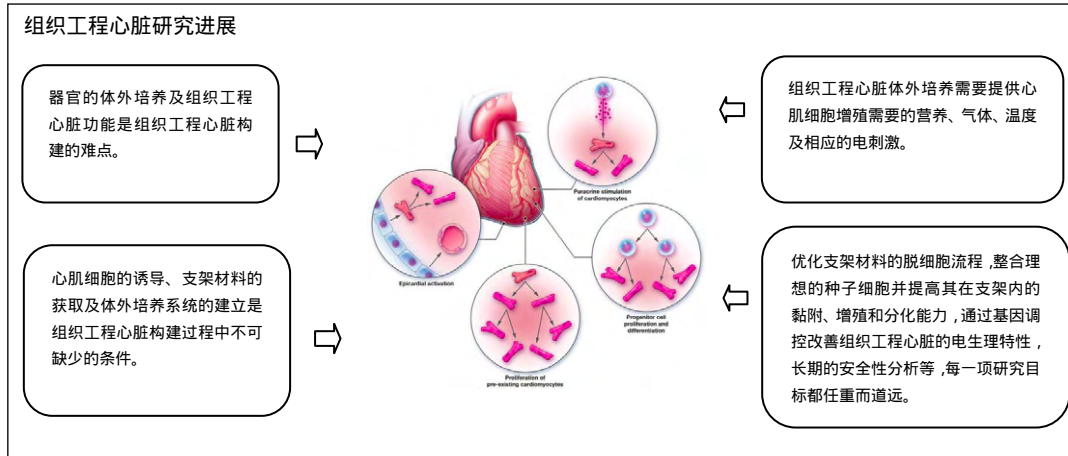


组织工程心脏：电生理特性及长期安全性？

全彩玲^{1,2,3}, 李鸣晖^{2,3}, 齐忠权^{2,3} (厦门大学, ¹生命科学学院, ²器官移植研究所, 福建省厦门市 361102; ³福建省器官与组织再生重点实验室, 福建省厦门市 361102)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0098 ORCID: 0000-0002-6490-3351(全彩玲)

文章快速阅读：



全彩玲, 女, 1984 年生, 河南省范县人, 汉族, 2016 年厦门大学毕业, 博士, 主要从事组织工程心脏研究。

并列第一作者: 李鸣晖, 女, 1993 年生, 黑龙江省鸡西市人, 汉族, 厦门大学在读硕士。

通讯作者: 齐忠权, 博士, 教授, 厦门大学器官移植研究所, 福建省厦门市 361102; 福建省器官与组织再生重点实验室, 福建省厦门市 361102

中图分类号: R318

文献标识码: A

稿件接受: 2017-09-17

文题释义：

组织工程心脏：是将通过体外扩增的细胞种植于生物相容性良好的支架材料上，细胞能够牢固黏附、生长增殖和定向诱导分化，使其具有心脏组织的细胞组成和基本功能，实现能够在体外生产出可以代替正常心脏的功能性心脏组织的最终目标。

去细胞支架材料：去细胞是指用去污剂将组织或器官中的细胞去除，获得一个保留完整细胞外基质的组织或器官支架，并维持其原有的三维空间结构、生化组成和生物活性。要得到良好的去细胞心脏支架，选择一个能够将细胞去除完全，且维持原有组织或器官完整的支架系统和机械强度的去污剂至关重要。

摘要

背景：由于供体心脏严重短缺并受制于伦理道德，很多需要心脏移植的患者最终因缺乏供体心脏而死亡。理论上组织工程心脏是解决供体心脏不足的重要手段。

目的：回顾分析组织工程心脏构建用的支架材料、种子细胞及细胞接种培养方法，为后期组织工程心脏的构建做参考。

方法：由作者检索 2004 年至 2016 年 PubMed 数据库及 SCL(web of science)数据库关于组织工程心脏构建方法研究的文献，共检索文献 2 921 篇，按照纳入和排除标准进行筛选，共纳入 53 篇。

结果与结论：器官的体外培养及组织工程心脏功能是组织工程心脏构建的难点。组织工程心脏体外培养需要提供心肌细胞增殖需要的营养、气体、温度及相应的电刺激。心肌细胞的诱导、支架材料的获取及体外培养系统的建立是组织工程心脏构建过程中不可缺少的条件。优化支架材料的脱细胞流程，整合理想的种子细胞并提高其在支架内的黏附、增殖和分化能力，通过基因调控改善组织工程心脏的电生理特性，长期的安全性分析等，每一项研究目标都任重而道远。

