

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-065

骨骼肌芯片及其在生物医学领域的研究进展

王达庆¹, 陶婷婷², 张旭², 李洪敬¹(¹ 大连医科大学附属第一医院, 辽宁 大连 116011; ² 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 骨骼肌作为人体最丰富的组织之一, 是人体运动功能的主要承担者, 并且在能量代谢、免疫调节和衰老过程中发挥重要作用。骨骼肌所处的微环境结构复杂, 包括多种细胞类型、独特的三维结构以及力学特征。因此, 建立高仿生的骨骼肌模型具有一定的挑战性。器官芯片可以精确地模拟人体组织的关键结构和功能特性, 从而为骨骼肌模型的建立提供了一种新的途径。本文综述了目前骨骼肌芯片的构建及其在疾病建模、药物评价与再生医学等生物医学研究中的应用。依据人体骨骼肌组织微环境的特点, 重点介绍了构建骨骼肌芯片的关键要素, 包括动态培养环境、机械刺激、电刺激、血管化与神经化, 以及其他工程策略包括各向异性支架的制备与两端锚定的策略等。目前的骨骼肌芯片在细胞来源及功能等方面仍存在一定的局限性。未来通过与基因编辑、生物传感等技术相结合, 骨骼肌芯片有望在生物医学研究领域发挥更重要的作用。

关键词: 骨骼肌; 器官芯片; 疾病模型; 药物评价; 再生医学

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Advances in skeletal muscle-on-a-chip for biomedical research

WANG Daqing¹, TAO Tingting², ZHANG Xu², LI Hongjing¹

(¹The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning, China; ²Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China)

Abstract: Skeletal muscle, one of the most abundant tissues in the human body, plays a crucial role in motor function, energy metabolism, immune regulation, and the aging process. The skeletal muscle tissue microenvironment is highly complex, involving a variety of cell types, a three-dimensional architecture, and specific mechanical properties. Replicating these intricate features *in vitro* to create a biomimetic skeletal muscle model has long posed significant challenges. The advent of organ-on-a-chip technology, which integrates microfluidics with 3D cell culture, offers a groundbreaking approach to faithfully replicate the key structural and functional characteristics of human skeletal muscle tissue. The organ-on-a-chip technology enables precise control over the microenvironment, facilitating the study of skeletal muscle development, disease progression, and drug screening in a highly controlled *in vitro* setting. The skeletal muscle-on-a-chip (SMoC) has been utilized to investigate a variety of muscle-related diseases,

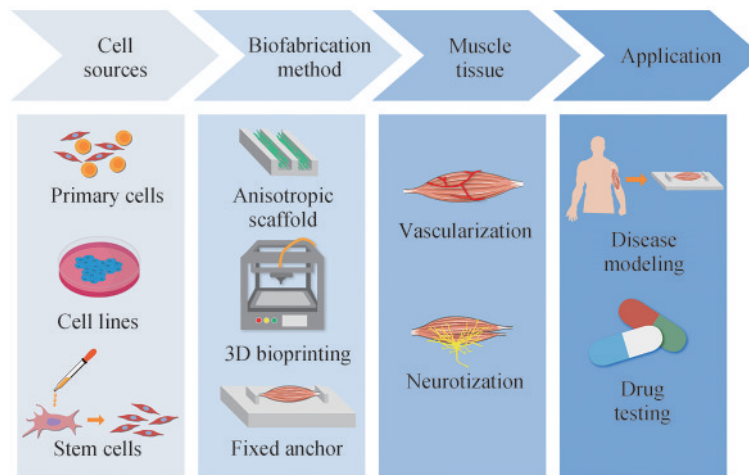
收稿日期: 2024-08-22 修回日期: 2024-08-28

基金项目: 国家自然科学基金 (82102229); 大连市“登峰计划”科研项目 (DF2023004)

引用本文: 王达庆, 陶婷婷, 张旭, 李洪敬. 骨骼肌芯片及其在生物医学领域的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(4): 867-882

Citation: WANG Daqing, TAO Tingting, ZHANG Xu, LI Hongjing. Advances in skeletal muscle-on-a-chip for biomedical research [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(4): 867-882

including Duchenne muscular dystrophy and amyotrophic lateral sclerosis, offering valuable insights into disease mechanisms and potential therapeutic strategies. Additionally, SMOc serves as a powerful tool for testing the efficacy and toxicity of new drugs, as well as exploring tissue repair and regeneration techniques. Recent advances in the design and fabrication of SMOcs have further enhanced their physiological relevance, including the incorporation of anisotropic scaffolds to guide muscle fiber alignment and the use of electrical and mechanical stimulation to mimic the native muscle environment. These improvements have led to more accurate disease models and more reliable drug testing platforms, making SMOc a versatile and promising tool in biomedical research. In the end, the prospects and challenges facing the future development of SMOc were discussed. Currently, SMOc still exhibit limitations in terms of cell sources and functionalities. However, the integration with emerging technologies such as gene editing and biosensing in the future could pave the way for significant advancements and breakthroughs. The development of SMOc is expected to further promote the process of translational medicine, with potential applications extending beyond basic research into clinical settings, where it could revolutionize personalized medicine, regenerative therapy and precision drug development.



Keywords: skeletal muscle; organs-on-chip; disease modeling; drug testing; regenerative medicine

骨骼肌作为人体最丰富的组织之一，约占人体总质量的40%。骨骼肌不仅是运动功能的主要承担者，还深刻影响着人体的能量代谢、免疫调节和衰老过程。骨骼肌通过其复杂的结构和高度特化的功能，实现了从微观的肌原纤维到宏观的肌纤维束的协同工作，从而产生和传递收缩力^[1]。骨骼肌疾病，如肌肉萎缩症、线粒体肌病、重症肌无力等，具有复杂的病理机制和多个器官系统的动态相互作用，这些特点给临床诊断和治疗带来了巨大挑战。这些疾病不仅影响患者的运动功能，还干扰了人体的能量代谢、免疫调节和衰老过程。因此，针对各种骨骼肌疾病的药物和治疗方法的研发显得尤为重要^[2]。

骨骼肌所处的微环境涉及多方面因素，其中不仅包括多种细胞类型、细胞因子，还包含了丰富的血管网络以支持氧气和营养物质的输送，以及复杂的神经支配来实现不同的功能等。在这样的微环境中，骨骼肌细胞不仅要完成其基本的收缩功能，还要与周围环境进行密切的信息交流，以维持机体的整体稳态并适应各种生理及病理状态。在构建骨骼肌模型时，需要充分考虑这些因素，以确保模型的复杂性和准确性。传统上，骨骼肌研究主要依赖于人类受试者的肌肉活检、动物模型或二维细胞培养。然而，这些方法均存在局限性。人类受试者的研究受限于组织可用性和伦理问题，而动物模型因种属差异无法准确模拟

人类疾病。二维细胞培养尽管易于操作且具备高通量的优势，但由于缺乏许多生理条件，如细胞间的相互作用、细胞外基质的影响以及细胞的三维结构等，无法精准重现体内的细胞微环境，形成的骨骼肌组织无法形成结构良好的肌纤维并产生收缩。传统模型的局限性推动了三维培养的体外肌肉组织工程的发展。许多工程化的肌肉组织已被用于体外机制研究和体内替代疗法。与传统的二维培养相比，三维培养的肌肉组织有着更长的培养时间、更高的成熟度以及更强的机械性能^[3]。然而，由于骨骼肌的收缩特性，直接将肌肉细胞与基质材料混合接种到平面中会因肌肉细胞的迁移和融合而导致基质的严重收缩、扭曲甚至坍塌。此外，基质的变形也会减少肌肉细胞的应变，不利于肌管的融合和成熟。

骨骼肌芯片通过两端锚定等方式有效地解决了传统三维培养中的基质坍塌问题，从而有效提高骨骼肌组织的生理功能和稳定性^[4]。此外，基于微流控系统的骨骼肌芯片可以模拟更加真实的细胞微环境，实现神经支配，诱导血管样结构的形成。这些设备由光学透明材料制成，可以在不干扰样品的情况下进行比色扫描和成像，并且系统中的流体流动允许分离细胞排泄的因子或用于实时监测基因表达的标记物，从而实现动态监测细胞行为和对外部刺激的反应^[5-6]。骨骼肌芯片为细胞培养提供可控变量，同时纳入多种细胞类型、因子以及机械和电刺激，并允许动态观测各种因素对细胞行为和治疗反应的影响^[7]，从而为骨骼肌疾病建模、药物筛选及

