用, 影响心肌组织的力-电功能、相关因子的分泌以及血管的生成 (Souders et al. 2009). 心肌组织的细胞外基质由胶原、纤粘连蛋白、层粘连蛋白及弹性蛋白、蛋白聚糖等组成. 其中最主要的成分是胶原, 主要是 I, III, IV, V, VI 型. 其中 I 和 III 型胶原比例高达 90% 以上 (I 型占 80%、III 型 12% 而 IV, V, VI 型胶原为 10%~12%). I 型胶原粗纤维与弹性较好的细纤维 III 型胶原的构成为心肌层提供良好的弹性基质.

心肌层之间呈纵横交错排布 (LeGrice et al. 1995), 层内的心肌细胞通过胞外的黏合带和细胞桥粒连接, 并通过这些连接蛋白与胞内细胞骨架的肌动蛋白和肌节蛋白连接. 尽管单个心肌细胞每次收缩只发生 10% 左右的形变, 仅产生约几十纳牛的收缩力 (Tung & Parikh 1991), 但心肌层间的这种复杂结构足以将使心腔产生较大的变形来对抗腔内的高压. 另外, 心肌组织的力学特性在整个发育过程中呈动态变化 (Gershlak et al. 2013, Jacot et al. 2010). 研究者利用原子力学显微镜对小鼠心脏硬度进行测量, 发现出生后心肌组织急剧变硬 (胚胎为约 12 kPa、新生鼠为约 39 kPa) (Jacot et al. 2010), 这一结果与利用单轴拉伸法测得的心肌组织力学特性一致 (胚胎为约 10 kPa、新生鼠/成年鼠为约 20 kPa) (Gershlak et al. 2013). 心肌组织弹性模量的变化与功能改变密切相关, 例如研究者发现基底硬度不仅影响心肌细胞内产生的主动收缩力, 而且会影响收缩应变, 并对心肌细胞的搏动频率产生显著的影响 (Tallawi et al. 2015).

与此同时, 心肌组织力学微环境的改变将对心肌细胞的基因、蛋白表达以及细胞间通讯等产生影响. 首先, 心肌细胞能够通过细胞膜上的力敏感离子通道 (如 TRPV4, BK) 感受细胞微环境中的静态和动态力学刺激, 激活细胞膜上的电生理和细胞内的生物化学响应, 这个过程被称为“力化学转导”, 这对调控心肌细胞的结构和功能有非

常重要的影响. 例如, 研究发现力敏感离子通道对细胞膜的拉伸应变较敏感, 可以通过升高细胞内的钙离子水平来调控其收缩能力 (Bett & Sachs 1997, Lammerding et al. 2004); 近年来研究者也发现一些力敏感离子通道如 BK 通道能够对基质材料的硬度产生响应, 然后通过电压门控钙离子通道影响心肌细胞的收缩和功能 (Zhao et al. 2017). 另外, 细胞膜上的多种黏着斑蛋白 (如 integrin, talin 和 vinculin) 能主动感知基质硬度的变化, 进而调控细胞膜上黏着斑的形成及其相关的下游信号通路 (比如受体酪氨酸激酶和 GTP 酶) (Jaalouk & Lammerding 2009, Zhao et al. 2015), 最终调节心肌细胞的增殖、凋亡、分化和成熟等 (Vanichapol et al. 2015). 此外, 力学刺激也会影响心肌成纤维细胞的迁移、分化以及细胞外基质分泌能力. 有研究表明, 力学刺激和细胞骨架张力可以通过 Rho/ROCK 和 MAPK/ERK 通路对心肌细胞和心肌成纤维细胞产生影响 (Sano et al. 2001), 而对于这些通路的异常调控将导致先天性缺陷和疾病的发生 (Zeidan et al. 2006).

### 2.1.2 疾病状态下的心肌细胞力学微环境

当处于病理状态时, 心肌细胞所处微环境会发生紊乱, 其收缩功能也出现障碍. 在持续锻炼或怀孕过程中出现的生理性肥厚, 可通过减少锻炼或在婴儿出生后逆转 (Bernardo et al. 2010). 相比而言, 病理性肥厚是心肌组织对疾病状态 (如高血压) 作出应激反应而出现的非正常生长, 且伴有细胞凋亡增加、间质纤维化增加和心功能障碍等为特征, 是不可逆转的. 患有高血压的病人, 心肌细胞长期受到超负荷的持续刺激, 其所处的力学微环境及细胞本身的力学性质都发生改变. 随着病程的延长, 心肌肥厚的程度加剧. 研究发现出现病理性肥厚的心肌细胞的刚度 (约 5.95 kPa) 明显大于正常心肌细胞 (约 3.79 kPa), 且细胞刚度随着肥厚程度的加剧而增大 (Solon et al. 2007, 贾欣华等 2014). 除高血压相关的心肌肥厚外, 心肌病、冠心病和心脏老化等均可导致心肌细胞刚度的增大, 并最终导致心脏电生理功能的改变.

心肌细胞外基质是主要由胶原构成的具有伸缩性的网状系统, 并且参与了细胞间力学信号的转导. 在疾病状态下细胞外基质硬度会发生改变, 例如正常成熟心肌组织硬度为 10~20 kPa, 发生梗死后出现纤维化的组织硬度会达到 35~70 kPa (Czarnecka et al. 2010). 这主要是因为, 在心肌纤维化过程中, 心肌组织外基质胶原纤维过量沉积, 胶原容积分数和胶原浓度增大, 各型胶原排列出现紊乱以及比例失调. 胶原纤维比例失调 (I/III 型胶原比例升高) 使其硬度增大, 心室壁的顺应性下降, 舒张期充盈出现障碍; 若心肌纤维化进一步加重, 最终会导致不正常的心肌收缩; 而心壁内冠状动脉的纤维化, 将使弹性降低、管壁增厚、管腔狭窄和心肌细胞血供不足, 最后导致心肌收缩力出现减退 (Corona et al. 2013). 心肌纤维化与病毒性心肌炎、心肌梗死、高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等许多疾病有着非常密切的联系 (Conti 2006).



扩张型心肌病 (DCM) 主要是由心腔单侧或双侧扩大, 导致心脏泵血功能障碍、心肌肥厚等情况引起的 (戴辰程等 2014). 研究者认为, 扩张型心肌病患者随着病情不断加剧, 心室会发生重构, 主要包括心室扩张加剧、应力增大, 心肌细胞负荷增大, 毛细血管周围呈现出纤维化, 交感神经张力增大, 心肌供氧不足以及心肌能量代谢障碍等 (杨作成 2014). 近年来研究结果证实, 心肌病与心律失常是互为因果关系的两种疾病, 心律失常的发生很容易导致心肌细胞的电生理重构和收缩能力下降以及细胞外基质的重构, 最终出现心肌病, 进而再加剧心律失常 (荣仔萍等 2014, 徐正平和周睿 2014).

## 2.2 在体心肌细胞电学微环境

### 2.2.1 正常状态心肌细胞电学微环境

心脏处在一个由节律性电信号介导的动态力-电耦合环境中, 正常的心肌电学微环境对其实现同步收缩和搏动功能至关重要. 心脏中约有 1% 的心肌细胞可自发地产生节律性兴奋 (称为起搏细胞), 构成了负责生成电脉冲或动作电位的窦房结, 来启动整个心脏的搏动 (DiFrancesco & Tortora 1991, Dorn et al. 2015, Fahrenbach et al. 2007, Mangoni et al. 2003, Mesirca et al. 2015). 窦房结产生的电兴奋首先通过电传播速率较快的节间束传播到右、左心房 (传播速度为约 0.4 m/s), 引起心房区域的搏动; 然后通过导电速率较慢的房室交界区 (约 0.02 m/s) 传播至心室区, 使得心房和心室的动作电位产生了时间间隔, 引起心房和心室节律性收缩的先后次序; 心室区域的电信号首先通过房室束 (约 1 m/s) 传播, 然后通过具有网络状结构的浦肯野纤维 (2~3 m/s) 将电信号传播至心室的各个部分, 引起心室区域的同步搏动. 由于电信号传播至左、右心室的传导路径相似且导电速率非常高, 所以左右心室几乎同时收缩, 形成功能上的合胞体.

当电信号通过浦肯野纤维传播至心肌细胞之后, 随后的电兴奋传导通过相邻心肌细胞间的缝隙连接 (gap junctions) 完成 (0.4~0.5 m/s), 使整个室壁由内而外发生兴奋, 实现心脏的正常搏动功能, 因此心肌细胞间形成正常的缝隙连接对其电生理功能至关重要. 这种由连接素 (Cx) 构成的缝隙连接, 不仅维持着细胞间电信号的传导, 而且可以介导一些生物信号物质的直接交流, 对细胞的新陈代谢、增殖和分化过程都起着重要调控作用 (郭继鸿 2003). 在心脏中, 缝隙连接主要由 GJA1 基因编码的 Cx43 蛋白构成, 其正常表达对心脏的同步搏动和泵血功能起着重要作用. 在心肌细胞接收到电兴奋、膜电位产生变化之后, 相邻的心肌细胞胞内钠离子浓度发生改变, 在离子浓度差的作用下, 胞内的正电位通过缝隙连接传播至未兴奋的心肌细胞, 引起电信号在相邻心肌细胞间的快速传播. 这种功能上的不可替代性, 在一些情况下 (如心肌细胞受到损伤、细胞内 pH 值下降和基因缺陷) 会导致缝隙连接蛋白的功能异常或关闭, 心

肌细胞间的兴奋传导会减慢或停滞,引起一些心血管病症的发生(余承高 1985).

在心肌组织的电学微环境中,钠离子和钙离子扮演着重要的角色(Crespo et al. 1990). 在起搏细胞中,细胞的自动去极化由钠钾离子泵介导,3个钠离子进入胞内的同时有2个钾离子离开,引起了膜内电位的上升,当膜电位到达阈电位后,钠离子通道开放导致钠离子大量涌入,膜电位快速到达动作电位,由此引起了自律细胞的去极化和电兴奋的产生. 在心室心肌细胞中,钠离子通过缝隙连接从已兴奋的心肌细胞流入未兴奋的心肌细胞,电位上升至阈电位后引发动作电位,因此,钠离子对于心脏中电信号的产生和传播具有重要的作用. 在心肌细胞兴奋的平台期早期,自由钙离子通过L型钙离子通道进入细胞,导致细胞内钙离子浓度升高. 高浓度的自由钙离子诱发肌浆网表面的兰尼碱受体(ryanodine)打开,介导了钙致钙释放(CICR)的正反馈循环,引起细胞内自由钙离子浓度急速上升(Endo 1977, Fabiato 1983),然后和ATP协同作用导致肌球蛋白丝相对于肌动蛋白丝产生滑动,产生了肌小节的收缩和心肌细胞的搏动(Sandow 1952). 由此,通过这些精密的传导路径、胞间缝隙连接和离子机制构成了心脏的电学微环境,完成了电信号向心肌正常收缩的转变.

### 2.2.2 疾病状态下的心肌细胞电学微环境

心律不齐是心衰患者的重要特征之一(Abraham et al. 2002). 心衰或酸碱平衡失调、电解质紊乱等可致心肌出现电重塑,主要表现为:复极离散,动作电位时程(APD)延长,各向异性增加和电不稳定性,心肌易发生折返激动和后除极,最终心衰症状加重(Knollmann et al. 2000). 几乎所有心衰患者都伴有复杂的心律失常. 心衰发生时,心室出现扩大且传导系统发生病变,这些均可引起室内传导阻滞,导致机械活动和电活动的分离,这种心室的电重塑将致使心室收缩发生不协调的状况. 病理状态下,重塑心肌细胞膜Cx43的基因表达降低且排列紊乱,导致细胞间电传导出现延迟,细胞间电信号相互制约减弱,各向异性和传导速度发生改变,最终诱发心律失常.

很多研究者利用疾病模型来研究疾病状态下心肌电学相关蛋白的变化. 例如,研究者以斑马鱼和小鼠作为代表研究了电信号在心脏发育过程中的作用. 斑马鱼的心脏由两个心室组成,但其电信号传导机制与人相似(Arrenberg et al. 2010; Chi et al. 2010, 2008; Sedmera et al. 2003; Tu & Chi 2012). 电信号的传播主要通过间隙连接完成,间隙连接在同步动作电位和调节同步收缩发挥重要作用(Ye & Black 2011). 具体来说,间隙连接家族中连接素(Cxs)的表达和修饰的错误调节可导致心律失常或胚胎早期死亡(Kumai et al. 2000, Seki et al. 2015). 小鼠的心肌细胞表达多种间隙链接蛋白(包括Cx30, Cx30.2, Cx40, Cx43, Cx45和Cx46(Chi et al. 2010, Gros et al. 2010, Kreuzberg et al. 2005, Kumai et al. 2000, Seki et al. 2015)),其存在对心脏的正常发育至关重要(Beauchamp et al. 2012, Gros et al. 2010, Kirchhoff et al. 1998, Kreuzberg et al.

2005, Kumai et al. 2000, Reaume et al. 1995), 其不正常表达会导致先天性精神缺陷. 比如, Cx45 表达缺失的胚胎心脏在第九天开始收缩, 但在几小时内, 出现了传导阻滞和心内膜缺损, 并伴随着心脏内胶状物的出现. 进一步实验结果表明, Cx45 通过影响钙离子/钙调磷酸酶和 NFATc1 信号来干预心肌内层上皮间充质的转化. 综上所述, 间隙连接的激活和表达在心脏传导系统的发育过程中具有极其重要的作用 (Kumai et al. 2000). 同样, 控制或修饰 Cxs 也为降低心律失常、增强心脏功能以及介导病损后功能重建提供了一个可能的临床路径 (Seki et al. 2015). 具体来说, 在斑马鱼基因敲除突变体的模型中, 敲除 Cx46 的突变体表现出收缩不同步和腔壁组织混乱 (Chi et al. 2010). Cx46 敲除后, 利用转基因诱导心肌表达 Cx46, 56% 的动物出现心室电信号的传导以及恢复了收缩.

成熟的心肌组织中, 电信号的激活是通过细胞内外的离子通过电压门控离子通道 (如钠离子通道 (Nav1.5) 或硝酸钾通道 (Kir1.2Kv4.2)) 交换完成, 这些信号的传导进一步通过间隙连接进行传递. 多能干细胞 (hiPSC) 分化的心肌细胞如果缺乏电压门控离子通道相关蛋白的表达将无法发育为成熟的功能性细胞 (Lieu et al. 2013). 此外, Cxs 表达水平的改变可影响电压门控离子通道的形成, 并引起先天或后天的心律失常 (Bierhuizen et al. 2008, Xiong et al. 2015). 例如, 磷酸酶介导的肥厚小鼠模型中, Cx40 和 Nav1.5 下调, 导致心律失常并增加了小鼠的死亡率 (Bierhuizen et al. 2008). 此外, 扩张型心肌病患者 KCNQ1 基因突变会出现室性心动过速, 而 KCNQ1 基因编码了电压门控钾通道 (Xiong et al. 2015). 这些结果表明, 心血管相关的疾病会改变电压门控离子通道相关蛋白和基因的表达, 进而会影响心肌细胞对电信号传导的能力, 最终引起心律失常等疾病.

### 3 用于心肌细胞微环境构建的先进生物材料及其力-电性能

#### 3.1 水凝胶

水凝胶是一种能够在水中溶胀、可保持大量水分而又不溶解于水的三维网状高分子聚合物, 具有良好的生物相容性和力学性能可控性, 被广泛运用于构建心肌微环境. 由于存在大量的亲水基团, 水凝胶的含水率高达 90% 以上. 根据水凝胶中网络键合的不同, 水凝胶可分为物理水凝胶和化学水凝胶. 物理水凝胶是通过物理作用力如静电作用、氢键、链的缠绕等形成的, 加热后凝胶可重新转变为溶液, 是非永久性、热可逆凝胶. 化学凝胶是由化学键交联形成的三维网络聚合物, 具有永久性. 由于水凝胶所具有的三维网络结构、含水量高和力学性能可控等特性与体内心肌细胞所处基质微环境相似, 被广泛用于工程化心肌组织的体外构建研究.