关键词：

组织工程心脏；支架材料；去细胞方法；组织构建；细胞接种

主题词：

心脏；支架材料；细胞接种；组织工程

Tong Cai-ling, M.D., School of Life Science, Organ Transplantation Institute, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China; the Key Laboratory of Organ and Tissue Regeneration of Fujian Province, Xiamen 361102, Fujian Province, China

Li Ming-hui, Studying For master's degree, Organ Transplantation Institute, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China; the Key Laboratory of Organ and Tissue Regeneration of Fujian Province, Xiamen 361102, Fujian Province, China

Tong Cai-ling and Li Ming-hui contributed equally to this work.

Corresponding author:

Qi Zhong-quan, M.D., Professor, Organ Transplantation Institute, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China; the Key Laboratory of Organ and Tissue Regeneration of Fujian Province, Xiamen 361102, Fujian Province, China

Tissue-engineered heart: electrophysiological properties and long-term safety

Tong Cai-ling^{1,2,3}, Li Ming-hui^{2,3}, Qi Zhong-quan^{2,3} (¹School of Life Science, ²Organ Transplantation Institute, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China; ³the Key Laboratory of Organ and Tissue Regeneration of Fujian Province, Xiamen 361102, Fujian Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Insufficiency of donor heart and ethics are the major obstacles to heart transplantation. Theoretically, a tissue-engineered heart is an important means to solve the donor heart insufficiency.

OBJECTIVE: To review the scaffold materials, seed cells and cell incubation methods in the construction of tissue-engineered heart, thus providing references for the future study on the tissue-engineered heart.

METHODS: A retrieval of PubMed and Web of Science databases was performed for the articles addressing the construction of tissue-engineered heart from 2004 to 2016. Totally 2 921 articles were searched, and finally 53 eligible articles were included in accordance with the inclusion and exclusion criteria.

RESULTS AND CONCLUSION: *In vitro* organ culture and the function of tissue-engineered heart are the difficulties in the construction of tissue-engineered heart. *In vitro* construction of tissue-engineered heart requires the supply of nutrients, gases, temperature and corresponding electrical stimulation. Myocardial cells, scaffold materials and organ culture system are indispensable for the tissue-engineered heart construction. Therefore, it is highly important to optimize the decellular process, select an ideal seed cell and improve its adhesion, proliferation and differentiation, improve the electrophysiological properties of the tissue-engineered heart by gene regulation, and confirm the long-term safety of the tissue-engineered heart.

Subject headings: Heart; Stents; Cells, Cultured; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

组织工程是一门以细胞学和材料学相结合,进行体外或体内构建组织或器官的学科。它可以用来修复、维持或提高某组织或器官的功能^[1-2],甚至可以成为一种满足临床和康复需要的生物替代品。随着科学技术突飞猛进的发展,越来越多的人造器官出现在人们的视野里,如:组织工程皮肤^[3]、组织工程血管^[4]、组织工程声带^[5]、组织工程心脏^[6]、组织工程肾脏^[7]、组织工程肝脏^[8]、组织工程视网膜^[9]、组织工程膀胱等^[10]。耶鲁大学的科学家们已经使用动物细胞制备出了鼠的肺部组织,可以被植入啮齿动物体内,并在一定时间内发挥功效^[11]。组织工程器官按照研究内容可分为:生物材料、种子细胞、构建组织和器官的方法和技术三部分。组织工程器官按照构建组织的材料组分进行分类可分为机械性人造器官、半机械性半生物性人造器官和生物性人造器官三大类别。组织工程器官需具备3个必不可少的要素:第一,具有生物相容性良好的支架材料;第二,具有合适接种的种子细胞;第三,种子细胞要能够在支架上增殖、诱导及分化,最终分化为具有功能的细胞。理想的组织工程器官具有广阔的临床应用和前景,如何构建出良好的组织工程器官也成为了当前组织工程领域的研究热点。