再生医学研究提供了新的平台^[8-12]。

本文综述了骨骼肌芯片的最新研究进展，包括其设计原理、关键技术、种子细胞来源以及促进骨骼肌细胞成熟的关键因素。同时，我们还探讨了骨骼肌芯片在生物医学研究中的广泛应用，包括疾病建模、药物检测以及骨骼肌修复与再生等方面。最后，我们展望了骨骼肌芯片的未来发展方向，强调了跨学科技术的整合与创新对于推动骨骼肌芯片技术发展的重要性。

1 人体骨骼肌的结构与功能

骨骼肌是一种高度血管化的复杂组织，主要由无分裂能力的多核肌纤维呈束状排列而成。此外，健康骨骼肌组织中还存在卫星细胞（satellite cell, SC）、纤维脂肪生成祖细胞（fibro-adipogenic progenitor, FAP）、平滑肌细胞、内皮细胞和免疫细胞（巨噬细胞、T细胞、NK细胞等）^[13]。卫星细胞具有干细胞性质，附着于肌纤维表面，在肌纤维受损时可增殖分化，帮助骨骼肌组织进行再生。

骨骼肌是人体运动功能的主要承担者，通过肌腱与骨骼相连，其独特的分层可以有效地产生和传递收缩力^[14-15]（图1）。骨骼肌被包裹在肌外膜（epimysium）中，既可以保护肌肉组织，又有利于相对于其他组织滑动。肌外膜、肌束膜（perimysium）和肌内膜（endomysium）共同构成肌肉结缔组织，主要由细胞外基质和成纤维细胞组成^[16]。每一束

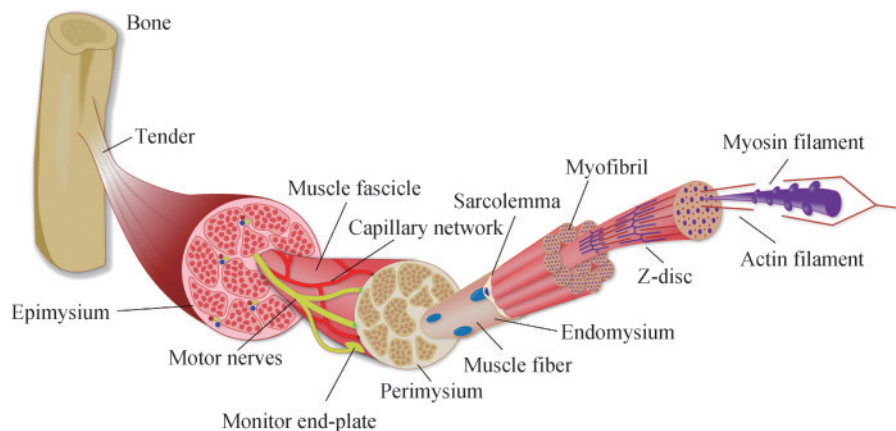


图1 骨骼肌组织结构

Fig. 1 Structure of skeletal muscle tissue

肌纤维被称为肌束 (fascicle), 被肌束膜所包围。在肌束内, 每个单独的肌纤维 (muscle fiber) 被肌内膜包围。每个肌纤维由多个平行的肌原纤维 (myofibril) 组成。肌原纤维是长条状的平行蛋白质纤维, 贯穿整个肌纤维。每个肌原纤维被肌浆网包围, 作为肌肉收缩的钙离子库^[1, 17]。最后, 每个肌纤维具有称为肌原纤维节 (sarcomere) 的长度单位, 其中包含交错排列的肌球蛋白 (myosin) 和肌动蛋白纤维 (actin filament), 是骨骼肌的功能性收缩单位。每个肌纤维内有数十万个肌原纤维节, 它们在Z盘 (z-disc) 处相互连接。Z盘是相邻肌原纤维节中相邻肌动蛋白纤维通过 α -肌动蛋白 (α -actinin) 交联的位置。肌原纤维节的主要组成部分是粗肌丝 (成束的肌球蛋白分子) 和细肌丝 (缠绕的肌球蛋白和肌动蛋白)^[18-19]。肌球蛋白驱动粗肌丝在细肌丝上滑动, 导致肌纤维的宏观收缩。

骨骼肌具有极高的代谢效率和丰富的血管网络, 以确保氧气、必需的营养物质以及代谢废物的高效运输与排除, 从而维持肌纤维的运动功能。肌束膜与肌内膜之间的区域, 富含细胞外基质, 为肌纤维的持续运作提供了丰富的营养支持。骨骼肌组织中, 卫星细胞作为骨骼肌中的多能干细胞, 紧贴于肌纤维的肌膜外缘, 是肌肉再生过程的主要驱动力。当肌肉受损时, 卫星细胞被激活, 参与修复过程, 恢复肌肉组织的功能。

肌肉的精准运动控制依赖于复杂的神经调控系统。每个肌纤维都受到一个特定运动神经元的精准支配, 这种一对一的对应关系确保了肌肉收缩的同步性与协调性。神经冲动通过运动神经轴突传递至神经肌肉连接处 (neuromuscular junction, NMJ), 在此处, 神经冲动触发乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 的释放, ACh与肌纤维膜上的受体结合, 激发动作电位, 进而引发细胞内钙离子的急剧释放。这一过程促进了肌动蛋白与肌球蛋白之间的相互作用, 形成肌丝滑动机制, 驱动骨骼肌的收缩^[20]。

2 骨骼肌芯片的关键要素

骨骼肌组织所处的微环境成分复杂, 涵盖了肌纤维间的信号传导、血液供应、营养物质的交

换、机械应力分布以及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 等因素的精细调控, 这些因素共同作用于骨骼肌细胞的增殖、分化、成熟及功能维持。为了构建出具有高度生理相关性的骨骼肌模型, 研究者需在设计时充分考虑这些微环境要素, 同时模拟出骨骼肌特有的组织结构, 如肌原纤维排列、神经肌肉接头以及肌膜内外信号传导机制, 以确保模型能够准确反映骨骼肌的生物学特性和功能表现。

骨骼肌组织的核心功能在于通过肌纤维的收缩来驱动力量与运动。在构建体外骨骼肌组织模型时, 仿生模拟这一生理过程是关键所在。为实现这一目标, 研究者们采用了机械刺激 (如施加拉伸与压力) 与电刺激 (如外部电场应用) 的方法, 旨在促进肌肉细胞的有序排列及其收缩潜能的发育。此外, 传统的静态培养环境往往限制了肌肉组织获取充足营养与氧气的的能力, 进而限制了细胞的生长与成熟。为此, 通常需要应用动态培养策略, 利用生物反应器或灌流系统创造的流体环境, 增强物质交换效率, 从而确保营养与氧气的有效供给, 为体外骨骼肌组织模拟体内生理环境提供了有力支持。血管化作为骨骼肌发育与维持的基石, 在体外模型中同样不可或缺。构建精细的血管网络, 能够有效解决营养与氧气供应问题, 促进肌肉细胞的健康生长与成熟。最后, 鉴于骨骼肌与神经系统间的紧密联系, 神经信号对肌肉收缩与功能调节起着至关重要的作用。因此, 在体外模型中引入神经元或神经支持细胞, 不仅模拟了体内的神经化过程, 还显著增强了肌肉组织的功能性与成熟度。通过肌肉细胞与神经元的联合培养, 实现了更为完善的肌肉-神经连接体系, 进一步提升了体外肌肉组织的功能稳定性与实际应用潜力。

2.1 细胞来源

成熟、稳定的骨骼肌细胞来源是构建骨骼肌芯片的关键基础。细胞来源的选择直接影响骨骼肌组织的生物功能和结构。目前, 用于骨骼肌芯片的细胞主要来自原代细胞、细胞系以及多能干细胞 (表1)。

表1 用于构建骨骼肌芯片的细胞来源

Table 1 Cell sources for skeletal muscle-on-a-chip

细胞来源	优势	局限性	应用
原代细胞 ^[21-24]	生理相关性 能够保留患者特定的疾病病理特征	增殖能力有限 获取较困难 存在个体差异	研究肌肉发育、疾病机制和评估治疗干预措施的理想材料 个性化医疗
细胞系 ^[25-26]	易于获取 增殖速度快 生理一致性	缺乏生理相关性 人源细胞系缺乏	初步的机制研究与药物筛选 高通量研究
干细胞 ^[27-28, 29-31]	无限增殖 易于操控	分化效率不确定	肌肉发育、遗传性肌肉疾病研究 再生医学

原代细胞具有生理相关性和保留患者特定疾病病理特征的优势，使其成为研究肌肉发育、疾病机制和评估潜在治疗干预的理想选择。然而，原代细胞也存在一些局限性，如传代扩增能力差、变异性和获取过程中的伦理约束。尽管如此，通过酶消化等方法从肌肉活检中分离出的原代细胞（即卫星细胞，或称成肌细胞），已被广泛用于构建具有电响应和收缩功能的人类骨骼肌模型，以模拟和研究肌肉疾病的病理机制^[32]。