水凝胶的硬度调控范围很大, 非常有利于模拟体内心肌生理或病理力学微环境如



图 2(a) (Dawson et al. 2008). 通过改变聚合物的相对分子质量、浓度和交联密度可以合成不同硬度的水凝胶, 最小硬度仅为  $0.2\sim 0.4\text{kPa}$ (含水率 99.5%), 最大硬度可达  $200\text{kPa}$  (Gattazzo et al. 2014, Nava et al. 2012). 心肌细胞和干细胞在不同硬度的水凝胶中的细胞学行为、功能及分化特性都不相同. 例如, 将心肌细胞接种于不同硬度的聚丙烯酰胺凝胶与  $0.5\text{mg/mL}$  鼠尾 I 型胶原共价偶联混合物表面 ( $1\text{kPa}$ ,  $10\text{kPa}$  和  $50\text{kPa}$ ), 发现心肌细胞在  $10\text{kPa}$ (类似胚胎组织硬度) 的凝胶表面出现有序条纹, 而在硬度  $50\text{kPa}$  的凝胶上出现无序条纹, 这一结果表明体外基底硬度与体内力学微环境不匹配很可能会引起不正常的细胞响应 (Jacot et al. 2008).

天然水凝胶包括蛋白质 (如胶原蛋白、明胶丝和蛋白) 和多糖 (如透明质酸、琼脂糖和藻酸盐) 聚合物, 力学性能较弱且无法控制. 例如, 自组装胶原水凝胶的硬度仅为约  $1\text{kPa}$ , 且因不可控降解使其硬度逐渐减小. 现有方法主要通过修饰官能团方法来改善水凝胶的稳定性和力学性能 (酪胺 (Toh et al. 2012)、硫醇盐 (Young & Engler 2011) 和丙烯酸酯 (Khetan et al. 2009)) 或者添加其他物质 (明胶甲基丙烯酸酯/聚(乙二醇)) (Ma et al. 2015)、透明质酸和胶原蛋白/聚丙烯酰胺 (PAA) (Macrí-Pellizzeri et al. 2015)). 此外, 也可通过共价交联改变其力学性能. 例如, 聚丙烯酰胺凝胶与  $0.5\text{mg/mL}$  鼠尾 I 型胶原共价交联调节其力学性能. 与天然的水凝胶相比, 合成水凝胶的力学性能可实现精准调控, 如 PEG, PAA, 聚环氧乙烷 (PEO), 聚乙烯醇 (PVA) 及其衍生物也被用于构建体外细胞的力学微环境. 同时, 生物活性分子包括 ECM 分泌的多肽、蛋白质片段和生长因子可以通过功能末端 (如羟基、羧基和氨基) 对合成水凝胶进行修饰来改善其生物相容性.

细胞内、外所含有的纤维状蛋白主要包括肌动蛋白、胶原蛋白、纤维蛋白和波形蛋白等 (Storm et al. 2005, Wen & Janmey 2013). 而目前体外用于工程化心肌组织构建的水凝胶材料主要有胶原蛋白、纤维蛋白、层粘连蛋白、藻酸盐和明胶等天然材料, 以及聚己酸内酯、聚氨酯、聚丙烯酰胺凝胶和聚二甲基硅氧烷等聚合物材料. 体外选取支架材料时通常将天然材料和合成聚合物复合, 获得力学性能和生物相容性均满足要求的生物材料, 进而更好地模拟体内力学微环境构建有功能性的心肌组织. 同时, 水凝胶的硬度还将影响细胞的迁移方式以及干细胞的分化.

由于细胞之间存在电信号传导与交流, 研究发现电刺激对细胞的影响与细胞微环境的电导率息息相关. 大多数传统生物材料导电性较差, 因此近些年新型导电性生物材料得到广泛的开发. 一般通过将水凝胶与导电材料 (如导电聚合物或低聚物 (Mihic et al. 2015)、AuNPs (Dvir et al. 2011)、CNTs (Su et al. 2013)、石墨烯 (Annabi et al. 2015)) 复合来提高水凝胶材料的导电性能如 图 2(b), 最终用于体外进行电学微环境构建和调控.

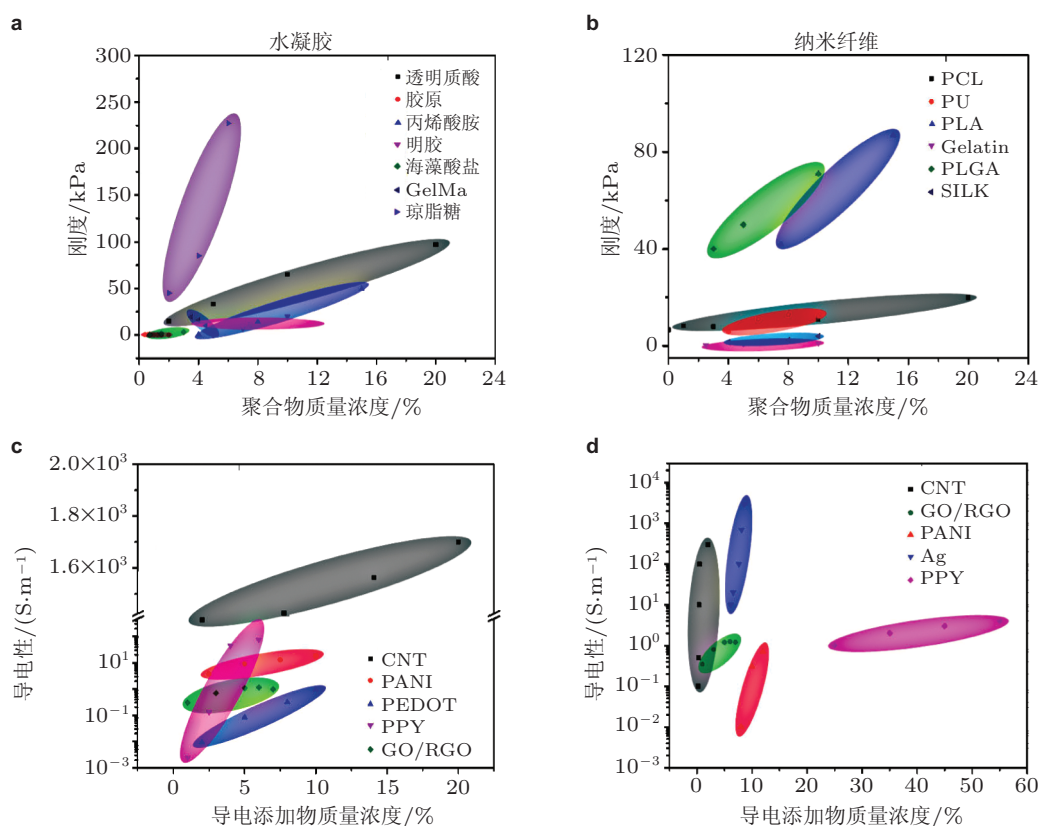


图 2

先进生物材料的力 - 电性能. (a) 不同聚合物浓度水凝胶的力学性能, (b) 加入不同导电粒子水凝胶的电学性能, (c) 不同聚合物浓度纤维材料的力学性能, (d) 加入不同导电粒子浓度纤维材料的电学性能

### 3.2 纤维支架

与聚合物多孔基质相比, 纤维支架结构更接近于生物在体 ECM. 相比于微米级纤维支架, 纳米纤维的平均直径在 50~500 nm 范围之内, 与细胞能够产生更好的相互作用, 且具有更高的比表面积, 为细胞培养提供充足的空间. 除了经济适用、可规模化生产外, 合成多聚物的支架还具有其他优势, 如支架的力学性能可调、表面可以通过蛋白包被和化学交联特殊信号分子实现功能化, 其力学性能实现从千帕级到吉帕级的调控 (如 图 2(c)). 基于这些强大的特点, 纳米纤维材料已被视为构建生物工程支架最理想的方案, 也在心肌组织工程再生领域显示出极为广阔的应用前景. 纳米纤维能通过多种技术方法制备, 主要包括自组装体法、相分离法和静电纺丝方法.

材料的选择取决于支架应用目的. 对于生物组织工程支架来说, 具有良好生物降

解性和生物相容性的聚合物是优先之选. 具体的选择可根据再生组织以及再生所需时间等因素来进一步确定. 在组织工程支架制备中, 应用最多的合成材料是聚酯类, 如 (Martins et al. 2017) 聚丙交酯 (poly lactide, PLA)、聚乙交酯 (poly glycolyde, PGA) 和聚己内酯 (poly caprolactone, PCL). 有时, 具有两种或更多种聚合物性质的材料更为有利. 在这些情况下, 共聚物或聚合物的共混物被选择用于制备纳米纤维材料. 目前天然材料如蛋白质或多糖因更易于被细胞识别也特别地受到再生医学领域的关注. 迄今, 纤维素 (cellulose) (Bhandari et al. 2017)、胶原 (collagen) (Nune et al. 2017)、天然丝 (natural silk) (Wang et al. 2017)、纤维蛋白原 (fibrinogen) (Martins et al. 2017)、壳多糖/脱乙酰壳多糖 (chitin/chitosan) (Koizumi et al. 2017)、透明质酸 (hyaluronic acid) (Fallacara et al. 2017) 等均已经被用于制备纳米纤维支架材料. 陈焱等利用静电纺丝技术制备纳米级别的 PCL 纤维和 PCL/gelatin 复合型纤维支架研究物理微环境对 iPSC 向心肌细胞分化的影响及其机制. 结果显示三维 PCL 纳米纤维仿生支架不仅可用于 iPSC 扩增培养, 还可通过其提供的物理生物信号调节细胞内 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号活性进而促进 iPSC 向心肌细胞的分化 (陈焱 2015). 纯的生物纤维材料的电学性能一般较差, 目前研究者将具有高导电性能的添加物用于提高支架的导电性 (如 图 2(d)), 用于构建电学微环境促进心肌组织成熟.

#### 4 基于先进生物材料的心肌细胞力学微环境体外构建

细胞力学微环境的调控对于心肌细胞或组织的生长发育至关重要, 研究者采用不同方法来构建二维 (2D) 和三维 (3D) 心肌力学微环境, 进而维持和促进心肌组织表型和功能的成熟 (Haggart et al. 2014, Ye et al. 2013, 段翠密等 2006). 体外构建力学微环境的方法主要包括材料硬度、静态拉伸、动态拉伸和动态压力 (如 图 3). 构建和调控力学微环境通常有两种机制: (1) 调控不同硬度的材料来影响细胞行为; (2) 对基底以一定频率进行动态拉伸. 这种调控会影响心肌细胞表型、细胞内肌节结构、钙处理以及收缩功能相关的基因和蛋白表达等.

##### 4.1 心肌细胞基质硬度力学微环境体外构建

研究者将 I 型胶原覆盖于聚丙烯酰胺凝胶来确定鸡胚胎的心肌组织收缩过程中细胞内应变和基质应变之间的关系 (Engler et al. 2008). 研究表明对于较软的基底, 心肌细胞收缩可促使基底变形, 而对于较硬的基底心肌细胞收缩只能引起细胞自身变形. 另外, 将心肌细胞分别接种于胶原覆盖的聚丙烯酰胺凝胶表面 (杨氏模量分别为 3, 22, 50 和 144 kPa (Bhana et al. 2010)) 培养 120 h 后, 结果显示在 3 kPa 胶原上的心肌细胞出现最低的兴奋阈值 (3.5 V/cm), cTnI 表达较高 (52% 阳性染色区域), 但细胞密度、收缩力 (0.18 V/mm<sup>2</sup>) 和心肌细胞伸长 (纵横比: 1.3~1.4) 减小. 在 144 kPa 基质

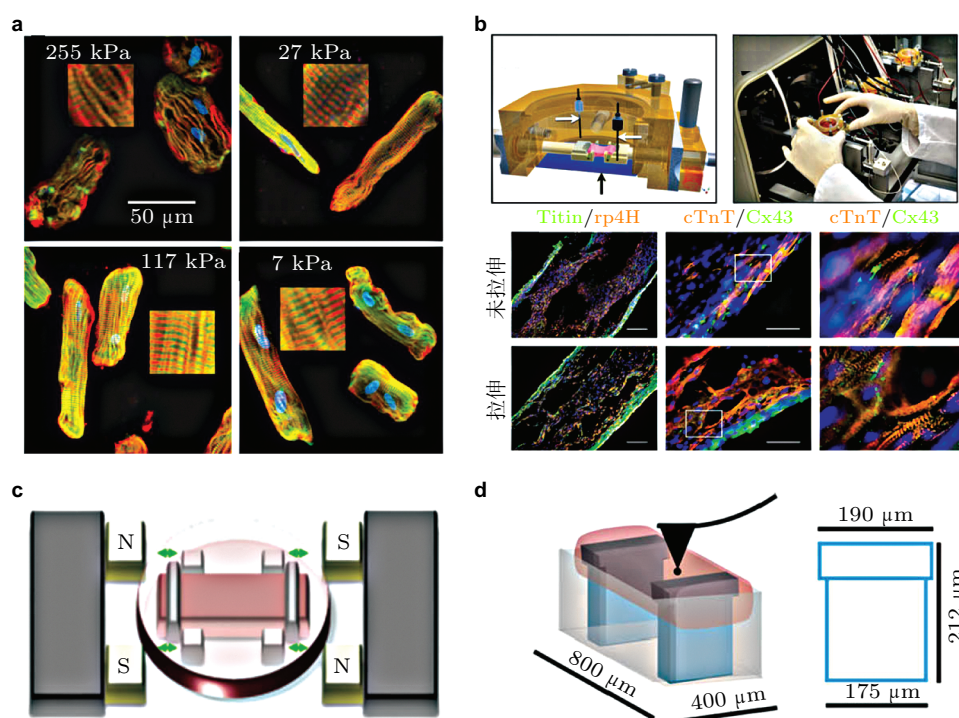


图 3

心肌细胞力学微环境构建方法. (a) 通过改变基底硬度影响细胞内牵引力和最终影响蛋白和基因表达和细胞表型, (b) 通过拉伸 2D 材料最终影响细胞的响应, (c) 细胞处于 3D 状态下利用磁性纳米颗粒进行拉伸, (d) 细胞处于 3D 状态下进行压缩刺激

上的心肌细胞 cTnI 表达减少 (30% 阳性染色区域), 心肌成纤维细胞的密度增大 (70% 阳性染色区域), 且电兴奋较差. 总之, 基底硬度 (约 50 kPa) 高于正常心肌组织将阻碍体外心肌细胞成熟, 而较软的基底可以模拟早期心肌组织力学微环境, 并促进心肌细胞某些功能的成熟.

I 型胶原蛋白是成年心肌组织细胞外基质的一种丰富的蛋白, 但与心肌细胞结合的基膜含有大量的层粘连蛋白. 研究者用层粘连蛋白覆盖基底培养心肌细胞, 发现心肌细胞力学转导信号与在胶原覆盖基底上结果不完全相同. 在柔软的 (7 kPa) 层粘连蛋白覆盖的聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 上的心肌细胞, 培养 48 h 后表现出有序的肌节结构, 但在中间硬度材料上表达不足 (117 kPa, 27 kPa) (Galie et al. 2013). 然而, 在硬度更高基底上的心肌细胞也会出现有序的肌节结构 (255 kPa) (Galie et al. 2013). 另外,  $\alpha$ -actinin 在不同硬度基质上的表达量无明显差异 (Galie et al. 2013), 表明硬度对肌动蛋白的产生没有影响, 但对细胞内蛋白形成的结构有影响. 另一研究将心肌细胞短时间培养在硬度为 10 kPa 和 200 kPa 的基底上, 细胞出现非常有序的肌节结构 ( $\leq 48$  h).