组织工程心脏是组织工程研究的重点。组织工程心脏是将通过体外扩增的细胞种植于生物相容性良好的支架材料上,细胞能够牢固黏附、生长增殖和定向诱导分化,使其具有心脏组织的细胞组成和基本功能,实现能够在体外生产出可以代替正常心脏的功能性心脏组织的最终目标。在中国,每年都有数以千计的人在等待心脏移植^[12],心脏移植也是心肌梗死后的最终救治手段。尽管器官移植有着显著的治疗作用,但由于供体心脏严重短缺并受制于伦理道德,很多需要心脏移植的患者最终因缺乏供体心脏而死亡。异种移植技术的出现似乎解决了供体来源不足问题,但患者术后必须要依赖免疫抑制剂药物长期维持治疗,使得移植后的急性或慢性免疫排斥反应成为了新的世界性难题。而组织工程心脏可以从理论上解决这些问题。近年来,大量的国内外学者致力于组织工程心脏的研究并取得了大量成果,现就组织工程心脏近年来的研究进展进行综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由作者检索2004年1月至2016年12月PubMed数据库及SCI(web of science)数据库关于组织工程心脏构建方法研究的文献,进行系统整理、总结和分析。

1.2 纳入排除标准 纳入组织工程心脏支架材料、种子细胞培养及接种方法有关文献;排除重复研究及陈旧性文献。共检索文献2 921篇,按照纳入和标准进行筛选,共纳入53篇。

2 结果 Results

2.1 心脏支架材料 良好的支架材料是构建组织工程心脏的基础。一个理想的组织工程心脏支架材料要具备以下特征:要具有良好的生物相容性。生物材料最终应用于人体内,具有免疫反应的组织工程材料会被受体排斥,造成移植失败,给患者带来极大痛苦。要具有合适的表面结构,良好的生物材料要有较好地细胞亲和性,这样种子细胞才能通过识别材料表面位点定位在细胞表面,实现在支架材料内的进一步增殖、分化、形成器官。材料表面要光滑,具有抗凝血作用,可以保证器官的长时间存活。另外支架材料要具有合适的孔径大小,可以增大细胞贴附面积,可供细胞进行物质交换及废物的排出。具有一定的力学强度和柔韧性。力学强度可以使材料在细胞培养接种过程中保持完整的形态结构;柔韧性可以使支架材料和机体有机的贴合在一起。

近年来,组织工程中作为细胞支架的生物材料选择主要趋向于天然高分子材料、合成高分子材料和去细胞心脏支架材料3种(表1)。

2.2 去细胞支架材料的制备及评估 去细胞是指用去污剂将组织或器官中的细胞去除,获得一个保留完整细胞外基质的组织或器官支架,并维持其原有的三维空间结构、生化组成和生物活性。要得到良好的去细胞心脏支架,选择一个能够将细胞去除完全,且维持原有组织或器官完整的支架系统和机械强度的去污剂至关重要。Ott等^[6]将大鼠心脏置于改良的Langendorff装置上,通过冠状动脉灌注来对比SDS、PEG和Triton-X100三种化学去垢剂的脱细胞程度。结果显示,SDS的洗脱效果明显优于PEG和Triton-X100,并且洗脱时间短,效率高。目前

表 1 组织工程中作为细胞支架的生物材料

| 材料 | 特点 |
|-------------|---|
| 天然高分子材料及无机物 | (1)是一些无毒、亲水性强、生物相容性好的材料,如:海藻酸盐 ^[13] 、胶原蛋白 ^[14] 、水凝胶等 ^[15] ; (2)虽然该材料具有良好的组织相容性和细胞亲和性,支架可逐渐被降解吸收,但由于其表面缺少细胞识别位点 ^[16] ,被种植的自体细胞易脱落,后期实验无法达到预期效果; (3)后续研究对材料表面进行处理,使其适合细胞附着和生长,可以制成各种形状的器官,用于组织的再生 ^[17] 。 |
| 纳米材料 | (1)一种经人工修饰合成的化和材料 ^[18-20] ,近年来在疾病治疗和组织修复中也有较广泛的应用; (2)其优异性能在组织工程领域也展现出诱人的前景。 |
| 去细胞心脏支架材料 | (1)具有更多的优势,通过去污剂去除细胞后的心脏组织纤维支架可以完整地保留心脏的三维空间结构和复杂的脉管系统; (2)具有良好的机械强度、柔韧度和张力; (3)有很强的生物相容性,高细胞亲和性,良好的纤维结构允许细胞附着,可以提供适合细胞生长、增殖和迁移的微环境,为后期种子细胞的种植创造了良好的条件 ^[21] ,是组织工程最理想的材料。 |