细胞系因其易于获取、增殖率高和功能稳定而被广泛应用于早期通量化药物筛选和基本肌肉生物学研究。目前，人源性骨骼肌细胞系的稳定构建仍然是一个巨大挑战，尽管动物细胞系如小鼠 L6 或 C2C12 成肌细胞在肌肉组织工程中得到了广泛应用，但它们无法精确模拟人类肌肉生物学及其对药物等外界刺激的反应，缺乏与原发性人类细胞的生理相关性。

人多能干细胞（human pluripotent stem cell, hPSC）具有无限的增殖潜力，并具有分化为成肌细胞的潜力，是高通量研究以及骨骼肌再生和组织工程的重要细胞资源^[27]。Rao 等^[28]通过在从 hPSC 分化的近轴中胚层细胞中瞬时过表达 Pax7 来获得诱导的产肌祖细胞（induced myogenic progenitor cell, iMPC），在优化的 3D 培养条件下，来自多个 hPSC 系的 iMPC 可重复形成功能性骨骼肌组织。Van der Wal 等^[33]利用 hiPSC 创新研发出无转基因技术，高效培养出可增殖的肌源前体细胞。在优化的培养条件下，他们制造出了高收缩性的 3D 骨骼肌组织，其收缩力与天然肌母细胞来源的相似。基因和蛋白质组学分析表明，hiPSC 衍生和原代的肌母细胞衍生的 3D 组织在肌源分化和肌小节功能相关

蛋白的表达谱上相似，适用于个性化人类骨骼肌组织的健康与疾病研究。

2.2 生物材料

在骨骼肌芯片的构建中，生物材料的选择同样至关重要。生物材料不仅为骨骼肌细胞提供了一个适合生长和分化的三维基质环境，还通过其物理和化学特性直接影响细胞的行为和表型（表 2）。

肌肉细胞的成熟和分化显著依赖于基底材料的刚度^[40]，8~11 kPa 是促进骨骼肌分化的最佳基质硬度^[41]。因此，在设计用于骨骼肌芯片的微流控设备时，需要选择具有适当机械特性的生物材料，如胶原蛋白和 Matrigel 等，这些材料可以通过调节其成分和结构来模拟体内环境的力学特性。

此外，生物材料的生物相容性也是不可忽视的因素。例如，Matrigel 因富含细胞结合基序和生长因子而被广泛用于构建肌肉细胞的 3D 培养，能够促进细胞的生长和分化。同时，为了提供额外的机械强度，通常会将胶原蛋白等聚合物与之结合使用，以形成更加稳定的细胞外基质模拟物。这些生物材料的选择和组合不仅优化了细胞的培养环境，还增强了模型对体内环境的模拟能力^[7]。

为了更好地满足肌肉细胞外基质复杂的环境需求，也经常使用杂合基质材料。如利用 Matrigel 和 fibrinogen 的混合材料进行工程化肌肉束的体外构建，不仅为肌肉细胞提供了足够的支撑和机械强度，fibrinogen 独有的纤维丝结构也可以促进肌肉细胞的取向性生长，提高肌纤维的融合效率和成熟度^[42]。

表2 用于骨骼肌芯片的生物材料

Table 2 Biomaterials for skeletal muscle-on-a-chip

材料	优势	缺点
甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA) ^[34]	良好的生物相容性 可调交联密度以控制材料的渗透性和机械性能 可以引入其他丙烯酸系链基团以制成复合系统	分子量与成分存在批次间差异 不能与光敏或自由基敏感的酶或因子结合使用
胶原蛋白 ^[35-36]	良好的生物相容性 可促进细胞黏附与增殖 通过调整比例可改变机械性能	分子量与成分存在批次间差异 成本相对较高
纤维蛋白(fibrin) ^[34]	良好的生物相容性 可促进细胞黏附与增殖 易将细胞封装在内部	由于在凝血级联反应中的作用,不能与血流结合复合蛋白,因此不容易修饰
Matrigel ^[37-38]	良好的生物相容性 支持细胞迁移和分化 促血管生成	分子量与成分存在批次间差异 成本相对较高
聚己内酯(PCL) ^[36]	良好的生物相容性 易于加工 无免疫原性	细胞黏附性较差 缺乏生物活性,通常与其他生物活性材料结合使用
聚乳酸-乙醇酸共聚物 (PLGA) ^[39]	易于加工 可降解性	生物相容性相对较差,需要额外的涂层或处理来提高细胞黏附性 降解过程中会产生乳酸和乙醇酸,可能影响细胞活性

2.3 动态培养环境

由于骨骼肌组织具有高代谢特征,静态培养环境下的骨骼肌组织面临营养与氧气供应不足的问题,这限制了细胞的生长与成熟进程。动态培养条件的引入为提高骨骼肌组织的能量供给和物质交换提供了有力支持。动态培养通过搅动培养基,改善了组织周围的传质效率,从而提高了氧气和营养的输送能力,减少组织中心的核心坏死现象,促进骨骼肌细胞间的相互作用与融合,有效增强肌肉纤维的定向排列和收缩功能^[43-45]。基于摆台的动态培养是一种简单有效且低成本的方法^[46-47]。在骨骼肌组织模型的构建中,放置摆台上进行动态培养的骨骼肌组织的结构和力学功能显著增加,产生肌肉束可具备接近体内新生肌肉的力学性能^[48]。

2.4 机械刺激与电刺激

机械刺激(包括张力与应力负荷)与电刺激(如施加外部电场)在促进骨骼肌成熟方面尤为突出。在胚胎发育和成年阶段,骨骼肌对机械张力和负荷变化具有高度的适应性。特别是在胚胎生长期,骨骼肌经历了连续的被动拉伸过程,这

一过程对于肌肉的正常发育至关重要。为了在体外模拟这种自然现象,研究者们采用了多种方法,其中之一便是通过施加连续增加的拉伸力来诱导肌肉组织中特定生长因子的分泌,如胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)的剪接变异体以及机械生长因子,这些因子对于促进组织成熟具有关键作用^[49-50]。

多项研究已经证实了循环拉伸在体外形成的骨骼肌组织中的积极作用,它不仅能够增强肌肉组织的功能性,还能促进其分化和成熟^[51-53]。例如,Heher等^[54]开发了一种创新的生物反应器系统,该系统利用磁力传输技术为接种在支架上的细胞提供机械刺激。通过这种方式,生成的肌管展现出了更加成熟的表型,并且研究进一步揭示了机械转导在肌电信号传导中的重要作用。

在骨骼肌的发育与维持功能的过程中,功能性神经支配以及来自运动神经元的电化学信号同样起着至关重要的作用。对体外形成的肌束施加运动模拟电刺激后,肌束在收缩强度、体积大小、肌管直径和长度、肌节蛋白表达以及糖酵解和脂肪酸代谢等方面均表现出积极的改变^[55]。

为了模拟这些条件,体外研究中常采用电场刺激作为神经活动的替代手段来构建骨骼肌组织

模型。通过精细调整脉冲的宽度和能量，可以在最小化肌肉损伤的同时，实现数周内的持续刺激^[56-57]。这种刺激方式不仅模拟了慢速或快速肌肉类型的神经元输入，还促使工程肌肉的动力学特性发生相应转变，但肌球蛋白重链（myosin heavy chain, MHC）亚型的直接转变并未完全实现^[58]。而通过延长电刺激时间至超过60秒，以模拟成人比目鱼肌的神经支配模式，能够成功诱导骨骼肌从快速型向慢速型的表型转变^[57, 59]。此外，Banan Sadeghian等^[60]研究发现，将特定频率、半持续时间和脉冲序列振幅的电刺激施加于光聚明胶上的C2C12细胞，能够显著提升肌管的收缩持久性，并促进肌管伸长，同时上调与肌管成熟相关的基因表达。

除了电刺激外，研究者还开始探索运动神经元和神经肌肉接头形成在促进肌肉发育和功能中的额外益处。例如，使用突触源性分子Agrin处理骨骼肌组织，显著促进了乙酰胆碱受体的形成和聚集，进而使肌肉产生的收缩力加倍^[61]。

2.5 血管化与神经化

体外骨骼肌组织的血管化和神经化是促进肌肉细胞生长和成熟的另一重要途径。血管网络为肌肉组织提供了必要的氧气和营养支持，同时也参与了组织的生成和修复过程^[62]。在体外构建合适的血管网络，可以通过多种工程策略实现，如模具占位法、牺牲支架法和3D打印法等。这些策略各有优劣，但都能在一定程度上模拟体内血管网络的结构和功能。例如，Wan等^[63]开发了一种嵌入3D细胞外基质支架的环形微流控通道，采用热响应聚合物和微铣削成型技术，利用聚酯蜡和石蜡混合物制造了牺牲模板，以实现支架中的微流控通道生成，从而模拟肌肉组织中的脉管系统。