RT-qPCR 结果显示在硬度为 27 kPa 凝胶中  $\alpha$ -actinin 的 mRNA 表达增加, 整合素  $\beta$ 1 和黏着斑表达上调, 表明心肌细胞在体外 48 h 培养期间试图恢复丢失的结构和功能 (Walker et al. 2011). 这些结果表明基底硬度会影响心肌细胞的基因和功能蛋白的表达, 并且还影响细胞活性和蛋白的后处理, 如磷酸化、泛素化和降解 (Hidalgo et al. 2009, Kruger et al. 2009).

除此之外, 研究者还发现二维培养中基底硬度对心肌细胞收缩率、产生的应力和钙处理均有影响 (Galie et al. 2013, Hazeltine et al. 2012, Rodriguez et al. 2011). Galie 等研究发现硬度不仅影响心肌细胞内产生的主动收缩力, 而且会影响收缩应变. 此外, 这些参数短暂的变化表明心肌细胞在体外响应是自适应的, 随时间变化而发生改变. Bajaj 等的研究结果与之相似, 将鸡胚心肌细胞接种于层粘连蛋白覆盖的聚丙烯酰胺凝胶, 在最初 24 h 内基底硬度对心肌细胞搏动的频率产生显著的影响 (硬度为 18 kPa 基底比 1 kPa 和 50 kPa 和培养板培养效果好) (Bajaj et al. 2010). 然而, 5 d 后心肌细胞反应是不依赖于基底硬度, 这表明心肌细胞黏附, 心肌成纤维细胞的调节功能以及细胞与细胞之间接触可以克服二维体外培养时最初的影响. 如在前几个小时内心肌细胞收缩的暂时变化可以部分归因于基底本身的黏附水平以及心肌成纤维细胞的重塑. 总的来说, 这些结果证明硬度对于心肌细胞成熟起着重要的作用, 它可以在时间上改变生长因子或小分子的递送 (Bajaj et al. 2010, Forte et al. 2012, Galie et al. 2013, Hazeltine et al. 2012, Rodriguez et al. 2011).

干细胞向心肌细胞的分化也受基底硬度和配体密度的影响, 主要是通过改变多种细胞特异性基因和蛋白表达来影响细胞的成熟 (Engler et al. 2008, 2004, 2006; Trappmann et al. 2012). 许多研究已表明干细胞向心肌细胞分化和成熟部分是由于心肌细胞释放的相关可溶性因子的作用 (即旁分泌作用), 在培养过程中加入这些旁分泌因子可提高干细胞分化成心肌细胞 (Feric & Radisic 2016, Ivashchenko et al. 2013, Mummery et al. 2012, Veerman et al. 2015). 基底硬度可以帮助干细胞的分化 (Engler et al. 2004, 2006, Roy et al. 2013, Tse & Engler 2011, Vincent & Engler 2013), 在短时间培养过程中, 基底硬度与其发育早期变化相匹配时在体外能够改善干细胞向心肌细胞分化. 实际上, 在基底硬度对人干细胞分化成心肌细胞影响的研究中, 将细胞接种于含有荧光珠的聚丙烯酰胺凝胶上, 并用牵引力显微镜来分析 (Hazeltine et al. 2012), 在硬度为 100 kPa 的凝胶基质上, 相比较原代心肌细胞, 干细胞分化获得的心肌细胞具有更高的收缩应力, 而在 4~76 kPa 硬度的凝胶上没有差异, 表明 100 kPa 凝胶促进干细胞分化成功能性成熟的心肌细胞.



## 4.2 心肌细胞应力/应变力学微环境体外构建

应力/应变力学微环境构建是指在培养过程中对工程化组织施加力学刺激。Sadoshima 等将心肌细胞静态拉伸 20% 的应变来研究细胞的力学敏感性, 通过 northern 和 3H 标记氨基酸吸收的变化来测量肌节、Z- 闰盘、整合素、肌膜离子通道、G- 蛋白耦合受体对细胞感知环境的影响 (Sadoshima et al. 1992)。体外力学拉伸是维持兴奋收缩耦合的一个关键因素, 如心肌细胞在静态拉伸培养过程中通过微纤维形成不同的结构或结构以不同角度螺旋、离子通道的活性 (Sigurdson et al. 1992, Simpson et al. 1995, 1996; 魏严等 2009)、黏着斑组成 (Sharp et al. 1997)、基因的表达来体现力学刺激对心肌细胞收缩耦合的影响 (Van Wamel et al. 2000)。在另一研究中 (Vandenberg et al. 1996), 研究者将心肌细胞接种于胶原和层粘连蛋白覆盖的孔板中, 4d 培养过程中逐步增大应变 (25%) 来验证力学拉伸和整合素在心肌细胞成熟过程中的作用。相比无拉伸状态, 拉伸后的心肌细胞呈现有序排列, 总肌球蛋白重链 (MHC) 数量、双核细胞的数量和纵向细胞面积均有增加。Vandenberg 等推测双核现象和纵向面积的增大与细胞生理肥厚性生长相关, 细胞排列有序以及  $\alpha$ -MHC 和  $\beta$ -MHC 同工型含量提高预示着心肌细胞成熟的促进 (Vandenberg et al. 1996)。然而, 众所周知在发育和成熟过程中 MHC 呈现从一种同工型转变为另一种同工型的动态平衡 (Hoh et al. 1978, Nadal-Ginard & Mahdavi 1989), 这些条件下 MHC 蛋白表达的变化不足以说明促进了心肌细胞成熟。但是, 这些结果首次强调了力学刺激对心肌细胞生长和成熟的重要性, 为未来构建工程化组织模拟体内心肌组织打下了理论基础。

与静态拉伸相比, 周期性力学拉伸模拟了心脏舒张期心室血液循环填充过程。许多研究表明周期性拉伸影响细胞内结构形成, 细胞内和细胞外牵引力以及相关基因和蛋白的表达 (Aikawa et al. 1999, Crosara-Alberto et al. 2009, Dhein et al. 2014, Eghbali et al. 2005, Christine Fink et al. 2000, Haggart et al. 2014, Kim et al. 2009, Komuro et al. 1996, Leychenko et al. 2011, Malhotra et al. 2010, Salameh et al. 2010b, Ye et al. 2013, Zhang et al. 2007, 况薇等 2014)。研究者采用 Flexcell 系统研究了心肌细胞对力学刺激响应, 以及拉伸和一些小分子或生长因子结合对心肌细胞表型和功能的影响, 发现力学拉伸对心肌细胞表型影响很大 (Leychenko et al. 2011, Salameh et al. 2010a)。例如, 心肌细胞接种于明胶覆盖的基膜上, 在 10% 应变下周期性拉伸 24h (Salameh et al. 2010a), 间隙连接蛋白的表达和形成的结构发生变化。然而此研究并没有说明间隙连接表达的改变与促进心肌细胞成熟相关。再者, 力学拉伸会影响黏着斑激酶的活性 (Crosara-Alberto et al. 2009, Ferrarini et al. 2006, Shyu et al. 2010, Takahashi et al. 1999, Zentilin et al. 2010), 调节体外细胞肥大和黏着。Leychenko 等研究力学拉伸激活血管内皮生长因子的机制 (Leychenko et al. 2011), 结果发现与静态相比, 动态拉伸刺激使

成年鼠心肌细胞血管生长因子表达提高三倍, 并激活成年鼠 NF- $\kappa$ B, MAPK/ERK1/2, 和 PI3K 的通路. 而 NF- $\kappa$ B 通路的激活对血管生长因子的分泌具有调节作用 (Baker & Zaman 2010). 虽然力学拉伸刺激的部分研究结果存在争议, 但动态拉伸可激活肥大诱导作用引起的 MAPK/ERK1/2, 和 PI3K 通路 (Haggart et al. 2014, Sadoshima et al. 1993, Yanazume et al. 2002) 的研究结果得到一致认同.

由于二维与三维状态下细胞骨架分布不同, 二维条件下的研究结果并不能很好的适用于三维 (Abbott 2003). 二维培养时, 通过添加小分子或改变表面涂层增加基底硬度可以增强心肌细胞收缩力. 但二维培养系统中, 基质的硬度和孔径大小通常是相互关联的, 很难确定硬度、孔径和配体组织对细胞的单一作用 (Chaudhuri & Mooney 2012; Engler et al. 2008, 2004, 2006; Griffin et al. 2004; Holle & Engler 2011; Huebsch et al. 2010; Trappmann et al. 2012; Tse & Engler 2011; Young et al. 2012). 而三维培养体系中基底硬度的作用相对均匀, 但由于周围复合物的不断形成、整合素结合、细胞骨架重排以及可用性营养更加复杂的原因, 加大了评估这些参数对细胞特定作用的困难. 为更好地控制这些参数以促进工程化组织的成熟, 研究者已开始对体外三维培养系统的构建和调控进行系统研究 (Chen et al. 2008, Massai et al. 2013, Rangarajan et al. 2014, Shapira-Schweitzer & Seliktar 2007). 越来越多研究发现, 即使没有加载力学刺激, 三维培养系统下也可促进细胞的排列, 提高心肌功能相关的基因和蛋白的表达 (Black et al. 2009, Stoppel et al. 2015), 而这些结果在力学刺激后得到了进一步的改善.

目前, 研究者已经初步开发了各种生物反应器用于三维心肌组织周期性拉伸刺激 (Birla et al. 2007, Black et al. 2009, Cha et al. 2006, Kluge et al. 2011). Eschenhagen 团队分别将鼠和鸡心肌细胞包埋于胶原凝胶基底中 (Fink et al. 2000, Zimmermann et al. 2000) 并进行拉伸, 结果表明拉伸刺激后心肌组织的功能有所改善. Zimmermann 等设计管道状组织工程结构, 心肌组织实现 0.51 mN 的最大收缩幅度, 并且随着培养时间加长收缩力加强, 心肌组织表现出一种主动 - 长度和被动力 - 频率的关系, 表明获得的工程化心肌组织类似于体内组织 (Zimmermann et al. 2000). 在类似研究中, 将鸡心肌细胞包埋在胶原凝胶中, 对心肌组织施加单向周期性拉伸, 四天后心肌细胞长径比、肌丝长度和线粒体密度均有增加, 代谢活动增强, 肌节  $\alpha$ -actinin 表达增加 40% (Fink et al. 2000). 整体而言, 力学拉伸对三维心肌组织表型成熟化至关重要, 但结果中并没有报道拉伸幅度和频率导致的最大收缩力. 研究者随后对该设计进行改进, 设计环形结构实现更好的参数控制, 在拉伸 (10% 应变、2 Hz) 7 d 后观察到高度有序的肌节以及黏附增加和间隙连接的形成 (Zimmermann et al. 2002).

Legant 等将凝胶悬浮在两个平行的 PDMS 柱子之间 (Galie et al. 2015, Legant et al. 2009), 柱子的偏转可以测定水凝胶中细胞产生的收缩力. 考虑到心肌细胞有限的重塑和增殖能力, 在构建的生物组织中共培养心肌成纤维细胞是非常必要的 (Galie &

Stegemann 2011, Porter & Turner 2009, Sullivan & Black 2013). 通过进一步改进, 实现在较大结构组织 (Galie et al. 2015)、微结构组织 (Boudou et al. 2012)、锯齿状三维胶原结构中包埋心肌细胞和心肌成纤维细胞, 通过原子力显微镜尖端施加不同大小振幅和频率刺激, 增强了组织的收缩力. 这些实验只研究了 0.5~2 Hz 的加载频率, 结果发现 2 Hz 的力学加载可增强心肌细胞表型, 且构建的心肌组织搏动频率保持在 1 Hz 左右. 在另一个生物反应器中可实现周期性拉伸, 多孔胶原材料一边粘在培养皿上, 另一边连接在钢棒上 (控制动态拉伸) (Liu et al. 1999), 心肌细胞包埋于胶原中. 经过拉伸刺激后 (80 r/min, 14 d) 发现胶原基质的形成以及心肌细胞进入胶原的数量均有增加.

除了传统的力学刺激方法, 如生物材料的物理变形, 研究者也尝试其他方法来对工程化心肌组织的力学刺激. 一种是施加与细胞伸展方向相反的压缩刺激; 另一种是通过灌注实现流体剪切应力. 灌注可以是连续的, 如使用蠕动泵实现一个稳定或周期性变化的流量. 脉动流的频率可以通过调节来模拟人 (1 Hz) 或啮齿动物 (2~3 Hz) 的心率. 在研究压缩 (1 Hz, 15% 应变) 和流体剪切力对包埋在 RGD 修饰的海藻酸水凝胶中心肌细胞的影响 (Shachar et al. 2012) 的研究中, 相比持续压缩细胞保持球形的结构, 4 d 短周期 (间歇压缩) 的压缩促使心肌组织形成典型的条纹纤维以及 Cx43 表达增加. 此外, 间歇性压缩组织后成纤维细胞生长因子和转换生长因子 (TGF- $\beta$ ) 的分泌水平比正常有所提高, 表明心肌细胞表型发生变化, 说明在体外培养系统中动态刺激对维持心肌细胞表型至关重要. 然而, 值得注意的是, TGF- $\beta$  释放表明心肌成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 类似于心肌梗死后心肌成纤维细胞被激活, 因此延长研究周期对于研究心肌成纤维细胞激活过程十分必要. 灌注可促进营养供给和气体交换, 这对构建毫米级或更大尺寸的心脏组织用于修复至关重要 (Radisic et al. 2003, 2008, 2004). 此外, 研究者发现脉冲灌注还可以给材料表面细胞提供剪切应力或作为机械手段刺激细胞 (Brown et al. 2008). 当脉动流 (1 Hz) 实验速率分别为 1.50 mL/min 和 0.32 mL/min 时, 组织的兴奋阈值在两种速率下均有显著降低, 但高流脉动流刺激下的心肌组织出现收缩振幅提高的现象, 而低流速脉冲灌注导致细胞长度和直径变大, 表明这一刺激会引起细胞肥大. 这些结果显示动态剪切应力对心肌细胞表型有潜在的重要作用.

最近有研究利用磁性纳米颗粒对三维大孔海藻酸盐支架中的细胞施加力学刺激 (Sapir et al. 2014). 通过外部提供 5 Hz 的交变磁场对接种有心肌细胞的大孔支架施加力学加载. 相比无力学刺激组, 在短期 (20 min) 外部磁场刺激下, 心肌组织形成了更多各向异性的条纹纤维状结构, 且蛋白激酶磷酸化增加 (与肥大相关 (DeBosch et al. 2006, Fujio et al. 2000, Sapir et al. 2014, Schaub et al. 1997, Shiojima et al. 2002)). 在刺激和无刺激下组织 p38 促分裂活化蛋白激酶表达无明显差异. 因此, 基于以上结果需要通过优化材料和刺激参数进一步的研究磁场刺激对细胞功能的影响.

### 4.3 心肌细胞非线性弹性和黏弹性力学微环境体外构建

在体心肌组织的力学微环境会表现明显的非线性弹性行为, 研究在体心肌组织的这种行为对构建体外功能性的心肌组织有非常重要的意义. 在体 ECM 的非线性弹性行为主要包括应力刚化和黏弹性行为. 应力刚化现象出现在 ECM 应力状态非常低的区域, 可以在细胞内和细胞外的丝状生物聚合物凝胶观测到 (胶原、纤维蛋白、肌动蛋白和微管等) (Storm 2005). 研究者将硫酸化透明质酸 (HA) 水凝胶与聚乙二醇丙烯酸酯交联, 控制交联剂相对分子质量来改变水凝胶弹性模量 (Tse & Engler 2010), 在体外模拟 ECM 应力刚化行为. Young 等将鸡胚胎心肌细胞接种于弹性模量随时间缓慢增加的水凝胶基底上, 模拟在体发育过程中心肌组织的硬化过程; 研究发现相较于培养在弹性模量不变的基底时, 心肌细胞在逐渐硬化的水凝胶上表现更加成熟, 细胞肌节长度增加, 转录因子 (Nkx2.5) 和肌钙蛋白 (cTn) 的表达提高 (Engler et al. 2008). 黏弹性行为是心肌组织和 ECM 另外一种重要的非线性弹性行为, 然而, 很多用于构建体外组织工程的水凝胶的力学行为是线弹性的. 最近, 已有研究分别报道 ABA 型三嵌段水凝胶和脘交联的 PEG 水凝胶可以模拟 ECM 的应力松弛行为. 在 3D 力学微环境构建中, 心肌细胞的铺展与增殖都会依赖于基质材料的黏弹性性能. 此外, 研究发现应力松弛的时间尺度与细胞行为也有关系.