SDS是心脏组织脱细胞最常用的灌注液。除此化学方法外,物理洗脱法和酶消化法也可达到去细胞的目的。前者如声波降解法、搅拌法等通常与化学洗脱法一起进行,达到去除破碎细胞成分的效果^[22]。但由于心脏的脉管系统复杂且脆弱,故通常不会采用此法以免破坏支架的完整性。酶消化法主要是利用胰酶、胶原酶和核酸酶等的酶解作用破坏细胞膜蛋白进而脱去细胞。酶具有很强的特异性,所以不同的细胞和材料组成,在消化过程中酶的选择和作用时间也要做出相应改变,选择正确的酶处理方可体现其高效性。此外,酶的选择和处理不当还会导致胶原蛋白和纤维组成被破坏,得到不完整的心脏支架。

Rieder等^[23]通过完全去除细胞的效率及再细胞化的潜力两方面比较了3种猪心脏瓣膜的脱细胞方法,发现使用0.25%叔辛基苯基聚氧乙烯/脱氧胆酸钠和核酸酶消化可得到一个再细胞化效果良好的支架。Hussein等^[24]总结并分析了多种常用的物理、化学和生物洗脱液的作用原理及优缺点,可以为细胞洗脱液的初步选择提供参考。2015年,Papalamprou等^[25]在其研究中通过抗原清除的方法构建细胞外基质支架,同时采用亲水性和亲脂性的异种抗原以分段的方式除去心脏组织中心肌细胞和非心肌细胞的抗原成分和细胞组成,也可成功保持原有心脏组织的结构、生化特性和力学特性,且后续实验结果表明,将小鼠或人的间充质干细胞接种至以抗原清除法构建的心脏支架进行再细胞化,细胞迁移较为深入,显示其具有良好的生物兼容性。而通过变性去污剂SDS洗涤得到的心脏支架再细胞化后较多细胞分布在外周区域,体内实验也显示移植后伴有长期的慢性炎症反应^[26]。去细胞方法虽多,但还需要在实验中不断摸索,积累经验,找到最简单有效的去除方法和试剂作用的最佳浓度和时间,方可达到理想的洗脱效果。

理想的心脏去细胞支架是无毒性、无致病性、无免疫原性的。去细胞后心脏支架内细胞残留情况和心脏支架的完整性及各项指标也是组织工程心脏成败的关键。去细胞支架材料的成分主要包括胶原蛋白、肌原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白等^[27],可用染色分析其细胞残留

情况,扫描电子显微镜观察其形态结构,用Western blot或质谱分析等技术对各成分做定量分析等,可通过各个方向的抗拉伸实验评估整个支架的弹性及强度,同时灌注有色染料可清晰观察到心脏支架内的大血管及脉管系统是否完整。Ott等^[6]用苏木精-伊红染色和免疫荧光染色等评估脱细胞程度,发现经SDS洗脱12 h又经Triton-X100和洗涤液灌注后心脏支架内没有检测到细胞存在。通过组织学方法如苏木精-伊红染色来判断细胞是否清除完全是目前最常用的手段之一,还可以通过扫描电子显微镜观察脱细胞程度及残留组分。细胞未洗脱彻底会增强心脏支架的免疫原性,与后期种植的异种细胞不相容,移植到体内后会引发受体的免疫排斥反应,使组织工程心脏失去意义。同时也要注意,心脏组织脱细胞完全后需用洗涤液灌流冲洗,以防止洗脱液对支架结构的毒性作用。且避免洗脱液在支架内滞留时间过长,持续消化过度,破坏其纤维和胶原组成,降低支架机械强度,增大移植手术难度。

近年来,人们在多种组织和器官中对去细胞支架材料也进行了系列研究,并评估了去细胞支架作为3维支架的可能性^[28]。在软骨组织工程领域中,细胞外基质来源支架被已证明是很好的软骨组织工程仿生支架,被应用于临床实践中。虽然接种细胞后支架会出现萎缩,但可通过配合交联剂使用或其他物理化学方法来改进,克服缺陷^[29]。杨立信等^[30]将去细胞瓣叶植入SD大鼠背部皮下,按照不同的包埋时间取出瓣叶进行一系列组化实验,以此来评价去细胞支架的免疫原性及炎症反应。后期也可通过器官移植等体内实验来分析支架免疫原性的高低。