神经化过程也是提高体外骨骼肌组织功能的关键。肌肉的完全发育需要神经支配，去神经化将显著抑制肌肉发育，而高度神经支配的肌肉则促进继发肌原纤维的形成通过引入神经元或神经支持细胞，可以模拟体内神经化过程，增强肌肉组织的功能和成熟程度^[64]。通过联合培养策略构建的包含肌肉细胞与神经元的复合组织模型，在

功能上更加完整，组织的稳定性也显著提高。

3 骨骼肌芯片研究进展

骨骼肌芯片的设计理念主要聚焦于模拟人体骨骼肌组织的复杂结构和功能，以提供一种更加接近生理环境的体外研究平台。微加工技术在其中起到了至关重要的作用。光刻技术和软光刻技术被广泛应用于制备具有线性排列图案的基底，这些基底通过空间约束来引导肌肉细胞的定向排列。此外，静电纺丝和微流体纺丝技术可用于制备水凝胶微丝或纳米纤维，这些微丝不仅作为细胞生长的支架，还能通过其独特的形貌和力学特性促进细胞的定向排列和分化。三维生物打印技术也是构建骨骼肌芯片的重要工具，它允许精确控制细胞和生物墨水的沉积，从而构建出大尺寸、复杂结构的肌肉组织。

3.1 各向异性支架的制备

体内的肌纤维呈高度的定向、密集排列。在体外模型中，若生物材料缺乏适当的定向排列，产生的肌纤维则无法有效传递力量和收缩。为了接近体内骨骼肌的结构，骨骼肌芯片通过微加工技术，在微米或纳米尺度上构建具有各向异性结构的支架，以引导成肌细胞的定向排列、融合和分化，形成成熟的、多核骨骼肌细胞，从而模拟出高度有序且功能性的骨骼肌组织。此外，肌肉收缩引起的支架形变可用于监测肌肉的机械特性。基于各向异性支架材料诱导的主要方式包括：微图案化基底诱导法、各向异性静电纺丝支架诱导法以及微流控各向异性微丝诱导法。

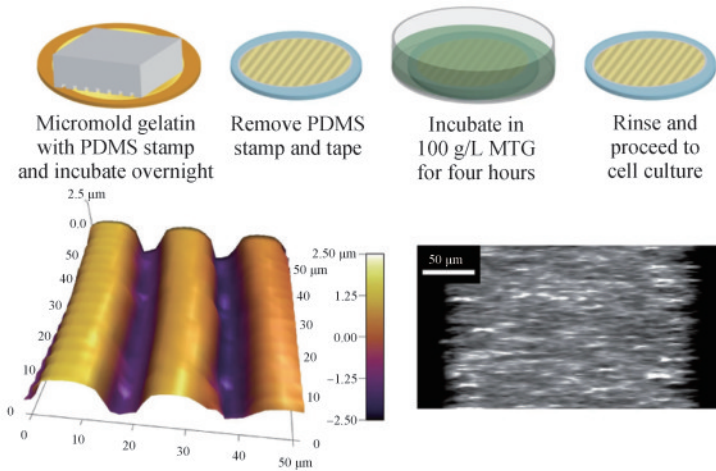
微图案化基底诱导法通过光刻或软光刻技术制备具有线性排列图案的基底，以约束并引导肌肉细胞的定向排列、融合和分化，形成成熟的肌纤维。这种方法能够在微米尺度上精确控制细胞的排列，有助于模拟体内骨骼肌组织的结构和功能，特别是在研究肌纤维方向性对其生物学行为影响时，具有重要价值。然而，基于微图案技术的骨骼肌组织通常处于静态环境中，缺少动态培养环境可能导致骨骼肌芯片与真实生理环境之间

存在一定差距。

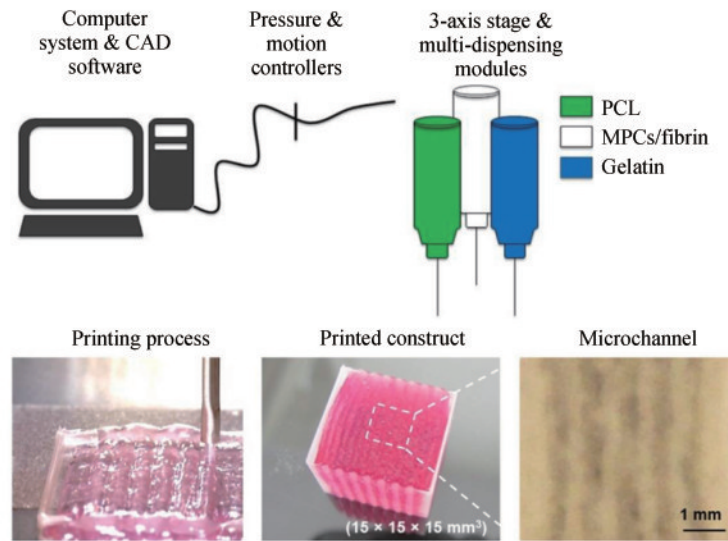
通过静电纺丝或微流体纺丝技术制备的水凝胶微丝，能够引导成肌细胞的三维定向排列。静电纺丝技术利用电场力将高分子材料拉制成纳米微丝，而微流体技术则通过微尺度流体的精确控制，制备出具有各种复杂形态的水凝胶微丝。相对于微图案技术，静电纺丝和微流体纺丝技术能够更容易地生成三维结构的微丝支架，提供更接近体内环境的立体支撑，有效促进细胞的定向排列和分化。此外，这些技术还能更灵活地调整微

丝的形态和机械特性，满足不同实验需求，为骨骼肌芯片提供了理想的支架材料^[25, 31, 65]（图2）。

3D打印是一种制备组织工程支架的有效方法，可用于开发定向排列的肌纤维样结构，该结构模仿高度组织的多层肌肉束，用于重建广泛的肌肉缺陷。然而，由于缺乏精确的纳米结构控制，目前的3D打印技术往往难以精确地操纵肌纤维的密集排列。为了克服这一局限性，3D打印和静电纺丝的结合成为了设计和生产各向异性支架的一种有效方法。Yeo等^[68]通过3D打印生成了单轴微图



(a) 微图案化芯片引导肌纤维排列^[66]
(a) Micropatterning chip guiding myofiber alignment^[66]



(b) 3D打印支架引导肌纤维排列^[67]
(b) 3D printed scaffold guiding myofiber alignment^[67]

图2 各向异性支架用于引导肌纤维排列

Fig.2 Anisotropic scaffolds for guiding myofiber alignment

案化的 PCL/胶原蛋白支架作为物理支撑,并用负载内皮细胞的微/纳米纤维覆盖。这种结合了 3D 打印与静电纺丝生成的分层结构,在提供有效的机械稳定性的同时,确保了均匀的细胞分布,并在将内皮细胞转化为狭窄的细长结构的过程中,有效促进成肌细胞的成肌能力。

3.2 两端锚定策略

为了解决传统骨骼肌 3D 培养中的基质坍塌问题,骨骼肌芯片通常将负载细胞的三维基质的两端通过锚点固定,这种方法不但可以有效防止因肌肉细胞收缩而导致的基质坍塌,还可为肌束提供一定的张力支持。在收缩的肌肉细胞中,通过两端锚定的轴向拉伸诱导产生细胞内的细胞骨架介导的内部张力,可以有效刺激细胞的轴向排列和成肌细胞的融合分化^[69]。目前用于骨骼肌芯片两端锚定的策略包括 PDMS 芯片锚定、尼龙框架固定以及化学修饰法等(图 3)。

PDMS 芯片在肌肉束研究中的应用,特别是其锚定技术,近年来取得了显著进展。传统的 PDMS 微柱锚定方法通过将肌肉束两端固定在微柱上,实现了对肌肉束的机械拉伸与收缩力的实时监测。Gilbert 团队利用 3D 打印技术,以聚氨酯板作为负模,简化了 PDMS 培养腔系统的制备过程,并与电刺激设备集成,成功构建了能够监测肌肉束力学特性并探究治疗效果的系统^[26]。后续的研究进一步扩展了这种方法的应用范围,例如构建了神经肌肉接头的 3D 模型和基于 96 孔板的微型肌肉接种系统,提高了实验的通量和效率^[72, 73-74]。为了模拟不同部位的肌肉组织的不同纤维配列特点,Wang 等^[34]设计了一种类似于乐高积木的拼接式芯片,可沿着 x - y - z 轴进行多种模式的组装,从而模拟不同的纤维排列结构。