## 5 心肌细胞电学及力 – 电耦合微环境体外构建

研究发现外加电刺激可以使心肌组织产生响应达到同步收缩, 而电信号的这种兴奋收缩耦合对心脏发育和功能有着重要的促进作用. 电刺激可以影响心肌细胞动作电位的产生、搏动频率和持续时间, 增加具有自发搏动能力的细胞比例, 促进细胞的同步搏动 (如图 4), 因此提高了组织的同步性和信号传递, 产生了更大的收缩力 (Nunes et al. 2013, S. Zhao et al. 2016). 许多研究表明在体外培养的过程中施加电刺激, 干细胞和原代细胞中心肌特异蛋白的表达均呈现阳性结果 (王佳南等 2009, 张颖等 2007). 大多数电刺激的装置设计简单, 使用两个电极提供脉冲电场刺激培养基中的心肌细胞 (Tandon et al. 2011).

### 5.1 心肌细胞电学微环境体外构建

在过去十几年, 研究发现能够通过电刺激在体外构建成熟的心肌组织 (Brevet et al. 1976, McDonough & Glembotski 1992), 主要通过激活许多通路使细胞产生一系列生理反应, 如转录因子的激活、钙处理、氧化应激反应、蛋白激酶的表达和激活和磷酸酶的激活. 转录因子如 NFAT3, GATA4, NRF-1 (核呼吸因子), c-Jun 和铬黄 C 对心肌细胞生长成熟、细胞内线粒体增殖以及祖细胞分化过程都非常重要 (Xia et al. 1998, Xia et al. 2000). 电刺激通过激活 CaMK 通路调节心肌细胞的钙处理能力和应激反应



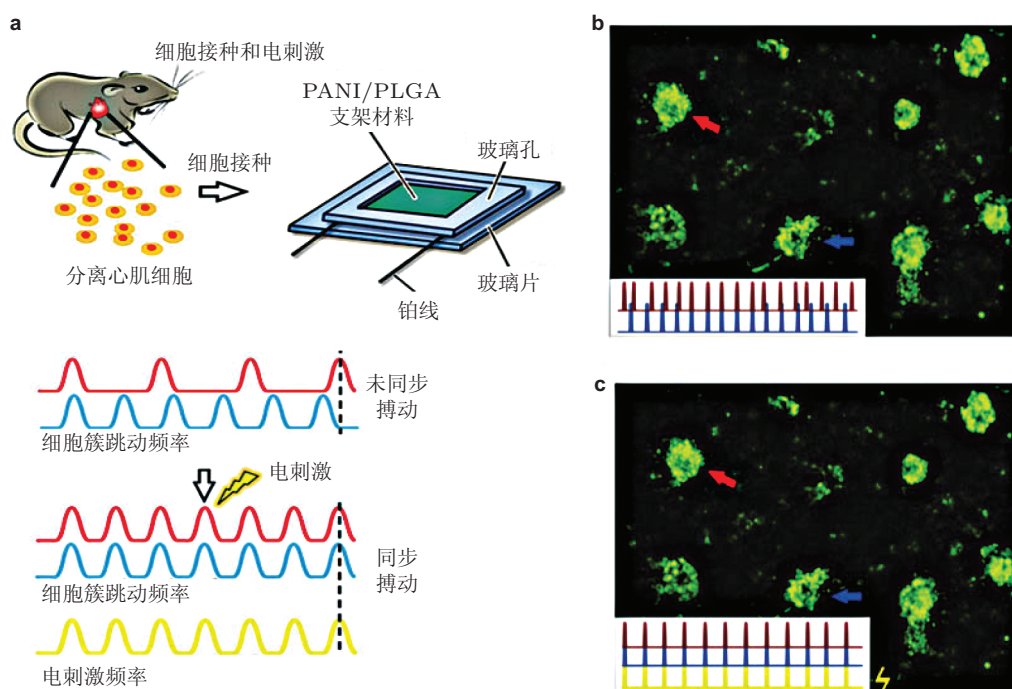


图 4

心肌组织电学微环境构建 (Hsiao et al. 2013). (a) 示意图展示了心肌细胞在导电 PANi/PLGA 支架上的接种、电刺激和预期结果: 通过导电材料、玻璃片和铂线共同组装了用于施加电刺激的培养孔; 未施加电刺激时, 不同的细胞簇具有着不同步的搏动频率 (红色和蓝色波形); 施加电刺激后, 不同的细胞簇对电信号产生响应, 搏动频率变为同步 (红色、蓝色波形与黄色相同步); (b) 实验结果显示, 未施加电刺激时两个独立细胞簇的跳动频率 (红色和蓝色箭头指示了被观测的两个细胞簇, 红色和蓝色竖线表示其跳动频率); (c) 施加电刺激后, 这两个细胞簇的跳动频率与施加的电刺激步调一致 (黄色线表示外加的电刺激频率), 达到同步搏动, 证明导电材料增强了心肌细胞对电信号的响应能力

( $\text{Ca}^{2+}$ /依赖钙调蛋白激酶) (McKinsey & Olson 1999, Passier et al. 2000, Xia et al. 2000). CaMK-I 和 CaMK-IV 的激活可引起磷酸酯酶的激活 (如钙调神经磷酸酶), 但是当发生过表达时最终会导致病理性肥大 (McKinsey & Olson 1999, Passier et al. 2000). 这些结果可以明确导致病理发生的电信号持续时间, 以此更清楚地设计体外培养的方法来研究生理或病理反应过程.

心肌收缩和动作电位的产生是受到成熟相关的功能蛋白 (组织相容性复合物、肌钙蛋白、Cx36) 以及离子通道的调控. 这些关键蛋白的表达水平不仅受力学转导通路调控, 而且可以通过电刺激来调节. 对接种于培养板上细胞施加 6 d 的电刺激 (10 Hz, 1 V,



5 ms), 结果发现细胞排列更加有序且 Cx43 表达增加, 细胞长径比也增大 (Baumgartner et al. 2015). 另外还发现人 ether-a-go-go 基因 (HERG) 相关的电压门控钾离子通道 Kcnh2 在施加电刺激时表达上调 (Curran et al. 1995, Volberg et al. 2002). 上述结果均证明体外施加电刺激对于信号通路的成熟和发育非常重要. 因此, 电刺激可以提高心肌细胞成熟, 刺激的频率和电压大小的不同也同样影响心肌细胞的行为.

在基于各种材料的三维心肌组织构建研究中, 均显示与电刺激相结合有助于干细胞向心肌细胞表型分化, 并改善心肌细胞的功能 (Barash et al. 2010; Chiu et al. 2011; Kapur 2011; Maidhof et al. 2012; Park et al. 2014; Pietronave et al. 2013; Tandon et al. 2009, 2011; Wang et al. 2013). 大多数用于细胞培养的生物材料并不具有导电性, 因此需要通过外加电刺激实现心肌组织的同步收缩, 也可通过添加导电材料如碳纳米管和石墨烯等提高支架的导电性 (Dvir et al. 2011, Martins et al. 2014, Shin et al. 2013, You et al. 2011, Zhou et al. 2014). Radisic 等研究了电刺激在心肌组织形成和成熟中的作用, 将心肌细胞和心肌成纤维细胞包埋于胶原中, 培养 3 d 后连续 5 d 施加电脉冲刺激 (2 ms、5 V/cm、1 Hz) 模拟体内心肌的电学微环境 (Zhao et al. 2016). 施加电刺激后心肌组织的电信号传导和收缩特性有所改善, 不仅提高了 MHC、Cx43、肌酸激酶 MM 和 cTnI 的表达, 而且心肌细胞收缩力也有显著增强, 收缩频率增加且实现同步收缩 (Zhao et al. 2016). 在另一研究中, 通过使用 L 型钙通道、间隙连接和 PI3K 通路阻断剂, 确认了功能性间隙连接、细胞骨架和兴奋收缩耦合是实现组织收缩的必要条件 (Zhao et al. 2016). 此外, 在培养 3 d 开始刺激, 防止细胞内心肌蛋白的积累, 限制心肌细胞成熟和收缩 (Radisic et al. 2007), 建立了精确的控制刺激条件, 并了解了刺激前、刺激时和刺激后心肌细胞表型的变化. 在另一研究中, 三维心肌组织由单层二维细胞层叠而成, 仅一天的电刺激加载就使层与层之间的电导-收缩耦合明显增强 (Shimizu et al. 2002), 这表明电刺激可促进心肌组织耦合的过程中建立同步收缩.

此外, 研究者也将电刺激与小分子结合, 如将小分子的传递、整合素结合的改变, 或材料表面结构特性的调控、生长因子的传递与电刺激结合. 例如, IGF-1 可以防止心肌细胞肥厚, 并在氧化应激以及受损后改善心肌生存状态 (Fujio et al. 2000, Huynh et al. 2010, Kajstura et al. 2001, Mehrhof et al. 2001, Park et al. 2014). 相比于单独施加电刺激或添加 IGF-1, 对有序 PGS 支架接种的心肌细胞施加 8 d 双因子刺激后 (2 ms 持续时间、5 V/cm 振幅、1 Hz 频率), 细胞直径显著增大且 Cx-43 表有所提高 (Park et al. 2014).

## 5.2 心肌力 - 电耦合微环境体外构建

如上所述, 在体外培养过程中单独施加力或电刺激可以改善心肌细胞的行为并促进其成熟. 心肌层细胞间的耦合促进电信号传播, 实现整个组织的同步收缩, 最终将血

液输送到身体 (Vunjak-Novakovic et al. 2010). 电兴奋和收缩耦合对心脏的功能都具有至关重要的作用. 因此, 了解三维培养时力-电刺激结合产生的相关生理效应, 对体外构建功能性心肌组织具有重要的作用.

### 5.2.1 心肌细胞三维剪切力-电耦合微环境

为了将营养和小分子输送到施加电刺激的组织中并同时提供基于流体的力学刺激, 研究者设计了培养基灌注和电刺激结合的生物反应器. 相比单独刺激或静态培养, 当同时进行灌注 (蠕动泵,  $18\mu\text{L}/\text{min}$ ) 和电刺激培养 ( $3\text{V}/\text{cm}$ ,  $3\text{Hz}$ , 单相方波) 时, 心肌细胞接种于粘连蛋白的有序支架上, 结果提高了 cTnT 表达并增加了收缩强度 (Maidhof et al. 2012). 在另一研究中, 对培养在海藻酸三维膜上的心肌细胞施加灌注和电刺激 ( $74.4\text{mA}/\text{cm}^2$ 、双相、 $1\text{Hz}$ ), 4d 后心肌细胞对成熟度有所促进 (增加伸长和条纹纤维以及 Cx43 表达) (Barash et al. 2010).

在另一研究中, 研究者对脱细胞心脏支架采用灌注和电刺激结合的方式进行三维心肌组织重建 (Momtahan et al. 2015, Ott et al. 2008). 将心肌细胞接种于老鼠脱细胞的心脏支架后, 通过灌注 (在左心房进, 通过主动脉瓣出) 充气 and 放气来填充心室, 实现流体和力学拉伸共同提供力学刺激 (Ott et al. 2008). 同时, 通过施加电刺激 ( $1\text{Hz}$ ,  $5\sim 20\text{V}$ ,  $2\text{ms}$ ) 以促进细胞之间的力电耦合. 实验结果显示, 培养 8d 后, 当刺激频率小于  $4\text{Hz}$  时, 心肌组织产生  $320\text{Pa}$  ( $2.4\text{mmHg}$ ) 的收缩压 (约为成年大鼠心脏功能的 2% 和人类 16 周胎儿心脏功能的 25%) (Johnson et al. 2000), 但当刺激高于  $4\text{Hz}$  时收缩压降低. 这项研究表明灌注和电刺激结合在脱细胞心脏体系中的可行性, 以及用它来构建功能性心脏模型的潜能.

### 5.2.2 心肌细胞三维力学拉伸-电耦合微环境构建

为了更真实地模拟在体心肌组织的生理特征, 研究者开发了力学拉伸和电刺激结合的生物反应器 (Feng et al. 2005, Isenberg & Tranquillo 2003, Lu et al. 2013, Miklas et al. 2014, Morgan & Black 2014, Wang et al. 2013), 以期将模拟心室填充过程的力学刺激与电刺激结合以实现心肌组织的同步收缩 (如图 5). 具体是通过电场对整个组织施加电刺激, 而通过物理拉伸对心肌组织施加应变刺激. 最早的力-电反应器系统是单轴拉伸, 展示了平台的可行性和可调节性 (Feng et al. 2005). 研究者对第一个生物反应器采取了多种方式的改进, 包括增加测试的样本数量和提高刺激参数的精确度. Morgan 等基于先前力学刺激的系统设计了生物反应器单元 (Morgan & Black III 2014, Morgan & Black 2014), 进一步在组织周围添加两个单独碳棒来施加电刺激. 这种组合系统提供仿生的力-电耦合刺激, 模拟了体内的等容收缩期. 原代心肌细胞培养在纤维水凝胶中, 通过“延迟”刺激机制 (在力学刺激开始  $0.49\text{s}$  后开始电刺激) 模仿等容收缩时

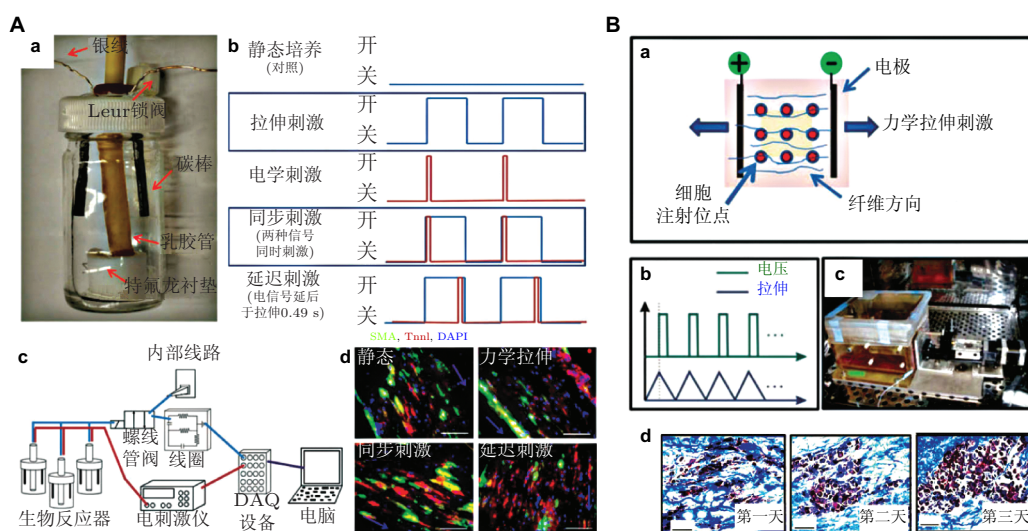


图 5

心肌力 - 电耦合微环境构建. (A) 一种结合气动扩张拉伸和电刺激的力 - 电耦合体外构建平台 (K. Y. Morgan & Black 2014): (a) 实物图显示了该力 - 电耦合生物反应器, 力学刺激由气动扩张产生, 电刺激由碳棒引入; (b) 实验设置了对照组、单独力学拉伸组、单独电刺激组、力 - 电同步刺激组和模拟在体心肌的力 - 电延迟刺激组; (c) 示意图显示了通过电脑实现对生物反应器的力 - 电刺激的独立调控; (d) 功能蛋白染色结果显示, 相比对照组和力 - 电单独刺激组, 两种力 - 电耦合刺激方法能够促进心肌功能蛋白的表达, 并且在模拟心肌等容收缩的力 - 电延迟刺激组中, 肌钙蛋白的表达进一步增强. (B) 一种结合机械拉伸和电刺激的力 - 电耦合体外构建平台 (Wang et al. 2013): (a) 示意图展示了在对培养了心肌细胞的材料进行机械拉伸的同时用平行电极施加电刺激; (b) 刺激方案展示了力学拉伸和电刺激的波形; (c) 生物反应器实物图; (d) 力 - 电耦合刺激 1d、2d 和 4d 组织 Masson 染色结果显示出肌纤维结构的形成和随时间增多 (红色区域), 证明了该刺激方法对心肌组织形成和成熟的促进作用

间, 与其他条件相比 SERCA2 表达增强, 而与静态培养或力、电单独刺激的培养组相比, Akt1 表达增强 (Morgan & Black 2014). 随后的研究也表明, 进一步改变力和电刺激的加载时间, 会促进收缩力的产生和松弛率的降低, 表明这种类型的系统可用于研究心律失常疾病状态下心肌组织的功能变化 (Morgan & Black 2014).