2.3 种子细胞的选取 正常的心脏组织由多种细胞组成,心肌细胞是其主要的工作细胞。成熟的心肌细胞在体内增殖能力较低,心肌细胞的获取成为组织工程心脏构建的难题。

近年来有人指出,心肌细胞要不断搏动以维持心脏的泵血功能,这也许是阻碍心肌细胞同时收缩与分裂的原因之一,并认为心肌细胞的增殖可以通过调控某些基因的表达来实现^[31]。

Matsuyama等^[32]发现敲除了新生鼠心肌细胞连接蛋白43的表达基因, p38 MAPK通路的抑制剂和表达上调的成纤维细胞生长因子能够刺激心肌细胞的增殖, 也有研究结果表明抑制或过表达体内某些基因可以促进心肌细胞增殖^[33]。

另外有研究显示, 心肌细胞干性的丧失是由于高氧环境中DNA损伤所致, 低氧环境有利于心肌干细胞干性的维持^[34]。但鲜有体外成功获得大量心肌细胞的报道。种子细胞作为组织工程心脏的关键, 应同时满足易于获取、分化程度低、增殖能力强、免疫原性低等条件。所以, 作为生命之源的干细胞成为组织工程器官构建中种子细胞的优秀候选者, 主要因为干细胞具有以下特征:

(1)具有自我更新能力。干细胞通过对称和非对称有丝分裂产生两种不同命运的细胞, 一种细胞继续保持原有干细胞的功能, 另一种为具有特定功能的细胞。子代干细胞可以不断的分裂下去并保持着干细胞的生物特性。这种分裂方式对维持机体器官的稳定性起到了非常重要的作用。

(2)具有多向分化性。胚胎干细胞具有全能分化性, 能够分化为各谱系的细胞和特定组织干细胞, 在特定环境中发育成完整的个体, 也可用于临床细胞移植治疗疾病。但它存在着移植免疫排斥的限制和伦理学的困扰不能广泛获取和应用。成体干细胞虽只能在体外有限扩增, 分化效率低, 但这类细胞存在于宿主体内, 可直接从患者自身获取, 无移植排斥也无伦理道德的束缚。

(3)具有高度增殖能力和相对静止期。干细胞在体内可以连续分化增殖数代, 也可以在较长时间内处于静止状态。当机体器官受损时, 干细胞处于相对活跃的状态, 可以增殖数代来修复受损的组织部位。

(4)干细胞的分化需要特定的微环境。在与不同的细胞接触或不同激素、试剂作用下, 干细胞向着不同的方向进行特异性分化。

间充质干细胞作为干细胞家族的重要成员之一因其来源广泛, 提取和体外培养技术较成熟, 易于扩增和纯化等优势, 被认为是最有希望应用于临床治疗的一类种子细胞。间充质干细胞来源于发育早期的中胚层和外胚层, 可取自全身结缔组织和器官间质中, 脐血、肌肉、脂肪、骨骼等都有间充质干细胞存在, 以成人骨髓组织中含量最多。除来源丰富外, 间充质干细胞还具有低免疫原性、无MHC限制性、体外扩增迅速且稳定、损伤去化作用及归巢功能、免疫调节和组织修复能力强等特点^[35], 是一类理想的种子细胞。

2011年Stubbs等^[36]利用干细胞修复心脏。也有人将经过培养的间充质干细胞植入小鼠心肌梗死模型中, 发现能有效减少心梗面积和心肌纤维化^[37-38]。除骨髓来源的间充质干细胞外, 脂肪组织中间充质干细胞的应用也日渐广泛。它在体内细胞基数大, 且可通过微创等更安

全的手段获得, 具有比骨髓间充质干细胞更强的增殖能力和更稳定的增殖活性, 比骨髓间充质干细胞有更大的优越性^[39]。间充质干细胞可以沿着胶原纤维等胞外机制四处爬行^[40], 这也是它作为去细胞支架种子细胞的重要原因之一。

另有研究发现, 用含有5-aza胞苷的培养基培养可成功在体外将间充质干细胞诱导成心肌细胞并检测到动作电位^[41-43], 证实了在调节因子的作用下, 间充质干细胞可以成功分化为心肌细胞。近年来, 心肌干细胞的研究^[44], 也为临床上终末期心脏病的治疗和受损心脏的修复带来了新的希望(图1)。