然而,PDMS 微柱的制备过程较为复杂,且微柱的存在往往会破坏肌肉束的完整性,从而影响了实验的准确性和可靠性。为了克服这些局限性,研究人员不断探索新的锚定方法。Khodabukus 等^[75-76]设计了放置在 PDMS 模具中的尼龙框架,肌肉束的两端通过分子间力固定于框架上,为肌肉束提供机械拉伸。在这种方法的基础上,此团

队开发了一种芯片,通过测量薄膜中微珠的位移来原位监测肌肉束的收缩力^[42]。

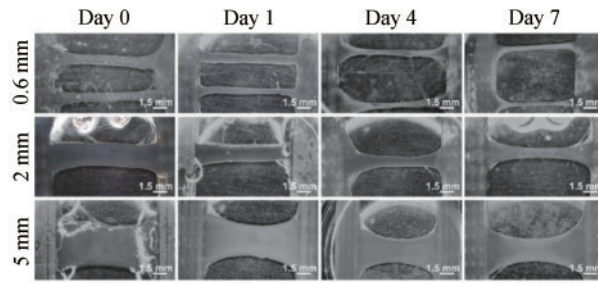
受到尼龙框架固定方式的启示,研究人员通过对模具进行化学修饰调整负载肌肉细胞的基质和模具的结合力,实现基质两端固定于模具上,并对肌肉束进行两端轴向拉伸。Mondrinos 等^[71]使用双官能交联剂对肌肉束接种腔室进行选择性的化学修饰,使得只有经过修饰的部分能够与肌肉束紧密连接,作为锚点提供机械拉伸。这种方法不仅简化了制备过程,还减少了对肌肉束完整性的破坏。Agrawal 等^[77]则利用光敏水凝胶材料制造了负载细胞的水凝胶芯片,并通过集成的明胶锚点实现了对肌肉束的固定和被动张力的测量。

4 骨骼肌芯片在生物医学研究中的应用

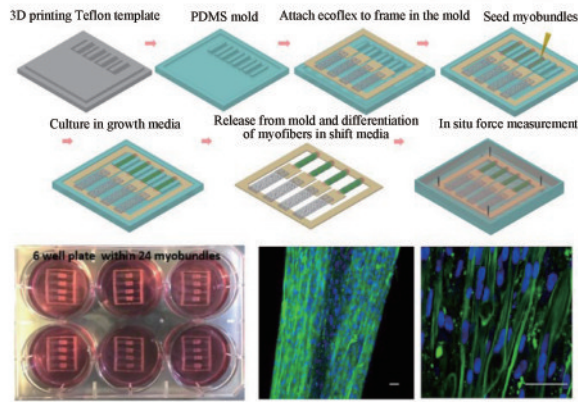
4.1 疾病模拟

与传统的二维培养方法相比,骨骼肌芯片通过提供三维的细胞外基质环境,更准确地模拟了体内多核肌肉细胞的生长条件,从而有效克服了二维培养在复刻疾病相关表型方面的局限性,在疾病建模领域展现出了巨大的潜力,尤其是针对那些影响肌肉结构与功能的复杂疾病(图 4)。

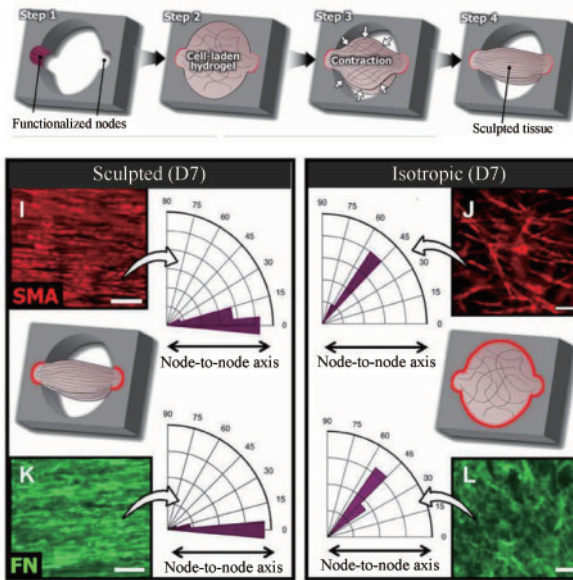
在遗传性肌肉疾病如杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)的建模中,骨骼肌芯片发挥了关键作用。DMD 由 dystrophin 基因的突变引起,导致肌肉结构支持和细胞信号传导功能受损。利用骨骼肌芯片,研究人员能够结合患者来源的 iPSC 或原代细胞,成功诱导出 DMD 的病理表型。首次报道的 DMD 体外模型是使用永生化的肌萎缩小鼠肌前体细胞构建的 DMD 三维肌肉模型^[79]。Serena 等^[38]通过骨骼肌芯片提供体外定量证据,证明成血管细胞在 DMD 患者肌管内能高效恢复抗肌萎缩蛋白的积累和分布,验证了其作为潜在治疗 DMD 的新策略,并展示了该模型在预测新药或疗法疗效方面的应用前景。这些模型不仅再现了 DMD 患者肌肉细胞的小肌管、低融合率和弱机械性能等特征,还通过模拟外显子复制等特定遗传变异,进一步揭示了疾病背后的遗传机制。此外,骨骼肌芯片还支持了针对



(a) PDMS两端锚定制备肌肉束^[70]
 (a) Muscle bundle using PDMS anchor^[70]



(b) 使用尼龙框架固定肌肉束，然后放入PDMS芯片中^[42]
 (b) Muscle bundle secured with a nylon frame, then placed into a PDMS chip^[42]



(c) 化学修饰芯片固定肌肉束^[71]
 (c) Chemically modified chip used for muscle bundle fixation^[71]

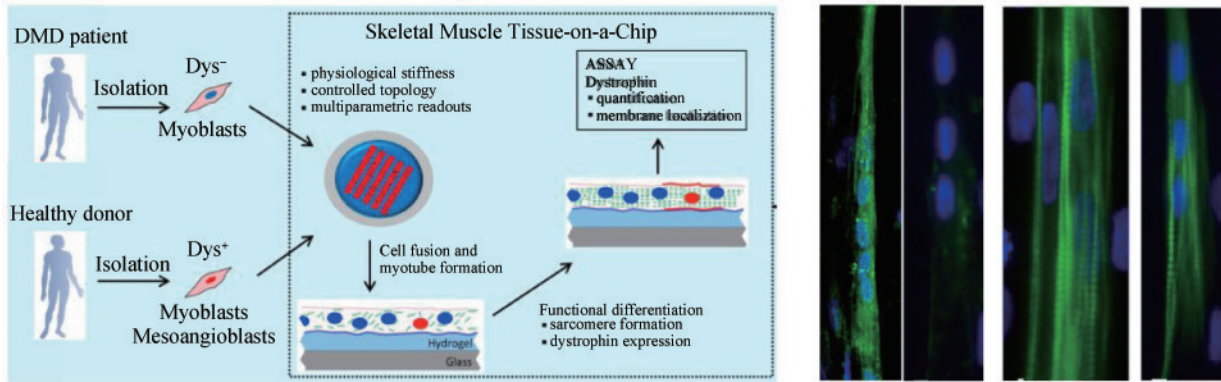
图3 骨骼肌芯片的两端锚定策略

Fig. 3 Anchoring strategies for skeletal muscle-on-a-chip

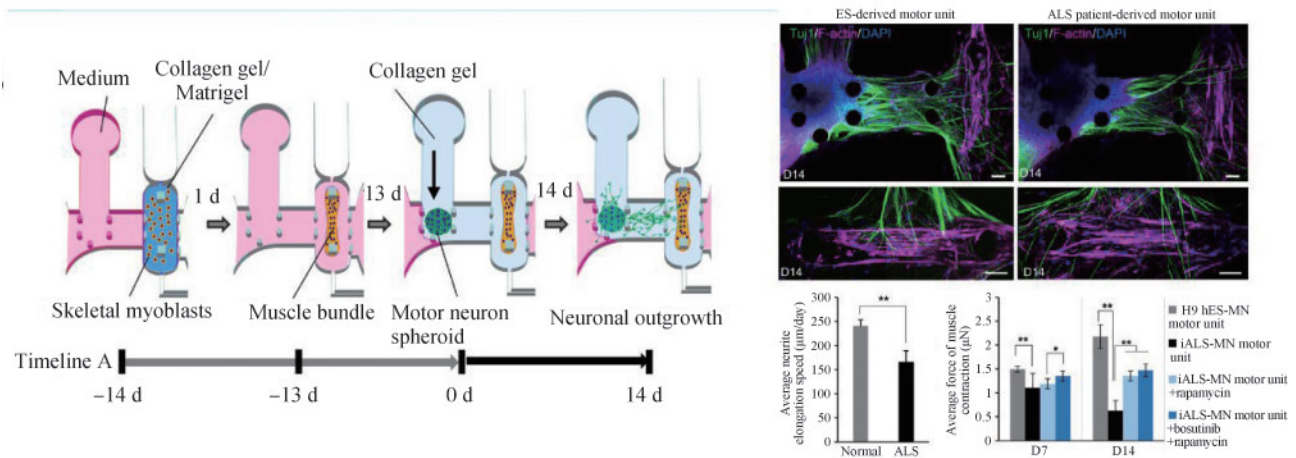
DMD 治疗的探索，如利用β1-整合素激活抗体改善肌肉细胞的成熟和稳定性^[26]。