Miklas 等研发了一个力 - 电生物反应器平台, 包含有 8 个微组织和两个电极, 每个电极可同时对四个微组织施加电刺激, 与之前的设计相比实现了高通量 (Miklas et al. 2014). 对于这些微组织, 同时采用气动驱动的拉伸设备对组织施加静态压力, 且通过观察 PDMS 柱的形变来观测每个微孔中组织的拉伸情况. 相比单独的力或电刺激, 在 5% 静态应变 5% 和 3~4 V/cm, 1 Hz 的电刺激下组织培养 3 d 后呈现出排列有序的

肌节 (cTnT), 且间隙连接蛋白的表达 (Cx43) 增强 (Miklas et al. 2014). Wang 等开发了可在组织培养箱中实现力-电加载的培养平台, 可同时培养 2~4 个组织样品 (规格约为 3 mm × 20 mm × 20 mm), 通过对周期性拉伸的振幅和频率以及电脉冲频率实现精确调节, 使其与体内组织相匹配 (Wang et al. 2013). 为证明该设计的有效性, 研究者将脱细胞的猪心肌层作为支架材料, MSC 作为细胞源, 验证 5-氮杂胞苷 (24 h) 与力-电耦合刺激结合对提高 MSC 向心肌分化的效率. 实验结果显示, 经过两天的力学拉伸 (20%) 和电刺激 (5 V, 1 Hz), 心肌相关特异性蛋白包括  $\alpha$ -actin, MHC, cTnT, Cx43 和 N-钙黏着蛋白等均呈阳性表达. 上述结果均表明力学和电刺激耦合调控可进一步促进体外构建心肌组织的成熟化, 为临床应用提供重要的实验基础.

## 6 结论与展望

虽然目前研究已证实, 通过力学和电学微环境调控对心肌功能及干细胞分化为心肌细胞有着显著的影响, 但其在心肌组织构建中的应用仍然处在起步阶段. 近年来, 已有国外研究者发现能够通过调控干细胞的  $\beta$ -catenin 通路, 来实现高效的干细胞向心肌细胞的分化 (Lian et al. 2012). 目前国内研究者在该领域也取得了大量的研究成果, 杨黄恬课题组发现了多个能够影响干细胞向心肌细胞分化的信号通路, 利用细胞因子或基因修饰的方法促进了心肌细胞的分化效率和功能 (Cao et al. 2013, Tang et al. 2016); 龙勉课题组开展发现了基质材料的硬度和形貌等力学因素对间充质干细胞分化的影响的研究, 发现可通过调控基质材料的力学微环境来诱导干细胞的分化方向 (Li et al. 2013, Lu et al. 2014). 研究如何促进心肌细胞的分化, 以及使用干细胞分化得到心肌细胞构建功能化心肌组织的实验方法, 可以推进人源干细胞用于心肌组织工程的进程, 促进工程化心肌组织的临床治疗应用. 因此未来需要更多地研究如何利用力学和电学微环境促进干细胞向心肌细胞的分化, 并以此来构建具有临床应用潜力的工程化心肌组织.

关于力学刺激特别的问题是刺激时间变化的作用, 所有的研究都是以恒定的振幅和频率进行力学刺激, 但是力学刺激在体内是高度可变的. 由于高度可变性是健康的的心脏功能重要的组成部分, 因此力学刺激的变化可能会改善 3D 结构组织的成熟. 对于电学刺激而言, 未来的工作应该主要目标是优化重要的电刺激参数, 包括振幅、持续时间等, 以在体外实现更加成熟的功能性心肌组织. 基于在体心肌微环境, 体外对工程化心肌组织力-电微环境耦合调控是对心肌组织微环境更准确的重构, 且耦合的加载顺序、时间间隔、程度以及频率等条件对工程化心肌组织的生物学响应也起关键作用.

了解力-电微环境耦合调控对心肌组织的作用, 可更好地设计新颖且有效的生物



反应器用于体外构建具有完整功能的心肌组织. 可在体外构建的心肌组织应用在三个领域: 组织再生、疾病模型和药物测试 (Control & Prevention 2014, Corona et al. 2013, Xiao et al. 2014). 心肌力 - 电微环境构建用于工程化组织再生通过获得来自患者的特殊细胞, 体外在三维生物支架材料上进行培养, 然后将细胞与材料移植到体内患者受损的部位, 通过增殖、生长和分化形成新的组织, 而此时材料经过一定时间后完全降解. 细胞、支架材料和细胞因子可以同时结合使用, 也可以独立用来构建工程化的心肌组织. 而由于在体心肌细胞所处特殊的微环境, 使得在体外通过施加力 - 电刺激促进心肌细胞生长和分化以及组织的形成, 可一定程度提高心肌细胞的成熟度, 最终构建完整的具有一定功能的心肌组织.

鉴于心血管疾病和各种继发症的患病率上升且死亡率增加的趋势 (Control & Prevention 2014, Thom et al. 2006), 目前急需建立体外心脏疾病模型, 从而更好地理解发病机制及其寻找有效的治疗手段. 可实现力 - 电加载的生物反应器为体外构建病理状态下的疾病模型, 模拟疾病状态下的力 - 电微环境, 甚至为疾病的发展过程提供了可能的研究平台. Morgan 等设计反应器可调节力学刺激的强度和持续时间以及电刺激的频率和时间模拟心脏相关疾病, 进而研究疾病状态下心肌细胞的生物学响应. 力 - 电刺激生物反应器系统可调控力 - 电刺激的时间, 因此能够模仿发育过程中发生病变心肌细胞和心肌组织. 比如主动脉瓣狭窄和心脏衰竭等. 主动脉瓣狭窄患者主要是主动脉瓣不完全开放, 即保留左心室收缩功能等容收缩时间下降, 左心室收缩功能发生下降时, 等容收缩时间下降. 收缩的延迟可能是由于左心室排出血液长时间通过阻塞的主动脉瓣, 导致的结果后负荷增加和收缩减慢. 因此可以通过调节延迟外加力学刺激的时间来模拟这一过程. 研究者们开发了一些可以制备高通量、微型的体外心肌组织设备 (例如微流体通道、微设备和细胞芯片) 用于模拟体内心肌组织功能和测试药物及浓度对心肌组织的影响. 在一个研究中, 一种芯片被设计用于高通量分析心肌细胞在不同性能基底 (排列) 或小分子浓度 (异丙肾上腺素) 时的响应 (Agarwal et al. 2013). 这个芯片能够连续测量舒张和收缩应力 (Agarwal et al. 2013, Wang et al. 2014). 此心肌芯片设备已经应用于诸多方面, 例如疾病模型的发展 (巴氏综合症) 和药物筛选 (Bhatia & Ingber 2014, Chan et al. 2013, Esch et al. 2014), 未来也可以用于干细胞分化和共培养 (Farouz et al. 2015). 最后, 另一个优势是在体外研究体内的可变性和不规则性. 鉴于心率和舒张压变量在大多个人中是多变的, 未来的工作可了解振幅和速率变化在维持组织功能的作用 (Cysarz et al. 2007, Musialik-Lydka et al. 2003).

**致谢** 国家自然科学基金 (81401270, 11372243, 11522219, 11532009)、陕西省自然科学基金基础研究计划 (2015JM3108)、徐峰和张晓慧的青年千人计划项目资助.



## 参考文献

- 陈新. 2009. 临床心律失常学. 北京: 人民卫生出版社 (Chen X. 2009. Clinical Arrhythmology. Beijing: People's Medical Publishing House).
- 陈焱. 2015. 静电纺丝纳米纤维支架诱导 iPS 细胞心肌分化及机制研究. 西安: 第四军医大学 (Chen Y. 2015. Electrospun Nanofibrous Scaffold Induces Cardiomyocyte Differentiation of iPS Cell and Its Mechanism. Xi'an: Fourth Military Medical University).
- 戴辰程, 李文秀, 肖燕燕, 金梅, 韩玲. 2014. 心室预激性扩张型心肌病临床特点分析. 中华实用儿科临床杂志, **29**: 683-686 (Dai C C, Li W X, Xiao Y Y, Jin M, Han L. 2014. Clinical characteristics of ventricular preexcitation dilated cardiomyopathy induced by accessory pathway. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, **29**: 683-686).
- 段翠密, 常海霞, 郭希民, 赵云山, 何文俊, 江红, 王常勇. 2006. 力学刺激在工程化心肌组织结构和功能改建中的作用研究. 组织工程与重建外科杂志, **2**: 12-15 (Duan C M, Chang H X, Guo X M, Zhao Y S, He W J, Jiang H, Wang C Y. Effects of mechanical stimulation on the structural and functional remodeling of engineered cardiac muscle. *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery*, **2**: 12-15).
- 郭继鸿. 2003. 缝隙连接与心脏的传导. 临床心电学杂志, **12**: 194-199 (Guo J H. 2003. Gap junction and electrical transmission in heart. *Journal of Clinical Electrocardiology*, **12**: 194-199).
- 郝嘉, 游凯, 肖颖彬. 2011. 心肌成纤维细胞的特性和调节. 心血管病学进展, **32**: 405-408 (He J, You K, Xiao Y B. 2011. Characteristics and regulation of cardiac fibroblasts. *Advances in Cardiovascular Diseases*, **32**: 405-408).
- 贾欣华, 冯建涛, 敖卓, 孙全梅, 韩东, 刘元生. 2014. 高血压心肌肥厚状态下心肌细胞微尺度刚度变化的实验研究. 电子显微学报, **33**: 264-270 (Jia X H, Feng J T, Ao Z, Sun Q M, Han D, Liu Y S. 2014. Stiffness study on myocardium from hypertension-associated hypertrophy at micro scales. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, **33**: 264-270).
- 况薇, 唐敏, 何学令, 吴文超, 刘小菁, 李良. 2014. 周期性拉伸应变对大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的影响. 生物医学工程学杂志, **31**: 596-600 (Kuang W, Tang M, He X L, Wu W C, Liu X J, Li L. 2014. Differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cell into cardiomyocyte-like cells induced by cyclic stretching strain. *Journal of Biomedical Engineering*, **31**: 596-600).
- 梁仔萍, 董十月, 沈贵林, 张永乐. 2014. 中西医结合治疗急性冠脉综合征 (热结血瘀证) 临床观察. 中国中医急症, **23**: 2313-2315 (Rong Z P, Dong S Y, Shen G L, Zhang Y L. 2014. Clinical study on integrative medicine treatment for acute coronary syndrome. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, **23**: 2313-2315).
- 王佳南, 张晓刚, 郑丽娜, 汤为学. 2009. 仿生电刺激在离体心肌诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化中的作用. 解放军医学杂志, **34**: 537-540 (Wang J N, Zhang X G, Zheng L N, Tang W X. 2009. Effects of biomimetic electrical stimulation on inducing differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells in isolated myocardium. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, **34**: 537-540).
- 魏严, 张西正, 郭勇, 李瑞欣, 吴金辉, 闫玉仙, 张永红. 2009. 体外培养心肌细胞代谢和微管蛋白对拉伸应变的响应. 中国生物医学工程学报, **28**: 421-427, 438 (Wei Y, Zhang X Z, Guo Y, Li R X, Wu J H, Yan Y X, Zhang Y H. 2009. The response of metabolism and tubulin of cardiac myocytes in vitro to mechanical stretch. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, **28**: 421-427, 438).
- 徐正平, 周睿. 2014. 依折麦布联合阿托伐他汀治疗急性冠脉综合征的临床疗效. 实用临床医药杂

- 志, **18**: 110-111 (Xu Z P, Zhou R. 2014. The clinical effect of Ezetimibe combining atorvastatin for the treatment of acute coronary syndrome. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, **18**: 110-111).
- 薛梅, 梁涛, 邱建丽, 刘波. 2014. 心脏移植受者生存质量现状的研究. 中华护理杂志, **49**: 924-927 (Xue M, Liang T, Qiu J L, Liu B. 2014. Quality of life in heart transplantation recipients. *Chinese Journal of Nursing*, **49**: 924-927).
- 杨作成. 2014. 儿童扩张型心肌病合并心律失常诊治. 中国实用儿科杂志, **29**: 654-658 (Yang Z C. 2014. Diagnosis and treatment of dilated cardiomyopathy combined with arrhythmia in children. *Cardiovascular Disease Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, **29**: 654-658).
- 余承高. 1985. 心肌细胞间的连接和信息交通. 生理科学进展, 70-73 (Yu C G. 1985. Gap junction and communication between cardiomyocytes. *Progress in Physiological Sciences*, 70-73).
- 张惊, 王永武. 2007. 心肌组织工程研究进展. 心脏杂志, **19**: 230-231 (Zhang L, Wang Y W. 2007. Research progress in cardiac tissue engineering. *Chinese Heart Journal*, **19**: 230-231).
- 张颖, 郑燕倩, 王红卫, 杨智昉, 刘远谋, 李慈珍. 2007. 新生大鼠心肌细胞培养及电生理特性观察. 上海交通大学学报 (医学版), **27**: 398-400 (Zhang Y, Zheng Y, Wang H, Yang Z, Liu Y, Li C. 2007. Method for culturing neonatal rat cardiac myocytes and observation of its electrophysiological properties. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, **27**: 398-400).
- Abbott A. 2003. Cell culture: Biology's new dimension. *Nature*, **424**: 870-872.
- Abraham W T, Fisher W G, Smith A L, Delurgio D B, Leon A R, Loh E, Kocovic D Z, Packer M, Clavell A L, Hayes D L, Ellestad M, Trupp R J, Underwood J, Pickering F, Truex C, McAtee P, Messenger J. 2002. Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med*, **346**:1845-1853.
- Agarwal A, Goss J A, Cho A, McCain M L, Parker K K. 2013. Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies. *Lab on a Chip*, **13**: 3599-3608.
- Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Zhu W, Kadowaki T, Yazaki Y. 1999. Rho family small G proteins play critical roles in mechanical stress-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Circ Res*, **84**: 458-466.
- Annabi N, Shin S R, Tamayol A, Miscuglio M, Bakooshi M A, Assmann A, Mostafalu P, Sun J Y, Mithieux S, Cheung L, Tang X S, Weiss A S, Khademhosseini A. 2015. Highly elastic and conductive human-based protein hybrid hydrogels. *Advanced Materials*, **28**: 40.
- Arrenberg A B, Stainier D Y, Baier H, Huisken J. 2010. Optogenetic control of cardiac function. *Science*, **330**: 971-974.
- Bajaj P, Tang X, Saif T A, Bashir R. 2010. Stiffness of the substrate influences the phenotype of embryonic chicken cardiac myocytes. *J Biomed Mater Res A*, **95**: 1261-1269.
- Baker E L, Zaman M H. 2010. The biomechanical integrin. *J Biomech*, **43**: 38-44.
- Banerjee I, Fuseler J W, Price R L, Borg T K, Baudino T A. 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **293**: H1883-1891
- Barash Y, Dvir T, Tandeitnik P, Ruvinov E, Guterman H, Cohen S. 2010. Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **16**: 1417-1426.
- Baumgartner S, Halbach M, Krausgrill B, Maass M, Srinivasan S P, Sahito R G. 2015. Electrophysiological and morphological maturation of murine fetal cardiomyocytes during electrical stimulation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, **20**: 104-112.