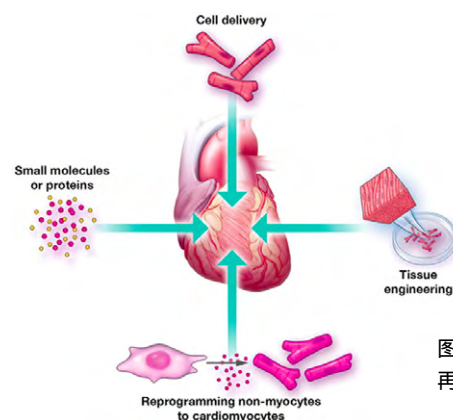


图1 心脏损伤后再生的方法^[44]

2.4 细胞的接种 除上述支架材料和种子细胞的选取之外, 种子细胞是否能均匀而广泛的附着在支架材料上行使功能并且保持良好的增殖、迁移和分化能力也是体外构建组织工程器官成败的关键。目前, 支架材料接种细胞的方法并不局限, 可单次种植也可多次种植, 可单种细胞种植也可多种混合细胞种植。但在接种细胞之前, 根据细胞外基质支架材料的不同来把握细胞接种量是必不可少的。细胞接种过多会过快的消耗营养物质且细胞易聚集, 导致心肌层肥厚; 接种量过少不利于细胞的黏附, 且细胞低密度生长环境会降低细胞的增殖和分化能力, 影响器官功能。脱细胞支架的再细胞化过程可分为静态和动态两种方式。静态培养是将种子细胞和支架材料置于培养装置中共培养, 使种子细胞能够接触、附着并生长在脱细胞支架上。该装置构造简单, 操作方便, 对培养条件要求较低, 应用较为广泛。但该法培养方式和条件过于单一, 不能良好的模拟器官在体内所处的微环境, 细胞种植效率不高。

近几年, 应用生物反应器将细胞接种至支架材料上的动态培养方式显示出较大的优势, 主要是通过主动脉和冠状动脉灌注。它可以同时满足细胞化过程中必要的营养物质、适宜温度、需氧和无菌环境, 并且可以人为调控培养基更新速率和持续时间, 保证细胞的新陈代谢。Kang等^[45]通过静态培养和生物反应器动态培养两种方式培养接种了脂肪干细胞的去细胞软骨支架, 将其

移植入裸鼠体内, 3周后观察其再细胞化程度发现动态培养组的细胞分布更加均匀, 且有更多型胶原的沉积。接种细胞之前, 用相应培养基灌流平衡去细胞支架, 可以让细胞更好的附着和贴壁生长。通过灌流系统模拟最佳培养条件, 可以使人造器官在移植前适应体内微环境, 增强种子细胞的增殖、迁移和特异性分化能力和支架的机械强度, 赋予组织工程器官更好的功能。此外, 气体的组分也是影响器官培养的重要因素。细胞在培养过程中一般需要体积分数5%的CO₂浓度和95%的空气, 而培养器官对O₂的需求量则大大增加。在心脏培养过程中O₂的浓度要达到90%以上。

一个好的组织工程心脏应具有正常心脏的三维架构、适当的细胞组成分布及泵血功能^[6]。Guyette等^[46]用人的iPSC及其诱导成的心肌细胞作为种子细胞接种到器官捐赠者的心脏去细胞支架构建组织工程心脏, 并检测到其具有电传导性、收缩和新陈代谢功能。Weymann等^[47]用猪的去细胞支架接种小鼠的心肌细胞和人脐带静脉内皮细胞构建组织工程心脏并可检测到构建体的电生理活性。要制备具有搏动功能的心脏, 可以通过电极和药物刺激恢复心脏的电生理^[48]。Hirt等^[49]发现持续的电场刺激可以提高组织工程心脏的自发搏动性, 趋化心肌细胞向搏动中心分布, 从而改善组织工程心脏的结构和功能性质。