对于神经退行性疾病如肌萎缩侧索硬化症

(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)，骨骼肌芯片同样展现出了其独特的优势。ALS 涉及运动神经元的丧失和肌肉萎缩，而骨骼肌芯片通过构建肌



(a) 杜氏肌营养不良DMD的骨骼肌芯片模型的形成和治疗测试^[38]
 (a) Formation of a skeletal muscle chip model for DMD and its application in treatment testing^[38]



(b) 肌萎缩性脊髓侧索硬化症的骨骼肌芯片模型^[78]
 (b) Skeletal muscle chip model for ALS^[78]

图 4 基于骨骼肌芯片建立疾病模型

Fig.4 Establishment of disease models using skeletal muscle-on-a-chip

肉-神经共培养系统，可以模拟肌肉与神经之间的复杂相互作用。Osaki 等^[78]通过使用患者来源的 iPSC 分化的光敏感运动神经元构建肌肉-神经共培养芯片，实现了肌肉-神经连接。与非 ALS 运动单位相比，ALS 运动单位产生的肌肉收缩较少，运动神经元退化增加，肌肉凋亡增加。这种共培养芯片不仅能够观察到 ALS 患者来源的运动神经元对肌肉细胞的负面影响，包括肌肉收缩减弱、神经元降解和肌肉凋亡增加，还为评估潜在的治疗方法提供了可靠的体外平台。

此外，骨骼肌芯片还被应用于研究类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 等炎症性疾病对骨骼肌的影响。RA 患者的自身反应性免疫细胞会攻击关节及其他组织，包括骨骼肌。通过构建 RA 患者来源的肌束并置于 3D 培养环境中，研究

人员能够观察到 RA 肌肉束在电刺激下的异常收缩行为，并发现 α -肌动蛋白 (sarcomeric α -actinin, SAA) 蛋白水平与肌肉损伤程度之间的关联^[21]。

4.2 药物评价

构建一个药物评价模型，其核心在于能够精准模拟人体肌肉的反应特性，并对外源性药物展现出迅速可靠的响应。利用原代成肌细胞及人类多能干细胞衍生的成肌细胞所构建的工程化骨骼肌组织已被广泛用于药物检测。集成了多种组织类型的骨骼肌芯片系统，能够在体外模拟复杂的器官间相互作用，从而显著增强了体外药物评估系统的预测准确性和实际应用价值。

鉴于药物测试往往需要较长时间来触发并观

察其生理效应，开发一种能够实时监测肌肉收缩力的系统显得尤为重要。Zhang等^[42]便设计出这样一套系统，能够在体内环境中直接测量肌肉的收缩力量，通过引入西立伐他汀、甲羟戊酸及辅酶Q10等化合物，揭示了这些物质对肌肉束力学特性的即时与长期影响。该研究发现，西立伐他汀迅速触发了肌病症状，而甲羟戊酸则能有效逆转这一病变过程，辅酶Q10则未展现出显著的逆转效果。

此外，为了进一步提升药物筛选的效率和精确度，更小型的骨骼肌芯片平台应运而生。这些平台不仅便于操作，还能够高通量模式下研究肌肉生物学特性，加速了新药开发的步伐。Gilbert-Honick等^[80]构建了人类骨骼肌微组织阵列芯片，并实现了在96孔板中的高通量培养与药物测试。该系统不仅精确评估了在不同药物（如地塞米松、IGF-1）作用下的肌肉结构变化与收缩力表现，还揭示了伊立替康对肌束收缩力及肌管萎缩的剂量依赖性影响。这一系统通过实现半自动化的组织形成与培养流程，为药物筛选领域开辟了一个高效、精准的新平台，预示着未来药物研发将更加精准、快速且个性化。

4.3 骨骼肌修复与再生

骨骼肌通过卫星细胞进行自我再生。卫星细胞是静止的肌肉干细胞的储存库，可以在创伤或疾病时被激活，并产生新形成的多核肌纤维。骨骼肌芯片通过对肌管形成和肌肉相关生物过程进行精确复刻，可以模拟骨骼肌损伤后的自然修复与再生过程。通过骨骼肌芯片不仅可以观察卫星细胞的激活、增殖、分化和融合成肌管的动态过程，还能深入分析不同生长因子、细胞因子以及药物对骨骼肌再生效率和质量的影响。此外，骨骼肌芯片还能提供一个高度可控的环境，以研究特定疾病或环境状态对骨骼肌修复能力的潜在影响，从而为开发针对肌肉损伤、肌肉萎缩及遗传性疾病的新型治疗手段提供有力支持。

骨骼肌组织具有高代谢特征，缺氧状态会严重影响骨骼肌的再生能力。源自小鼠或人类的骨骼肌器官研究表明，随着缺氧程度的增加，肌肉

经历了从代偿阶段（以增强的收缩功能、肌纤维空泡化、肥大样改变、肌纤维类型转换和代谢转变为特征）到失代偿阶段的转变，这与体内肌肉反应相仿，并凸显了种间差异。此外，源自人类的骨骼肌器官还被用于评估肌肉的自我修复能力以及药物对受损肌肉的保护作用，显示出在未来疾病建模和再生疗法中的巨大潜力^[81]。

随着航天技术的进步，微重力导致的肌肉萎缩和肌肉再生受损逐渐被重视^[37, 82-83]。Kim等^[84]将骨骼肌芯片发射到国际空间站，在微重力环境下通过转录组学和蛋白质组学方法，从而揭示了微重力暴露对肌肉组织的影响。该研究发现，在微重力条件下培养的骨骼肌组织脂质代谢增强，且凋亡基因表达增加。添加IGF-1和15-羟基前列腺素脱氢酶抑制剂部分抑制了微重力的作用。

5 总结与展望

综上所述，骨骼肌芯片通过整合干细胞生物学、材料科学与微加工技术，为深入理解骨骼肌的生理或病理特征、药物筛选及再生医学提供了一个崭新的平台。目前已经成功构建了具有仿生肌肉各向异性结构、高成熟度和优异力学性能的骨骼肌体外模型。骨骼肌芯片在模拟骨骼肌方面有着巨大优势，为治疗先天性肌肉疾病、年龄相关性肌肉病变以及药物研发和靶向疗法开辟了新的道路。

由于骨骼肌微环境的复杂性，骨骼肌芯片的构建仍面临诸多挑战。首先，高通量骨骼肌模型的构建依赖于稳定的细胞供应。寻找可靠且稳定的人源化肌肉前体细胞来源是加快研究进程的关键。此外，如何在体外构建复杂的肌肉-血管、肌肉-神经及肌肉-肌腱接头，以模拟体内肌肉组织的复杂生理环境，是另一个亟待解决的问题。这些结构的构建将极大地提升体外骨骼肌组织的生理功能和成熟度，突破现有功能的限制。未来骨骼肌芯片的发展将更加注重跨学科技术的整合与创新。随着合成生物学的发展，基因编辑技术的应用可以为骨骼肌芯片提供更为稳定和功能化的细胞来源，促进骨骼肌组织的血管化和神经化进程。生物传感技术的引入将实现骨骼肌力学、电生理

及生物标志物的实时监测，为骨骼肌功能的精准调控提供有力支持。新型生物材料的开发将为骨骼肌细胞提供更加符合生理学特征的细胞外基质环境，进一步促进组织的成熟与功能恢复。骨骼肌芯片的进一步完善，将在生物医学研究中发挥重要作用，为骨骼肌相关疾病的个性化治疗、康复医学以及再生医学领域带来革命性的突破。