- Beauchamp P, Desplantez T, McCain M L, Li W, Asimaki A, Rigoli G, Parker K K, Saffitz J E, Kleber A G. 2012. Electrical coupling and propagation in engineered ventricular myocardium with heterogeneous expression of connexin43. *Circ Res*, **110**: 1445-1453.
- Bernardo B C, Weeks K L, Pretorius L, McMullen J R. 2010. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, **128**: 191-227.
- Bett G C, Sachs F. 1997. Cardiac mechanosensitivity and stretch-activated ion channels. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **7**: 4.
- Bhana B, Iyer R K, Chen W L, Zhao R, Sider K L, Likhitpanichkul M, Simmons C A, Radisic M. 2010. Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells. *Biotechnol Bioeng*, **105**: 1148-1160.
- Bhandari J, Mishra H, Mishra P K, Wimmer R W, Ahmad F J, Talegaonkar S. 2017. Cellulose nanofiber aerogel as a promising biomaterial for customized oral drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, **12**: 2021-2031.
- Bhatia S N, Ingber D E. 2014. Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology*, **32**: 760-772.
- Bierhuizen M F, Boulaksil M, van Stuijvenberg L, van der Nagel R, Jansen A T, Mutsaers N A M, Yildirim C, van Veen T A B, de Windt L J. 2008. In calcineurin-induced cardiac hypertrophy expression of Na V 1.5, Cx40 and Cx43 is reduced by different mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*, **45**: 373-384.
- Birla R K, Huang Y C, Dennis R G. 2007. Development of a novel bioreactor for the mechanical loading of tissue-engineered heart muscle. *Tissue Eng*, **13**: 2239-2248.
- Black L D 3rd, Meyers J D, Weinbaum J S, Shvelidze Y A, Tranquillo R T. 2009. Cell-induced alignment augments twitch force in fibrin gel-based engineered myocardium via gap junction modification. *Tissue Engineering Part A*, **15**: 3099-3108.
- Black L D 3rd, Meyers J D, Weinbaum J S, Shvelidze Y A, Tranquillo R T. 2009. Cell-induced alignment augments twitch force in fibrin gel-based engineered myocardium via gap junction modification. *Tissue Eng Part A*, **15**: 3099-3108.
- Boudou T, Legant W R, Mu A, Borochin M A, Thavandiran N, Radisic M, Zandstra P W, Epstein J A, Margulies K B, Chen C S. 2012. A microfabricated platform to measure and manipulate the mechanics of engineered cardiac microtissues. *Tissue Eng Part A*, **18**: 910-919.
- Brevet A, Pinto E, Peacock J, Stockdale F E. 1976. Myosin synthesis increased by electrical stimulation of skeletal muscle cell cultures. *Science*, **193**: 1152-1154.
- Brown M A, Iyer R K, Radisic M. 2008. Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Prog*, **24**: 907-920.
- Cao N, Liang H, Huang J J, Wang J, Chen Y X, Chen Z Y, Yang H T. 2013. Highly efficient induction and long-term maintenance of multipotent cardiovascular progenitors from human pluripotent stem cells under defined conditions. *Cell Research*, **23**: 1119-1132.
- Cha J M, Park S N, Noh S H, Suh H. 2006. Time-dependent modulation of alignment and differentiation of smooth muscle cells seeded on a porous substrate undergoing cyclic mechanical strain. *Artif Organs*, **30**: 250-258.
- Chan C Y, Huang P-H, Guo F, Ding X, Kapur V, Mai J D, Yuen P K, Huang T J. 2013. Accelerating drug discovery via organs-on-chips. *Lab on a Chip*, **13**: 4697-4710.
- Chaudhuri O, Mooney D J. 2012. Stem-cell differentiation: Anchoring cell-fate cues. *Nat Mater*, **11**: 568-569.

- Chen Q-Z, Harding S E, Ali N N, Lyon A R, Boccaccini A R. 2008. Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, **59**: 1-37.
- Chi N C, Bussen M, Brand-Arzamendi K, Ding C, Olgin J E, Shaw R M, Martin G R, Stainier D Y. 2010. Cardiac conduction is required to preserve cardiac chamber morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**: 14662-14667.
- Chi N C, Shaw R M, Jungblut B, Huisken J, Ferrer T, Arnaout R, Scott I, Beis D, Xiao T, Baier H, Jan L Y, Tristani-Firouzi M, Stainier D Y. 2008. Genetic and physiologic dissection of the vertebrate cardiac conduction system. *PLoS Biol*, **6**: e109.
- Chiu L, Iyer R K, Reis L A, Nunes S S, Radisic M. 2011. Cardiac tissue engineering: current state and perspectives. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, **17**: 1533-1550.
- Conti C R. 2006. Cardiac resynchronization therapy for chronic heart failure: why does it not always work? *Clin Cardiol*, **29**: 335-336.
- Control C F D, Prevention. 2014. National diabetes statistics report: Estimates of diabetes and its burden in the United States, 2014. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services.
- Corona B T, Ward C L, Baker H B, Walters T J, Christ G J. 2013. Implantation of in vitro tissue engineered muscle repair constructs and bladder acellular matrices partially restore in vivo skeletal muscle function in a rat model of volumetric muscle loss injury. *Tissue Engineering Part A*, **20**: 705-715.
- Crespo L M, Grantham C J, Cannell M B. 1990. Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature*, **345**: 618-621.
- Crosara-Alberto D P, Inoue R Y, Costa C R C. 2009. FAK signalling mediates NF- $\kappa$ B activation by mechanical stress in cardiac myocytes. *Clinica Chimica Acta*, **403**: 81-86.
- Curran M E, Splawski I, Timothy K W, Vincen G M, Green E D, Keating M T. 1995. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*, **80**: 795-803.
- Cysarz D, Lange S, Matthiessen P F, Van Leeuwen P. 2007. Regular heartbeat dynamics are associated with cardiac health. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **292**: R368-R372.
- Czarnecka D, Kusiak A, Wilinski J, Styczkiewicz K, Wojciechowska W, Bacior B. 2010. Effects of cardiac resynchronization therapy on sleep apnea, quality of sleep and daytime sleepiness in patients with chronic heart failure. *Przegl Lek*, **67**: 1249-1252.
- Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. 2008. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev*, **60**: 215-228.
- DeBosch B, Treskov I, Lupu T S, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin A J. 2006. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*, **113**: 2097-2104.
- Dhein S, Schreiber A, Steinbach S, Apel D, Salameh A, Schlegel F, Kostelka M, Dohmen P M, Mohr F W. 2014. Mechanical control of cell biology. Effects of cyclic mechanical stretch on cardiomyocyte cellular organization. *Prog Biophys Mol Biol*, **115**: 93-102.
- DiFrancesco D, Tortora P. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, **351**: 145-147.
- Dorn T, Goedel A, Lam J T, Haas J, Tian Q, Herrmann F, Bundschu K, Dobрева G, Schiemann M, Dirschinger R, Guo Y, Kühl S J, Sinnecker D, Lipp P, Laugwitz K L, Kühl M, Moretti A. 2015. Direct nkx2-5 transcriptional repression of is1 controls cardiomyocyte subtype identity. *Stem Cells*, **33**: 1113-1129.



- Dvir T, Timko B P, Brigham M D, Naik S R, Karajanagi S S, Levy O, Jin H, Parker K K, Langer R, Kohane D S. 2011. Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nature Nanotechnology*, **6**: 720-725.
- Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan T Y, Ruan H, Wang Y, Toro L, Stefani E. 2005. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res*, **96**: 1208-1216.
- Endo M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiological Reviews*, **57**: 71-108.
- Engler A J, Carag-Krieger C, Johnson C P, Raab M, Tang H Y, Speicher D W, Sanger J W, Sanger J M, Discher D E. 2008. Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: Scar-like rigidity inhibits beating. *J Cell Sci*, **121**: 3794-3802.
- Engler A J, Griffin M A, Sen S, Bonnemann C G, Sweeney H L, Discher D E. 2004. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol*, **166**: 877-887.
- Engler A J, Sen S, Sweeney H L, Discher D E. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, **126**: 677-689.
- Esch M B, Smith A S, Prot J-M, Oleaga C, Hickman J J, Shuler M L. 2014. How multi-organ microdevices can help foster drug development. *Adv Drug Deliv Rev*, **69**: 158-169.
- Fabiato A. 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology*, **245**: C1.
- Fahrenbach J P, Mejia-Alvarez R, Banach K. 2007. The relevance of non-excitabile cells for cardiac pacemaker function. *J Physiol*, **585**: 565-578.
- Fallacara A, Manfredini S, Durini E, Vertuani S. 2017. Hyaluronic Acid Fillers in Soft Tissue Regeneration. *Facial Plastic Surgery*, **33**: 087-096.
- Farouz Y, Chen Y, Terzic A, Menasché P. 2015. Concise review: Growing hearts in the right place: On the design of biomimetic materials for cardiac stem cell differentiation. *Stem Cells*, **33**: 1021-1035.
- Feng Z, Matsumoto T, Nomura Y, Nakamura T. 2005. An electro-tensile bioreactor for 3-D culturing of cardiomyocytes. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, **24**: 73-79.
- Feric N T, Radisic M. 2016. Maturing human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in human engineered cardiac tissues. *Adv Drug Deliv Rev*, **96**: 110-134.
- Ferrarini M, Arsic N, Recchia F A, Zentilin L, Zacchigna S, Xu X, et al. 2006. Adeno-associated virus-mediated transduction of VEGF165 improves cardiac tissue viability and functional recovery after permanent coronary occlusion in conscious dogs. *Circ Res*, **98**: 954-961.
- Fink C, Ergün S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. 2000. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *The FASEB Journal*, **14**: 669-679.
- Forte G, Pagliari S, Ebara M, Uto K, Tam J K, Romanazzo S, Escobedo-Lucea C, Romano E, Di Nardo P, Traversa E, Aoyagi T. 2012. Substrate stiffness modulates gene expression and phenotype in neonatal cardiomyocytes in vitro. *Tissue Eng Part A*, **18**: 1837-1848.
- Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis R N, Walsh K. 2000. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*, **101**: 660-667.
- Galie P A, Byfield F J, Chen C S, Kresh J Y, Janmey P A. 2015. Mechanically stimulated contraction of engineered cardiac constructs using a microcantilever. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, **62**: 438-442.
- Galie P A, Khalid N, Carnahan K E, Westfall M V, Stegemann J P. 2013. Substrate stiffness affects

- sarcomere and costamere structure and electrophysiological function of isolated adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Pathol*, **22**: 219-227.
- Galie P A, Stegemann J P. 2011. Simultaneous application of interstitial flow and cyclic mechanical strain to a three-dimensional cell-seeded hydrogel. *Tissue Eng Part C Methods*, **17**: 527-536.
- Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. 2014. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1840**: 2506-2519.
- Gershlak J R, Resnikoff J I, Sullivan K E, Williams C, Wang R M, Black L D. 2013. Mesenchymal stem cells ability to generate traction stress in response to substrate stiffness is modulated by the changing extracellular matrix composition of the heart during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **439**:161-166.
- Ghafar-Zadeh E, Waldeisen J R, Lee L P. 2011. Engineered approaches to the stem cell microenvironment for cardiac tissue regeneration. *Lab Chip*, **11**: 3031-3048.
- Griffin M A, Engler A J, Barber T A, Healy K E, Sweeney H L, Discher D E. 2004. Patterning, prestress, and peeling dynamics of myocytes. *Biophys J*, **86**: 1209-1222.
- Gros D, Théveniau-Ruissy M, Bernard M, Calmels T, Kober F, Söhl G, Willecke K, Nargeot J, Jongasma H J, Mangoni M E. 2010. Connexin 30 is expressed in the mouse sino-atrial node and modulates heart rate. *Cardiovasc Res*, **85**: 45-55.
- Haggart C R, Ames E G, Lee J K, Holmes J W. 2014. Effects of stretch and shortening on gene expression in intact myocardium. *Physiol Genomics*, **46**: 57-65.
- Hazeltine L B, Simmons C S, Salick M R, Lian X, Badur M G, Han W, Delgado S M, Wakatsuki T, Crone W C, Pruitt B L, Palecek S P. 2012. Effects of substrate mechanics on contractility of cardiomyocytes generated from human pluripotent stem cells. *Int J Cell Biol*, **2012**: 508294.
- Hench L L, Polak J M. 2002. Third-generation biomedical materials. *Science*, **295**: 1014-1017.
- Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, **105**: 631-638.
- Hoh J F, McGrath P A, Hale P T. 1978. Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J Mol Cell Cardiol*, **10**: 1053-1076.
- Holle A W, Engler A J. 2011. More than a feeling: Discovering, understanding, and influencing mechanosensing pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**: 648-654.
- Hsiao C W, Bai M Y, Chang Y, Chung M F, Lee T Y, Wu C T, Maiti B, Liao Z X, Li R K, Sung H W. 2013. Electrical coupling of isolated cardiomyocyte clusters grown on aligned conductive nanofibrous meshes for their synchronized beating. *Biomaterials*, **34**: 1063-1072.
- Huebsch N, Arany P R, Mao A S, Shvartsman D, Ali O A, Bencherif S A, Rivera-Feliciano J, Mooney D J. 2010. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater*, **9**: 518-526.
- Huynh K, McMullen J R, Julius T L, Tan J W, Love J E, Cemerlang N, et al. 2010. Cardiac-specific IGF-1 receptor transgenic expression protects against cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, **59**: 1512-1520.
- Isenberg B C, Tranquillo R T. 2003. Long-term cyclic distention enhances the mechanical properties of collagen-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng*, **31**: 937-949.

- Ivashchenko C Y, Pipes G C, Lozinskaya I M, Lin Z, Xiaoping, X, Needle S, Grygielko E T, Hu E, Toomey J R, Lepore J J, Willette R N. 2013. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit temporal changes in phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **305**: H913-922.
- Jaalouk D E, Lammerding J. 2009. Mechanotransduction gone awry. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **10**: 63.
- Jacot J G, Martin J C, Hunt D L. 2010. Mechanobiology of cardiomyocyte development. *J Biomech*, **43**: 93-98.
- Jacot J G, McCulloch A D, Omens J H. 2008. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes. *Biophys J*, **95**: 3479-3487.
- Johnson P, Maxwell D, Tynan M, Allan L. 2000. Intracardiac pressures in the human fetus. *Heart*, **84**: 59-63.
- Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli A M, Li B, Chimenti S, Medow M S, Limana F, Nadal-Ginard B, Leri A, Anversa P. 2001. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes*, **50**: 1414-1424.
- Kapur N K. 2011. A clinical commentary on the articles “strategies for tissue engineering cardiac constructs to affect functional repair following myocardial infarction” and “stem cell-based cardiac tissue engineering”: repairing, reprogramming, and renewing: the promise of myocardial cytotherapeutics. *J Cardiovasc Transl Res*, **4**: 603-604.
- Khetan S, Katz J S, Burdick J A. 2009. Sequential crosslinking to control cellular spreading in 3-dimensional hydrogels. *Soft Matter*, **5**: 1601-1606.
- Kim D H, Lipke E A, Kim P, Cheong R, Thompson S, Delannoy M, Suh K Y, Tung L, Levchenko A. 2009. Nanoscale cues regulate the structure and function of macroscopic cardiac tissue constructs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**: 565-570.
- Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Kruger O, Traub O, Willecke K. 1998. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol*, **8**: 299-302.
- Kluge J A, Leisk G G, Cardwell R D, Fernandes A P, House M, Ward A, et al. 2011. Bioreactor system using noninvasive imaging and mechanical stretch for biomaterial screening. *Annals of Biomedical Engineering*, **39**: 1390-1402.
- Knollmann B C, Knollmann-Ritschel B E, Weissman N J, Jones L R, Morad M. 2000. Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing caldesmon. *J Physiol*, **525**: 483-498.
- Koizumi R, Azuma K, Izawa H, Morimoto M, Ochi K, Tsuka T, et al. 2017. Oral administration of surface-deacetylated chitin nanofibers and chitosan inhibit 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**: 279.
- Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Yazaki Y. 1996. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *The FASEB Journal*, **10**: 631-636.
- Kreuzberg M M, Sohl G, Kim J S, Verselis V K, Willecke K, Bukauskas F F. 2005. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ Res*, **96**: 1169-1177.
- Kruger M, Kotter S, Grutzner A, Lang P, Andresen C, Redfield M M, Butt E, dos Remedios C G, Linke W A. 2009. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, **104**: 87-94.

- Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. 2000. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development*, **127**: 3501-3512.
- Laflamme M A, Murry C E. 2011. Heart regeneration. *Nature*, **473**: 326-335.
- Lammerding J, Kamm R D, Lee R T. 2004. Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1015**: 53-70.
- Legant W R, Pathak A, Yang M T, Deshpande V S, McMeeking R M, Chen C S. 2009. Microfabricated tissue gauges to measure and manipulate forces from 3D microtissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: 10097-10102.
- LeGrice I J, Smaill B, Chai L, Edgar S, Gavin J, Hunter P J. 1995. Laminar structure of the heart: ventricular myocyte arrangement and connective tissue architecture in the dog. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **269**: H571-H582.
- Leychenko A, Konorev E, Jijiwa M, Matter M L. 2011. Stretch-induced hypertrophy activates NFkB-mediated VEGF secretion in adult cardiomyocytes. *PLoS One*, **6**: e29055.
- Li Z, Gong Y, Sun S, Du Y, Lu D, Liu X, Long M. 2013. Differential regulation of stiffness, topography, and dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, **34**: 7616-7625.
- Lian X, Zhang J, Azarin S M, Zhu K, Hazeltine L B, Bao X, Hsiao C, Kamp T J, Palecek S P. 2012. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature Protocols*, **8**: 162-175.
- Lieu D K, Fu J D, Chiamvimonvat N, Tung K C, McNeerney G P, Huser T, Keller G, Kong C W, Li R A. 2013. Mechanism-based facilitated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, **6**: 191-201.
- Liu M, Montazeri S, Jedlovsky T, Van Wert R, Zhang J, Li R K, et al. 1999. Bio-stretch, a computerized cell strain apparatus for three-dimensional organotypic cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **35**: 87-93.
- Lu D, Luo C, Zhang C, Li Z, Long M. 2014. Differential regulation of morphology and stemness of mouse embryonic stem cells by substrate stiffness and topography. *Biomaterials*, **35**: 3945-3955.
- Lu L, Mende M, Yang X, Korber H F, Schnittler H J, Weinert S, et al. 2013. Design and validation of a bioreactor for simulating the cardiac niche: A system incorporating cyclic stretch, electrical stimulation, and constant perfusion. *Tissue Eng Part A*, **19**: 403-414.
- Ma Y, Ji Y, Huang G, Ling K, Zhang X, Xu F. 2015. Bioprinting 3D cell-laden hydrogel microarray for screening human periodontal ligament stem cell response to extracellular matrix. *Biofabrication*, **7**: 044105.
- Macr-Pellizzeri L, Pelacho B, Sancho A, Iglesias-Garc-a O, Sim-on-Yarza A M, Soriano-Navarro M, Gonz-lez-Granero S, Garc-a-Verdugo J M, De-Juan-Pardo E M, Prosper F. 2015. Substrate stiffness and composition specifically direct differentiation of induced pluripotent stem cells. *Tissue Engineering Part A*, **21**: 1633-1641.
- Maidhof R, Tandon N, Lee E J, Luo J, Duan Y, Yeager K, Konofagou, Konofagou E, Vunjak-Novakovic G. 2012. Biomimetic perfusion and electrical stimulation applied in concert improved the assembly of engineered cardiac tissue. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **6**: e12-e23.
- Malhotra R, D'Souza K M, Staron M L, Birukov K G, Bodi I, Akhter S A. 2010. G $\alpha$ q-mediated activation of GRK2 by mechanical stretch in cardiac myocytes the role of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, **285**: 13748-13760.



- Mangoni M E, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. 2003. Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 5543-5548.
- Martins A, Araújo J V, Reis R L, Neves N M. 2017. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomedicine*, **2**: 929.
- Martins A M, Eng G, Caridade S G, Mano J O F, Reis R L, Vunjak-Novakovic G. 2014. Electrically conductive chitosan/carbon scaffolds for cardiac tissue engineering. *Biomacromolecules*, **15**: 635-643.
- Massai D, Cerino G, Gallo D, Pennella F, Deriu M, Rodriguez A, Montecvecchi F M, Bignardi C, Audenino A, Morbiducci U. 2013. Bioreactors as engineering support to treat cardiac muscle and vascular disease. *Journal of Healthcare Engineering*, **4**: 329-370.
- McDonough P M, Glembotski C C. 1992. Induction of atrial natriuretic factor and myosin light chain-2 gene expression in cultured ventricular myocytes by electrical stimulation of contraction. *J Biol Chem*, **267**: 11665-11668.
- McKinsey T A, Olson E N. 1999. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev*, **9**: 267-274.
- Mehrfhof F B, Müller F U, Bergmann M W, Li P, Wang Y, Schmitz W, Dietz R, von Harsdorf R. 2001. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation*, **104**: 2088-2094.
- Mesirca P, Torrente A G, Mangoni M E. 2015. Functional role of voltage gated Ca(2+) channels in heart automaticity. *Front Physiol*, **6**: 19.
- Mihic A, Cui Z, Wu J, Vlacic G, Miyagi Y, Li S H, Lu S, Sung H W, Weisel R D, Li R K. 2015. A conductive polymer hydrogel supports cell electrical signaling and improves cardiac function after implantation into myocardial infarct. *Circulation*, **132**: 772.
- Mihic A, Li J, Miyagi Y, Gagliardi M, Li S H, Zu J, Weisel R D, Keller G, Li R K. 2014. The effect of cyclic stretch on maturation and 3D tissue formation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials*, **35**: 2798-2808.
- Miklas J W, Nunes S S, Sofla A, Reis L A, Pahnke A, Xiao Y, Laschinger C, Radisic M. 2014. Bioreactor for modulation of cardiac microtissue phenotype by combined static stretch and electrical stimulation. *Biofabrication*, **6**: 024113.
- Momtahan N, Sukavaneshvar S, Roeder B L, Cook A D. 2015. Strategies and processes to decellularize and recellularize hearts to generate functional organs and reduce the risk of thrombosis. *Tissue Eng Part B Rev*, **21**: 115-132.
- Morgan K Y, Black L D 3rd. 2014. It's all in the timing: Modeling isovolumic contraction through development and disease with a dynamic dual electromechanical bioreactor system. *Organogenesis*, **10**: 317-322.
- Morgan K Y, Black L D 3rd. 2014. Mimicking isovolumic contraction with combined electromechanical stimulation improves the development of engineered cardiac constructs. *Tissue Eng Part A*, **20**: 1654-1667.
- Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, Arnett D K, Blaha M J, Cushman M, de Ferranti S, Després J P, Fullerton H J, Howard V J, Huffman M D, Judd S E, Kissela B M, Lackland D T, Lichtman J H, Lisabeth L D, Liu S, Mackey R H, Matchar D B, McGuire D K, Mohler E R 3rd, Moy C S, Muntner P, Mussolino M E, Nasir K, Neumar R W, Nichol G, Palaniappan L, Pandey D K, Reeves M J, Rodriguez C J, Sorlie

- P D, Stein J, Towfighi A, Turan T N, Virani S S, Willey J Z, Woo D, Yeh R W, Turner M B. 2015. Heart disease and stroke statistics—2015 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*, **131**: e29-322.
- Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, Arnett D K, Blaha M J, Cushman M, Das S R, de Ferranti S, Després J P, Fullerton H J, Howard V J, Huffman M D, Isasi C R, Jiménez M C, Judd S E, Kissela B M, Lichtman J H, Lisabeth L D, Liu S, Mackey R H, Magid D J, McGuire D K, Mohler E R 3rd, Moy C S, Muntner P, Mussolino M E, Nasir K, Neumar R W, Nichol G, Palaniappan L, Pandey D K, Reeves M J, Rodriguez C J, Rosamond W, Sorlie P D, Stein J, Towfighi A, Turan T N, Virani S S, Woo D, Yeh R W, Turner M B. 2006. Heart disease and stroke statistics—2006 update a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, **113**: e85-e151.
- Mummery C L, Zhang J, Ng E S, Elliott D A, Elefanty A G, Kamp T J. 2012. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*, **111**: 344-358.
- Musialik-Lydk A, Sredniawa B, Pasyk S. 2003. Heart rate variability in heart failure. *Kardiol Pol*, **58**: 10-16.
- Nadal-Ginard B, Mahdavi V. 1989. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *Journal of Clinical Investigation*, **84**: 1693.
- Nava M M, Raimondi M T, Pietrabissa R. 2012. Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues. *BioMed Research International*, **2012**: 797410.
- Nune S K, Rama K S, Dirisala V R, Chavali M Y. 2017. Chapter 11-Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds for tissue repair and regeneration. *Nanostructures for Novel Therapy*, 281-311.
- Nunes S S, Miklas J W, Liu J, Aschar-Sobbi R, Xiao Y, Zhang B, Jiang J, Massé S, Gagliardi M, Hsieh A, Thavandiran N, Laflamme M A, Nanthakumar K, Gross G J, Backx P H, Keller G, Radisic M. 2013. Biowire: A platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods*, **10**: 781-787.
- Ott H C, Matthiesen T S, Goh S K, Black L D, Kren S M, Netoff T I, Taylor D A. 2008. Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, **14**: 213-221.
- Park H, Larson B L, Kolewe M E, Vunjak-Novakovic G, Freed L E. 2014. Biomimetic scaffold combined with electrical stimulation and growth factor promotes tissue engineered cardiac development. *Experimental Cell Research*, **321**: 297-306.
- Passier R, Zeng H, Frey N, Naya F J, Nicol R L, McKinsey T A, Overbeek P, Richardson J A, Grant S R, Olson E N. 2000. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest*, **105**: 1395-1406.
- Pietronave S, Zamperone A, Oltolina F, Colangelo D, Follenzi A, Novelli E, Diena M, Pavesi A, Consolo F, Fiore G B, Soncini M, Prat M. 2013. Monophasic and biphasic electrical stimulation induces a precardiac differentiation in progenitor cells isolated from human heart. *Stem Cells Dev*, **23**: 888-898.
- Porter K E, Turner N A. 2009. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & Therapeutics*, **123**: 255-278.
- Radisic M, Euloth M, Yang L, Langer R, Freed L E, Vunjak-Novakovic G. 2003. High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng*, **82**: 403-414.
- Radisic M, Marsano A, Maidhof R, Wang Y, Vunjak-Novakovic G. 2008. Cardiac tissue engineering using

- perfusion bioreactor systems. *Nature Protocols*, **3**: 719-738.
- Radisic M, Park H, Gerecht S, Cannizzaro C, Langer R, Vunjak-Novakovic G. 2007. Biomimetic approach to cardiac tissue engineering. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **362**: 1357-1368.
- Radisic M, Yang L, Boublik J, Cohen R J, Langer R, Freed L E, et al. 2004. Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286**: H507-516.
- Rangarajan S, Madden L, Bursac N. 2014. Use of flow, electrical, and mechanical stimulation to promote engineering of striated muscles. *Annals of Biomedical Engineering*, **42**: 1391-1405.
- Reaume A G, de Sousa P A, Kulkarni S, Langille B L, Zhu D, Davies T C, Juneja S C, Kidder G M, Rossant J. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*, **267**: 1831-1834.
- Rockwood D N, Akins R E, Jr Parrag I C, Woodhouse K A, Rabolt J F. 2008. Culture on electrospun polyurethane scaffolds decreases atrial natriuretic peptide expression by cardiomyocytes in vitro. *Biomaterials*, **29**: 4783-4791.
- Rodriguez A G, Han S J, Regnier M, Sniadecki N J. 2011. Substrate stiffness increases twitch power of neonatal cardiomyocytes in correlation with changes in myofibril structure and intracellular calcium. *Biophys J*, **101**, 2455-2464.
- Roy M, Kusurkar T S, Maurya S K, Meena S K, Singh S K, Sethy N, et al. 2013. Graphene oxide from silk cocoon: A novel magnetic fluorophore for multi-photon imaging. *Biotech*, **4**: 67-75.
- Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik T J, Izumo S. 1992. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*, **267**: 10551-10560.
- Sadoshima J, Xu Y, Slayter H S, Izumo S. 1993. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*, **75**: 977-984.
- Salameh A, Karl S, Djilali H, Dhein S, Janousek J, Daehnert I. 2010a. Opposing and synergistic effects of cyclic mechanical stretch and alpha- or beta-adrenergic stimulation on the cardiac gap junction protein Cx43. *Pharmacol Res*, **62**: 506-513.
- Salameh A, Wustmann A, Karl S, Blanke K, Apel D, Rojas-Gomez D, Franke H, Mohr F W, Janousek J, Dhein S. 2010b. Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43. *Circ Res*, **106**: 1592-1602.
- Sandow A. 1952. Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J Biol Med*, **25**: 176-201.
- Sano M, Fukuda K, Sato T, Kawaguchi H, Suematsu M, Matsuda S, Koyasu S, Matsui H, Yamauchi-Takahara K, Harada M, Saito Y, Ogawa S. 2001. ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res*, **89**: 661-669.
- Sapir Y, Polyak B, Cohen S. 2014. Cardiac tissue engineering in magnetically actuated scaffolds. *Nanotechnology*, **25**: 014009.
- Schaub M, Hefti M A, Harder B A, Eppenberger H M. 1997. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *Journal of Molecular Medicine*, **75**: 901-920.
- Sedmera, D, Reckova, M, deAlmeida, A, Sedmerova, M, Biermann, M, Volejnik, J, et al. 2003. Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **284**: H1152-1160.
- Seki A, Nishii K, Hagiwara N. 2015. Gap junctional regulation of pressure, fluid force, and electrical fields

- in the epigenetics of cardiac morphogenesis and remodeling. *Life Sci*, **129**: 27-34.
- Shachar, M, Benishti, N, Cohen, S. 2012. Effects of mechanical stimulation induced by compression and medium perfusion on cardiac tissue engineering. *Biotechnol Prog*, **28**: 1551-1559.
- Shapira-Schweitzer K, Seliktar D. 2007. Matrix stiffness affects spontaneous contraction of cardiomyocytes cultured within a PEGylated fibrinogen biomaterial. *Acta Biomater*, **3**: 33-41.
- Sharp W W, Simpson D G, Borg T K, Samarel A M, Terracio L. 1997. Mechanical forces regulate focal adhesion and costamere assembly in cardiac myocytes. *Am J Physiol*, **273**: H546-556.
- Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, Shibata T, Isoi Y, Kikuchi A, et al. 2002. Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *Journal of Biomedical Materials Research*, **60**: 110-117.
- Shin S R, Jung S M, Zalabany M, Kim K, Zorlutuna P, Kim S B, Nikkhah M, Khabiry M, Azize M, Kong J, Wan KT, Palacios T, Dokmeci MR, Bae H, Tang XS, Khademhosseini A. 2013. Carbon-Nanotube-Embedded Hydrogel Sheets for Engineering Cardiac Constructs and Bioactuators. *ACS Nano*, **7**: 2369-2380.
- Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, Rosenzweig A, Kahn C R, Abel E D, Walsh K. 2002. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 37670-37677.
- Shyu K G, Wang B W, Lin C M, Chang H. 2010. Cyclic stretch enhances the expression of toll-like receptor 4 gene in cultured cardiomyocytes via p38 MAP kinase and NF-kappaB pathway. *J Biomed Sci*, **17**: 15.
- Sigurdson W, Ruknudin A, Sachs F. 1992. Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels. *Am J Physiol*, **262**: H1110-1115.
- Simmons C S, Petzold B C, Pruitt B L. 2012. Microsystems for biomimetic stimulation of cardiac cells. *Lab on a Chip*, **12**: 3235-3248.
- Simpson D G, Sharp W W, Borg T K, Price R L, Samarel A M, Terracio L. 1995. Mechanical regulation of cardiac myofibrillar structure. *Ann N Y Acad Sci*, **752**: 131-140.
- Simpson D G, Sharp W W, Borg T K, Price R L, Terracio L, Samarel A M. 1996. Mechanical regulation of cardiac myocyte protein turnover and myofibrillar structure. *Am J Physiol*, **270**: C1075-1087.
- Smart S K, Cassady A I, Lu G Q, Martin D J. 2006. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*, **44**: 1034-1047.
- Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges P C, Janmey P A. 2007. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J*, **93**: 4453-4461.
- Souders C A, Bowers S L, Baudino T A. 2009. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*, **105**: 1164-1176.
- Stoppel W L, Hu D, Domian I J, Kaplan D L, Black L D 3rd. 2015. Anisotropic silk biomaterials containing cardiac extracellular matrix for cardiac tissue engineering. *Biomed Mater*, **10**: 034105.
- Storm C. 2005. Nonlinear Elasticity in Biological Gels. *Nature*, **435**: 191-194.
- Storm C, Pastore J J, MacKintosh F C, Lubensky T C, Janmey P A. 2005. Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature*, **435**: 191-194.
- Shin S R, Jung S M, Zalabany M, Kim K, Zorlutuna P, Kim S B, Nikkhah M, Khabiry M, Azize M, Kong J, Wan K T, Palacios T, Dokmeci M R, Bae H, Tang X S, Khademhosseini A. 2013. Carbon-nanotube-embedded hydrogel sheets for engineering cardiac constructs and bioactuators. *ACS Nano*, **7**: 2369-2380.