3 小结 Conclusions

组织工程器官是一个令移植研究者兴奋的领域。近年来, 在国内外诸多科学工作者的共同努力下, 组织工程心脏已克服很多障碍, 取得很大进展。人们已经可以构建出较理想的小动物^[6]、猪甚至人的心脏脱细胞支架^[46-47], 并且可以通过接种不同来源和功能的种子细胞构建出跳动的组织工程心脏。尽管组织工程心脏的功能与正常心脏的功能还相差很多, 但随着器官培养方式和材料种类的多样化以及干细胞和生物技术领域的不断发展, 器官的体外培养会越来越有效便捷, 组织工程心脏的功能会越来越接近正常心脏。心脏发育调控研究的开展, 也逐步揭示了一些与心脏功能联系紧密的基因, 如Seme3a基因与心脏交感神经的重组重建及心脏电生理重构紧密相关^[50-51]。FSTL1与心脏的修复关系密切^[52]。另外, 心脏窦房结细胞的体外诱导分化也为组织工程心脏的研究奠定了基础^[53], 起搏器细胞都具有超级化激活环核苷酸门控通路(HCN)基因, 该基因与起搏器细胞的功能关系密切, HCN基因突变会导致起搏器细胞失活, 造成心律不齐等症状。不可否认, 心肌在再生医学领域的临床应用还没有实现, 组织工程心脏在未来还会面临诸多挑战。优化支架材料的脱细胞流程, 整合理想的种子细胞并提高其在支架内的黏附、增殖和分化能力, 通过基因调控改善组织工程心脏的电生理特性, 长

期的安全性分析等, 每一项研究目标都任重而道远。随着3D生物打印技术的发展, 若能在不久的将来打印出具有仿生结构的支架或具有结构功能的心脏, 必能发挥出组织工程心脏在临床应用的巨大潜力。

作者贡献: 综述设计为第一作者和通讯作者, 资料收集为全体作者, 第一作者成文, 通讯作者审阅。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, United States: 2015; 131(4): e29-322.
- [2] 姚震, 陈林. 我国心血管疾病现状与展望[J]. *海南医学*. 2013, 24(13): 1873-1876.
- [3] Cahn F, Kyriakides TR. Generation of an artificial skin construct containing a non-degradable fiber mesh: a potential transcutaneous interface. *Biomed Mater*. 2008; 3(3): 34110.
- [4] Nemen-Guanzon JG, Lee S, Berg JR, et al. Trends in Tissue Engineering for Blood Vessels. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 956345.
- [5] Ling C, Li Q, Brown ME, et al. Bioengineered vocal fold mucosa for voice restoration. *Sci Transl Med*. 2015; 7(314): 314ra187.
- [6] Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Med*. 2008; 14(2): 213-221.
- [7] Uzarski JS, Xia Y, Belmonte JC, et al. New strategies in kidney regeneration and tissue engineering. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014; 23(4): 399-405.
- [8] Palakkan AA, Hay DC, Anil Kumar PR, et al. Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges. *Liver Int*. 2013; 33(5): 666-676.
- [9] Kador KE, Montero RB, Venugopalan P, et al. Tissue engineering the retinal ganglion cell nerve fiber layer. *Biomaterials*. 2013; 34(17): 4242-4250.
- [10] Atala A. Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull*. 2011; 97: 81-104.
- [11] Petersen TH, Calle EA, Zhao L, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. 2010; 329(5991): 538-541.
- [12] Hu XJ, Dong NG, Liu JP, et al. Status on Heart Transplantation in China. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Dec 5; 128(23): 3238-3242.
- [13] Li Z, Zhang M. Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 75(2): 485-493.
- [14] Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*. 2008; 89(5): 338-344.