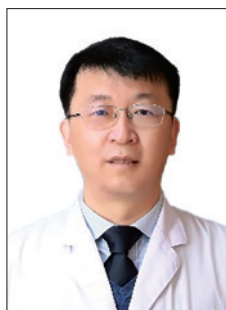
参 考 文 献

- [1] FRONTERA W R, OCHALA J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function[J]. *Calcified Tissue International*, 2015, 96(3): 183-195.
- [2] HAY M, THOMAS D W, CRAIGHEAD J L, et al. Clinical development success rates for investigational drugs[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(1): 40-51.
- [3] WANG J, KHODABUKUS A, RAO L J, et al. Engineered skeletal muscles for disease modeling and drug discovery[J]. *Biomaterials*, 2019, 221: 119416.
- [4] ORTEGA M A, FERNÁNDEZ-GARIBAY X, CASTAÑO A G, et al. Muscle-on-a-chip with an on-site multiplexed biosensing system for *in situ* monitoring of secreted IL-6 and TNF- α [J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(15): 2568-2580.
- [5] BAKER M. Tissue models: a living system on a chip[J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 661-665.
- [6] UZEL S G M, PAVESI A, KAMM R D. Microfabrication and microfluidics for muscle tissue models[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2014, 115(2-3): 279-293.
- [7] SMOAK M M, PEARCE H A, MIKOS A G. Microfluidic devices for disease modeling in muscle tissue[J]. *Biomaterials*, 2019, 198: 250-258.
- [8] HUH D, HAMILTON G A, INGBER D E. From 3D cell culture to organs-on-chips[J]. *Trends in Cell Biology*, 2011, 21(12): 745-754.
- [9] ZHAO M Q, LIU H T, ZHANG X, et al. Advances in skeletal muscle engineering in biomedical research[J]. *Advanced Materials Technologies*, 2023, 8(22): 2300595.
- [10] MA C, PENG Y S, LI H T, et al. Organ-on-a-chip: a new paradigm for drug development[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2021, 42(2): 119-133.
- [11] SACKMANN E K, FULTON A L, BEEBE D J. The present and future role of microfluidics in biomedical research[J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 181-189.
- [12] MEHLINGM, TAY S. Microfluidic cell culture[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 25: 95-102.
- [13] ZHANG X, HABIBALLA L, AVERSA Z, et al. Characterization of cellular senescence in aging skeletal muscle [J]. *Nature Aging*, 2022, 2(7): 601-615.
- [14] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Fiber types in mammalian skeletal muscles[J]. *Physiological Reviews*, 2011, 91(4): 1447-1531.
- [15] LUO W B, LIU H, WANG C Y, et al. Bioprinting of human musculoskeletal interface[J]. *Advanced Engineering Materials*, 2019, 21(7): 1900019.
- [16] SEFTON E M, KARDON G. Connecting muscle development, birth defects, and evolution: an essential role for muscle connective tissue[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2019, 132: 137-176.
- [17] ROSSI D, BARONE V, GIACOMELLO E, et al. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains[J]. *Traffic*, 2008, 9(7): 1044-1049.
- [18] HANSON J, HUXLEY H E. Structural basis of the cross-striations in muscle[J]. *Nature*, 1953, 172(4377): 530-532.
- [19] HUXLEY H E. Electron microscope studies of the organisation of the filaments in striated muscle[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1953, 12(1/2): 387-394.
- [20] OSTROVIDOV S, SALEHI S, COSTANTINI M, et al. 3D bioprinting in skeletal muscle tissue engineering[J]. *Small*, 2019, 15(24): e1805530.
- [21] OLIVER C E, PATEL H, HONG J, et al. Tissue engineered skeletal muscle model of rheumatoid arthritis using human primary skeletal muscle cells[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2022, 16(2): 128-139.
- [22] MONTARRAS D, MORGAN J, COLLINS C, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration[J]. *Science*, 2005, 309(5743): 2064-2067.
- [23] CHOI K H, YOON J W, KIM M S, et al. Muscle stem cell isolation and *in vitro* culture for meat production: a methodological review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(1): 429-457.
- [24] RAJABIAN N, SHAHINI A, ASMANI M, et al. Bioengineered skeletal muscle as a model of muscle aging and regeneration[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2021, 27(1-2): 74-86.
- [25] ZHAO M Q, LIU H T, ZHANG X, et al. A flexible microfluidic strategy to generate grooved microfibers for guiding cell alignment[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(14): 4880-4890.
- [26] EBRAHIMI M, LAD H, FUSTO A, et al. *De novo* revertant fiber formation and therapy testing in a 3D culture model of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 132: 227-244.
- [27] FERREIRA M J S, MANCINI F E, HUMPHREYS P A, et al. Pluripotent stem cells for skeletal tissue engineering[J].

- Critical Reviews in Biotechnology, 2022, 42(5): 774-793.
- [28] RAO L J, QIAN Y, KHODABUKUS A, et al. Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 126.
- [29] ABUJAROUR R, VALAMEHR B. Generation of skeletal muscle cells from pluripotent stem cells: advances and challenges[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2015, 3: 29.
- [30] URCIUOLO A, SERENA E, GHUA R, et al. Engineering a 3D *in vitro* model of human skeletal muscle at the single fiber scale [J]. PLoS One, 2020, 15(5): e0232081.
- [31] CHEESBROUGH A, SCISCIONE F, RICCIO F, et al. Biobased elastomer nanofibers guide light-controlled human-iPSC-derived skeletal myofibers[J]. Advanced Materials, 2022, 34(18): e2110441.
- [32] SHIMA A, MORIMOTO Y, SWEENEY H L, et al. Three-dimensional contractile muscle tissue consisting of human skeletal myocyte cell line[J]. Experimental Cell Research, 2018, 370(1): 168-173.
- [33] VAN DER WAL E, IULIANO A, IN 'T GROEN S L M, et al. Highly contractile 3D tissue engineered skeletal muscles from human iPSCs reveal similarities with primary myoblast-derived tissues[J]. Stem Cell Reports, 2023, 18(10): 1954-1971.
- [34] WANG Z H, LIU S T, HAN M Y, et al. 3D printing-electrospinning hybrid nanofibrous scaffold as LEGO-like bricks for modular assembling skeletal muscle-on-a-chip functional platform[J/OL]. Advanced Fiber Materials. (2024-06-04) [2024-08-01]. <https://doi.org/10.1007/s42765-024-00433-5>.
- [35] NISHIYORI M, UEDA H. Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia[J]. Molecular Pain, 2008, 4: 52.
- [36] CHOI J S, LEE S J, CHRIST G J, et al. The influence of electrospun aligned poly(*Epsilon*-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes[J]. Biomaterials, 2008, 29(19): 2899-2906.
- [37] PARAFATI M, GIZA S, SHENOY T S, et al. Human skeletal muscle tissue chip autonomous payload reveals changes in fiber type and metabolic gene expression due to spaceflight[J]. NPJ Microgravity, 2023, 9(1): 77.
- [38] SERENA E, ZATTI S, ZOSO A, et al. Skeletal muscle differentiation on a chip shows human donor mesoangioblasts' efficiency in restoring dystrophin in a Duchenne muscular dystrophy model[J]. Stem Cells Translational Medicine, 2016, 5(12): 1676-1683.
- [39] FUJIE T, SHI X T, OSTROVIDOV S, et al. Spatial coordination of cell orientation directed by nanoribbon sheets [J]. Biomaterials, 2015, 53: 86-94.
- [40] JACOT J G, MCCULLOCH A D, OMENS J H. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes[J]. Biophysical Journal, 2008, 95(7): 3479-3487.
- [41] ENGLER A J, GRIFFIN M A, SEN S, et al. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments [J]. Journal of Cell Biology, 2004, 166(6): 877-887.
- [42] ZHANG X, HONG S, YEN R, et al. A system to monitor statin-induced myopathy in individual engineered skeletal muscle myobundles[J]. Lab on a Chip, 2018, 18(18): 2787-2796.
- [43] RANGARAJAN S, MADDEN L, BURSAC N. Use of flow, electrical, and mechanical stimulation to promote engineering of striated muscles[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2014, 42(7): 1391-1405.
- [44] FERNÁNDEZ-COSTA J M, TEJEDERA-VILAFRANCA A, FERNÁNDEZ-GARIBAY X, et al. Muscle-on-a-chip devices: a new era for *in vitro* modelling of muscular dystrophies[J]. Disease Models & Mechanisms, 2023, 16(6): dmm050107.
- [45] OKANO T, MATSUDA T. Hybrid muscular tissues: preparation of skeletal muscle cell-incorporated collagen gels [J]. Cell Transplantation, 1997, 6(2): 109-118.
- [46] JACKMAN C P, CARLSON A L, BURSAC N. Dynamic culture yields engineered myocardium with near-adult functional output[J]. Biomaterials, 2016, 111: 66-79.
- [47] SHADRIN I Y, ALLEN B W, QIAN Y, et al. Cardiopatch platform enables maturation and scale-up of human pluripotent stem cell-derived engineered heart tissues[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 1825.
- [48] JUHAS M, ENGELMAYR G C JR, FONTANELLA A N, et al. Biomimetic engineered muscle with capacity for vascular integration and functional maturation *in vivo*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(15): 5508-5513.
- [49] CHEEMA U, YANG S Y, MUDERA V, et al. 3-D *in vitro* model of early skeletal muscle development[J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2003, 54(3): 226-236.
- [50] CHEEMA U, BROWN R, MUDERA V, et al. Mechanical signals and *IGF- I* gene splicing *in vitro* in relation to development of skeletal muscle[J]. Journal of Cellular Physiology, 2005, 202(1): 67-75.
- [51] HANDSCHIN C, MORTEZAVI A, PLOCK J, et al. External physical and biochemical stimulation to enhance skeletal muscle bioengineering[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015, 82-83: 168-175.
- [52] DUGAN J M, CARTMELL S H, GOUGH J E. Uniaxial cyclic strain of human adipose-derived mesenchymal stem cells and