- Sullivan K E, Black L D. 2013. The role of cardiac fibroblasts in extracellular matrix-mediated signaling during normal and pathological cardiac development. *J Biomech Eng*, **135**: 71001.
- Sutton M G S J, Sharpe N. 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*, **101**: 2981-2988.
- Takahashi N, Seko Y, Noiri E, Tobe K, Kadowaki T, Sabe H, et al. 1999. Vascular endothelial growth factor induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125FAK) in cultured rat cardiac myocytes. *Circ Res*, **84**: 1194-1202.
- Tallawi M, Rai R, Boccaccini A R, Aifantis K E. 2015. Effect of substrate mechanics on cardiomyocyte maturation and growth. *Tissue Eng Part B Rev*, **21**: 157-165.
- Tandon N, Cannizzaro C, Chao P H, Maidhof R, Marsano A, Au H T, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. 2009. Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. *Nat Protoc*, **4**: 155-173.
- Tandon N, Marsano A, Maidhof R, Wan L, Park H, Vunjak-Novakovic G. 2011. Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, **5**: e115-125.
- Tang Y, Hong Y Z, Bai H J, Wu Q, Chen C D, Lang J Y, Oheler K R B, Yang H T. 2016. Plant homeo domain finger protein 8 regulates mesodermal and cardiac differentiation of embryonic stem cells through mediating the histone demethylation of pmaip1. *Stem Cells*, **34**: 1527-1540.
- Toh W S, Lim T C, Kurisawa M, Spector M. 2012. Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials*, **33**: 3835-3845.
- Trappmann B, Gautrot J E, Connelly J T, Strange D G, Li Y, Oyen M L, Stuart M A C, Boehm H, Li B J, Vogel V, Spatz J P, Watt F M, Huck W T S. 2012. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nature Materials*, **11**: 642-649.
- Tse J R, Engler A J. 2010. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 10, Unit 10.16, doi: 10.1002/0471143030.cb1016s47.
- Tse J R, Engler A J. 2011. Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One*, **6**: e15978.
- Tu S, Chi N C. 2012. Zebrafish models in cardiac development and congenital heart birth defects. *Differentiation*, **84**: 4-16.
- Tung L, Parikh S S. 1991. Cardiac mechanics at the cellular level. *J Biomech Eng*, **113**: 492-495.
- Van Wamel J, Ruwhof C, Van der Valk-Kokshoorn E, Schrier P, Van der Laarse A. 2000. Rapid gene transcription induced by stretch in cardiac myocytes and fibroblasts and their paracrine influence on stationary myocytes and fibroblasts. *Pflügers Archiv*, **439**: 781-788.
- Vandenburgh H H, Solerssi R, Shansky J, Adams J W, Henderson S A. 1996. Mechanical stimulation of organogenic cardiomyocyte growth in vitro. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **270**: C1284-C1292.
- Vanichapol, T, Leelawat, K, Hongeng, S. 2015. Hypoxia enhances cholangiocarcinoma invasion through activation of hepatocyte growth factor receptor and the extracellular signalregulated kinase signaling pathway. *Mol Med Rep*, **12**: 3265-3272.
- Veerman C C, Kosmidis G, Mummery C L, Casini S, Verkerk A O, Bellin M. 2015. Immaturity of human stem-cell-derived cardiomyocytes in culture: fatal flaw or soluble problem? *Stem Cells Dev*, **24**: 1035-1052.
- Vincent L G, Engler A J. 2013. Stem cell differentiation: Post-degradation forces kick in. *Nat Mater*, **12**:

- 384-386.
- Volberg W A, Koci B J, Su W, Lin J, Zhou J. 2002. Blockade of human cardiac potassium channel human ether-a-go-go-related gene (HERG) by macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**: 320-327.
- Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, Martens T P, Radisic M. 2010. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, **16**: 169-187.
- Walker L A, Medway A M, Walker J S, Cleveland J C, Jr Buttrick P M. 2011. Tissue procurement strategies affect the protein biochemistry of human heart samples. *J Muscle Res Cell Motil*, **31**: 309-314.
- Wang B, Wang G, To F, Butler J R, Claude A, McLaughlin R M, Williams L N, de Jongh Curry A L, Liao J. 2013. Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations. *Langmuir*, **29**: 11109-11117.
- Wang G, McCain M L, Yang L, He A, Pasqualini F S, Agarwal A, Yuan H, Jiang D, Zhang D, Zangi L, Geva J, Roberts A E, Ma Q, Ding J, Chen J, Wang D Z, Li K, Wang J, Wanders R J, Kulik W, Vaz F M, Laflamme M A, Murry C E, Chien K R, Kelley R I, Church G M, Parker K K, Pu W T. 2014. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with iPSC and heart-on-chip technologies. *Nature Medicine*, **20**: 616.
- Wang Q, Jian M, Wang C, Zhang Y. 2017. Carbonized silk nanofiber membrane for transparent and Sensitive electronic skin. *Advanced Functional Materials*, **27**: 1605657.
- Wen Q, Janmey P A. 2013. Effects of non-linearity on cell-ECM interactions. *Experimental Cell Research*, **319**: 2481-2489.
- Xia Y, Buja L M, McMillin J B. 1998. Activation of the cytochrome c gene by electrical stimulation in neonatal rat cardiac myocytes. Role of NRF-1 and c-Jun. *J Biol Chem*, **273**: 12593-12598.
- Xia Y, McMillin J B, Lewis A, Moore M, Zhu W G, Williams R S, Kellems R E. 2000. Electrical stimulation of neonatal cardiac myocytes activates the NFAT3 and GATA4 pathways and up-regulates the adenylosuccinate synthetase 1 gene. *J Biol Chem*, **275**: 1855-1863.
- Xiao Y, Zhang B, Liu H, Miklas J W, Gagliardi M, Pahnke A, Thavandiran N, Sun Y, Simmons C, Keller G, Radisic M. 2014. Microfabricated perfusable cardiac biowire: A platform that mimics native cardiac bundle. *Lab on a Chip*, **14**: 869-882.
- Xiong Q M, Cao Q, Zhou Q Q, Xie J Y, Shen Y, Wan R, Yu J H, Yan S J, Marian Ali J, Hong K. 2015. Arrhythmogenic cardiomyopathy in a patient with a rare loss-of-function KCNQ1 mutation. *J Am Heart Assoc*, **4**: e001526.
- Yanazume T, Hasegawa K, Wada H, Morimoto T, Abe M, Kawamura T, Sasayama S. 2002. Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*, **277**: 8618-8625.
- Ye F, Yuan F, Li X, Cooper N, Tinney J P, Keller B B. 2013. Gene expression profiles in engineered cardiac tissues respond to mechanical loading and inhibition of tyrosine kinases. *Physiol Rep*, **1**: e00078.
- Ye K Y, Black L D 3rd. 2011. Strategies for tissue engineering cardiac constructs to affect functional repair following myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*, **4**: 575-591.
- You J O, Rafat M, Ye G J, Auguste D T. 2011. Nanoengineering the heart: Conductive scaffolds enhance connexin 43 expression. *Nano Letters*, **11**: 3643-3648.
- Young J, Tuler J, Braden R, Shup-Magoffin P, Christman K, Engler A. 2012. Dynamic hyaluronic acid hydrogels for cardiac therapy are biocompatible and degradable. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **6**: 192-192

- Young J L, Engler A J. 2011. Hydrogels with time-dependent material properties enhance cardiomyocyte differentiation in vitro. *Biomaterials*, **32**: 1002-1009.
- Zeidan A, Javadov S, Karmazyn M. 2006. Essential role of Rho/ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, **72**: 101-111.
- Zentilin L, Puligadda U, Lionetti V, Zacchigna S, Collesi C, Pattarini L, Ruozi G, Camporesi S, Sinagra G, Pepe M, Recchia F A, Giacca M. 2010. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction. *FASEB J*, **24**: 1467-1478.
- Zhang S J, Truskey G A, Kraus W E. 2007. Effect of cyclic stretch on  $\beta$ 1D-integrin expression and activation of FAK and RhoA. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **292**: C2057-C2069.
- Zhao H, Yu Y, Wu X, Liu S, Liu B, Du J, Li B, Jiang L H, Feng X Q. 2017. A role of BK channel in regulation of  $Ca^{2+}$  channel in ventricular myocytes by substrate stiffness. *Biophysical Journal*, **112**: 1406-1416.
- Zhao S, Xu Z, Wang H, Reese B E, Gushchina L V, Jiang M, Agarwal P, Xu J S, Zhang M J, Shen R L, Liu Z G, Weisleder N, He X M. 2016. Bioengineering of injectable encapsulated aggregates of pluripotent stem cells for therapy of myocardial infarction. *Nat Commun*, **7**: 13306.
- Zhao Y W, Zhu T, Zhang X Y, Wang Q Y, Zhang J Y, Ji W B, Ma Y F. 2015. Splicing factor 2/alternative splicing factor contributes to extracellular signalregulated kinase activation in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep*, **12**: 3890-3894.
- Zhou J, Chen J, Sun H, Qiu X, Mou Y, Liu Z, Zhao Y, Li X, Han Y, Duan C, Tang R, Wang C, Zhong W, Liu J, Luo Y, Mengqiu Xing M, Wang C. 2014. Engineering the heart: Evaluation of conductive nanomaterials for improving implant integration and cardiac function. *Scientific Reports*, **4**.
- Zimmermann W H, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Wei J, Eschenhagen T. 2000. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng*, **68**: 106-114.
- Zimmermann W H, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach J F, Kostin S, Neuhuber W L, Eschenhagen T. 2002. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res*, **90**: 223-230.

(责任编辑: 靳 刚)

## Engineering mechanical-electrical cell microenvironment in myocardium using advanced biomaterials

XU Feng<sup>1,2</sup>      ZHANG Xiaohui<sup>1,2,†</sup>      BAO Xuejiao<sup>1,2</sup>      ZHAO Guoxu<sup>1,2</sup>  
LIU Fusheng<sup>2,3</sup>      HUANG Guoyou<sup>1,2</sup>      LI Yuhui<sup>1,2</sup>      LU Tianjian<sup>4</sup>

<sup>1</sup> The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

<sup>2</sup> Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBC),  
Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

<sup>3</sup> State Key Laboratory for Strength and Vibration of Mechanical Structures School of Aerospace, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

<sup>4</sup> Moe Key Laboratory for Multifunction Materials and Structure,  
Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

**Abstract** Cardiovascular diseases remain the leading cause of human death worldwide. The development of cardiac tissue engineering has provided a most potential strategy for the treatment of cardiovascular disease through regenerating functional cardiac tissues and restoring dysfunctional myocardium. The occurrence and progress of cardiovascular diseases are closely related to the changes of mechanical and electrical cell microenvironment in native myocardium. In the last decades, with the advances in biomaterials and micro- and nano-fabrication techniques, increasing evidence has demonstrated that the biomimicking of mechanical-electrical cell microenvironment is important for the maturation and functionalization of engineered cardiac tissues for the purpose of myocardium restoration. In this review, we firstly elucidated the biological basis of mechanical properties and electrical signal transmission in native myocardium, including the mechanical and electrical microenvironment in physiological and pathological conditions. Then, we reviewed the current research progress of advanced biomaterials for cardiac tissue engineering applications. Finally, we summarized the development and manipulation of mechanical and electrical microenvironment using advanced biomaterials, and the biological responses of cardiomyocytes and

---

Received: 4 July 2017; accepted: 11 September 2017; online: 25 September 2017

† E-mail: xiaohuizhang@mail.xjtu.edu.cn

Cite as: Xu F, Zhang X H, Bao X J, Zhao G X, Liu F S, Huang G Y, Li Y H, Lu T J. Engineering mechanical-electrical cell microenvironment in myocardium using advanced biomaterials.

*Advances in Mechanics*, 2018, 48: 201807

© 2018 *Advances in Mechanics*.



cardiac tissues to the biomimicking mechanical-electrical microenvironment.

**Keywords** mechanical microenvironment, electrical microenvironment, cardiac tissue engineering, biomaterial



徐峰, 2008 年取得剑桥大学工程学博士学位, 2008—2011 年在哈佛医学院/哈佛大学-麻省理工学院健康科学与技术研究中心任博士后. 2011 年回国, 现任西安交通大学教授、生命学院副院长, 同卢天健教授共同建立“仿生工程与生物力学研究中心”, 并担任主任. 在课题开展中遵循“力学基础理论-生物技术研发-应用推广”的学术思路, 通过理解和探索人体组织/细胞的力学行为和力学环境, 将固体力学和流体力学与工程学、生物医学等领域进行交叉融合, 开展了生物组织热-力-电耦合学、细胞热-力-电微环境工程、基于生物微流体力学的即时诊断技术的研究. 科研成果包括中英文专著和教材 5 本; 作为第一/通讯作者发表 150 余篇论文; 发明专利 20 余项; 在生物热-力耦合学方面的工作获得国家自然科学奖二等奖(第二完成人)、教育部科学技术奖一等奖(第二完成人).



张晓慧, 2009 年获得美国塔夫茨大学生物技术博士学位, 2009—2013 年在哈佛医学院/哈佛大学-麻省理工学院健康科学与技术研究中心任博士后, 2013 年全职回国, 现任西安交通大学教授. 致力于新型生物材料的开发与应用、工程化组织器官及疾病模型的体外构建、生殖医学工程以及细胞冷冻保存等生物医学领域中的应用研究. 2013 年入选中组部“青年千人计划”. 迄今已在 *Advanced Functional Materials*, *Biomaterials* 等国际知名学术期刊发表 SCI 论文 40 余篇, 总引用次数超过 2200 次, H 因子 24. 另申报发明专利 7 项(国际 2 项, 美国 2 项, 欧洲 1 项, 日本 1 项, 中国 1 项), 其中 5 项为第一发明人. 担任 SCI 期刊 *Nanobiomedicine* 的编委, 应邀担任期刊 *ASME Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine* 专刊副主编, 2014 年国际组织工程与再生医学学会亚太年会 (TERMIS-AP 2014) 的分会主席.