- [15] Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2011; 8(5):607-626.
- [16] 徐志云,张宝仁. 组织工程心脏瓣膜的研究现状与进展[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(3): 233-235.
- [17] Hoang Thi TT, Lee JS, Lee Y, et al. Enhanced Cellular Activity in Gelatin-Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels without Compromising Gel Stiffness. *Macromol Biosci*. 2016;16(3):334-340.
- [18] Alghazali KM, Nima ZA, Hamzah RN, et al. Bone-tissue engineering: complex tunable structural and biological responses to injury, drug delivery, and cell-based therapies. *Drug Metab Rev*. 2015;47(4):431-454.
- [19] Karunaratne A, Xi L, Bentley L, et al. Multiscale alterations in bone matrix quality increased fragility in steroid induced osteoporosis. *Bone*. 2016;84:15-24.
- [20] Kim SY, Hwang JY, Shin US. Preparation of nano/macroporous polycaprolactone microspheres for an injectable cell delivery system using room temperature ionic liquid and camphene. *J Colloid Interface Sci*. 2016;465:18-25
- [21] 王圣,李温斌. 去细胞组织工程心脏瓣膜研究现状与展望[J]. 中国医疗器械信息, 2009, 15(2): 14-17.
- [22] Bai R, Liu HL. Heart decellularized matrix application in cardiac tissue engineering. *Jiefangjun Yixueyuan Xuebao*. 2015;7:1-4.
- [23] Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 127(2):399-405.
- [24] Hussein KH, Park KM, Kang KS, et al. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;67:766-778.
- [25] Papalamprou A, Griffiths LG. Cardiac Extracellular Matrix Scaffold Generated Using Sarcomeric Disassembly and Antigen Removal. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(4):1047-1060.
- [26] Papalamprou A, Chang CW, Vapniarsky N, et al. Xenogeneic cardiac extracellular matrix scaffolds with or without seeded mesenchymal stem cells exhibit distinct in vivo immunosuppressive and regenerative properties. *Acta Biomaterialia*. 2016;45:155-168.
- [27] Li Q, Uygun BE, Geerts S, et al. Proteomic Analysis of Naturally-Sourced Biological Scaffolds. *Biomaterials*. 2015;75: 37-46.
- [28] HERRMANN F E M, LEHNER A, HOLLWECK T et al. In vitro biological and mechanical evaluation of various scaffold materials for myocardial tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(4):958-966.
- [29] 肖统光. 细胞外基质来源支架在软骨组织工程中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(38): 5737-5744.
- [30] 杨立信. 骨髓间质干细胞构建组织工程心脏瓣膜的实验研究[J]. 第二军医大学. 2004.
- [31] 黄胜兰,吴敬波. 心肌细胞增殖的研究进展[J]. 现代临床医学, 2011, 37(6):9-11.
- [32] Matsuyama D, Kawahara K. Proliferation of neonatal cardiomyocytes by connexin43 knockdown via synergistic inactivation of p38 MAPK and increased expression of FGF1. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(6):631-642.
- [33] Ebel H, Zhang Y, Köhler K, et al. Directed expression of dominant-negative p73 enables proliferation of cardiomyocytes in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(3):411-419.
- [34] Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell*. 2014;157(3): 565-579.
- [35] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*. 2007; 25(11):2739-2749.
- [36] Stubbs SL, Crook JM, Morrison WA, et al. Toward Clinical Application of Stem Cells for Cardiac Regeneration. *Heart Lung Circ*. 2011;20(3):173-179.
- [37] Sun L, Cui M, Wang Z, et al. Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 improve remodeling in a rat model of acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 357(3):779-784.
- [38] de Macedo Braga LM, Lacchini S, Schaan BD, et al. In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. *J Biomed Sci*. 2008;15(3):365-374.
- [39] 王福科,刘流,李俊男,等. 间充质干细胞在组织工程中的应用进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36): 6800-6804.
- [40] Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3): 301-313.
- [41] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Med*. 2001;7(4): 430-436.
- [42] Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, et al. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2007;6(5):593-597.
- [43] Carvalho PH, Daibert AP, Monteiro BS, et al. Differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(1):82-89.
- [44] Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell*. 2013;12(6):689-698.
- [45] Kang H, Lu S, Peng J, et al. In vivo construction of tissue-engineered cartilage using adipose-derived stem cells and bioreactor technology. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(1):123-133.
- [46] Guyette JP, Charest JM, Mills RW, et al. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res*. 2016;118(1): 56-72.
- [47] Weymann A, Patil NP, Sabashnikov A, et al. Bioartificial heart: a human-sized porcine model—the way ahead. *PLoS One*. 2014 ; 9(11):e111591.
- [48] Tao ZW, Mohamed M, Hogan M, et al. Establishing the Framework for Fabrication of a Bioartificial Heart. *ASAIO J*. 2015;61(4): 429-436.
- [49] Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, et al. Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;74: 151-161.
- [50] He Q, Johnston J, Zeitlinger J. ChIP-nexus enables improved detection of in vivo transcription factor binding footprints. *HHS Public Access*. 2015;33(4): 395-401.
- [51] 温华知. 腺病毒介导的Sema3A基因对大鼠心肌梗死后交感神经重构和电重构的影响[D]. 武汉大学, 2010.
- [52] Alteköester AK, Harvey RP. Bioengineered FSTL1 Patches Restore Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Trends Mol Med*. 2015;21(12):731-733.
- [53] Rimbach C, Jung JJ, David R. Generation of Murine Cardiac Pacemaker Cell Aggregates Based on ES-Cell-Programming in Combination with Myh6-Promoter-Selection. *J Vis Exp*. 2015;(96): e52465.