- C2C12 myoblasts in coculture[J]. *Journal of Tissue Engineering*, 2014, 5: 2041731414530138.
- [53] BOONEN K J, LANGELAAN M L, POLAK R B, et al. Effects of a combined mechanical stimulation protocol: value for skeletal muscle tissue engineering[J]. *Journal of Biomechanics*, 2010, 43(8): 1514-1521.
- [54] HEHER P, MALEINER B, PRÜLLER J, et al. A novel bioreactor for the generation of highly aligned 3D skeletal muscle-like constructs through orientation of fibrin *via* application of static strain[J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 24: 251-265.
- [55] CHEN Z W, LI B J, ZHAN R Z, et al. Exercise mimetics and JAK inhibition attenuate IFN- γ -induced wasting in engineered human skeletal muscle[J]. *Science Advances*, 2021, 7(4): eabd9502.
- [56] KHODABUKUS A, BAAR K. Defined electrical stimulation emphasizing excitability for the development and testing of engineered skeletal muscle[J]. *Tissue Engineering Part C, Methods*, 2012, 18(5): 349-357.
- [57] KHODABUKUS A, BAEHR L M, BODINE S C, et al. Role of contraction duration in inducing fast-to-slow contractile and metabolic protein and functional changes in engineered muscle [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2015, 230(10): 2489-2497.
- [58] HUANG Y C, DENNIS R G, BAAR K. Cultured slow *vs.* fast skeletal muscle cells differ in physiology and responsiveness to stimulation[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2006, 291(1): C11-C17.
- [59] EKEN T, ELDER G C B, LØMO T. Development of tonic firing behavior in rat soleus muscle[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2008, 99(4): 1899-1905.
- [60] BANAN SADEGHIAN R, EBRAHIMI M, SALEHI S. Electrical stimulation of microengineered skeletal muscle tissue: effect of stimulus parameters on myotube contractility and maturation[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018, 12(4): 912-922.
- [61] BIAN W N, BURSAC N. Soluble miniagrin enhances contractile function of engineered skeletal muscle[J]. *FASEB Journal*, 2012, 26(2): 955-965.
- [62] HARDMAN D, NGUYEN M L, DESCROIX S, et al. Mathematical modelling of oxygen transport in a muscle-on-chip device[J]. *Interface Focus*, 2022, 12(5): 20220020.
- [63] WAN L, FLEGLE J, OZDOGANLAR B, et al. Toward vasculature in skeletal muscle-on-a-chip through thermo-responsive sacrificial templates[J]. *Micromachines*, 2020, 11(10): 907.
- [64] ARRIGONI C, PETTA D, BERSINI S, et al. Engineering complex muscle-tissue interfaces through microfabrication[J]. *Biofabrication*, 2019, 11(3): 032004.
- [65] SU W W, YANG Q, LI T, et al. Electrospun aligned nanofiber yarns constructed biomimetic M-type interface integrated into precise co-culture system as muscle-tendon junction-on-a-chip for drug development[J]. *Small Methods*, 2024: e2301754.
- [66] BETTADAPUR A, SUH G C, GEISSE N A, et al. Prolonged culture of aligned skeletal myotubes on micromolded gelatin hydrogels [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 28855.
- [67] KIM J H, SEOL Y J, KO I K, et al. 3D bioprinted human skeletal muscle constructs for muscle function restoration [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 12307.
- [68] YEO M J, KIM G H. Micro/nano-hierarchical scaffold fabricated using a cell electrospinning/3D printing process for co-culturing myoblasts and HUVECs to induce myoblast alignment and differentiation[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 107: 102-114.
- [69] NGUYEN M L, DEMRI N, LAPIN B, et al. Studying the impact of geometrical and cellular cues on myogenesis with a skeletal muscle-on-chip[J]. *Lab on a Chip*, 2024, 24(17): 4147-4160.
- [70] FAN T, WANG S, JIANG Z, et al. Controllable assembly of skeletal muscle-like bundles through 3D bioprinting[J]. *Biofabrication*, 2021, 14(1): 015009.
- [71] MONDRINOS M J, ALISAF AEI F, YI A Y, et al. Surface-directed engineering of tissue anisotropy in microphysiological models of musculoskeletal tissue[J]. *Science Advances*, 2021, 7(11): eabe9446.
- [72] MILLS R J, PARKER B L, MONNOT P, et al. Development of a human skeletal micro muscle platform with pacing capabilities[J]. *Biomaterials*, 2019, 198: 217-227.
- [73] AFSHAR BAKOOSHLI M, LIPPMANN E S, MULCAHY B, et al. A 3D culture model of innervated human skeletal muscle enables studies of the adult neuromuscular junction[J]. *eLife*, 2019, 8: e44530.
- [74] AFSHAR M E, ABRAHA H Y, BAKOOSHLI M A, et al. A 96-well culture platform enables longitudinal analyses of engineered human skeletal muscle microtissue strength[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 6918.
- [75] KHODABUKUS A, MADDEN L, PRABHU N K, et al. Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle[J]. *Biomaterials*, 2019, 198: 259-269.
- [76] KHODABUKUS A, KAZA A, WANG J, et al. Tissue-engineered human myobundle system as a platform for evaluation of skeletal muscle injury biomarkers[J]. *Toxicological Sciences*, 2020, 176(1): 124-136.
- [77] AGRAWAL G, AUNG A, VARGHESE S. Skeletal muscle-on-a-chip: an *in vitro* model to evaluate tissue formation and injury [J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(20): 3447-3461.

- [78] OSAKI T, UZEL S G M, KAMM R D. Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPSC-derived muscle cells and optogenetic motor neurons[J]. *Science Advances*, 2018, 4(10): eaat5847.
- [79] VANDENBURGH H, SHANSKY J, BENESCH-LEE F, et al. Automated drug screening with contractile muscle tissue engineered from dystrophic myoblasts[J]. *FASEB Journal*, 2009, 23(10): 3325-3334.
- [80] GILBERT-HONICK J, IYER S R, SOMERS S M, et al. Engineering functional and histological regeneration of vascularized skeletal muscle[J]. *Biomaterials*, 2018, 164: 70-79.
- [81] LI J, ZHANG W H, LIU A Q, et al. An engineered anisotropic skeletal muscle organoid-on-a-chip for deciphering muscle response under intermittent hypoxia[J]. *Advanced Functional Materials*, 2024: 2401564.
- [82] JUHL O J 4th, BUETTMANN E G, FRIEDMAN M A, et al. Update on the effects of microgravity on the musculoskeletal system[J]. *NPJ Microgravity*, 2021, 7(1): 28.
- [83] REN Z P, AHN E H, DO M, et al. Simulated microgravity attenuates myogenesis and contractile function of 3D engineered skeletal muscle tissues[J]. *NPJ Microgravity*, 2024, 10(1): 18.
- [84] KIM S C, AYAN B, SHAYAN M, et al. Skeletal muscle-on-a-chip in microgravity as a platform for regeneration modeling and drug screening[J]. *Stem Cell Reports*, 2024, 19(8): 1061-1073.



通讯作者: 李洪敬(1968—),男,医学博士,教授,主任医师,博士生导师。研究方向为关节外科及运动医学。
E-mail: lhj68430@163.com



通讯作者: 张旭(1986—),男,博士,副研究员。研究方向为基于器官芯片的心血管疾病研究。
E-mail: zhangxu6@dicp.ac.cn



第一作者: 王达庆(1997—),男,骨科学博士研究生。研究方向为关节外科与运动医学。
E-mail: wangdaqing2020@gmail.com